

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
**ESCOLA DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

*ATIVAÇÃO DOS MASTÓCITOS E OS EFEITOS DE SEUS MEDIADORES NO  
EDEMA INTERSTICIAL E IMUNOTROMBOSE CAUSADA PELA INFECÇÃO  
POR SARS-COV-2*

**Aluno: Seigo Nagashima**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lucia de Noronha**

**Curitiba, março de 2021**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
**ESCOLA DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

*ATIVAÇÃO DOS MASTÓCITOS E OS EFEITOS DE SEUS MEDIADORES NO  
EDEMA INTERSTICIAL E IMUNOTROMBOSE CAUSADA PELA INFECÇÃO  
POR SARS-COV-2*

Dissertação de mestrado acadêmico apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia de Noronha

**Curitiba, 2021**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Edilene de Oliveira dos Santos CRB-9/1636

N147a Nagashima, Seigo  
2021 Ativação dos mastócitos e os efeitos de seus mediadores no edema intersticial e imotrombose causada pela infecção por SARS-COV-2 / Seigo Nagashima ; orientadora: Lucia de Noronha. -- 2021  
54 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2021.  
Inclui bibliografia

1. Ciências da saúde. 2. Betacoronavirus. 3. Edema. 4. Mastócitos. 5. Imotrombose. 6. Mediadores químicos. I. Noronha, Lucia de. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título

CDD. 20.ed. – 610



Dedico este trabalho à Ciência e àqueles que se utilizam dessa ferramenta para moldar um futuro mais brilhante e otimista.

## Agradecimentos

Aos meus pais e irmão, pelo apoio incondicional que sempre tive em toda minha vida, e sei que sempre terei.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia de Noronha, por acreditar no meu potencial, acreditar que eu seria digno de concretizar esse desafio e ajudar a resgatar o espírito de pesquisador que há anos havia esquecido.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), seus professores e colaboradores. São promotores de pesquisa científica de ponta e excepcionais disseminadores do conhecimento científico.

Aos meus honoráveis amigos (e por coincidência colegas de trabalho) do LPE, Ana Paula, Marina, Ana Paula estagiária e Felipe, pela tarefa hercúlea de preservarem sua paciência comigo. Em determinados momentos, convivendo mais tempo comigo que a própria família. Em especial à Carol, pela parceria no cotidiano e por ter se tornado minha “co-orientadora” não oficial.

Aos meus mestres, os professores da graduação do curso do bacharelado em Ciências Biológicas, por terem iluminado este caminho da Ciência, que por vezes é desgastante, mas nunca decepcionante.

Ao Professor Luiz Fernando Pereira, pelos anos que passou me incentivando (insistindo) a iniciar o Mestrado, assim como por suas palavras que repercutiram em minha mente desde a conclusão do curso: “Vai para o mestrado! Não deixe a Ciência perder alguém como você”. Nove anos depois, aqui estou, professor!

À Professora Maria Laura Medeiros Assef, por ter me introduzido ao universo do LPE, local em que tudo isso começou.

A todos os integrantes do “Biopsias pandemia”. Indubitavelmente, é o grupo de Whatsapp mais intelectual e útil que existe.

Aos pacientes que compuseram as amostras utilizadas neste estudo, assim como seus familiares, que se sensibilizaram em contribuir conosco e com a Ciência.

À família que temos a possibilidade de escolher: os amigos. Em especial ao Patrick, Bill, Vina, Pauleta, Nathália, Biba, Ana Paula, Gis e Gi pela estimada presença significativa em minha vida e por me escutarem tantas vezes sobre as pesquisas com o tema COVID-19.

**"O aspecto mais triste da vida neste momento é que a ciência reúne conhecimento mais rapidamente do que a sociedade reúne sabedoria"**

**-Isaac Asimov**

## Resumo

**Introdução:** Em dezembro de 2019, a cidade de Wuhan na China enfrentou um surto de um vírus respiratório até então desconhecido. Responsável pela atual pandemia, o Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2) é o causador da nova Doença do Coronavírus de 2019 (COVID-19). Este vírus tem afinidade pelo receptor da Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2), o qual é expresso, entre outros, por pneumócitos tipo 1 e 2 e células endoteliais. Após a infecção e morte dos pneumócitos, o vírus atravessa o interstício do septo alveolar e passa a infectar as células endoteliais dos capilares adjacentes, causando piroptose e, por consequência, imunotrombose. As moléculas pró-inflamatórias secretadas pelo processo piroptótico endotelial, juntamente com a tempestade de citocinas, ocasionada pela invasão celular pelo próprio SARS-CoV-2, ativam os mastócitos, que, por meio de seus mediadores químicos, entre eles a Interleucina 4 (IL-4), promovem aumento da permeabilidade vascular, inundando o ambiente do septo alveolar com plasma, o que permite a formação do edema intersticial e intra-alveolar, além da formação de membranas hialinas. **Objetivo:** Avaliar o papel dos mastócitos e seus mediadores no edema intersticial, na lesão vascular e na imunotrombose em amostras pulmonares de biópsias *post mortem* de pacientes que foram a óbito por COVID-19. **Método:** Os grupos amostrais foram divididos em (i) biópsias *post mortem* de pacientes acometidos pela COVID-19 (Grupo COVID-19; n=6), (ii) biópsias *post mortem* de pacientes acometidos Influenza A subtipo H1N1 pandêmico de 2009 ou H1N1pdm09 (Grupo H1N1; n=10) e (iii) amostras de pacientes que faleceram por outras doenças sem acometimento pulmonar (Grupo CONTROLE; n=11). Técnicas de imunohistoquímica e histoquímica foram utilizadas com o intuito de quantificar a imunexpressão de IL-4 (anticorpo primário anti-IL-4), a densidade de mastócitos e precursores (anticorpo primário anti-CD117) e mastócitos em processo de desgranulação (Azul de Toluidina - AT). **Resultados:** Os dados histopatológicos, histoquímicos e imunohistoquímicos demonstraram aumento significativo na densidade dos mastócitos e precursores (CD117+), de mastócitos íntegros e em processo de desgranulação (AT), assim como o aumento da imunexpressão tecidual de IL-4 nos pacientes acometidos pela COVID-19, quando comparados com pacientes que pertencem aos grupos H1N1 e CONTROLE. **Conclusão:** Uma maior quantidade de mastócitos foi encontrado nos pacientes acometidos pela COVID-19, bem como uma maior expressão tecidual de IL-4, quando comparados aos Grupos H1N1 e CONTROLE. Esta observação sugere que o processo inflamatório exacerbado, causado pela presença do SARS-CoV-2, tem a capacidade de ativar os mastócitos, que são células sentinelas presentes em praticamente todos os nossos tecidos. A ativação dos mastócitos promove a sua desgranulação e a consequente secreção de seus mediadores citoplasmáticos, como a IL-4, contribuindo assim com os processos imunopatológicos associados à gravidade da doença.

**Palavras-chave:** SARS-CoV-2, imunotrombose, edema intersticial, mastócito, mediadores químicos.

## Abstract

**Introduction:** In December 2019, the city of Wuhan in China faced an outbreak of a hitherto unknown respiratory virus. Responsible for the current pandemic, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the cause of the new Coronavirus Disease of 2019 (COVID-19). This virus has an affinity for the Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE-2) receptor, which is expressed, among others, by type 1 and 2 pneumocytes and endothelial cells. After infection and death of the pneumocytes, the virus crosses the interstice of the alveolar septum and begins to infect the endothelial cells of the adjacent capillaries, causing pyroptosis and, consequently, immunothrombosis. The pro-inflammatory molecules secreted by the endothelial pyroptotic process, together with the cytokine storm, caused by the cellular invasion by SARS-CoV-2, activate mast cells, which, through their chemical mediators, including Interleukin 4 (IL-4), promote increased vascular permeability, flooding the alveolar septum environment with plasma, which allows the formation of interstitial and intra-alveolar edema, in addition to the formation of hyaline membranes. **Objective:** To evaluate the role of mast cells and their mediators in interstitial edema, vascular injury, and immunothrombosis in pulmonary samples of *post mortem* biopsies from patients who died from COVID-19. **Method:** The sample groups were divided into (i) *post mortem* biopsies of patients affected by COVID-19 (group COVID-19; n = 6), (ii) *post mortem* biopsies of patients affected by Influenza A pandemic H1N1 subtype 2009 or H1N1pdm09 (group H1N1; n = 10) and (iii) samples from patients who died of other diseases without pulmonary involvement (CONTROL group; n = 11). Immunohistochemistry and histochemistry techniques were used in order to quantify the immunoeexpression of IL-4 (primary anti-IL-4 antibody), the density of mast cells, and precursors (primary anti-CD117 antibody) and mast cells in the degranulation process (Blue of Toluidine - AT). **Results:** Histopathological, histochemical, and immunohistochemical data showed a significant increase in the density of mast cells and precursors (CD117+) of healthy mast cells and the process of degranulation (TA), as well as an increase in IL-4 tissue immunoeexpression in patients affected by COVID-19 when compared with patients belonging to the H1N1 and CONTROL groups. **Conclusion:** A more significant number of mast cells was found in patients affected by COVID-19 and a greater tissue expression of IL-4 when compared to the H1N1 and CONTROL groups. This fact suggests that the exacerbated inflammatory process, caused by the presence of SARS-CoV-2, can activate mast cells, which are sentinel cells present in almost all tissues. The activation of mast cells promotes their degranulation and the consequent secretion of inflammatory mediators, such as IL-4, thus contributing to the immunopathological processes associated with the severity of the disease.

**Keywords:** SARS-CoV-2, immunotrombosis, interstitial edema, mast cell, chemical mediators.

## Lista de figuras

Figura 1 .....	14
Figura 2 .....	18
Figura 3 .....	22
Figura 4 .....	26
Figura 5 .....	41

## Lista de siglas e abreviaturas

**AT** - Azul de Toluidina

**B1R** - Receptor de bradicinina 1

**CD117** - Cluster de diferenciação 117

**CGA** - Campo de Grande Aumento

**COVID-19** - Doença por Coronavirus 2019, do inglês *Coronavirus Disease 2019*

**DAD** - Dano Alveolar Difuso

**ECA-2** - Enzima Conversora de Angiotensina-2

**FXII** - Fator de Hageman

**H1N1pdm09** - Influenza A do subtipo H1N pandêmico de 2009

**IgE** - Imunoglobulina do tipo E

**IL** - Interleucina

**IL-4** - Interleucina 4

**KKS** - Sistema Calicreína-Cinina, do inglês *Kinin–Kallikrein System*

**RT-qPCR** - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

**SARS-CoV-2** - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

**TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TNF- $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral alfa

**UTI** - Unidade de Terapia Intensiva

# Sumário

1.0 Introdução .....	11
2.0 Justificativa .....	19
3.0 Objetivos .....	20
3.1 Objetivo Geral.....	20
3.2 Objetivos Específicos.....	20
4.0 Metodologia.....	21
4.1 Amostras pacientes Grupo COVID-19 .....	21
4.2 Amostras pacientes Grupo H1N1 .....	23
4.3 Amostras pacientes Grupo CONTROLE .....	24
4.4 Análises Histológicas .....	24
4.4 Análises Imunohistoquímicas .....	25
4.5 Análises Estatística .....	27
5.0 Resultados e discussão .....	28
6.0 Limitações .....	35
7.0 Conclusão .....	36
8.0 Considerações finais .....	37
9.0 Passagem para doutorado .....	38
9.1 Introdução .....	38
9.2 Justificativa.....	40
9.3 Objetivo Geral.....	41
9.4 Objetivos específicos .....	42
9.4 Metodologia amostras .....	42
10.0 Referência bibliográfica .....	44
11.0 Anexos .....	50

## 1.0 Introdução

Em dezembro de 2019, as autoridades chinesas relataram um surto de contágio respiratório de etiologia desconhecida na cidade de Wuhan, capital da província de Hubei. Em janeiro de 2020, o vírus que proporcionava o surto e que se alastrava de forma alarmante foi identificado na amostra de nasofaringe de um paciente como um novo coronavírus (1). Este vírus respiratório, posteriormente seria denominado de SARS-CoV-2 (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*), causador da doença intitulada COVID-19 (Doença por Coronavirus 2019, do inglês *Coronavirus Disease 2019*) (2) e da atual pandemia, declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no dia 11 de março de 2020, dada a sua rápida expansão pelo mundo (3).

Embora o Influenza A do subtipo H1N1 pandêmico de 2009 (H1N1pdm09), vírus responsável pela primeira pandemia do século XXI, tenha deixado uma marca de aproximadamente 12 mil mortes, apenas nos Estados Unidos da América (4), em escala global, a estimativa do número de óbitos pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) entre 2009-2010 variou de 151.700-575.400 (5). O novo coronavírus já deixou um legado de 82.582.228 de casos e 1.818.910 óbitos até o fim da 53ª Semana do Calendário Epidemiológico do ano de 2020, em todo o planeta (6). Isso porque o número de pessoas acometidas pelo SARS-CoV-2 tem crescido de forma exponencial desde o surto até a propagação mundial (7). A taxa de transmissibilidade ( $R_0$ ) deste vírus é reflexo, principalmente, das suas características biológicas e da suscetibilidade do hospedeiro (8). Esta taxa varia de 1,6 a 4,1, ou seja, cada paciente positivado para SARS-CoV-2 poderia contaminar em média entre 1 a 4 pessoas, enquanto o  $R_0$  do H1N1pdm09 girou em torno de 1,3 e 1,8, justificando a tamanha disseminação da atual pandemia (9,10).

O novo coronavírus, pertencente ao grupo  $\beta$ -*coronavirus*, é formado por um capsídeo e seu interior contém ácido ribonucleico de fita simples sentido positivo (ssRNA), associado a uma nucleoproteína na proteína da matriz viral (11). Além da presença de várias outras proteínas em

sua superfície, uma delas merece destaque por sua importância, a proteína Spike (*spike protein*, S-Spike). Trata-se de uma espícula glicoproteica com alta afinidade aos receptores da Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ECA-2), os quais são expressos por quase todos os tipos celulares do corpo humano, deixando-nos então, muito vulneráveis à infecção e desenvolvimento da doença, uma vez que o SARS-CoV-2 usa a afinidade por estes receptores para invadir células humanas (12).

O SARS-CoV-2, ao entrar em contato com seu hospedeiro no ambiente pulmonar, se liga por meio do S-Spike de sua estrutura à ECA-2, largamente presentes no endotélio vascular e pulmonar (pneumócitos tipos I e II). A célula hospedeira endocita o agente viral, promovendo uma clivagem e diminuição da expressão e atividade do receptor da angiotensina (13).

Ao infectar as células do epitélio pulmonar, pneumócitos tipos I e II, o vírus acaba por lesá-las, proporcionando a síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como as Interleucinas 1 e 6 (IL-1, IL-6), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), bem como as citocinas sinalizadoras de infecção por patógenos intracelulares, Interferon alfa e beta (INF-  $\alpha$  e INF-  $\beta$ ), assim, contribuindo fortemente com o início da tempestade de citocinas (14). Este excesso de citocinas provoca o aumento da lesão tecidual local e sistêmica, associado a um exacerbado recrutamento de células inflamatórias, contribuindo com o Dano Alveolar Difuso (DAD), apoptose e piroptose nos pneumócitos e células endoteliais (14,15). A severidade da lesão deve ser associada não somente à infecção pelo vírus, mas também à citocinemias (16).

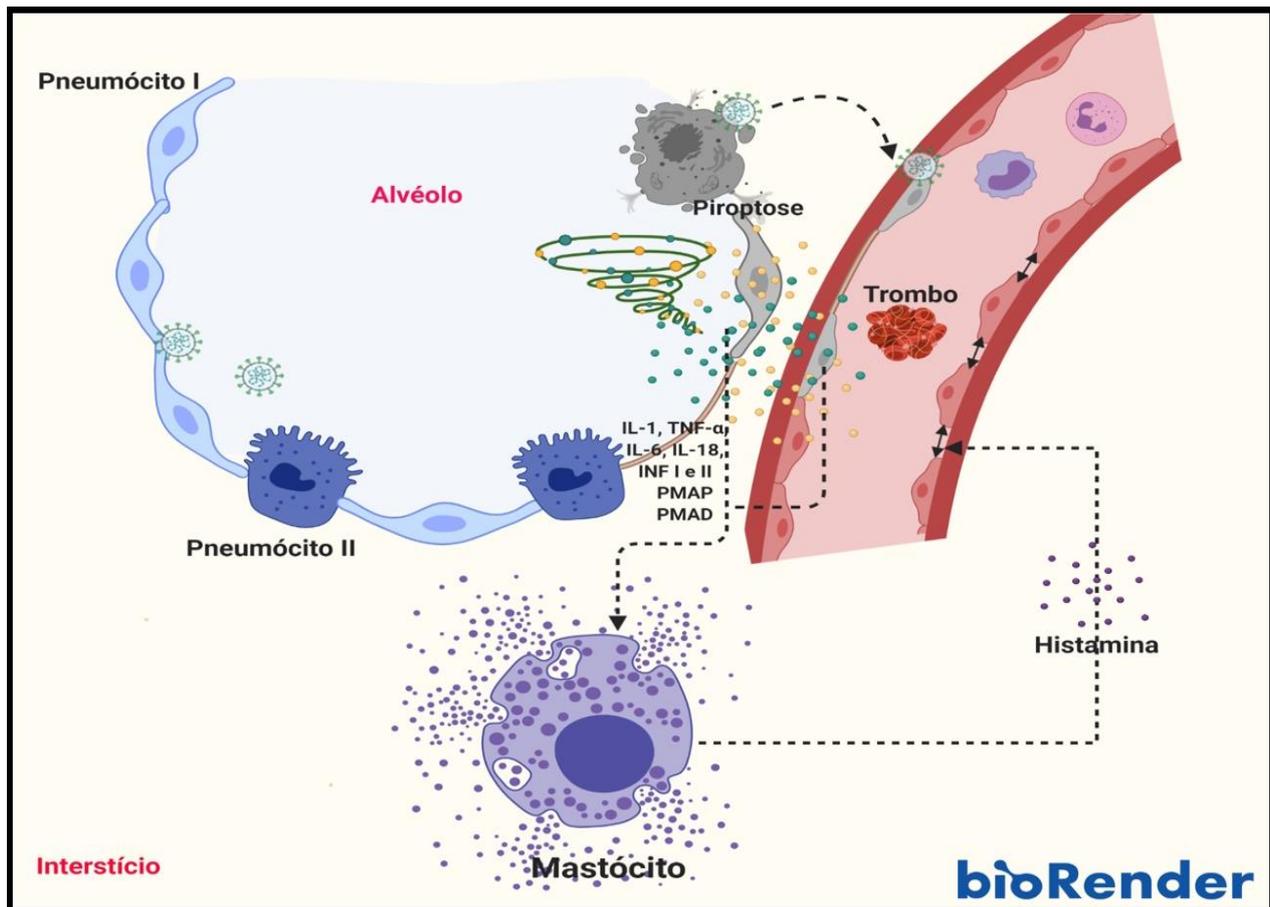
As citocinas pró-inflamatórias recrutam as células leucocitárias com o intuito de atuar na contenção da infecção. Todavia, os pneumócitos infectados acabam por morrer, liberando partículas virais para a luz alveolar, promovendo assim a passagem do SARS-CoV-2 para o interstício do septo alveolar e para o capilar alveolar, uma vez que se encontram intimamente próximos (16).

Com a chegada do vírus ao vaso, esse passa a infectar a célula endotelial – uma vez que ela também expressa o receptor ECA-2 em grande quantidade em sua membrana – também induzindo

nestas células os processos de apoptose e de piroptose (17). O processo piroptótico consiste numa morte celular programada alternativa, mediada principalmente pela Caspase-1, e que tem como processo final a formação de poros em sua membrana. A ativação da cascata proteolítica desta enzima, por consequência, catalisa a síntese e secreção de diversas citocinas pro-inflamatórias, entre elas a Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e a Interleucina 18 (IL-18) (18). As células podem detectar sinais de invasão por patógenos intracelulares, através da sinalização por receptores de membrana, iniciando a cascata proteolítica que culmina em sua autodestruição (19,20).

Como resultado, tem-se o início da formação de imunotrombose pela exposição de colágeno na camada íntima vascular e ativação dos fatores da cascata de coagulação da via intrínseca e extrínseca. Além das disfunções de coagulopatia, ocorre ainda a liberação de inúmeras citocinas pró-inflamatórias e fragmentos virais e celulares resultante da morte celular: as alarminas (PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) e DAMPs - Padrões Moleculares Associados a Danos, do inglês *Danger-Associated Molecular Patterns*) (19). As alarminas, juntamente com diversas citocinas, atuam na sensibilização de uma classe de células granulares, presentes em praticamente todos os nossos tecidos, que exercem a função de sentinelas do organismo: os mastócitos (21).

O processo fisiopatológico da infecção viral das células do epitélio alveolar e endoteliais pode ser observado pela representação gráfica da **Figura 1**.



**Figura 1: Fisiopatologia da infecção pelo SARS-CoV-2 nas vias aéreas inferiores.** Com a chegada do vírus ao ambiente alveolar, este passa a infectar os pneumócitos do tipo I e II, levando-os a morte por diversos processos, entre elas a piroptose, cuja característica é a secreção de inúmeras citocinas pro-inflamatórias e alarminas, contribuindo com a tempestade de citocinas. Pela proximidade do capilar alveolar, o vírus passa a infectar também a célula endotelial – que possui uma vasta expressão de ECA-2 – provocando a sua morte pelos mesmos caminhos fisiopatológicos citados anteriormente, relacionados aos pneumócitos. Como consequência da morte da célula endotelial, ocorre a exposição da lâmina basal de fibra colágeno vascular. O colágeno possui a capacidade de ativar o Fator de Hageman (FXII) de coagulação, presente na circulação, dando início à formação de imunotrombose. A vasta gama de citocinas e alarminas secretadas pelos processos de piroptose possuem a capacidade de ativar mastócitos presentes no interstício pulmonar. Confeccionado com BioRender.com. **Fonte:** o autor, 2021.

Mastócitos são células do tecido conjuntivo que apresentam diversos grânulos citoplasmáticos, encontradas em praticamente todos os tecidos, sendo mais abundantes no trato gastrointestinal, pele e vias aéreas. Se concentram em regiões que têm contato direto com o ambiente e normalmente não são encontradas circulando no ambiente endovascular (22). Originários da medula óssea, seus precursores se distribuem e migram para os tecidos alvo, tendo seu desenvolvimento influenciados pelo Fator de Citocina de Célula-Tronco (SCF) ao fazer a ligação com seu receptor, a proteína Tirosina–Quinase (c-kit/CD117 – Cluster de Diferenciação 117), constitutiva na membrana dos mastócitos, e, juntamente com outras citocinas, promovem-no

a atuar como uma célula madura. Além da maturação, SCF contribui com o recrutamento de mastócitos e seus precursores para os locais de lesão. Em roedores, se subdividem em dois grupos: mastócitos residentes em mucosa e mastócitos residentes em tecido conjuntivo (22,23). Em humanos, se subdividem em três grupos: os que contêm apenas triptase em seus grânulos; os que contêm apenas quimases em seus grânulos e os que contêm ambas as proteases (24). São comumente observados ao se utilizar técnicas simples de colorações histoquímicas, como o Azul de Toluidina (AT) e outros corantes metacromáticos. A partir da técnica de AT, torna-se possível observar seus grânulos em coloração violeta, contrastando com o citoplasma e o núcleo, que ficam azuis (24,25).

Estas células estão intimamente ligadas às respostas anafiláticas, sendo o mecanismo de ativação alérgica promovido pela ligação cruzada do antígeno (alérgeno) à Imunoglobulina do tipo E (IgE) com o seu receptor de membrana FcεRI. Em menor escala, também podem ser ativadas pela Imunoglobulina do tipo G (IgG), os quais possuem afinidade com seus receptores FcγRI (21). Entretanto, a ligação imunoglobulina-receptor não é o único caminho indutor da ativação e desgranulação dos mediadores citoplasmáticos. Inúmeras citocinas, anafilotoxinas, moléculas derivadas do sistema complemento, peptídeos originados de patógenos e venenos de animais peçonhentos tem a capacidade de promover a sensibilização dos mastócitos (23,26). Essa plasticidade da atuação dos mastócitos os torna capazes de fazer a regulação tanto da resposta imune inata como adaptativa (27).

Os subprodutos da ativação e desgranulação mastocitária, chamados de mediadores biológicos, podem ser divididos por duas etapas cronológicas: (a) secreção de produtos pré-formados como aminas vasoativas, proteases, proteoglicanos e algumas citocinas pró-inflamatórias, que tem sua liberação de maneira imediata após a sensibilização; e (b) uma secreção secundária (*de novo*), composta por mediadores recém sintetizados após a ativação. Pode-se exemplificar a secreção de mediadores lipídicos e uma numerosa gama de citocinas e quimiocinas (28,29). A desgranulação ocorre via processo de exocitose e é dependente do fluxo de Ca<sup>2+</sup>

citoplasmático (29). Subsequente à ativação, mastócitos possuem a habilidade de reabastecer seus grânulos (31).

Aminas vasoativas, ou aminas biogênicas, são moléculas de baixo peso molecular que contém um grupamento amina. Nos humanos, tem como representante principal a histamina (31). Potente agente inflamatório, a histamina possui receptores presentes na célula endotelial, promovendo sua contração e aumentando o espaçamento entre elas. O resultado é um aumento da permeabilidade vascular e extravasamento do plasma sanguíneo para o tecido intersticial (31). A histamina também promove a contração da musculatura lisa vascular e brônquica a partir da síntese de relaxantes musculares, como prostaciclina e óxido nítrico (32).

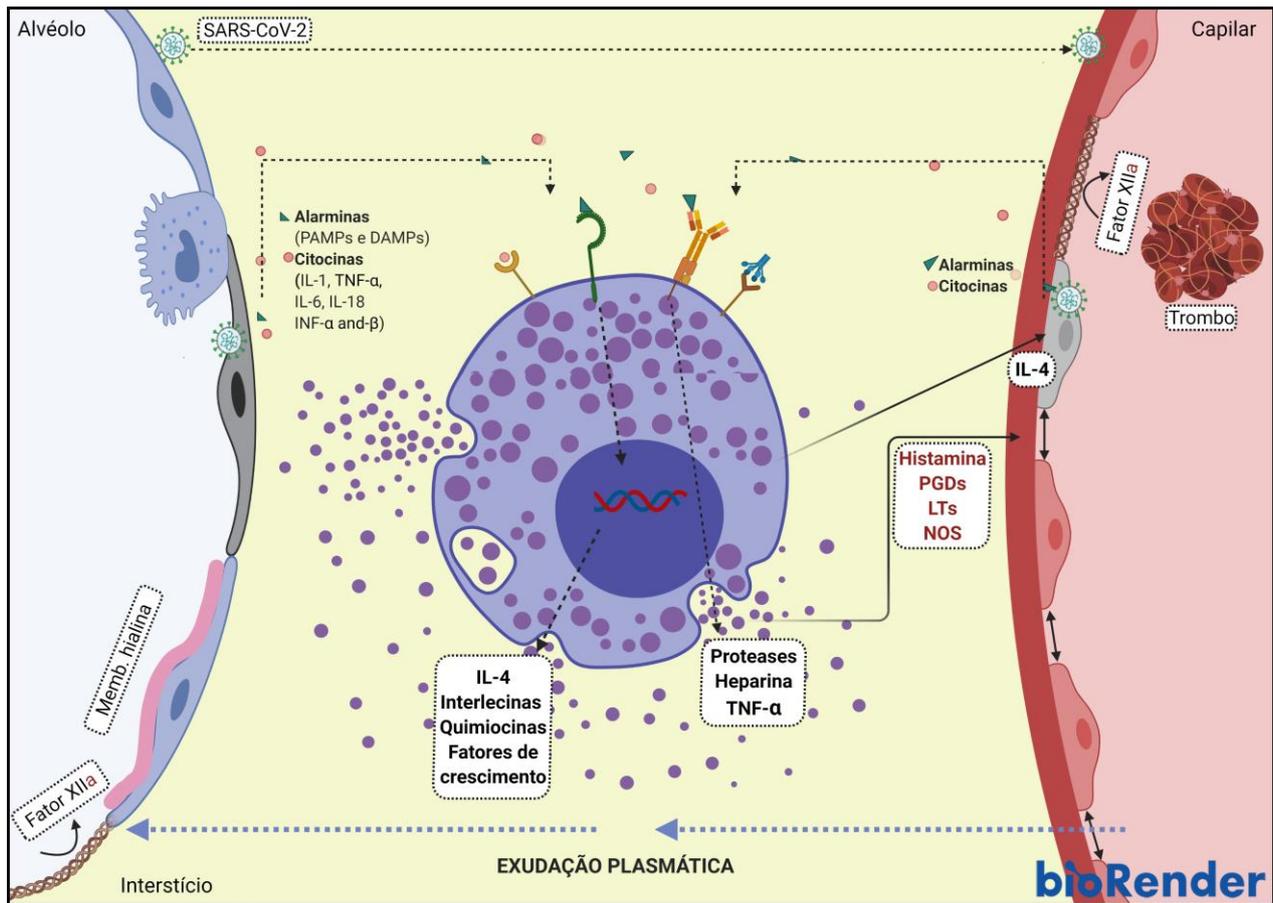
Quimase e triptase, esta última secretada em maior abundância, constituem o grupo de proteases séricas secretadas pelos mastócitos. Ambas tem papel no dano e remodelamento tecidual, aumento da permeabilidade vascular e ação protetiva contra venenos de animais peçonhentos (28,31). Heparina, um proteoglicano (macromoléculas proteicas glicosiladas), também está intimamente ligada à permeabilidade vascular, através da ativação do Fator de Hageman (FXII). Este, ativado, promove o início do Sistema Calicreína-Cinina (KKS, do inglês *Kinin–Kallikrein System*) (33,34).

Após a resposta da desgranulação imediata, é iniciada uma nova síntese, mais tardia, de mediadores. Este processo (*de novo*) se inicia com a liberação de mediadores lipídicos, sendo o mais notável os derivados do ácido araquidônico. Envolvido na via da ciclo-oxigenase (COX), o ácido araquidônico é metabolizado em prostaglandina D<sub>2</sub>, contribuindo com o aumento da permeabilidade vascular e edema intersticial. Também possui propriedade vasodilatadora e broncoconstritora de musculatura lisa (32,35).

Finalmente, se sucede a síntese de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento por meio da regulação de fatores de transcrição nuclear, horas após a ativação. A grande amplitude de citocinas compreende síntese *de novo* de TNF- $\alpha$ , assim como Interleucinas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 13 e 17 (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-17). Como exemplos de quimiocinas e

fatores de crescimento, vale exemplificar as Quimiocinas 1, 2, 3 e 4 (CCL1, CCL2, CCL3, CCL4); e fator de crescimento endotelial e vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento de fibroblasto (FGF2), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator estimulador de colônias de granulócitos (GM-CSF), respectivamente (30,32,36,37).

Pela variedade de citocinas sintetizadas, os mastócitos possuem um papel fundamental no cenário pró-inflamatório, mas também anti-inflamatório. IL-4 produzida por mastócitos promovem a modulação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> Th0 para o fenótipo Th2 (38). Esta linhagem de linfócitos auxiliares está associada à intensa secreção de IL-4. Outros importantes papéis desta citocina é a indução à troca de linfócitos B ativados para a produção de IgE (31). IL-4 promove permeabilidade vascular e apoptose das células endoteliais (39), contribuindo com a formação da imunotrombose. Por outro lado, IL-4 tem atuação anti-inflamatória, modulando macrófagos M2 (ativação alternativa), que tem a função de reparo tecidual e formação de fibrose (40). Triptase também está envolvida no reparo tecidual e síntese de matriz extracelular (MEC), tendo um papel importante no desfecho de doenças inflamatórias (23,30). O processo de desgranulação do mastócito, assim como a síntese, secreção e ação de seus mediadores no quadro infeccioso da COVID-19 pode ser observado na representação gráfica da **Figura 2**.



**Figura 2: Ativação e desgranulação dos mastócitos.** Representação gráfica ilustrando a atuação dos mastócitos no agravamento da doença, em decorrência de sua ativação, seja através dos eventos de piroptose e a tempestade de citocinas, ou por fragmentos virais e celulares resultantes da piroptose (PAMPs e DAMPs). Como consequência, uma grande quantidade de mediadores químicos armazenados no citoplasma dos mastócitos é secretada, sintetizada e novamente secretada. Dentre essas substâncias, aquelas que atuam na vasodilatação e promoção do aumento da permeabilidade vascular possuem grande importância na doença, uma vez que contribuem fortemente para o extravasamento plasmático intersticial e alveolar, acarretando aumento da lesão pulmonar, edema intersticial e formação de membrana hialina intra-alveolar; esta última originando o Dano Alveolar Difuso (DAD). Outro mediador de grande importância na COVID-19 é a Interleucina 4, secretada tardiamente, após a ativação de fatores de transcrição. Juntamente com o colágeno da lâmina basal exposta, IL-4 contribui com lesão do tecido endotelial, contribuindo com a formação de imunotrombos no ambiente capilar. Confeccionado com BioRender.com. **Fonte:** o autor, 2021.

## **2.0 Justificativa**

Sugere-se que o mastócito ativado atue diretamente na gravidade da fisiopatologia da COVID-19, dado o fato dessas células agirem na exacerbação da permeabilidade e lesão vascular, ocasionando o transporte do exsudato plasmático sanguíneo para o interstício alveolar e atuando na formação do edema intersticial e consequente edema intra-alveolar. O exsudato é composto, entre outros, por moléculas do sistema complemento e fatores da cascata de coagulação, que promovem a formação de membrana hialina na luz alveolar e DAD. Além disso, mastócitos ativados podem estar diretamente envolvidos na lesão vascular endotelial e formação de imunotrombose, devido a precoce secreção de citocinas, dentre as quais a IL-4 possui um papel de destaque.

Obter maior conhecimento a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta inflamatória agravada, causada pela ação direta dos mediadores secretados pelos mastócitos, pode auxiliar no melhor entendimento da doença bem como no tratamento adequado destes pacientes.

## **3.0 Objetivos**

### **3.1 Objetivo Geral**

O presente estudo tem como proposta avaliar os efeitos da IL-4, assim como quantificar o número de mastócitos e seus precursores, e ainda contabilizar mastócitos íntegros e em processo de desgranulação em amostras pulmonares de biópsias *post mortem* de pacientes que foram a óbito por COVID-19.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar as amostras estudadas de acordo com o gênero e faixa etária;
- Avaliar a imunexpressão imunohistoquímica tecidual da proteína IL-4 em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por COVID-19;
- Quantificar o número de mastócitos íntegros (CD117) em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por COVID-19;
- Quantificar o número de mastócitos em processo de desgranulação (AT) em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por COVID-19;
- Comparar os resultados acima com amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por H1N1pdm09;
- Comparar os resultados acima com amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por outras causas que não lesão pulmonar (controle);

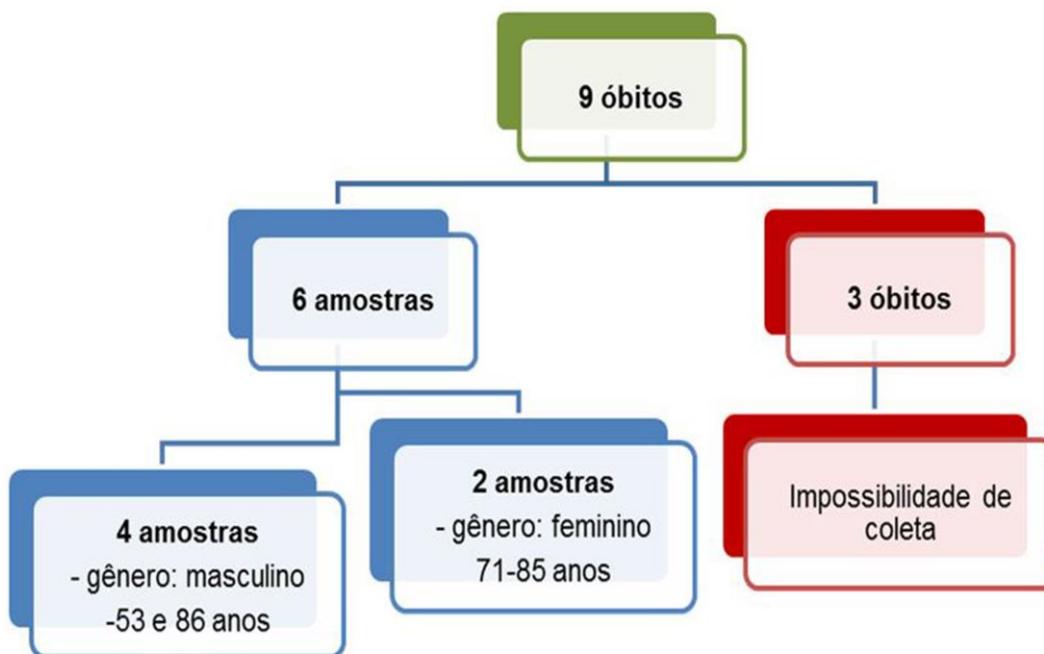
## 4.0 Metodologia

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sob os números 3.944.734 / 2020 e 2.550.445 / 2018 (**Anexo 1 e 2**). A metodologia foi realizada de acordo com as diretrizes e regulamentos relevantes. Os representantes legais dos pacientes assinaram o TCLE.

### 4.1 Amostras pacientes Grupo COVID-19

Os dados clínicos dos pacientes que foram a óbito por COVID-19 ( $n = 6$ ) são originários dos prontuários médicos durante a internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Marcelino Champagnat em Curitiba, Brasil, bem como suas amostras pulmonares *post mortem*. O teste para COVID-19, comprobatório para que o paciente fosse elegível a compor o estudo, foi realizado em esfregaços nasofaríngeos adquiridos durante o período de internação, a fim de se realizar a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR). A amplificação do genoma viral foi efetuada com o kit Invitrogen SuperScript™ III Platinum® One-Step qRT-PCR número Catálogo: 11732020, (Thermofisher Scientific, Waltham, MA) positivos para SARS-CoV-2.

As coletas (**Figura 3**) aconteceram entre os meses de março e abril do ano de 2020. Durante o período, um total de 9 pacientes morreram pela doença, sendo 6 coletas realizadas. Os demais pacientes não compuseram o presente estudo por impossibilidade na coleta por parte do intensivista ou por outros fatores condizentes com os critérios de não inclusão.



**Figura 3: Fluxograma representando a amostragem composta pelo grupo COVID-19.** No período entre março e abril de 2020, 9 pacientes foram a óbito por COVID-19 (verde). Dentre os casos de óbitos, foram coletadas 6 amostras, que compõem o grupo COVID-19 do presente estudo (azul). 3 pacientes que foram a óbito por conta da doença não compuseram a pesquisa pela impossibilidade na coleta (vermelho). **Fonte:** Caroline Busatta Vaz de Paula, 2021.

#### **Critérios de inclusão dos pacientes COVID-19:**

- Idade maior de 18 anos;
- Admissão hospitalar por quadro clínico compatível com COVID-19: febre, dispneia (SaO<sub>2</sub><92%) e/ou tosse;
- Testes imunológicos ou moleculares confirmando a infecção pelo COVID-19;
- Tempo da coleta após a morte menor do que 4 horas.

#### **Critérios de não inclusão/exclusão dos pacientes COVID-19:**

- Sorologia negativa para COVID-19;
- Pneumonia não causada por SARS-CoV-2;
- Negação da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por parte de um representante legal.

Após a constatação da morte, os representantes legais dos pacientes que se adequavam aos critérios de inclusão para comporem o Grupo COVID-19 eram comunicados e um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 3**) foi submetido à sua assinatura, com a

finalidade de esclarecimentos gerais a respeito do estudo, assim como dos protocolos da coleta e permissão da utilização da amostra pulmonar.

Dados demográficos de gênero, idade, comorbidades (incluindo diabetes, insuficiência cardíaca, hipertensão, obesidade, câncer, cirrose), medicamentos de uso crônico (especialmente inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores do receptor de angiotensina e ibuprofeno) também foram coletados.

Dados clínicos e infecciosos foram coletados com a finalidade de avaliar os pacientes com relação a progressão da infecção, sendo eles o tempo de hospitalização, a taxa de mortalidade, a identificação de fatores de risco para mortalidade e hospitalização prolongada e evolução radiológica das lesões pulmonares em pacientes COVID-19 e outros vírus respiratórios. O tempo de sobrevivência foi definida como o período compreendido entre o internamento/diagnóstico e o óbito.

As amostras pulmonares *post mortem* foram coletadas a partir de uma técnica de necropsia minimamente invasiva; uma mini-toracotomia da região anterior esquerda com ressecção de segmento do lobo superior esquerdo (com aproximadamente 3x3cm). A coleta se deu no próprio leito da UTI do hospital. As amostras foram acondicionadas em um frasco contendo solução de formalina a 10%, onde posteriormente foram embebidas e emblocadas em parafina, para fins histológicos.

#### **4.2 Amostras pacientes Grupo H1N1**

O grupo H1N1 (n = 10) é composto por amostras *post mortem* de pulmões de pacientes cuja causa de morte foi infecção respiratória aguda grave por Influenza A subtipo H1N1 pandêmico de 2009 (H1N1pdm09). Os fragmentos de pulmão são provenientes do banco de amostras teciduais parafinadas de necropsias do Hospital das Clínicas (HC) de Curitiba, Brasil.

Os pacientes foram testados por meio da técnica de RT-qPCR (técnica similar à do grupo COVID-19), sendo possível a caracterização positiva para H1N1pdm09. As amostras foram

fixadas em formalina a 10%, onde posteriormente foram embebidas e emblocadas em parafina, para fins histológicos.

Dados como gênero e idade dos pacientes foram obtidos por meio de uma pesquisa direta nos laudos de necropsias. O tempo de sobrevivência foi definida como o período compreendido entre o internamento/diagnóstico e o óbito.

### **4.3 Amostras pacientes Grupo CONTROLE**

O grupo CONTROLE (n = 11) é composto por amostras pulmonares provenientes de necropsias de pacientes que tiveram como causa de morte doença cardiovascular e neoplásica, não relacionados a lesões pulmonares. Os fragmentos de pulmão são originários do banco de amostras teciduais parafinadas de necropsias do Hospital das Clínicas (HC) de Curitiba, Brasil. As amostras foram fixadas em formalina a 10%, onde posteriormente foram embebidas e emblocadas em parafina, para fins histológicos.

Dados como gênero e idade dos pacientes foram obtidos por meio de uma pesquisa direta nos laudos de necropsias. O tempo de sobrevivência foi definida como o período compreendido entre o internamento/diagnóstico e o óbito.

### **4.4 Análises Histológicas**

As amostras pulmonares parafinadas foram submetidas a cortes histológicos com a finalidade de atender às necessidades das colorações histoquímicas e ensaios imunohistoquímicos utilizados no presente estudo. Cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina - H&E (Hematoxilina de Harris: NewProv, Cod. PA203, Paraná, BR; Eosina: BIOTEC Reagentes Analíticos, Cod. 4371, Paraná, BR), foram realizados com o objetivo de analisar as características anatomopatológicas.

As lâminas coradas a partir da técnica de AT (Êxodo Científica, cod. AT9115SO, São Paulo, Brasil) foram utilizadas para a contagem dos mastócitos íntegros e em processo de

desgranulação. Estes mastócitos foram contabilizados exclusivamente no septo alveolar e espaços perivasculares, através da contagem de células coradas em 10 Campos de Grande Aumento (CGA, objetiva de 40X), pelo microscópio óptico BX50 (OLYMPUS, Tóquio, Japão). Por fim, foram calculados os valores de média aritmética dos 10 CGA de cada paciente, de maneira que seus resultados foram organizados em planilhas de Excel e posteriormente submetidos à análise estatística.

#### **4.4 Análises Imunohistoquímicas**

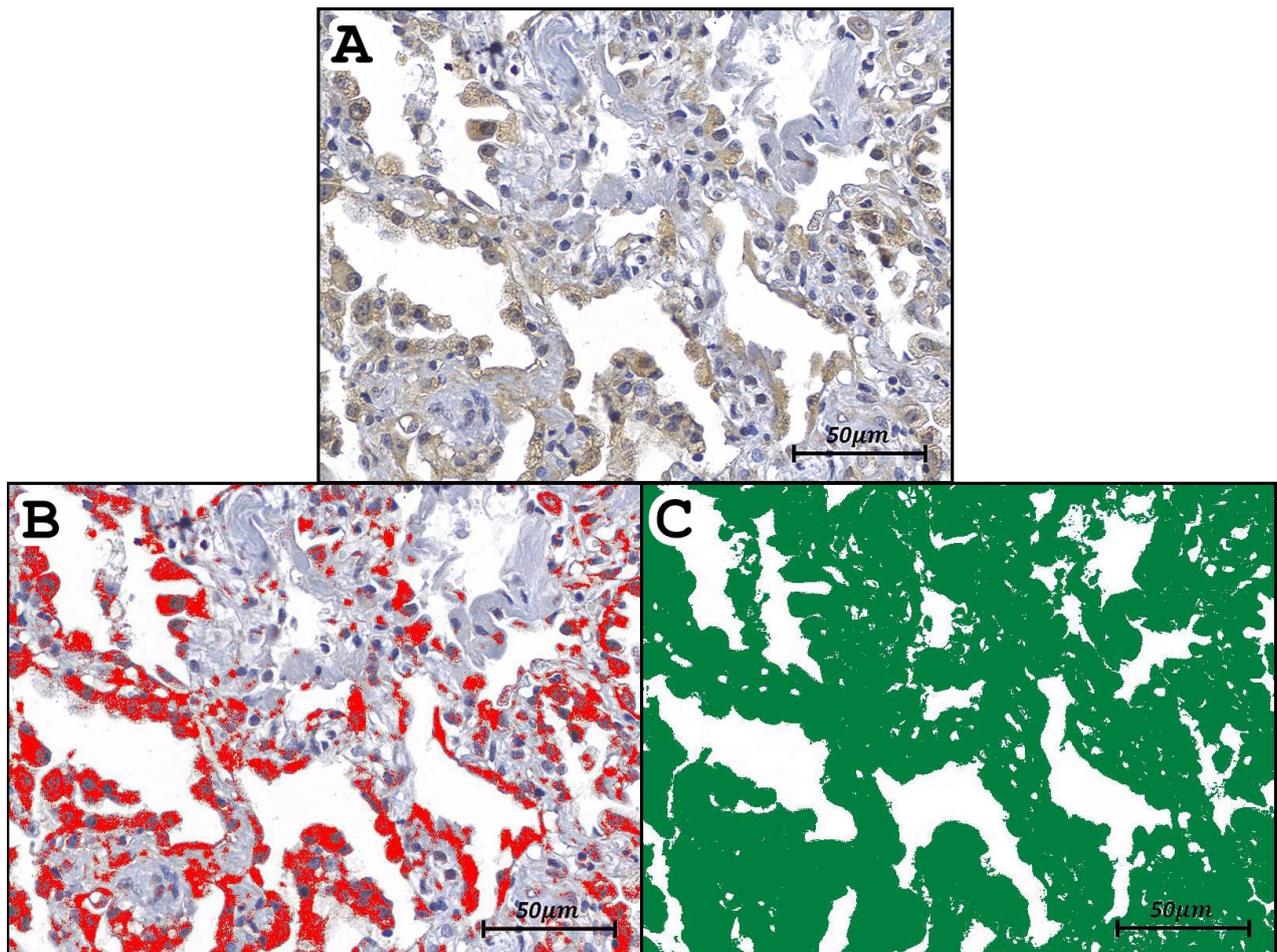
A técnica de imunohistoquímica foi empregada com o intuito de identificar a imunexpressão da IL-4 (anti-IL-4, Polyclonal/Rabbit, código PA5-25165, diluição 1:200, Thermo Fisher), para a observação da sua expressão em macrófagos alveolares e pneumócitos tipo II, entre outras células. A expressão tecidual de c-kit (anti-CD117, Polyclonal/Rabbit, código A4502) foi empregado a fim de se constatar a presença de mastócitos e progenitores. Para a revelação da técnica foi utilizado o polímero secundário Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System (Spring Bioscience, Pleasanton, CA). Os resultados foram confirmados pela marcação específica de um controle positivo, onde uma amostra tecidual com imunexpressão sabidamente positiva para o anticorpo foi alocada juntamente com as amostras dos pacientes (pele humana inflamada para o anti-IL-4 e pele humana com mastocitose para anti-CD117).

As lâminas imunomarcadas com IL-4 foram escaneadas com o auxílio do Scanner de lâminas Axio Scan.Z1 (Zeiss, Jena, Alemanha) e então submetidas a geração de 10 CGA pelo software ZEN Blue Edition (Zeiss, Jena, Alemanha). As análises foram realizadas de modo cego, sendo as imagens geradas obtidas de regiões amostrais aleatórias sem a interferência de um observador. De cada CGA, houve a mensuração das áreas de imunexpressão pelo software Image Pro-Plus versão 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD), através do emprego de um método de segmentação semiautomatizada por cores, na qual a área imunopositiva para IL-4 foi artificialmente delimitada e quantificada. Posteriormente, seu valor, expresso em micrômetros

quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ) foi dividido pelo valor de sua respectiva área de tecido total (**Figura 4**) e finalmente transformado em um valor percentual, sendo expresso na seguinte fórmula matemática:

$$\text{valor percentual} = \left( \frac{\text{Área imunopositiva}}{\text{Área tecido total}} \right) \times 100 .$$

Por fim, foram calculados os valores de média aritmética dos 10 CGA de cada paciente, de maneira que seus resultados foram organizados em planilhas de Excel e posteriormente submetidos à análise estatística.



**Figura 4:** Composição demonstrando os processos da segmentação semiautomatizada por cores. **A:** Imagem digitalizada de uma lâmina imunomarcada com anti-IL-4. **B:** Imagem anterior, cuja área de imunopositividade foi delimitada artificialmente pela cor vermelho, com o intuito da quantificação do seu valor. **C:** Imagem anterior, cuja área total foi delimitada artificialmente pela cor verde, com o intuito da quantificação do seu valor. **Fonte:** o autor, 2021.

As lâminas imunomarcadas com anti-CD117 foram utilizadas para a contagem dos mastócitos e seus progenitores (células nucleadas CD117 positivas). Estes mastócitos foram contabilizados exclusivamente no septo alveolar e espaços perivasculares, através da contagem de

células positivas em dez CGA, pelo microscópio óptico BX50 (OLYMPUS, Tóquio, Japão). Por fim, foram calculados os valores de média aritmética dos 10 CGA de cada paciente, de maneira que seus resultados foram organizados em planilhas de Excel e posteriormente submetidos à análise estatística.

#### **4.5 Análises Estatística**

Variáveis quantitativas foram caracterizadas por médias, desvio padrão e medianas, com valores mínimos e máximos. A condição de normalidade foi avaliada a partir do teste Shapiro-Wilk. A comparação das variáveis quantitativas entre dois grupos foi realizada por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para as variáveis demográficas foi utilizado o teste T- Student. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Os dados foram analisados por meio do software IBM SPSS Statistics v.20.0. (IBM Corp, Armonk, NY).

## **5.0 Resultados e discussão**

Os resultados e a discussão desta dissertação estão apresentados no artigo a seguir, já publicado na revista *Frontiers in Immunology*, indexada 1664-3224, Qualis A1, Scimago Q1, Fator de impacto 5,085.



# Mast Cells in Alveolar Septa of COVID-19 Patients: A Pathogenic Pathway That May Link Interstitial Edema to Immunothrombosis

Jarbas da Silva Motta Junior<sup>1,2</sup>, Anna Flavia Ribeiro dos Santos Miggiolaro<sup>1,2</sup>, Seigo Nagashima<sup>1</sup>, Caroline Busatta Vaz de Paula<sup>1</sup>, Cristina Pellegrino Baena<sup>1,2\*</sup>, Julio Scharfstein<sup>3</sup> and Lucia de Noronha<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná PUCPR, Curitiba, Brazil, <sup>2</sup> Hospital Marcelino Champagnat, Curitiba, Brazil, <sup>3</sup> Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal Do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Jean Sylvia Marshall,  
Dalhousie University, Canada

### Reviewed by:

Theoharis Constantin Theoharides,  
Tufts University School of Medicine,  
United States  
Paige Lacy,  
University of Alberta, Canada  
Zhangshan Cheng,  
St. Jude Children's Research Hospital,  
United States  
Jenny Hallgren,  
Uppsala University, Sweden

### \*Correspondence:

Cristina Pellegrino Baena  
cristina.baena@pucpr.br

### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular Innate Immunity,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 22 June 2020

Accepted: 27 August 2020

Published: 18 September 2020

### Citation:

Motta Junior JdS, Miggiolaro AFdS,  
Nagashima S, de Paula CBV,  
Baena CP, Scharfstein J and de  
Noronha L (2020) Mast Cells in  
Alveolar Septa of COVID-19 Patients:  
A Pathogenic Pathway That May Link  
Interstitial Edema to  
Immunothrombosis.  
Front. Immunol. 11:574862.  
doi: 10.3389/fimmu.2020.574862

It is currently believed that innate immunity is unable to prevent the spread of SARS-CoV-2 from the upper airways to the alveoli of high-risk groups of patients. SARS-CoV-2 replication in ACE-2-expressing pneumocytes can drive the diffuse alveolar injury through the cytokine storm and immunothrombosis by upregulating the transcription of chemokine/cytokines, unlike several other respiratory viruses. Here we report histopathology data obtained in post-mortem lung biopsies of COVID-19, showing the increased density of perivascular and septal mast cells (MCs) and IL-4-expressing cells ( $n = 6$ ), in contrast to the numbers found in pandemic H1N1-induced pneumonia ( $n = 10$ ) or Control specimens ( $n = 10$ ). Noteworthy, COVID-19 lung biopsies showed a higher density of CD117<sup>+</sup> cells, suggesting that c-kit positive MCs progenitors were recruited earlier to the alveolar septa. These findings suggest that MC proliferation/differentiation in the alveolar septa might be harnessed by the shift toward IL-4 expression in the inflamed alveolar septa. Future studies may clarify whether the fibrin-dependent generation of the hyaline membrane, processes that require the diffusion of procoagulative plasma factors into the alveolar lumen and the endothelial dysfunction, are preceded by MC-driven formation of interstitial edema in the alveolar septa.

**Keywords:** SARS-CoV-2, COVID 19, mast cells (MC), cell-mediated immunity, immune responses, interleukin-4 (IL-4)

## INTRODUCTION

As the pandemic caused by SARS-CoV-2 spreads to developing countries, the number of patients requiring intensive care treatment in overcrowded hospitals keeps increasing, limiting the clinical staff's capacity to prevent fatal outcomes. Viewed from the clinical perspective, the aims are to ameliorate respiratory functions by reducing the diffuse alveolar damage (DAD) that causes acute respiratory distress syndrome (ARDS) and to prevent the systemic thrombosis and multiple organ failure (1).

Although the temporal link between inflammatory edema and intra-alveolar hyaline membranes is yet to be proven, it has been established that infected pneumocytes undergoing apoptosis induce

an inflammatory response conducting to interstitial edema and the consequent influx of plasma-borne procoagulative factor accumulating in interstitial spaces. The procoagulative factor-rich interstitial edema so would leak through intra-alveolar spaces triggering fibrin deposition over the damage alveolar septa (hyaline membranes). Converging with these infection-associated inflammatory lesions, patients afflicted with severe COVID-19 DAD mount a systemic immunothrombosis response that is steered by hyper-activated leukocytes. Particularly sensitive to microthrombi deposition, the alveolar capillaries are eventually clogged with thrombi, further disabling oxygen transfer to the bloodstream (2, 3).

Strategically localized in the subendothelial region, mast cells (MCs) are specialized innate sentinel cells that, upon activation, induce microvascular leakage, thereby linking immunity to pro-inflammatory and procoagulative networks as complement and the contact/kallikrein-kinin system (4–6). Despite evidence that MCs sense RNA viruses via TLR7 (7), MC-dependent increases in microvascular permeability might be potentiated by a myriad of soluble inflammatory mediators, including complement anaphylatoxins and tissue-derived alarmins (7, 8). Although MC targeting by cromolyn inevitably comes to mind as a low-cost therapeutic option, it has been reported that traditional MC stabilizers are far less potent inhibitors of MC release of inflammatory mediator than luteolin analogs, recently recognized as alternative drug therapy in corona-virus infection (8, 9).

The current study was partly motivated by a recent report showing the transcriptional profile of epithelial cells infected by SARS-Cov-2 vs. other human respiratory viruses (10). In contrast to the phenotypic properties of other viruses, the antagonism of (anti-viral) type-I and type III interferons are associated with a robust increase in the transcriptional program of chemokines/cytokines in SARS-Cov-2-infected epithelial cells. At first sight, these results raise the possibility that specific subsets of leukocytes (or their progenitors) might be recruited to the inflamed lung via upregulated secretion of specific chemokines. Although the dynamics of leukocyte recruitment to the alveolar septum of COVID-19 are unknown, we reasoned that some of the pathological features associated with severe COVID-19 could result from MC recruitment and/or maturation. Following this reasoning, we sought to compare the immunopathological aspects described in COVID-19 with knowledge already acquired in other respiratory viral pandemics, such as the pandemic Influenza A virus H1N1 subtype (H1N1pdm09) (11).

## STUDY DESIGN AND POST-MORTEM RESULTS

### Post-mortem Samples and Methods

The present study was approved by the National Research Ethics Committee (Conselho Nacional de Ética em Pesquisa—CONEP), protocol number 3.944.734/2020 (COVID-19 patients), and 2.550.445/2018 (H1N1pdm09 and Control patients). All methods were carried out following relevant guidelines and regulations.

Families permitted the post-mortem biopsy of the cases of COVID-19 and H1N1pdm09.

We performed a histopathological study to compare the distribution of MCs in post-mortem lung biopsies of patients with COVID-19 (COVID-19 Group,  $n = 6$ , positive nasal swab RT-PCR for SARS-CoV-2 confirmed in more than one test) and post-mortem biopsies from patients with H1N1pdm09 infection (Group H1N1,  $n = 10$ , positive RT-PCR in fresh lung samples). Also included in this study was a Control group of lung samples ( $n = 10$ ) from patients who died from neoplastic or cardiovascular diseases.

Clinical data were obtained from medical records during hospitalization in the Intensive Care Unit (ICU). A minimally invasive lung post-mortem biopsy was performed through a left anterior mini-thoracotomy with upper left lobe segment resection. The area's selection followed two criteria; (i) area with more severe lung injury identified on tomography and (ii) preferably in the left lung due to the mini-thoracotomy technique. The resected pieces were up to  $3 \times 3$  cm.

The lung samples provided by post-mortem biopsy were formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) and stained with hematoxylin and eosin (H&E).

As read-outs, MCs and progenitors were identified by immunohistochemistry (IHC) using a polyclonal antibody anti-CD117 (c-kit polyclonal rabbit anti-human, Dako Agilent, A4502) staining on FFPE samples. The secondary polymer was Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System, Spring Bioscience, CA, USA. Specificity controls were performed by (i) omitting the primary antibody (negative control) and (ii) testing skin tissues with mastocytosis (positive controls for anti-CD117). MC and degranulation responses were identifying by the toluidine blue (TB) stain.

CD117<sup>+</sup> (only nucleated cells) and MCs were scored (IHC and TB) exclusively in the alveolar septa and perivascular spaces, by counting the positive cells per high-power field (HPF  $40\times$  Olympus objective  $0.26 \text{ mm}^2$ ). Average scores were obtained by screening 10 randomized HPFs (total area of  $2.6 \text{ mm}^2$  per case).

The immunohistochemistry technique was also used to identify the expression of the interleukin-4 (anti-IL-4, Polyclonal/Rabbit, clone PA5-25165, dilution 1:200, Thermo Fisher). As stated for CD117 immunostaining, we used as secondary polymer Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System, Spring Bioscience, CA, USA, and positive and negative controls were performed.

The slides of IL-4 were scanned (Axio Scan Scanner, Z1, Carl Zeiss, Germany), and the ZEN software selected ten HPF ( $40\times$  objective). The immunopositivity areas were measured by the Image-Pro Plus software version 4.5 (Media Cybernetics, USA). Subsequently, these areas were converted into percentages to enable statistical analysis.

The comparison of the quantitative variables of the two groups was performed using the non-parametric Kruskal Wallis test. Values of  $p < 0.05$  indicated statistical significance. The data were analyzed using the IBM SPSS Statistics v.20.0 software. Armonk, NY: IBM Corp.

**TABLE 1** | Comparison between COVID-19, H1N1, and Control groups according to clinical and histopathological findings.

Data	COVID-19 (N = 6)	H1N1 (N = 10)	CONTROL (N = 11)
Gender	Male 4 (66.6%) Female 2 (33.4%)	Male 8 (80.0%) Female 2 (20%)	Male 8 (72.7%) Female 3 (27.3%)
Age (years) <sup>a</sup>	76.5/80.5 (53–87)	43.5/44 (23–61) 0.005*	42.3/45 (18–60) 0.003*
Comorbidities (number of cases)	Hypertension (4/6) Dyslipidemia (1/6) Hypothyroidism (1/6) Class II obesity (2/6) Dementia (2/6) Diabetes Mellitus (1/6) Chronic Kidney Disease (2/6) Coronary Disease (2/6)	–	–
Time from hospitalization to death (days) <sup>a</sup>	12.8/10 (2–32)	4.70/1.5 (1–19) 0.006*	7.6/4 (1–46) 0.011*
Mechanical ventilation <sup>a</sup>	9.7/8 (0–21)	4.70/1.5 (1–19) 0.185*	–
IL-4 tissue expression <sup>a,b</sup>	8.26/9.37 (0.71–13.39)	0.54/0.41 (0.19–1.12) 0.003*	2.84/2.26 (0.23–7.41) 0.0509*
Number of CD117 <sup>+</sup> cells <sup>a,c</sup>	8.93/11.25 (2.90–12.70)	1.03/0.65 (0.20–3.10) 0.002*	0.51/0.35 (0.10–1.40) 0.001*
Number of Mast cells (toluidine blue) <sup>a,c</sup>	1.58/1.35 (1.50–1.05)	0.09/0.10 (0.30–0.00) 0.001*	0.05/0.00 (0.20–0.00) 0.001*

<sup>a</sup>Average/Median (Min–Max).<sup>b</sup>Tissue expression in percentage per HPF.<sup>c</sup>Number of CD117<sup>+</sup> MCs in 10 HPF (average).

\*p-values obtained were compared between COVID-19 vs. H1N1.

\*p-values obtained were compared between COVID-19 and Control group. p-values were performed using the non-parametric Mann-Whitney test (p &lt; 0.05).

## Histopathological and Immunohistochemical Results

Clinical characteristics of the COVID-19, H1N1, and Control groups as age, survival (time from hospitalization to death), mechanical ventilation, tissue expression of IL-4, CD117<sup>+</sup> cells, and MC score are listed in **Table 1**.

The COVID-19 group presented type 2 pneumocyte hyperplasia, hyaline membranes, and septal thickness with mild lymphocytic infiltration characterizing proliferative DAD. Furthermore, COVID-19 biopsies showed numerous fibrinous thrombi (**Figure 1**) following by neutrophilic endotheliitis. Signs of secondary bacterial pneumonia were not observed. Although the formation of hyaline membranes was also observed in H1N1 biopsies, the histopathological features of these patients were distinguished by a marked increase in septal thickness associated with lymphocytic infiltration and a massive intra-alveolar influx of neutrophils. There was no expressive neutrophilic endotheliitis in H1N1 cases. Signs of bacterial coinfection were found in 8 cases.

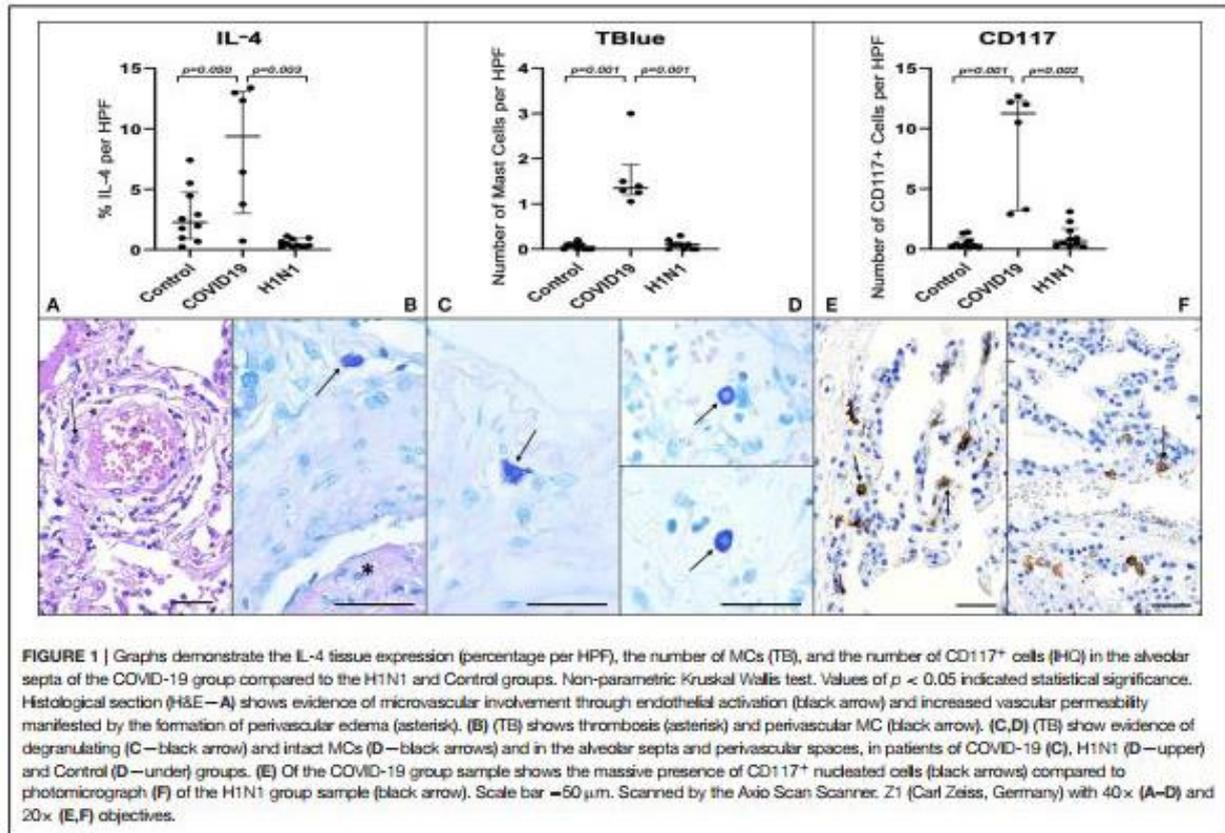
COVID-19 group samples presented numerous MCs. These innate sentinel cells were more frequently localized in the perivascular spaces between the alveolar sacs and terminal bronchioles and in the alveolar septa, close to the alveolar capillaries. The results presented in **Figure 1** and **Table 1** show the distribution of CD117<sup>+</sup> cells (IHQ) and MCs (TB) in post-mortem lung biopsies of patients with COVID-19 with a striking

difference in the number of CD117<sup>+</sup> cells and MCs between the COVID-19 group and the H1N1 ( $p = 0.002$  and  $0.001$ , respectively) and Control ( $p = 0.001$  and  $0.001$ , respectively) groups. The number of MCs counted by the TB technique was about 5-fold lower than the number of CD117<sup>+</sup> cells (IHC). MC degranulation (TB) was consistently seen in the alveolar septa of COVID-19, as well as TB<sup>+</sup> individual granules (non-nucleated) dispersed in tissues and MCs with depleted cytoplasm (**Supplementary Figure 1**).

By morphological criteria, the pulmonary cells expressing IL-4 are mainly alveolar macrophages and type II pneumocytes in all three groups (**Supplementary Figure 1**). The COVID-19 group presents statistically significant higher tissue expression of IL-4 (**Table 1** and **Figure 1**) compared to H1N1 ( $p = 0.003$ ) and Control groups ( $p = 0.0509$ , borderline).

## DISCUSSION

Despite their functional heterogeneity, human MCs are known to produce a wide range of pro-inflammatory molecules, including distinct categories of mediators stored in secretory granules. Among those that modulate endothelial barrier function are classical vasoactive mediators, such as histamine, leukotriene B4 and LTC4, prostaglandin D2, vascular endothelial growth factor, serine proteases, such as tryptase and chymase. MCs also contribute to cytokine networking by releasing the type-2



cytokine IL-4 and IL-6, a pivotal player in the systemic cytokine storm associated with severe COVID-19 (12).

Although MC-derived histamine is a classical inducer of microvascular leakage, previous analysis of MC function in allergic lung disease (13) linked bradykinin-induced inflammation to extravascular activation of plasma-borne contact factors by heparin (14) and/or polyphosphates (15), both of which are released from MC secretory granules. We observed the presence of degranulated MCs in the alveolar septa, regardless of the nature of the inflammatory mediators released by infected epithelial cells. It is tempting to speculate that MC-driven microvascular leakage favors the intra-alveolar formation of the hyaline membrane by harnessing the diffusion of plasma procoagulative factors from the interstitial space into the alveolar sac.

Previous studies in mice infected by SARS-Cov supported the concept that ACE-2 (angiotensin-converting enzyme 2) internalization following virus entry in epithelial cells worsens lung inflammation by down-modulating the surface expression of ACE-2, a key regulator of the renin-angiotensin system (16). Although the anti-inflammatory effects of ACE-2 are usually attributed to its ability to degrade angiotensin II, studies in mice deficient of ACE-2 demonstrated that this metalloprotease dampens LPS-induced inflammation in the lung

by degrading des-Arg-bradykinin, i.e., the high-affinity ligand of B1R, a subtype of endothelial bradykinin receptors whose surface expression is strongly upregulated by pro-inflammatory cytokines (16, 17).

Multiple mechanisms, including complement components (e.g., C5a) (18) and inflammatory cytokines (e.g., TNF-alpha), can mediate MC activation. Among these, immunoglobulin E (IgE) is probably the best known. Regarding the endothelial injury triggering immunothrombosis, activated MCs can release pro-inflammatory cytokines (e.g., IL-6) to induce matrix-degrading protease expression from endothelial cells, causing endothelial barrier injury. Activated MCs can also release proteases (e.g., tryptase) to induce vascular cell apoptosis, angiogenic factors to stimulate angiogenesis and histamine (19).

Another contrasting histopathological feature between COVID-19 and H1N1 described in our report was the increased numbers of IL4-expressing cells in the alveolar septa of patients with severe COVID 19. Classically produced by Th2 lymphocytes, IL-4 is a type-2 cytokine also secreted by MC, basophils, eosinophils, and innate lymphoid cells-2. Interestingly, longitudinal analysis of peripheral immune profiles of SARS-Cov-2 patients has recently revealed that cytokine signatures displayed by severe COVID-19 patients are shifted toward the type-2 cytokine profile. At the same time, type-1/3

responses are shared with the profiles of patients with moderate clinical manifestations (20). Although peripheral IL-4 responses were not as prominent as IL-5, IL-13, IgE, and eosinophils, the authors pointed out that severe clinical outcomes were associated with an upward trend for the IL-4 cytokine. Intriguingly, they also reported that levels of IgE levels were significantly higher in severe patients and continued to increase as the disease progressed.

IL-4 can impair endothelial barrier function by inducing cytoskeleton remodeling. IL-4 may upregulate the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), induce hyperpermeability and cause microvascular leakage (21). By morphological criteria, IL-4-expressing cells in COVID-19 patients include alveolar M2 macrophages and type II pneumocytes. It is unclear whether a fraction of the IL-4-expressing cells found in the alveolar septa are represented in the single-cell RNA sequencing profiles generated from peripheral blood mononuclear cells of COVID-19 patients. Interestingly, there is a precedent that IL-4 can induce hyperpermeability of vascular endothelial cells through the activation of the Wnt5A signaling pathway (21).

The presence of mast cells at the site in human tissues associated with its ability to release proangiogenic VEGF-A, histamine, tumor necrosis factor- $\alpha$  and several other vasoactive mediators of endothelial activation in the inflamed alveolar septa may have an indirect impact on platelet adhesion to the endothelial lining, and subsequent fibrin formation via cooperative activation of extrinsic/intrinsic pathways of coagulation (14, 15, 22). Inevitably, under the adverse influence of the cytokine storm, the risk of the microthrombi formation may increase. Besides, SARS-CoV-2 infection can induce lung tissue damage, resulting in activation, aggregation, and entrapment of the platelet leading to thrombosis and consumption coagulopathy (23).

While supporting the notion drug targeting of the KKS/B2R/B1R axis may protect patients from SARS (24), the experimental findings and arguments outlined in this study should encourage clinicians to conduct randomized trials to evaluate the potential benefit of low-cost therapy with MC stabilizers. Another potentially useful strategy could be to target the subsets of chemokines that presumably recruit C-kit positive MC progenitors to the injured/infected alveolar tissue, or by blocking the activity of mediators and growth factors drive MC maturation in the alveolar septa (25–27). This is the first report in the literature showing that increased MC density is a distinguishing pathological feature in the lungs of COVID-19 patients compared to H1N1-induced pneumonia.

The contrasting scores of CD117<sup>+</sup> cells and MC numbers (TB) in the alveolar septa of COVID-19 vs. H1N1 groups might reflect different rates of progenitors to the lung. Since TB staining is dependent on the presence of granules in the cytoplasm of tissue MCs when activated, MC may be undergoing active degranulation and showing reduced granule proteins in their cytoplasm, which in turn would reduce TB staining. Hence tissue MC degranulation could explain a discrepancy between CD117 and TB staining in the alveolar septa. Additional clinical studies are required to determine whether these discrepant

phenotypes are due to age factors or a more extended time from hospitalization to death of COVID-19 patients (mean 12.8 days) than H1N1 patients (mean 4.7 days). Finally, the finding that CD117<sup>+</sup> cells showed higher scores (about 5-fold over TB) suggests that the c-kit positive cells could include MCs and their progenitors, blood progenitor cells, CD31<sup>+</sup> cells, and type 2 innate lymphoid cells (28).

Our study presents some limitations that merit consideration. Given the scarcity of larger samples of collected post-mortem lung biopsies in this highly contagious environment of COVID-19 Intensive Care Units, our sample is limited. It is essential to interpret our findings with caution and validate them in other samples to replicate our results. Additionally, data based on FFPE post-mortem samples only provide static information at the time of death. They cannot reconstruct the evolving disease process. Furthermore, the COVID-19 and H1N1pdm09 are different pandemic diseases concerning their demographic risk groups, pathophysiology mechanisms, and coinfection prevalence.

In conclusion, we propose that drugs that uncouple the MC link to pro-inflammatory proteolytic networks, such as complement and the kallikrein-kinin cascade, may inhibit interstitial edema in the alveolar septa. By protecting the microvasculature from excessive leakage, MC stabilizing drugs may limit the intra-alveolar formation of the hyaline membrane while attenuating immunothrombosis in severe COVID-19.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/Supplementary Material.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by National Research Ethics Committee (Conselho Nacional de Ética em Pesquisa—CONEP), protocol number 3.944.734/2020 and 2.550.445/2018. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JM, AM, CB, JS, and LN: study design, data collection, writing, and critically reviewing the manuscript. JM, AM, SN, CP, and LN: data analysis and interpretation. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

AM was a recipient from a CAPES COVID 19 scholarship, LN was a researcher from CNPq, and JS was a recipient of FAPERJ/Pronex E-26/210.899/2016; CNE E-26/202.911/2017 CNPQ/Uni 432841/2016-4.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.574862/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Marini JJ, Gattinoni L. Management of COVID-19 respiratory distress. *J Am Med Assoc.* (2020) 323:2329–30. doi: 10.1001/jama.2020.6825
- Fox SE, Akmatbekov A, Harbert JL, Li G, Brown JQ, Heide RSV. Pulmonary and cardiac pathology in Covid-19: the first autopsy series from New Orleans. *medRxiv.* (2020) 2020.04.06.20050575. doi: 10.1101/2020.04.06.20050575
- Henry BM, Vikse J, Benoit S, Favalaro EJ, Lippi G. Hyperinflammation and derangement of renin-angiotensin-aldosterone system in COVID-19: a novel hypothesis for clinically suspected hypercoagulopathy and microvascular immunothrombosis. *Clin Chim Acta.* (2020) 507:167–73. doi: 10.1016/j.cca.2020.04.027
- Nascimento CR, Andrade D, Carvalho-Pinto CE, Serra RR, Velasco L, Brasil G, et al. Mast cell coupling to the kallikrein-kinin system fuels intracardiac parasitism and worsens heart pathology in experimental chagas disease. *Front Immunol.* (2017) 8:840. doi: 10.3389/fimmu.2017.00840
- Guillarte M, Sala-Cunill A, Luengo O, Labrador-Horrillo M, Cardona V. The mast cell, contact, and coagulation system connection in anaphylaxis. *Front Immunol.* (2017) 8:846. doi: 10.3389/fimmu.2017.00846
- Scharfstein J. Subverting bradykinin-evoked inflammation by co-opting the contact system. *Curr Opin Hematol.* (2018) 25:347–57. doi: 10.1097/MOH.0000000000000444
- Marshall JS, Portales-Cervantes L, Leong E. Mast cell responses to viruses and pathogen products. *Int J Mol Sci.* (2019) 20:1–18. doi: 10.3390/ijms20174241
- Kritas SK, Ronconi G, Caraffa A, Gallenga CE, Ross R, Conti P. Mast cells contribute to coronavirus-induced inflammation: new anti-inflammatory strategy. *J Biol Regul Homeost Agents.* (2020) 34:9–14. doi: 10.23812/20-Editorial-Kritas
- Theoharides TC. COVID-19, pulmonary mast cells, cytokine storms, and beneficial actions of luteolin. *Biofactors.* (2020) 46:306–8. doi: 10.1002/biof.1633
- Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu W-C, Uhl S, Hoagland D, Møller R, et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell.* (2020) 181:1036–45. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.026
- Wang HQ. Comparison of epidemiological and clinical characteristics of SARS, pandemic (H1N1) 2009 and COVID-19, and consideration of the prevention and control strategies on COVID-19. *Zhonghua yi Fang yi xue za zhi.* (2020) 54:713–9. doi: 10.3760/cma.j.cn112150-20200403-00508
- Xu X, Han M, Li T, Sun W, Wang D, Fu B, et al. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2020) 117:10970–5. doi: 10.1073/pnas.2005615117
- Sala-Cunill A, Björkqvist J, Senter R, Guillarte M, Cardona V, Labrador M, et al. Plasma contact system activation drives anaphylaxis in severe mast cell-mediated allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol.* (2015) 135:1031–43.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2014.07.057
- Oschatz C, Maas C, Lecher B, Jansen T, Björkqvist J, Tradler T, et al. Mast cells increase vascular permeability by heparin-initiated bradykinin formation *in vivo*. *Immunity.* (2011) 34:258–68. doi: 10.1016/j.immuni.2011.02.008
- Moreno-Sanchez D, Hernandez-Ruiz L, Ruiz FA, Docampo R. Polyphosphate is a novel pro-inflammatory regulator of mast cells and is located in acidocalcisomes. *J Biol Chem.* (2012) 287:28435–44. doi: 10.1074/jbc.M112.385823
- Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med.* (2005) 11:875–9. doi: 10.1038/nm1267
- Sodhi CP, Wohlford-Lenane C, Yamaguchi Y, Prinsle T, Fulton WB, Wang S, et al. Attenuation of pulmonary ACE2 activity impairs inactivation of des-arg9 bradykinin/BKB1R axis and facilitates LPS-induced neutrophil infiltration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (2018) 314:L17–31. doi: 10.1152/ajplung.00498.2016
- Carvellì J, Demaria O, Vély F, Batista L, Benmansour NC, Fares J, et al. Association of COVID-19 inflammation with activation of the C5a-C5aR1 axis. *Nature.* (2020). doi: 10.1038/s41586-020-2600-6. [Epub ahead of print].
- Wang J, Lindholt JS, Sukhova GK, Shi MA, Xia M, Chen H, et al. IgE actions on CD4<sup>+</sup> T cells, mast cells, and macrophages participate in the pathogenesis of experimental abdominal aortic aneurysms. *EMBO Mol Med.* (2014) 6:952–69. doi: 10.15252/emmm.201303811
- Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature.* (2020) 584:463–9. doi: 10.1038/s41586-020-2588-y
- Skaria T, Burgener J, Bachli E, Schoedon G. IL-4 causes hyperpermeability of vascular endothelial cells through Wnt5A signaling. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0156002. doi: 10.1371/journal.pone.0156002
- Ponomarev T, Payne H, Fabritz L, Wagner DD, Brill A. Mast cells granular contents are crucial for deep vein thrombosis in mice. *Circ Res.* (2017) 121:941–50. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311185
- Zhao X, Wang K, Zuo P, Liu Y, Zhang M, Xie S, et al. Early decrease in blood platelet count is associated with poor prognosis in COVID-19 patients—indications for predictive, preventive, and personalized medical approach. *EPMA J.* (2020) 11:139–45. doi: 10.1007/s13167-020-00208-z
- van de Veerdonk FL, Netea MG, van Deuren M, van der Meer JW, de Mast Q, Brüggemann RJ, et al. Kallikrein-kinin blockade in patients with COVID-19 to prevent acute respiratory distress syndrome. *Elife.* (2020) 9:e57555. doi: 10.7554/eLife.57555.sa2
- Weng Z, Patel AB, Panagiotidou S, Theoharides TC. The novel flavone tetramethoxyluteolin is a potent inhibitor of human mast cells. *J Allergy Clin Immunol.* (2015) 135:1044–52.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.032
- Patel AB, Theoharides TC. Methoxyluteolin inhibits neuropeptide-stimulated proinflammatory mediator release via mTOR activation from human mast cells. *J Pharmacol Exp Ther.* (2017) 361:462–71. doi: 10.1124/jpet.117.240564
- Bawazeer MA, Theoharides TC. IL-33 stimulates human mast cell release of CCL5 and CCL2 via MAPK and NF- $\kappa$ B, inhibited by methoxyluteolin. *Eur J Pharmacol.* (2019) 865:172760. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172760
- Zhou Y, Pan P, Yao L, Su M, He P, Niu N, et al. CD117-positive cells of the heart: progenitor cells or mast cells? *J Histochem Cytochem.* (2010) 58:309–16. doi: 10.1369/jbc.2009.955146

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Motta Junior, Miggiolaro, Nagashima, de Paula, Baena, Scharfstein and de Noronha. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## 6.0 Limitações

O presente trabalho apresentou algumas limitações a serem consideradas. Em decorrência do pequeno número de amostras que compõe o grupo COVID-19, justificada pela dificuldade da coleta de amostras pulmonares de biópsia *post mortem* em um ambiente altamente contagioso de UTI.

Dados obtidos a partir de amostras pulmonares parafinadas *post mortem* permitem predizer informações estáticas, relacionadas ao momento em que o paciente morreu. Outras informações a respeito da evolução da doença não podem ser inferidas.

A comparação entre pacientes acometidos pela COVID-19 e H1N1pdm09, sendo duas doenças pandêmicas diferentes, no ponto de vista clínico, relativas a seus grupos de risco demográfico, mecanismos fisiopatológicos e prevalência de coinfeccões também deve ser levado em consideração.

## 7.0 Conclusão

No presente estudo, o gênero não possui diferença estatística entre os grupos analisados. Entretanto, a idade elevada está associada como um fator de risco para indivíduos acometidos pela COVID-19, tendo uma média maior em relação aos pacientes pertencentes aos demais grupos.

Em relação aos marcadores imunohistoquímicos avaliados, o percentual de IL-4 tecidual, o número de mastócitos e de seus precursores, assim como o número de mastócitos íntegros granulados e em processo de desgranulação foram mais elevados no grupo COVID-19, quando comparados aos demais grupos.

Por conta da presença aumentada de mastócitos no ambiente pulmonar, associada à sua ativação por consequência das respostas inflamatórias exacerbadas, fica evidente a participação direta destas células ativadas e de seus mediadores citoplasmáticos nos processos fisiopatológicos correlacionados à gravidade da COVID-19.

A fim de se elucidar a participação dos mastócitos na COVID-19 mais profundamente, estudos adicionais envolvendo uma maior quantidade de amostras são indispensáveis.

## **8.0 Considerações finais**

Considerando que até o presente momento não há tratamentos precoces consagrados pela literatura para os sintomas causados pelo vírus SARS-CoV-2, somada à quantidade aumentada de mastócitos observados no ambiente pulmonar e perivascular dos pacientes que foram a óbito pela doença, sugere-se o uso terapêutico de drogas que inibam a ação pró-inflamatória dos mediadores secretados por essas células. Estudos recentes sugerem o reaproveitamento de drogas com ação antagonista aos receptores de histamina.

A atuação dos anti-histamínicos surge como uma opção com propósito de atenuar a ação de seu mediador no contexto inflamatório, tanto no ambiente pulmonar, como vascular. Isso porque a histamina age diretamente no aumento da permeabilidade vascular, promovendo edema intersticial e intra-alveolar e conseqüentemente quadro agudo de DAD.

## 9.0 Passagem para doutorado

### 9.1 Introdução

Mastócitos são conhecidos por sua ação nas respostas alérgicas e inflamatórias. No momento em que antígenos desencadeiam a sua ativação, através da sua ligação cruzada com IgE e a ligação com seu receptor de afinidade FcεRI, dão início a uma cascata de secreção de mediadores químicos armazenados em seu citoplasma (31). Entretanto, o processo de desgranulação mediados por IgE não são os únicos fatores a promover tal evento. Mastócitos conservam uma miríade de diferentes classes de receptores que, ao serem sinalizados através de seus ligantes, também induzem essa célula sentinela à desgranular (21).

Dentre os receptores de membrana promotores da ativação dos mastócitos independentes das IgEs, destacam-se os Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs), incumbidos ao reconhecimento de PAMPs e DAMPs, alarminas compreendidas por fragmentos celulares piroptóticos e fragmentos de patógenos e material genético resultante da resposta inflamatória inata e adaptativa (19,21).

Citocinas também estão vinculadas ao processo de ativação e desgranulação de mastócitos. Interleucina 33 (IL-33), citocina do tipo 1 pertencente à família da IL-1 largamente imunoexpressa em células epiteliais que estão em contato direto com o ambiente externo, também podem ativar mastócitos. São secretadas após insultos decorrentes de lesões, inflamação ou qualquer outro tipo de estresse, incluindo apoptose. Tem como receptor outra proteína da família da IL-1: ST2, ou receptor de Interleucina 1 solúvel do tipo 1 (IL-1RL1), amplamente expressa na superfície de mastócitos (21,41).

Como resposta à ativação e secreção dos mediadores pré-armazenados sob grânulos citoplasmáticos, uma enorme variedade de respostas fisiológicas é desencadeada local e sistemicamente. Histamina, uma amina vasoativa pertencente à uma classe de mediadores envolvidos na regulação do tônus e permeabilidade vascular, possui influência direta na dinâmica

da passagem de exsudato plasmático circulante ao tecido (32). Como consequência, inicia-se o quadro de edema intersticial, formação de membranas hialinas que recobrem a parede luminal alveolar e apoptose de pneumócitos do tipo I e sua substituição por pneumócitos do tipo II, características do dano alveolar difuso (DAD) (14).

A lesão da estrutura pulmonar promovida diretamente pelos mediadores mastocitários não é a única fonte do aumento da permeabilidade vascular, fator este que proporciona o agravamento da doença (34).

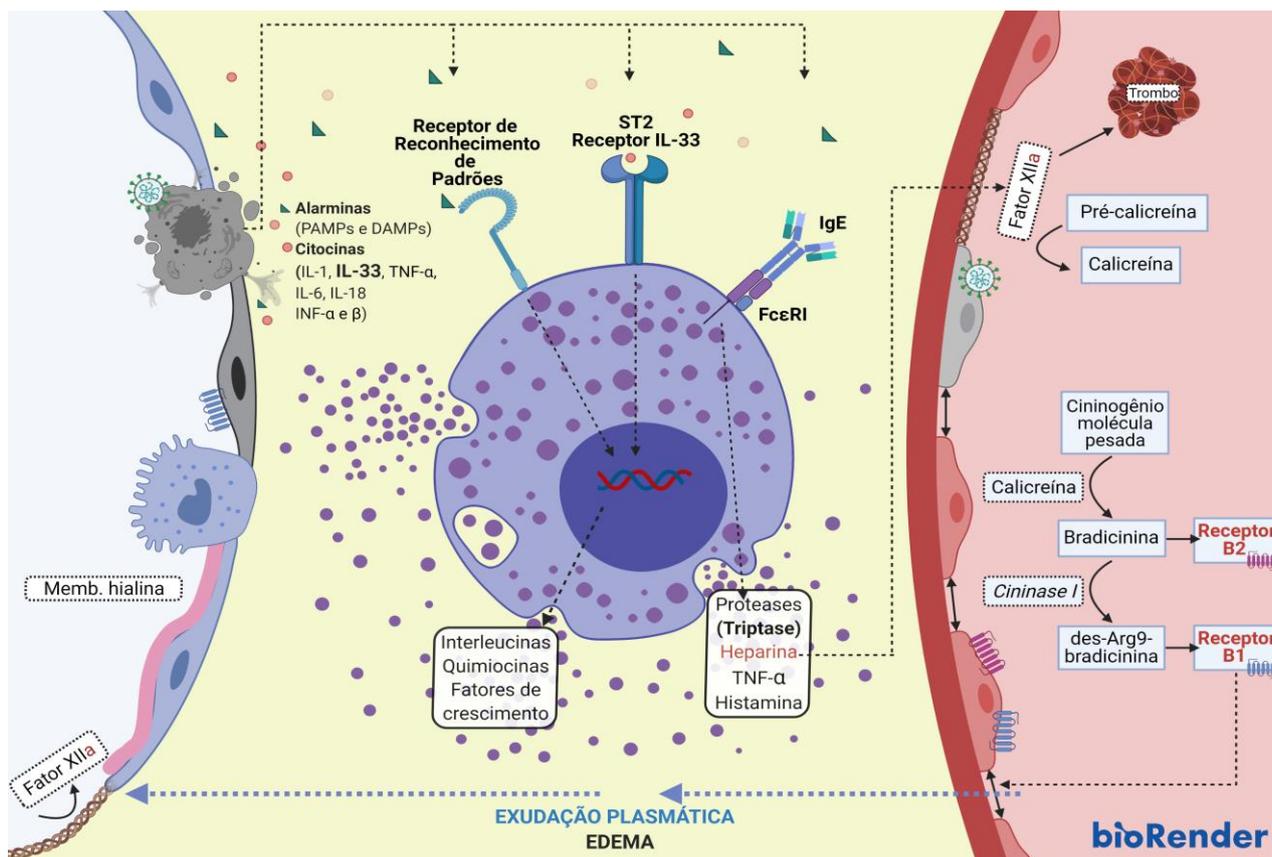
Dentre os diversos mediadores químicos secretados pela ativação dessa célula, a heparina surge indiretamente como pivô a iniciar uma complexa resposta inflamatória, envolvendo o Sistema de Ativação por Contato (CAS, do inglês *Contact Activation System*), que se resume a uma cascata proteolítica atuante na coagulação intravascular, inflamação e intensificação da permeabilidade vascular (21,34,42). A heparina, de maneira semelhante ao colágeno, ácidos nucleicos (DNA e RNA) e compostos artificiais como vidros e polímeros, leva a clivagem proteolítica do FXII à sua forma ativada (FXIIa), devido a sua atração elétrica por superfícies de carga negativa (43). O FXIIa possui um papel central no sistema de ativação por contato, seja atuando diretamente no início da cascata de coagulação das vias intrínsecas e extrínsecas, seja dando início ao KKS, convertendo a pré-caliceína em sua forma ativa circulante: a caliceína. Esta última ainda tem a capacidade de hidrolisar a forma neutra FXII, ativando-a, em um ciclo positivo de retroalimentação (43,44).

A caliceína é um polipeptídeo com funções de degradação proteica. No KKS, tem um papel fundamental na clivagem proteolítica dos cininogênios de alto peso molecular e baixo peso molecular, ambos sintetizados pelo fígado (44). Como resultado da ação da caliceína, o cininogênio de alto peso molecular é degradado no hormônio nonaptídico bradicinina, enquanto o cininogênio de baixo peso molecular é metabolizada na forma de calidina, um decapeptídeo com atuação fisiológica idêntica à bradicinina (34,45). Ambas têm como alvo os receptores de bradicinina 1 (B1R) e 2 (B2R). Enquanto BR2 são constitutivamente presentes em grande parte

dos tecidos, principalmente na vasculatura endotelial, B1R é ativado focalmente em situações de lesão tecidual, estresse e quadros inflamatórios (46). Deve-se ressaltar que os alvos do receptor B1R são as formas degradadas de bradicinina e calidina, resultado da ação enzimáticas de *cininases* (44). A ligação das cininas com seus respectivos receptores agonistas desencadeia processos de regulação do tônus vascular e inflamatórios, incluindo aumento da permeabilidade vascular e dor (47). O processo de desgranulação do mastócito, resultando na secreção de heparina e conseqüentemente no início da ativação do Sistema Contato e Sistema da Calicreína-Cinina pode ser observada pela representação gráfica da **Figura 5**.

## **9.2 Justificativa**

A participação dos mastócitos está evidente no agravamento do quadro inflamatório em pacientes acometidos pela COVID-19, dada a sua elevada densidade no tecido intersticial e perivascular pulmonar. Lesões e edema provocados em decorrência de uma permeabilidade vascular exagerada induzida por alguns de seus mediadores fazem correlação direta com desfechos desfavoráveis na COVID-19.



**Figura 5: Ativação e desgranulação dos mastócitos e seu papel indireto no aumento da permeabilidade vascular.** Representação gráfica ilustrando a atuação dos mastócitos no agravamento da doença, em decorrência de sua ativação através das citocinas secretadas durante os eventos de piroptose e a tempestade de citocinas, com destaque para IL-33, ou ainda por resíduos de fragmentos virais e celulares piroptóticos (PAMPs e DAMPs). IgE também participa da ativação dessas células. Como consequência, uma grande quantidade de mediadores químicos armazenados no citoplasma dos mastócitos é secretada. Entre essas substâncias, àquelas que atuam na vasodilatação e promoção do aumento da permeabilidade vascular possuem grande importância na doença, uma vez que contribuem diretamente para o extravasamento plasmático intersticial e alveolar, acarretando no aumento da lesão pulmonar, edema e formação de membrana hialina intra-alveolar; esta última originando o dano alveolar difuso (DAD). Em contrapartida, mediadores como a heparina tem atuação indireta no processo de edema intersticial e DAD. Heparina tem a capacidade de ativar Fator XII, que estimula a cascata proteolítica de coagulação e contribui com os quadros de microtrombose. Fator XII ativado também fomenta o início do sistema caliceína-cinina, que tem como desfecho a excreção do quadro inflamatório e exsudativo. Confeccionado com BioRender.com. **Fonte:** o autor, 2021.

### 9.3 Objetivo Geral

O estudo em questão tem como proposta avaliar a imunexpressão tecidual dos marcadores imunohistoquímicos anti-IL-33, anti-B1R, anti-B2R, bem como quantificar mastócitos sensibilizados pela imunoglobulina do tipo E e em processo de síntese e armazenamento de triptase em amostras pulmonares de pacientes com COVID-19. Tem-se ainda como objetivo detectar células em decurso apoptótico nas amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por COVID-19.

#### **9.4 Objetivos específicos**

- Caracterizar as amostras estudadas de acordo com o gênero e faixa etária;
- Realizar a detecção de células em processo de dano e fragmentação de seu DNA nas amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por COVID-19;
- Avaliar a imunexpressão imunohistoquímica tecidual dos receptores B1 e B2 da bradicinina e seus derivados em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por COVID-19;
- Avaliar a imunexpressão imunohistoquímica tecidual de IL-33 em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por COVID-19;
- Quantificar o número de mastócitos em processo de síntese e armazenamento de triptase em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por COVID-19;
- Quantificar o número de mastócitos sensibilizados por IgE em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por COVID-19;
- Comparar os resultados acima com amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por H1N1pdm09;
- Comparar os resultados acima com amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por outras causas que não lesão pulmonar (controles).

#### **9.4 Metodologia amostras**

Os dados clínicos dos pacientes que foram a óbito por COVID-19 (grupo COVID-19) são originários dos prontuários médicos durante a internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Marcelino Champagnat em Curitiba, Brasil, bem como as amostras pulmonares *post mortem* (n = 24). O teste para COVID-19 foi realizado em esfregaços nasofaríngeos adquiridos durante o período de internação, a fim de se realizar a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR). A amplificação do genoma viral foi efetuada com o kit Invitrogen

SuperScript™ III Platinum® One-Step qRT-PCR (número Catálogo: 11732020, Massachusetts, Estados Unidos), positivos para SARS-CoV-2.

O grupo H1N1 apresenta amostras *post mortem* de pulmões de pacientes cuja causa de morte foi infecção respiratória aguda grave por H1N1pdm09 (n = 10) durante a pandemia de 2009. Os pacientes foram testados por meio de amostras frescas de biópsias pulmonares post-mortem, e a RT-qPCR realizada (técnica similar à do grupo COVID-19) foi positiva para H1N1pdm09.

O grupo CONTROLE (n = 11) é composto por amostras pulmonares provenientes de necropsias de pacientes que morreram por doença cardiovascular e neoplásica, não envolvendo lesões pulmonares.

Para facilitar a execução dos ensaios técnicos histoquímicos e imunohistoquímicos, foi procedido à construção de blocos teciduais parafinados multiamostrais (TMA, do inglês Tissue Microarray) com a retirada de fragmentos cilíndricos medindo aproximadamente 0,3cm de diâmetro das áreas pulmonares dos blocos originais (blocos-doadores), sendo estas organizadas em novos blocos de parafina multiamostrais (blocos receptores).

## 10.0 Referência bibliográfica

1. Kumar M, Taki K, Gahlot R, Sharma A, Dhangar K. A chronicle of SARS-CoV-2: Part-I - Epidemiology, diagnosis, prognosis, transmission and treatment. *Sci Total Environ* [Internet]. 2020;734(336):139278. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139278>.
2. Ge H, Wang X, Yuan X, Xiao G, Wang C, Deng T, et al. The epidemiology and clinical information about COVID-19. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2020 Jun;39(6):1011–9.
3. Google. Google Trends [Internet]. 2004 [cited 2020 Dec 20]. Available from: <https://trends.google.com/trends/?geo=US>.
4. CDC Novel H1N1 Flu |CDC Estimates of 2009 H1N1 Influenza Cases, Hospitalizations and Deaths in the United States, April 2009 – January 16, 2010 [Internet]. [cited 2020 Dec 20]. Available from: [https://www.cdc.gov/h1n1flu/estimates/April\\_March\\_13.htm](https://www.cdc.gov/h1n1flu/estimates/April_March_13.htm).
5. Abdelrahman Z, Li M, Wang X. Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses. *Front Immunol*. 2020;11(November 2002).
6. WHO | World Health Organization [Internet]. [cited 2021 Feb 21]. Available from: <https://www.who.int/>.
7. Huang X, Wei F, Hu L, Wen L, Chen K. Epidemiology and Clinical Characteristics of COVID-19. *Arch Iran Med*. 2020 Apr;23(4):268–71.
8. Pereira A, Vaz de Paula C, Vedor de Paula E, Noronha L. PANDEMIC AND TERRITORY: DIFFUSION RHYTHM OF COVID-19 AMONG BRAZILIAN MUNICIPALITIES FROM FEBRUARY 25 TO MAY 11, 2020 ACCORDING

TO EXTRAMUNICIPAL SOCIAL PROXIMITY FACTORS. *Hygeia - Rev Bras Geogr Médica e da Saúde*. Accepted o.

9. Read J, Bridgen J, Cummings D, Ho A, Jewell C. Novel coronavirus 2019-nCoV: early estimation of epidemiological parameters and epidemic predictions. medRxiv [Internet]. 2020 Jan 28 [cited 2020 Dec 20];2020.01.23.20018549. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.01.23.20018549>.
10. Situação da Gripe [Internet]. Available from: <http://info.gripe.fiocruz.br/>.
11. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;323(11):1061–9.
12. Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemeology and pathogenesis of coronavirus (Covid-19) outbreak. *J Autoimmun*. 2020;109(January):1–4.
13. Yuki K, Fujiogi M, Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: A review Koichi. 2020;(January).
14. Anna Flavia Ribeiro dos Santos Miggiolaro a, Jarbas da Silva Motta Junior a, Caroline Busatta Vaz de Paula a, Seigo Nagashima a, Mineia Alessandra Scaranello Malaquias a, Lucas Baena Carstens b, Andrea N Moreno-Amaral c, Cristina Pellegrino Baena d L de N. Covid-19 cytokine storm in pulmonary tissue: Anatomopathological and immunohistochemical findings. *Diabetes Metab Syndr*. 2020;14(4)(January):337–9.
15. McGonagle D, Sharif K, O'Regan A, Bridgewood C. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2020;19(6):102537. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102537>.
16. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol*

- [Internet]. 2020;2:0–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.26232>
17. Nagashima S, Mendes MC, Camargo Martins AP, Borges NH, Godoy TM, Miggiolaro AFRDS, et al. Endothelial dysfunction and thrombosis in patients with COVID-19 - Brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;(October):2404–7.
  18. Yap JKY, Moriyama M, Iwasaki A. Inflammasomes and Pyroptosis as Therapeutic Targets for COVID-19. *J Immunol.* 2020;205(2):307–12.
  19. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486–541.
  20. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: Host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(2):99–109.
  21. Redegeld FA, Yu Y, Kumari S, Charles N, Blank U. Non-IgE mediated mast cell activation. *Immunol Rev.* 2018;282(1):87–113.
  22. Weiskirchen R, Meurer SK, Liedtke C, Huber M. Mast Cells in Liver Fibrogenesis. *Cells.* 2019;8(11):1–33.
  23. Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med [Internet].* 2012;106(1):9–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmed.2011.09.007>
  24. Atiakshin D, SamoiloVA V, Buchwalow I, Boecker W, Tiemann M. Characterization of mast cell populations using different methods for their identification. *Histochem Cell Biol.* 2017;147(6):683–94.
  25. Ribatti D. The Staining of Mast Cells: A Historical Overview. *Int Arch Allergy Immunol.* 2018;176(1):55–60.
  26. Metz M, Maurer M. Mast cells - key effector cells in immune responses. *Trends Immunol.* 2007;28(5):234–41.
  27. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune

- responses. *Nat Immunol.* 2005;6(2):135–42.
28. Graham AC, Temple RM, Obar JJ. Mast cells and influenza A virus: Association with allergic responses and beyond. *Front Immunol.* 2015;6(MAY):1–12.
  29. Khoury P, Lyons JJ. Mast cell activation in the context of elevated basal serum tryptase: genetics and presentations. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2019;19(12).
  30. Zhang T, Finn DF, Barlow JW, Walsh JJ. Mast cell stabilisers. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2016;778:158–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.071>.
  31. Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: Armed for battle. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2014;14(7):478–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3690>.
  32. Kunder CA, St John AL, Abraham SN. Mast cell modulation of the vascular and lymphatic endothelium. *Blood.* 2011;118(20):5383–93.
  33. Lagunoff D, Rickard A. Mast cell granule heparin proteoglycan induces Lacunae in confluent endothelial cell monolayers. *Am J Pathol* [Internet]. 1999;154(5):1591–600. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65412-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65412-0).
  34. Oschatz C, Maas C, Lecher B, Jansen T, Björkqvist J, Tradler T, et al. Mast Cells Increase Vascular Permeability by Heparin-Initiated Bradykinin Formation In Vivo. *Immunity.* 2011;34(2):258–68.
  35. Xu H, Bin NR, Sugita S. Diverse exocytic pathways for mast cell mediators. *Biochem Soc Trans.* 2018;46(2):235–47.
  36. Mukai K, Tsai M, Saito H, Galli SJ. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunol Rev.* 2018;282(1):121–50.
  37. Steeland S, Libert C, Vandenbroucke RE. A new venue of TNF targeting. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5):1–55.

38. Solymar DC, Agarwal S, Bassing CH, Alt FW, Rao A. A 3' enhancer in the IL-4 gene regulates cytokine production by Th2 cells and mast cells. *Immunity*. 2002;17(1):41–50.
39. Skaria T, Burgener J, Bachli E, Schoedon G. IL-4 causes hyperpermeability of vascular endothelial cells through Wnt5A signaling. *PLoS One*. 2016;11(5):1–22.
40. Yang CL, Sun YH, Yu WH, Yin XZ, Weng J, Feng B. Modulation of macrophage phenotype through controlled release of interleukin-4 from gelatine coatings on titanium surfaces. *Eur Cells Mater*. 2018;36:15–29.
41. Mehraj V, Ponte R, Routy JP. The Dynamic Role of the IL-33/ST2 Axis in Chronic Viral-infections: Alarming and Adjuvanting the Immune Response. *EBioMedicine* [Internet]. 2016;9:37–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.047>.
42. Scharfstein J. Subverting bradykinin-evoked inflammation by co-opting the contact system: Lessons from survival strategies of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Hematol*. 2018;25(5):347–57.
43. Naudin C, Burillo E, Blankenberg S, Butler L, Renné T. Factor XII Contact Activation. *Semin Thromb Hemost*. 2017;43(8):814–26.
44. Schmaier AH. The contact activation and kallikrein/kinin systems: Pathophysiologic and physiologic activities. *J Thromb Haemost*. 2016;14(1):28–39.
45. Ghebrehiwet B, Kaplan AP, Joseph K, Peerschke EIB. The complement and contact activation systems: partnership in pathogenesis beyond angioedema. *Immunol Rev*. 2016;274(1):281–9.
46. Kastin A. Handbook of biologically active peptides [Internet]. 2nd ed. 2013 [cited 2021 Feb 28]. Available from: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=Xz4yFpdSRrwC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Handbook+of+Biologicall>

y+Active+Peptides&ots=0YJcKh3Ciz&sig=gEJaLpqb1fBSMHtgIK-  
LqZ0UMkQ.

47. Dagnino APA, Campos MM, Silva RBM. Kinins and their receptors in infectious diseases. *Pharmaceuticals*. 2020;13(9):1–28.

## 11.0 Anexos

### Anexo 1

# COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



## PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** COVID19

Caracterização clínica e epidemiológica de pacientes atendidos em Curitiba-PR

**Pesquisador:** Cristina Pellegrino Baena

**Área Temática:** A critério do CEP

**Versão:** 1

**CAAE:** 30188020.7.1001.0020

**Instituição Proponente:** Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.944.734

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram encontrados óbices éticos nos documentos do protocolo.

#### Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

#### Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 31 de Março de 2020

Assinado por:

**Jorge Alves de Almeida Venancio**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## Anexo 2



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Expressão tecidual de moléculas de adesão e de interleucinas, em amostras pulmonares de pacientes que foram a óbito por pneumopatias graves pandêmicas (Influenza A H1N1) e não-pandêmicas.

**Pesquisador:** Lúcia de Noronha

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 76401717.0.3001.0020

**Instituição Proponente:** Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.550.445

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está objetivamente relatada, não havendo qualquer necessidade de outros esclarecimentos.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos necessários para a realização do projeto foram apresentados e estão em conformidade com a Resolução CNS N° 466 de 2012.

#### Recomendações:

Não se aplica.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 466/2012, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou ementas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

#### Situação do Parecer:

Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 19 de Março de 2018

Assinado por:  
**NAIM AKEL FILHO**  
(Coordenador)

**Endereço:** Rua Imaculada Conceição 1155  
**Bairro:** Prado Velho **CEP:** 80.215-901  
**UF:** PR **Município:** CURITIBA  
**Telefone:** (41)3271-2103 **Fax:** (41)3271-2103 **E-mail:** nep@pucpr.br

# Termo de consentimento livre e esclarecido

## Post-Mortem

O objetivo deste estudo é descrever sinais, sintomas, e demais aspectos da apresentação do quadro clínico, exames laboratoriais, evolução da doença, juntamente com alterações da pulmonares em pacientes com COVID-19.

O vírus SARS-CoV-2 emergiu no último bimestre de 2019, em que a doença provocada por este microrganismo foi reportada inicialmente na China, espalhando-se rapidamente pelos continentes, até que em 11 de março de 2020, a Organização Mundial de Saúde decretou estado de pandemia. O surto foi identificado como uma série de casos de pneumonia em que muitos pacientes evoluíram para insuficiência respiratória e óbito.

Embora existam muitos estudos em andamento para busca de tratamento e vacina, ainda não existe evidência definitiva de cura para toda a população.

### PROCEDIMENTOS:

1. Biópsia minimamente invasiva de fragmento pulmonar (dimensões de 3x3 cm), através de incisão com corte sobre a pele com comprimento entre 5 e 10 cm, em face anterior de tórax (peito) à esquerda.
2. Biópsia minimamente invasiva de fragmento de miocárdio (músculo do coração), com dimensões de 1x1 cm, quando acessível pela mesma abertura no tórax.
3. Biópsia minimamente invasiva de fragmento de músculo esquelético intercostal, com dimensões de 1x1 cm, quando acessível pela mesma abertura no tórax.
4. Biópsia de rim minimamente invasiva, guiada por Ultrassom, com punção por agulha para tecidos, com fragmentos de aproximadamente 10 a 20 mm.
5. Biópsia de fígado minimamente invasiva, guiada por Ultrassom, com punção por agulha para tecidos, com fragmentos de aproximadamente 10 a 20 mm.

### ANÁLISES:

A partir dos fragmentos de pulmão, coração, rim, músculo esquelético e fígado (quando coletados) serão realizados preparos em formato de lâminas para estudo de células, proteínas, anticorpos, presença do vírus, estudos genéticos e imunológicos.

### RISCOS:

Não há existência de qualquer risco biológico ao doador ou familiares em decorrência dos procedimentos a serem realizadas pela pesquisa.

### BENEFÍCIOS:

A autorização de coleta destas amostras de sangue e tecido pelos familiares do doador trazem como benefício a possibilidade de execução de estudos em busca de compreensão da nova doença provocada pelo vírus SARS-CoV2, além de contribuição para o desenvolvimento de linhas de tratamento e prevenção, como descrito acima.

## SIGILO E PRIVACIDADE:

Estou ciente de minha privacidade respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma me identificar será mantido em sigilo. Os pesquisadores se responsabilizam pela guarda e confidencialidade dos dados, bem como a não exposição dos dados de pesquisa.

## RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO:

Todas as despesas serão de responsabilidade dos Pesquisadores. Os participantes da pesquisa bem como seu acompanhante (se houver) não arcarão com nenhum custo referente a procedimento, exames, transporte, alimentação ou outros. Caso ocorra qualquer despesa, haverá ressarcimento dos valores gastos na forma seguinte: depósito em conta. Caso ocorra algum dano decorrente da minha da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado.

## CONTATO

Os pesquisadores envolvidos com o estudo são Juliano Gasparetto, Cristina Baena, Anna Flavia Miggiolaro, Felipe Tuon, Andrea Moreno, Lucia Noronha, Thyago Moraes, Lidia Moura, José Faria, Gustavo Lenci, que são pesquisadores e professores na Escola de Medicina da PUCPR e com eles poderei manter contato pelos telefones (41)3271-2979. O Conselho Nacional de Pesquisa (CONEP) é composto por um grupo de pessoas que estão trabalhando para garantir que seus direitos como participante de pesquisa sejam respeitados. Ele tem a obrigação de avaliar se a pesquisa foi planejada e se está sendo executada de forma ética. Se você achar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como você imaginou ou que está sendo prejudicado de alguma forma, você pode entrar em contato com o CONEP pelo telefone (61)3315-5877 entre segunda e sexta-feira das 08h às 18h ou pelo e-mail conep@saude.gov.br Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, Lote D 3º andar Brasília.

Por meio deste instrumento eu \_\_\_\_\_ (nome completo), \_\_\_\_\_ (grau de parentesco com o paciente), RG \_\_\_\_\_ autorizo a biópsia post-mortem do paciente após seu óbito para fins de determinação da causa de morte, doenças primárias, doenças não diagnosticadas e relacionar com a suspeita de infecção por Coronavírus (COVID-19).

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Data de óbito: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Hora de óbito: \_\_\_\_\_

Hospital em que ocorreu o óbito: \_\_\_\_\_

Declaro estar ciente que:

- O procedimento implica na retirada de amostras de órgãos do paciente de maneira minimamente invasiva.
- As amostras retiradas serão mantidas e acondicionadas respeitando o sigilo médico-paciente assim como as normas e padrões de confidencialidade e ética aplicadas a pesquisa científica.
- Esta biópsia post-mortem **não tem caráter pericial**, não sendo indicada para causas de morte não naturais ou suspeita, não importando o tempo entre o evento e a morte do paciente.
- Também autorizo o uso das amostras coletadas provenientes do exame de biópsia post-mortem para ensino e pesquisa, desde que sejam cumpridas as normas vigentes no país para esse fim.
- Declaro que tive respostas para minhas perguntas e que fui informado de forma satisfatória sobre o(s) procedimento(s) acima descrito(s).

Sendo assim expresso meu livre consentimento esclarecido para a biopsia post-mortem no Hospital:

---

Assinatura do parente ou responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura e CRM do médico solicitante: \_\_\_\_\_

Curitiba \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_.

Este documento deve ser preenchido em uma única via, assinado por todos, e anexado ao prontuário do paciente.