

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Diego Brito Caetité

**Participação da Anfiregulina (AREG) na Fisiopatologia da COVID-19**

Ribeirão Preto  
2022

Diego Brito Caetité

## **Participação da Anfiregulina (AREG) na Fisiopatologia da COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

Caetité, Diego Brito

Participação da Anfiregulina (AREG) na Fisiopatologia da COVID-19. Ribeirão Preto, 2021.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: José Carlos Farias Alves Filho

1. Reparo tecidual. 2. Macrófagos 3. Tolerância. 4.Fibrose.

**Nome:** Diego Brito Caetité

**Título:** Participação da Anfiregulina (AREG) na Fisiopatologia da COVID-19

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovado em: \_\_\_\_ DE \_\_\_\_\_ DE \_\_\_\_\_

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho. Instituição: FMRP-USP.

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Alexandre Todorovic Fabro

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dra. Lirlândia Pires de Sousa

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor (LID) do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2020/05211-3)

Aos meus pais, irmã e toda família,  
pelo amor e apoio incondicionais

## **Agradecimentos**

Aos meus pais Maria de Brito Caetité e Gilmar Silva Caetité, e minha irmã, Marine Brito Caetité pelo amor e carinho incondicional, pelos ensinamentos e exemplos os quais me definiram. Obrigado por estarem presentes nos momentos difíceis, me ajudando; e nos felizes, celebrando. Agradeço toda minha família.

Aos colegas do Laboratório de Inflamação e Dor, um laboratório fenomenal e fascinante, pois sempre obtive apoio científico e metodológico quando precisei. Agradeço pelas discussões científicas sobre esse trabalho, momentos de diálogo e aprendizado, e também pelos momentos de descontração (obs: fiquei com medo de escrever o nome de todos e esquecer de alguém, seria uma injustiça).

Obrigado aos meus amigos mais próximos, que diretamente ou indiretamente participaram desse trabalho e da minha formação, lá vai... Bruninha Manuella, Dani Nascimento, Samuel Oliveira, Cleyson Oliveira, Carol Oliveira, Marcos Rosa, Eduardo Damasceno, Guilherme Cebinelli, Paulo Melo e Flávio Protasio. Não esquecendo dos meus amigos de longe, que se tornaram presentes em minha vida, amparando em todos os momentos, Natalia Brito, Lais Oliveira, Danielle Ribeiro, Jaqueline Monteiro. Agradecer também todo mundo deste laboratório por ser essa família unida e amorosa.

Um agradecimento especial para a Dra. Danielle Nascimento, que me proporcionou momentos felizes como amiga e co-orientadora. Nunca me esquecerei das noites de trabalho, dos conselhos dados e do imenso conhecimento transmitido. Obrigado por acreditar em meu trabalho e ensinar tudo que sei.

Agradeço ao Professor Dr. José Carlos Farias Alves Filho profissional e pessoa exemplar, pela orientação, pelos valiosos ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento científico, intelectual e pessoal.

Aos técnicos Serginho, Diva, Ieda, e Katinha pela amizade, suporte técnico, carinho e disponibilidade.

À Ana Cristine e o Maykon, por abrirem portas que me permitiram chegar tão longe, sem a ação de vocês com toda certeza não estaria aqui.

Agradeço ao Professor Dr. José Carlos Farias Alves Filho profissional e pessoa exemplar, pela orientação, pelos valiosos ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento científico, intelectual e pessoal.

Aos demais Professores do Laboratório de Inflamação e Dor, Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, e Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, pelas contribuições científicas e ensinamentos que guiaram para o meu crescimento científico.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPQ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao *Center for Research in Inflammatory Diseases* (CRID) pelo apoio financeiro fundamental para desenvolvimento deste trabalho e concessão de bolsa de estudo (CNPq).

E a todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional e para a realização deste trabalho.

**O meu muito obrigado!**

“On Wednesdays we wear pink” .

(Mean Girls)

CAETITÉ, DB. **Participação da Anfiregulina (AREG) na Fisiopatologia da COVID-19.** 2022. 87 p. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2022.

## RESUMO

Os casos graves de COVID-19 são frequentemente caracterizados por um grande processo inflamatório que pode levar à falência de órgãos e à morte do paciente. Neste contexto, a anfiregulina (AREG), um fator de crescimento epidérmico semelhante ao EGF, tem sido descrita como importante no processo de reparo por exercer um papel fundamental na mediação dos mecanismos de tolerância. Considerando que a AREG é um fator importante no processo de homeostasia durante e após o processo inflamatório, decidimos investigar seu papel na fisiopatologia da COVID-19. Para isso, utilizamos amostras de PBMCs, de autópsias pulmonares e lavado traqueal de pacientes com COVID-19 (leve, moderada e severa) e comparamos a presença de AREG por RT-PCR, imunofluorescência e ELISA com base em grupos controle. Além disso, usamos um modelo experimental de infecção usando como base camundongos K18-hACE2 para entender o papel do AREG na fisiopatologia da COVID-19, também bloqueamos a sinalização do EGFR com intuito entender como os sinais emitidos por esse receptor se relacionam com a doença. Observamos que os níveis de AREG em PBMCs de pacientes com COVID-19 estavam elevados em comparação aos doadores saudáveis e que, este aumento, estava correlacionado com manifestações clínicas mais graves, com um provável desfecho de morte, também observamos um aumento das concentrações de AREG no lavado traqueal de pacientes hospitalizados e no homogenato do pulmão, bem como uma coloração intensa na imunofluorescência de autópsias pulmonares de pacientes que morreram de COVID-19. Vimos também que no modelo experimental de infecção, o AREG estava em altos níveis, assim como outros mediadores inflamatórios. Além disso, o bloqueio da sinalização do receptor AREG melhorou os sinais clínicos da doença no modelo de experimental. Em resumo, nossos dados indicam que o AREG está envolvido no processo fisiopatológico desencadeado pelo SARS-CoV-2 e está relacionado com a gravidade da doença.

**Palavras-chaves:** Tolerância. Reparo Tecidual. Fibrose.

CAETITÉ, DB. **Role of Amphiregulin (AREG) in the Pathophysiology of COVID-19.** 2022. 87 p. Master's degree dissertation. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil, 2022.

### **ABSTRACT**

Severe cases of COVID-19 are often characterized by a large inflammatory process that can lead to organ failure and patient death. In this context, amphiregulin (AREG), an epidermal growth factor EGF-like, has been described as important in the repair process by playing a key role in mediating tolerance mechanisms. Considering that AREG is an important factor in the homeostasis process during and after the inflammatory process, we decided to investigate its role in the pathophysiology of COVID-19. To this end, we used PBMCs, lung autopsy and tracheal lavage samples from patients with COVID-19 (mild, moderate and severe) and compared the presence of AREG by RT-PCR, immunofluorescence and ELISA based on control groups. In addition, we used an experimental infection model using K18-hACE2 mice to understand the role of AREG in the pathophysiology of COVID-19, we also blocked EGFR signaling in order to understand how the signals emitted by this receptor relate to the disease. We observed that AREG levels in PBMCs from patients with COVID-19 were elevated compared to healthy donors, and that this increase correlated with more severe clinical manifestations with a likely outcome of death, we also observed increased AREG concentrations in tracheal lavage from hospitalized patients and in lung homogenate, as well as intense staining in immunofluorescence from lung autopsies of patients who died of COVID-19. We also saw that in the experimental infection model, AREG was at high levels, as were other inflammatory mediators. Furthermore, blocking AREG receptor signaling improved the clinical signs of the disease in the experimental model. In summary, our data indicate that AREG is involved in the pathophysiological process triggered by SARS-CoV-2 and is related to disease severity.

**Keywords:** Tolerance. Tissue Repair. Fibrosis.

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo replicativo do SARS-CoV-2 .....	18
<b>Figura 2.</b> Principais sintomas da COVID-19.....	19
<b>Figura 3.</b> Características Estruturais do AREG .....	22
<b>Figure 4.</b> PBMCs de pacientes com COVID-19 e doadores voluntários saudáveis diferem na expressão gênica de Areg .....	39
<b>Figura 5.</b> PBMC de pacientes graves com COVID-19 diferem na expressão gênica de Areg em relação a doadores voluntários saudáveis.....	40
<b>Figura 6.</b> Pacientes com COVID-19 que evoluíram para óbito apresentam maior expressão de Areg no PBMC .....	41
<b>Figura 7.</b> Associação entre os níveis de expressão de Areg com características clínicas e comorbidades.....	42
<b>Figura 8.</b> Associação entre os níveis de expressão de Areg com idade. ....	42
<b>Figura 9.</b> Associação entre os níveis de expressão de Areg com o sexo .....	43
<b>Figura 10.</b> Níveis de citocinas no lavado traqueal de pacientes com COVID-19 ....	43
<b>Figura 11.</b> Níveis de citocinas em autópsias pulmonares de pacientes com COVID-19. ....	44
<b>Figura 12.</b> AREG está aumentado em autópsias de pulmão de pacientes com COVID-19 .....	44
<b>Figura 13.</b> Infecção com concentrações diferentes de SARS-CoV-2 em camundongos K18-hACE-2 produz sinais clínicos distintos.....	46
<b>Figura 14.</b> Análises histopatológicas de animais K18-ACE-2 infectados com SARS-CoV-2.....	47
<b>Figure 15.</b> Produção de citocinas no pulmão durante infecção experimental por SARS-CoV-2. ....	48
<b>Figura 16.</b> Protocolo representativo das estratégias de gate.....	49
<b>Figura 17.</b> Leucócitos são os produtores de AREG no pulmão. ....	49
<b>Figura 18.</b> Os monócitos-macrófagos F4/80+ são os produtores de AREG nos pulmões. ....	50
<b>Figura 19.</b> Protocolo representativo das estratégias de gate.....	50

<b>Figura 20.</b> Os monócitos-macrófagos F4/80+ são os produtores de AREG nos pulmões. ....	51
<b>Figura 21.</b> A inibição do EGFR melhora a saturação de oxigênio em modelo de infecção experimental .....	53
<b>Figura 22.</b> O bloqueio da sinalização do EGFR melhora aspectos histopatológicos do pulmão dos animais K18-ACE-2 infectados com SARS-CoV-2.....	54

## Sumário

<b>1. Introdução</b>	<b>16</b>
1.1 Visão Geral da Pandemia de COVID-19	17
1.2 Biologia do SARS-CoV-2	18
1.3 Fisiopatologia da COVID-19	19
1.4 Uma espada de dois gumes: Resistência e Tolerância	21
1.5 Anfiregulina (AREG): Estrutura, Regulação e Sinalização	22
1.6 Consequências Fisiológicas e Patológicas da sinalização do AREG	24
<b>2. Objetivos</b>	<b>27</b>
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
<b>3. Material e métodos</b>	<b>29</b>
3.1 Isolamento do PBMC	30
3.2 Isolamento de RNA e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	30
3.3 Lavado Traqueal	30
3.4 Quantificação de Citocinas	30
3.5 Amostras de autópsias de pulmão	31
3.6 Imunofluorescência	31
3.7 Produção do Estoque Viral	31
3.8 Camundongos K18-hACE-2	31
3.9 Modelo <i>in vivo</i> de infecção por SARS-CoV-2	32
3.10 Tratamento <i>in vivo</i> com Gefitinib	34
3.11 Marcação de superfície ou intracelular para citometria de fluxo	34
3.12 Quantificação do genoma viral do SARS-CoV-2	34
3.13 Coloração de Hematoxilina – Eosina	35
3.14 Análise estatística	37
<b>4. Resultados</b>	<b>39</b>
4.1 O PBMC de pacientes com COVID-19 possui níveis de mRNA de <i>Areg</i> mais elevados em comparação aos doadores saudáveis	40
4.2 Amostras de pulmão de pacientes com COVID-19 (+) apresentam níveis elevados de AREG em comparação aos doadores COVID-19 (-)	44
4.3 No modelo experimental de COVID-19 há aumento de produção de AREG e macrófagos/monócitos F4/80+ parecem ser a fonte geradora	46
4.4 O bloqueio da sinalização do EGFR melhora sinais clínicos e histopatológicos dos animais K18-ACE2 infectados com SARS-CoV-2	52
<b>5. Discussão</b>	<b>56</b>
<b>6. Conclusão</b>	<b>63</b>
<b>7. Referências</b>	<b>65</b>

<b>8. Anexos .....</b>	<b>70</b>
8.1 Anexo 1. Características dos pacientes com COVID-19 .....	71
8.2 Anexo 2. Aprovação do comitê de ética em experimentação animal .....	72
8.3 Anexo 3. Aprovação do comitê de ética em experimentação humana. ....	74

# **1. Introdução**

## 1.1 Visão Geral da Pandemia de COVID-19

No fim de 2019, diversas unidades de saúde reportaram casos de pneumonia com origem desconhecida em grupos de pessoas ligadas epidemiologicamente a um mercado de pescado (*Huanan Seafood Wholesale Market* em Wuhan), na província de Hubei, China (Zhu *et al.*, 2020).

De acordo com estudos retrospectivos, o primeiro relato oficial ocorreu em 8 de dezembro de 2019, após alguns dias o número de infectados aumentaram de maneira exponencial em indivíduos que não haviam tido contato direto com o estabelecimento (Chowdhury & Oommen, 2020). Além disso, era recorrente os casos de infecção nosocomial, esses acontecimentos sugeriam que havia transmissão entre humanos (Hu *et al.*, 2021).

No fim do mês de dezembro a Comissão Municipal de Saúde de Wuhan (*Wuhan Municipal Health Commission*) notifica publicamente a população e informa a Organização Mundial de Saúde (OMS) a ocorrência desse novo surto (Wu & McGoogan, 2020).

Desde o registro inicial em Wuhan, o número de casos cresceu rapidamente em outras cidades da província de Hubei, em aproximadamente 1 mês, se espalhou vertiginosamente para todas as 34 províncias Chinesas (Hu *et al.*, 2021). Em 11 de janeiro de 2020, o primeiro caso foi relatado fora da China continental, na Tailândia, em 30 de janeiro a OMS declara o surto do novo coronavírus como emergência global (Eurosurveillance Editorial Team, 2020). Em 11 de fevereiro, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*) nomeou o novo coronavírus como "SARS-CoV-2" (*Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2*) e a OMS nomeia a doença como "COVID-19" (*Coronavirus Disease 2019*) (ICTV, 2020).

Em fevereiro de 2020 ampliam-se os registros internacionais de casos, a associação entre uma alta transmissibilidade do SARS-CoV-2, somada a uma abundância de viagens internacionais, possibilita que em poucas semanas a COVID-19 se espalhe pelo mundo, com isso, em 11 de março a OMS eleva a doença ao patamar de pandemia (OMS, 2020).

Diariamente, acentua-se o relato de novas infecções e reinfecções com um acumulado de casos, em fevereiro de 2022, aproximando-se dos 400 milhões (Ritchie *et al.*, 2021). A emergência causada pela COVID-19 fez com que diversas entidades governamentais e privadas se unissem com intuito de frear a pandemia, entretanto, os

esforços para conter a disseminação do vírus são dificultados pela falta de dados sobre vários aspectos importantes sobre a infecção, que vão desde a fisiopatologia, até a resposta do hospedeiro e opções de tratamento (Tay *et al.*, 2020).

## 1.2 Biologia do SARS-CoV-2

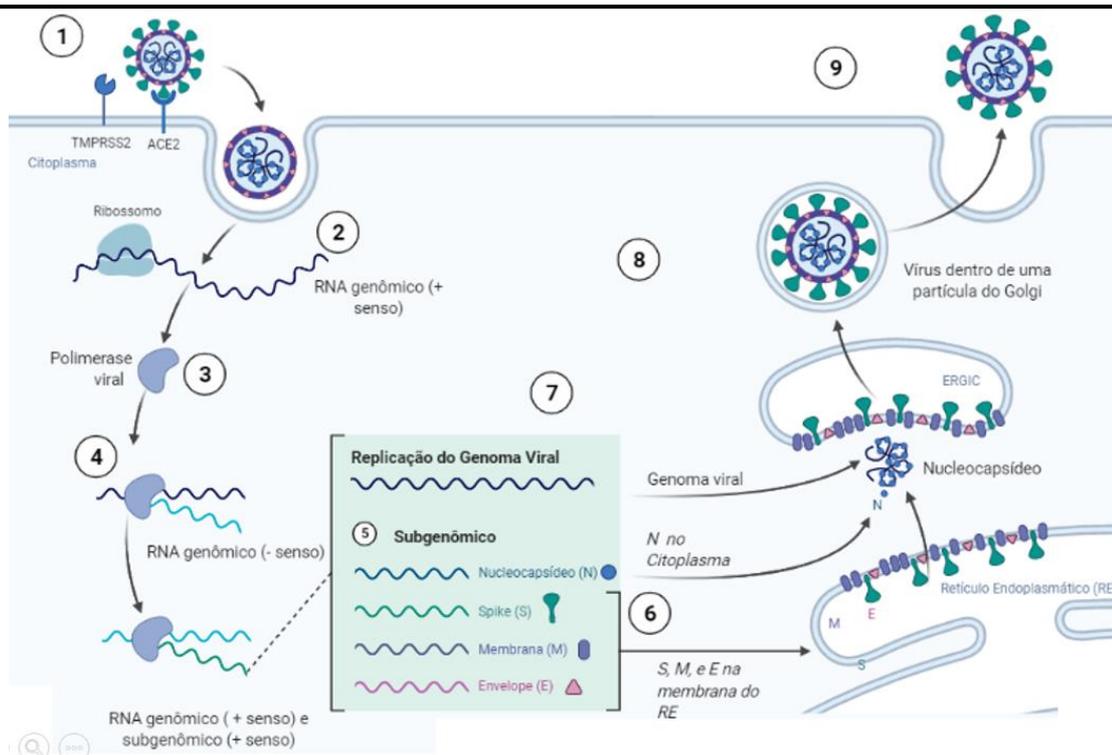
Os coronavírus (CoVs) são uma diversificada família de vírus envelopados, com RNA fita simples, de senso positivo, bastante conhecidos por infectar uma ampla variedade de vertebrados, entre esses vírus, 7 espécies tipicamente causam doenças em humanos (V'kovski *et al.*, 2021).

Os coronavírus humanos (HCoVs), HCoV-229E e o HCoV-OC43, circulam a muito tempo entre as populações humanas, também com o HCoV-NL63 e o HCoV-HKU1, descritos mais recentemente. Em conjunto, esses patógenos levam a infecções sazonais, geralmente leves do trato respiratório e que são genericamente associados a sintomas de "resfriado comum" (V'kovski *et al.*, 2021).

Em contrapartida, nos últimos 20 anos surgiram registro de 3 novas espécies de HCoVs altamente patogênicos, com grande potencial de desenvolver doença grave, são eles o SARS-CoV-1 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 1), o MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) e o SARS-CoV-2 (Tay *et al.*, 2020).

A primeira etapa do ciclo de vida dos coronavírus envolve a infecção do hospedeiro a partir da interação entre a proteína "spike" (S), com receptores celulares específicos. Para os HCoVs, têm sido descritos "human aminopeptidase N" (APN; HCoV-229E), "angiotensin-converting enzyme 2" (ACE2; HCoV-NL63, SARS-CoV e SARS-CoV-2) e o "dipeptidyl peptidase 4" (DPP4; MERS-CoV), como os ligantes que medeiam a entrada dos vírus nas células alvo (V'kovski *et al.*, 2021).

O ciclo de vida do SARS-CoV-2 consiste na invasão da célula hospedeira via ACE-2, expressão dos genes virais, formação e eventual saída dos novos vírus (Figura 1) (Yadav *et al.*, 2021).



**Figura 1 - Ciclo replicativo do SARS-CoV-2:** 1. O ciclo de vida do SARS-CoV-2 se inicia quando a proteína S, com seu domínio de ligação ao receptor (RBD) localizado na porção S1, interage com o receptor do hospedeiro (ACE-2). Após essa ligação, a porção S2 dessa mesma proteína sofre clivagem via proteases (TMPRSS2 e/ou catepsinas) permitindo a liberação do peptídeo de fusão, esse processamento leva a fusão do vírus com a célula alvo. 2. Após a fusão, o RNA genômico de sentido positivo (gRNA+) tem acesso ao seu citoplasma e é traduzido por ribossomos da própria célula em duas poliproteínas, pp1a e pp1ab, esses polipeptídeos sofrem autoproteólise (a partir de domínios quimi tripsina e papaína presentes em suas cadeias) liberando as proteínas não estruturais (nsps - *non-structural proteins*). A nsp12, nsp7 e nsp8, formam a RdRp (RNA-dependente RNA-polimerase). 3. Usando o gRNA+ a polimerase viral produz um RNA complementar de sentido negativo (gRNA-), com base nesse anti-genoma são sintetizados novos gRNA+ e RNAs subgenômicos. 5. Os RNAs subgenômicos são produzidos a partir da transcrição descontínua e são traduzidos 6. principalmente no retículo endoplasmático, gerando as proteínas estruturais. Essas por sua vez caem na via de transporte de vesículas da célula e seguem para o Golgi. 7. Os gRNAs+ sintetizados, interagem com as proteínas N do citoplasma formando o nucleocapsídeo, essa estrutura por sua vez se liga a outras proteínas estruturais como a E, M e S levando a formação da partícula viral madura. 8. Os vírus recém montados, se utilizam da via de secreção a partir do Golgi 9. para mediar sua exocitose ao meio extracelular. Criado com BioRender adaptado de Malone *et al.* 2022 e Yadav *et al.* 2021.

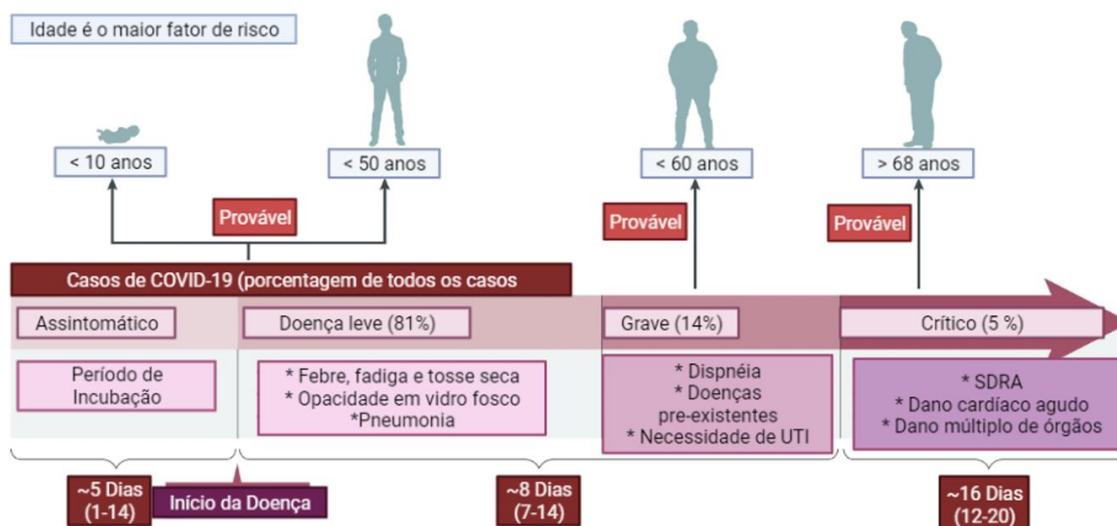
### 1.3 Fisiopatologia da COVID-19

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre principalmente pelo contato das superfícies de mucosa com as partículas virais presentes no ambiente, a disponibilidade dessas partículas depende da proximidade a indivíduos infectados que liberam aerossóis através de tosse, espirros e fala (V'kovski *et al.*, 2021).

O período de incubação, que diz respeito ao período entre a exposição ao vírus e o início dos sintomas, é cerca de 5-6 dias, mas em alguns casos pode-se estender a 14, durante esse tempo, também conhecido como período pré-sintomático, os indivíduos infectados podem ser contagiosos (Parasher, 2021).

Os sintomas dos pacientes com COVID-19 se manifestam em um amplo espectro

de sinais clínicos, variando desde manifestações leves a graves problemas respiratórios com múltiplas falhas de órgãos (Figura 2).



**Figura 2 - Principais sintomas da COVID-19:** Os sintomas típicos dos pacientes com COVID-19 são febre, tosse seca e fadiga e em casos graves dispnéia. A maioria das infecções, em particular adultos e crianças, são assintomáticas, contudo, pessoas mais velhas e/ou com comorbidades aumentam as chances de desenvolver formas graves da doença. Criado com BioRender adaptado de Hu et al., (2021).

As células do trato respiratório concentram os primeiros sítios de replicação do vírus, contudo, a expressão e distribuição tecidual dos receptores de entrada não estão restritos a esses locais, tornando outros órgãos potenciais alvos de invasão (Tay *et al.*, 2020; Parasher, 2021).

Ao reconhecer as células epiteliais do trato respiratório, o SARS-CoV-2 inicia seu ciclo de replicação e, eventualmente, migra para porções mais inferiores infectando células alveolares, esse processo estimula uma forte resposta imune nos pulmões (Hu *et al.*, 2021).

No trato respiratório inferior as células epiteliais, macrófagos alveolares (MAs) e células dendríticas (CDs) constituem os três principais componentes da resposta imune inata dos pulmões. As CDs abaixo do epitélio pulmonar em conjunto com o MAs, estão entre os primeiros leucócitos a responderem localmente ao vírus (Yuki *et al.*, 2020).

Quando a replicação viral acelera, a integridade da barreira epitelial-endotelial é comprometida, pois, além de infectar células pulmonares o SARS-CoV-2 também é capaz de invadir células endoteliais dos capilares do pulmão, isso contribui ainda mais para inflamação local, aumentando o influxo de leucócitos, principalmente monócitos e neutrófilos nos estágios iniciais da doença (Wiersinga *et al.*, 2020).

Essa inflamação inicial somada a morte celular em decorrência ao processo replicativo do SARS-CoV-2, proporciona um aumento da disponibilidade de DAMPs

(*Damage-Associated Molecular Patterns*), que incluem ATP e ácidos nucleicos, além de PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) como dsRNA (*double-stranded RNA*). Esses sinais são reconhecidos por PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) em diversos tipos celulares, que culminam na produção de citocinas e quimioatraentes pró-inflamatórios como IL-6, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4 (Tay *et al.*, 2020).

Essas proteínas recrutam mais leucócitos para região, que promovem ainda mais a produção de proteínas pró-inflamatórias estabelecendo um *loop* na produção desses compostos (Wiersinga *et al.*, 2020). A capacidade do vírus de infectar diversos órgãos, somado a tempestade de citocinas gerada por essa inflamação exacerbada, contribuem para promover dano sistêmico observado em casos graves (Tay *et al.*, 2020).

A inflamação excessiva é considerada uma das principais causas que contribuem para gravidade da COVID-19, entretanto, os mecanismos que desencadeiam a imunopatologia letal em indivíduos infectados não são completamente compreendidos, além disso, o desenvolvimento da forma grave da doença não parece estar somente relacionado à carga viral (Xu *et al.*, 2020; Lucas *et al.*, 2020).

Alternativamente, os indivíduos assintomáticos ou que desenvolvem quadros leves/moderados, possuem linfócitos T CD8+ vírus-específicos com uma elevada capacidade de reconhecer e eliminar células infectadas, limitando o espalhamento viral, além de possuírem linfócitos B que produzem anticorpos com alta capacidade de neutralização. Esses fatores, em conjunto com uma produção rápida de IFN-I (*Type I interferons*), promovem uma eliminação rápida do vírus com mínimo dano pulmonar (Wiersinga *et al.*, 2020; Tay *et al.*, 2020).

Ainda assim, o processo de retorno à homeostasia após a infecção por SARS-CoV-2 não se resume somente a competência do sistema imunológico em reconhecer e eliminar os vírus, mas também a capacidade que o hospedeiro possui em minimizar os danos advindos da replicação do patógeno, mas também pela ação do sistema imune. Nesse sentido, o indivíduo pode se proteger de uma doença infecciosa, utilizando duas estratégias distintas: resistência e tolerância (Medzhitov *et al.*, 2012).

#### **1.4 Uma espada de dois gumes: Resistência e Tolerância**

Fundamentalmente, duas principais estratégias de defesa -resistência e tolerância- são empregadas pelo hospedeiro para combater infecções como aquelas causadas por vírus. A resistência diz respeito a capacidade de controlar a carga viral, sendo assim, age limitando o dano ao hospedeiro causado pela reprodução do patógeno, em contrapartida, a tolerância previne ou reduz a imunopatologia mantendo o balanço homeostático mesmo com a presença do organismo invasor (Mok *et al.*, 2020).

A sobrevivência perante doenças infecciosas classicamente é atribuída a habilidade de eliminar o patógeno através de mecanismos de resistência, como a produção de citocinas, de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio, recrutamento de leucócitos e produção de anticorpos. Todavia, uma consequência inexorável dos processo inflamatório gerado pelo organismo invasor é a imunopatologia no intercurso da doença, nesse contexto, ao longo dos últimos anos foi reconhecida a importância da tolerância como um mecanismo essencial de defesa do organismo (McCarville & Ayres, 2017).

A tolerância à infecção se diferencia da resistência, pois possui um efeito benéfico ao indivíduo ainda que tenha um impacto neutro (e em alguns casos até mesmo positivo) no *fitness* do patógeno (Medzhitov *et al.*, 2012). Não se deve confundir tolerância à infecção, aos processos de tolerância imunológica que ocorrem através da eliminação de linfócitos T auto-reativos no timo ou na periferia (McCarville & Ayres, 2017; Mok *et al.*, 2020).

O controle do dano tecidual pode ocorrer por diversos mecanismos como (1) manutenção da integridade das células epiteliais prevenindo a invasão do patógeno através da função de barreira, (2) neutralização de toxinas e fatores de virulência, (3) regulando a duração e intensidade da resposta imune e (4) promovendo a regeneração do tecido danificado (Soares *et al.*, 2017).

Por outro lado, uma ativação exagerada desses mecanismos de tolerância pode contribuir para manutenção/aumento da carga do patógeno, persistência da infecção por um período prolongado ou ainda alterações permanentes no tecido danificado, através do desenvolvimento de um quadro fibrótico (McCarville & Ayres, 2017).

Os mecanismos de defesa frente ao patógeno -resistência e tolerância- são igualmente necessários no retorno a homeostase do hospedeiro, embora, grande parte dos esforços dos pesquisadores se voltem a estudar as estratégias que limitam o desenvolvimento do organismo patogênico, um emergente número de dados indica que a tolerância a infecção não deve ser ignorada.

Nesse sentido, a anfiregulina (AREG), um fator de crescimento epidérmico semelhante ao EGF, demonstrou desempenhar um papel fundamental na mediação dos mecanismos de tolerância, em diversos modelos de doenças infecciosas.

### **1.5 Anfiregulina (AREG): Estrutura, Regulação e Sinalização**

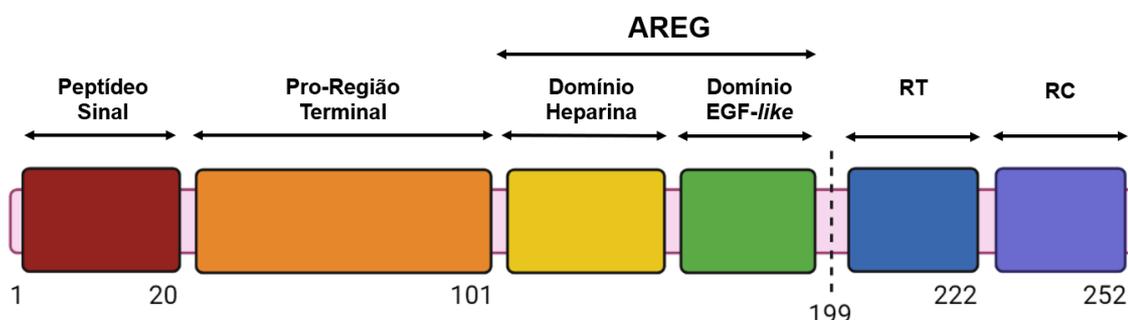
Embora uma grande gama de fatores contribua com a resposta do hospedeiro contra infecções ou antígenos estranhos, a anfiregulina (AREG) uma molécula semelhante ao fator de crescimento epitelial (EGF), tem se mostrado um desempenhar um papel central na tolerância ao patógeno (Zaiss *et al.*, 2015).

Classicamente o AREG, assim como outros membros da família do EGF, eram descritos como fatores derivados unicamente de células epiteliais, entretanto, em experimentos mais recentes, a anfiregulina pôde ser detectada em várias populações de leucócitos ativados (Berasain & Avila, 2014).

Por exemplo, em diversos contextos inflamatórios, macrófagos, basófilos, eosinófilos, mastócitos, ILC2s (células linfóides inatas do tipo 2), células dendríticas e linfócitos T CD4+ são capazes de produzir AREG em contextos específicos (Zaiss *et al.*, 2015). Os macrófagos, principalmente as populações polarizadas para um perfil M1, são um dos produtores mais conhecidos (Meng *et al.*, 2015).

A biodisponibilidade do AREG pode ser regulada em dois níveis, o primeiro diz respeito a regulação transcricional (através da associação de ativadores/repressores nas regiões promotoras) e o segundo, a partir de modificações pós-traducionais (como o processo de clivagem do fragmento fisiológico, descrito a seguir) (Singh *et al.*, 2021).

O *Areg* é transcrito como um mRNA de 1.4-kb, contendo 6 éxons que quando traduzidos produzem uma proteína transmembranar precursora de 252 aa chamada de Pro-AREG. O Pro-AREG contém múltiplos domínios, um peptídeo sinal (1 - 20aa), uma pro-região hidrofílica N-terminal (21 - 101aa), um domínio de ligação a heparina (102 - 140 aa), um domínio semelhante ao EGF (141 - 181aa), uma região de clivagem (182 - 198aa), um domínio hidrofóbico (199 - 221aa) e um domínio citoplasmático (222 - 252aa) (Singh *et al.*, 2021) (Figura 3).



**Figura 3 - Características Estruturais do AREG:** Estrutura do Pro-AREG indicando as regiões de domínio e os sítios de processamento proteolítico. RT - Região Transmembranar; RC- Região Citoplasmática. Criado com BioRender adaptado de Berasain & Avila, 2014.

O segundo ponto de regulação é vinculado a liberação da porção madura da anfiregulina que ocorre através do processamento proteolítico (*ectodomain shedding*) do Pro-AREG. Essa clivagem é feita pela enzima TACE (*tumor-necrosis factor-alpha converting enzyme*), uma proteína membrana que participa da família das desintegrinas e metaloproteinases, também conhecida como ADAM-17 (Berasain & Avila, 2014).

A ação enzimática da ADAM-17 é dependente da fosforilação de seu domínio

citoplasmático, desse modo, diversas proteínas quinase provenientes de outros processos de sinalização podem levar a ativação da TACE (Singh *et al.*, 2021). Na sua forma solúvel, o AREG age de maneira autócrina e parácrina via seu receptor EGFR, esse tipo de processo é chamado de mecanismo de transativação, já que múltiplos sinais (receptores de quimiocinas, citocinas, PRRs) são capazes de mediar a ativação do EGFR através da ação da ADAM-17 (Zaiss *et al.*, 2015).

O EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), também conhecido como ErbB1/HER1, é um receptor de tirosina quinase e representante mais conhecido da família do EGFR, que inclui também ErbB2/HER2/Neu, ErbB3/HER3 e ErbB4/HER4 (Pines *et al.*, 2010).

Além do AREG e EGF, existem outros cinco ligantes que também sinalizam via EGFR, são eles o TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor- $\alpha$* ), EREG (*epiregulin*), BTC (*betacellulin*), HB-EGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*) EPI (*epigen*), sendo que o AREG, EGF e TGF- $\alpha$  sinalizam exclusivamente por esse receptor (Berasain & Avila, 2014).

Cada ligante parece ativar o EGFR da mesma forma: ao interagirem com o receptor, estimulam um processo de homo/heterodimerização com outros membros da família do EGFR, promovendo autofosforilação através dos seus domínios quinase, os resíduos de tirosina fosforilados recrutam adaptadores e proteínas sinalizadoras (Pines *et al.*, 2010). Apesar dessas similaridades, a sinalização do EGFR por diferentes ligantes é conhecida por desencadear efeitos biológicos distintos, por mecanismos não totalmente conhecidos (Zaiss *et al.*, 2015).

Após o processo de ativação, a cascata *downstream* ao receptor envolve múltiplas vias de sinalização, cada uma dependente dos ligantes disponíveis e da combinação de receptores presentes no processo de dimerização. As vias conhecidas incluem ERK MAPK, PI3K-AKT, SRC, PLC- $\gamma$ -PKC, JNK, e JAK-STAT, como principais transdutoras de sinais (Pines *et al.*, 2010).

A consequência fisiológica do processo de sinalização do EGFR possibilita múltiplos destinos, dos quais podem envolver proliferação, crescimento, diferenciação, migração e sobrevivência celular. Entretanto, essas modificações, são desencadeadas em contextos celulares específicos, nesse sentido, o AREG é reconhecido como um fator importante em microambientes inflamatórios, principalmente infecciosos (McCarville & Ayres, 2017).

## 1.6 Consequências Fisiológicas e Patológicas da sinalização do AREG

Originalmente a anfiregulina foi descrita como sendo um poderoso mitógeno agindo

principalmente sobre células epiteliais, nesse sentido, os primeiros trabalhos que associavam o AREG a contextos inflamatórios descreviam sua importância na manutenção do epitélio frente modelos infecciosos de perfil Th2 (Zaiss *et al.*, 2015).

Os helmintos são capazes de estimular uma poderosa resposta inflamatória do tipo II, frequentemente são eliminados de maneira ineficaz do hospedeiro e causam diversos tipos de danos ao longo do seu ciclo de vida principalmente nos epitélios. Desse modo, a associação entre a integridade epitelial e a sinalização de AREG, ganhou destaque em diversos trabalhos dada sua capacidade de contribuir com a manutenção de função de barreira (Zaiss *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 2013; Minutti *et al.*, 2019).

Devido sua ação sinérgica com imuno mediadores como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 classicamente o AREG é considerado uma citocina de perfil Th2, dessa maneira, em consonância com efeitos fisiológicos desse tipo de resposta, a anfiregulina pode suprimir inflamação local (Zaiss *et al.*, 2013). Dentre os efeitos imunomoduladores, o AREG foi capaz de reduzir a inflamação pulmonar aguda induzida por LPS (Xu *et al.*, 2016), aumentar o poder supressor de células T reguladoras em modelos experimentais de colite (Zaiss *et al.*, 2013) e contribuir com aquisição de FoxP3 em linfócitos diferenciados *in vitro* (Ko *et al.*, 2020).

Embora seja associado a um mitógeno, o AREG se diferencia de outros ligantes do EGFR pois sua ação não se limita apenas à indução de uma resposta proliferativa, sua sinalização também é capaz de transduzir sinais de diferenciação. Essa atividade inesperada é a raiz de sua classificação (“Anfi”-regulina), apesar de ser um fator de crescimento, pode também induzir diferenciação de acordo ao tipo celular (Zaiss *et al.*, 2015).

Esse caráter bifuncional é a chave para sua participação no remodelamento da matriz extracelular. Mesmo que originalmente o AREG fosse associado a uma resposta do tipo II, trabalhos recentes mostraram que diversos leucócitos (independente ao comprometimento Th1, Th2, Th17) são capazes de produzi-lo, o que é consistente com sua função de reparo tecidual em múltiplos contextos (Zeiss *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2020).

Um passo crítico para o reparo tecidual é a deposição de proteínas típicas de tecido conectivo como o colágeno e a fibronectina (Suga *et al.*, 2014). Esse processo é mediado principalmente por fibrócitos, que no tecido se diferenciam em fibroblastos e em conjunto com outras células mesenquimais (fibroblastos residentes, pericitos, miofibroblastos) realizam o processo de reparo (Bellini *et al.*, 2007).

O AREG contribui com a regeneração do tecido danificado devido sua capacidade

de induzir a forma bioativa do TGF- $\beta$ , um potente sinalizador para diferenciação de fibroblastos (Minutii *et al.*, 2019). Além disso, a sinalização de AREG nessas células parece aumentar seu poder de deposição da matriz extracelular (Poole *et al.*, 2020).

A produção exacerbada e sinalização persistente de AREG está ligada a múltiplos desfechos patogênicos como: (1) progressão de neoplasias (Willmarth & Ethier, 2006), (2) piora de doenças autoimunes como artrite reumatóide e psoríase (Yamane *et al.*, 2008; Berasain & Avila, 2014) e fibrose (Zaiss *et al.*, 2015).

Ainda é pouco conhecido a relação entre o AREG e seu envolvimento no contexto de infecções virais, nesse sentido, dado o seu papel diverso nos processos inflamatórios e a emergência causada pela pandemia do SARS-CoV-2 decidimos investigar sua participação na fisiopatologia da COVID-19.

## **2. Objetivos**

## 2.1 Objetivo geral

Investigar a participação da anfiregulina (AREG) na fisiopatologia da COVID-19.

## 2.2 Objetivos específicos

- I. Analisar o perfil de expressão gênica e proteica de AREG em amostras de pacientes com COVID-19;
- II. Estabelecer um modelo experimental de COVID-19;
- III. Avaliar as concentrações de AREG nos animais infectados com SARS-CoV-2;
- IV. Identificar a população produtora de AREG;
- V. Verificar o efeito da inibição do EGFR no modelo experimental de COVID-19.

### **3. Material e métodos**

### 3.1 Isolamento do PBMC

Amostras de sangue periférico foram coletadas de pacientes e controles saudáveis por punção venosa e centrifugadas a 450 g para separação do soro. As células sanguíneas foram então ressuspensas na solução salina equilibrada de Hank (Corning), e a população de PBMC foi isolada por Percoll (GE Healthcare) gradiente de densidade. Os PBMCs isolados foram ressuspensos em RPMI 1640 (Corning) suplementados com 0,1% de BSA. A pureza dos PBMCs foi >95%, conforme determinado por Citospin de cor Rosenfeld (Laborclin).

### 3.2 Isolamento de RNA e PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

O RNA total das amostras de PBMC foi extraído usando o Kit de Isolamento RNeasy de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen), posteriormente quantificados e avaliados quanto sua qualidade no NanoDrop One/One<sup>c</sup> (ThermoFisher Scientific, USA). Para síntese do DNA complementar (cDNA), utilizamos 300ng do RNA total para conversão através do Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), segundo informações do fabricante. RT-qPCR foi feito utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) usando Viia7 Real-time PCR System (Applied Biosystems). A expressão gênica foi determinada em relação ao *Gapdh* e o *fold change* usando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  *threshold cycle*. O protocolo de amplificação foi 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min.

### 3.3 Lavado Traqueal

O fluido traqueal foi obtido por aspiração do tubo orotraqueal usando uma técnica asséptica. Os líquidos coletados foram misturados 1:1 com 0,1 M de ditiotreitol (Thermo Fisher Scientific) e incubados por 15 min a 37°C. A solução obtida foi centrifugada 750 g a 4°C por 10 min e o sobrenadante foi utilizado para medir a quantidade de citocinas. Para estimular a produção e coleta de fluido das vias aéreas a partir de controles saudáveis foi feita a inalação de 5mL de solução salina hipertônica (3%).

### 3.4 Quantificação de Citocinas

Os sobrenadantes resultantes do processamento do lavado traqueal, homogenato do pulmão dos animais K-18(hACE-2) infectados e as biópsias de pulmão dos pacientes foram coletados e os níveis de citocinas foram quantificados por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems).

### 3.5 Amostras de autópsias de pulmão

Pacientes com COVID-19 foram autopsiados com a abordagem minimamente invasiva guiada por ultra-som. O estudo de autópsia COVID19-HC-FMUSP foi aprovado pelo Comitê de Ética do HC-FMUSP (protocolo 2013/08216-2) e realizado na Plataforma de Imagem na Sala de Autópsia (<https://pisa.hc.fm.usp.br/>). O protocolo de amostragem foi previamente descrito (Duarte-Neto et al., 2019).

### 3.6 Imunofluorescência

As amostras de pulmão foram fixadas com solução tamponada a 4% de paraformaldeído por 24 horas a 4°C. As amostras fixadas foram criopreservadas com sacarose 30% a 4°C, em seguida, congeladas em meio preservante Tissue-Tek® O.C.T. e crio-seccionadas (14 a 16 µm). Crio-seções foram deixadas 20 minutos em temperatura ambiente para secagem seguida de duas lavagens com 0,3% Triton-X 100 em tampão fosfato + salina esterilizado (PBS, pH 7.2-7.4) e uma lavagem com PBS apenas. Para reduzir as ligações a proteínas inespecíficas, as crio-seções foram incubadas com soro de burro 10% por 1 hora. Anticorpos anti-AREG foram aplicados sobre as crio-seções e incubados a 4°C por 18 horas em câmara escura úmida. No dia seguinte, as crio-seções eram submetidas a novo processo de lavagem. Os anticorpos secundários conjugados com fluorocromo eram incubados em temperatura ambiente por 2 horas em câmara escura úmida, durante a incubação era adicionado 2% de soro de burro para estabilização dos anticorpos e redução do background. As crio-seções imunomarcadas foram observadas sob microscopia confocal.

### 3.7 Produção do Estoque Viral

O SARS-CoV-2 foi isolado de paciente testado positivo para o COVID-19, propagado e titulado em células Vero E6 em laboratório de biossegurança nível 3 (NB3). Estas células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e antibiótico/antimicótico (Penicilina 10,000 U/mL; Streptomina 10,000 µg/mL). O inóculo viral foi adicionado às células Vero em DMEM (FBS 2%) incubadas a 37°C com CO<sub>2</sub> 5% por 48h. Após este período, avaliou-se o efeito citopatogênico por microscópio, as células foram coletadas em monocamada e o sobrenadante armazenado imediatamente a -70°C. A titulação viral na cultura de células Vero E6 foi realizada utilizando-se o método de formação de placas (PFU).

### 3.8 Camundongos K18-hACE-2

Para realização da infecção experimental por SARS-CoV-2, utilizamos o

camundongo K18-hACE2 (B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/J), que expressa a ACE2 humana por meio do promotor da *queratina 18* (K18). Os animais foram obtidos a partir do Laboratório Jackson (The Jackson Laboratory), reproduzidos no Centro de Criação de Animais Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da FMRP/USP até o transporte para o laboratório de biossegurança 3 (NB3) do Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP/USP.

### 3.9 Modelo *in vivo* de infecção por SARS-CoV-2

Animais machos K18-hACE2 de 8 semanas de idade foram inoculados com  $5 \times 10^3$  ou  $5 \times 10^4$  PFU (em 50  $\mu$ L) por via intranasal sob leve anestesia por isoflurano. Animais não infectados foram inoculados com igual volume de meio de cultura DMEM estéril. Acompanhamos os efeitos da infecção sobre a perda de peso, principal sinal observado nesse modelo experimental. Para avaliação do perfil inflamatório, os animais foram eutanasiados no 2 e 5 dpi utilizando-se sobredose de xilazina e ketamina. Após a eutanásia, o pulmão esquerdo foi coletado em solução de PFA 4% e o pulmão direito coletado em trizol para posterior quantificação de carga viral ou em tampão RIPA para análise dos níveis de mediadores inflamatórios. Além disso, estabelecemos um *score* clínico para avaliação dos sinais induzidos pela infecção. A obtenção do *score* clínico foi feita por meio da adaptação de protocolo previamente descrito e seguindo avaliação mostrada na Tabela 1. Durante o todo o experimento, os animais tiveram livre acesso à água e à ração padrão para camundongos.

**Tabela 1: Score clínico adaptado para o modelo de infecção experimental por Sars-CoV-2.**

Variável	Avaliação	Escore
Peso	0% de perda	0
	1 a 5% de perda	1
	6 a 10% de perda	2
	11 a 15% de perda	3

	16 a 20% de perda	4
	> de 20% de perda	5
Postura e aparência	Sem piloerção	0
	Piloerção	1
Atividade	Ativo	0
	Atividade moderada	1
	Pouca atividade	2
	Imobilidade	3
Olhos (abertura)	Normal	0
	Fechamento lento	1
	Fechados	2
Responsividade a estímulos	Normal	0
	Moderada	1
	Baixa	2
Respiração	Normal	0
	Acelerada	1

### 3.10 Tratamento *in vivo* com Gefitinib

O gefitinib foi administrado diariamente oralmente na dose de 30 mg/kg, sendo os volumes administrados (proporcionais aos pesos dos animais) durante 5 dias, o tratamento foi iniciado um dia antes da infecção. Foi utilizado a carboximetilcelulose a 1% (m/v), como veículo, sendo administrada 100 µL da droga ou placebo, através de uma sonda para gavagem oral acoplada a uma seringa de insulina de 1 mL. Os camundongos machos K18-hACE2 de 8 semanas de idade foram inoculados com  $5 \times 10^3$  ou  $5 \times 10^4$  PFU (em 50 µL) por via intranasal sob leve anestesia por isoflurano. Animais não infectados foram inoculados com igual volume de meio de cultura DMEM estéril. No 5 d.p.i realizou-se a eutanásia e a coleta dos tecidos procedeu conforme descrito anteriormente (ver tópico 4.9).

### 3.11 Marcação de superfície ou intracelular para citometria de fluxo

Células do pulmão dos animais infectados com SARS-CoV-2 foram obtidas após digestão em uma solução de colagenase tipo II (1 mg/mL – *Sigma Aldrich*) por 45 min, a 37° C e 5% CO<sub>2</sub> em RPMI incompleto. Após incubação foram processadas com *cell strainer* (100 µm) em RPMI incompleto (RPMI-I). A marcação extracelular foi realizada com anti-F4/80 (1:200; BD Biosciences), anti-CD45 (1:200; BD Biosciences), anti-Ly6G (1:200; BD Biosciences), anti-CD11b (1:200; BD Biosciences) e anti-CD19 (1:200; BD Biosciences) com marcador de viabilidade celular (1:3000; Dye fixable viability – *eBioscience*), por 20 minutos a 4° C. As células foram centrifugadas (450G, 8 min, 4° C) e fixadas utilizando PFA 2%. E seguida a fixação fora ressuspensas em PBS 1x e adquiridas no citômetro de fluxo (FACSVerse™ – *BD Biosciences*). A análise dos dados foi realizada usando o software FlowJo® X.

### 3.12 Quantificação do genoma viral do SARS-CoV-2

O RNA total das amostras de pulmão foi extraído pelo método do Trizol® (Invitrogen, CA, EUA), posteriormente quantificados e avaliados quanto à sua qualidade no NanoDrop One/One<sup>c</sup> (ThermoFisher Scientific, USA). Para síntese do DNA complementar (cDNA), utilizamos 1000ng do RNA total para conversão através do Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), segundo informações do fabricante. A determinação do número de cópias do gene *N1* do SARS-CoV-2 em dada amostra foi feita por quantificação absoluta utilizando StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para acessar o número de cópias, uma curva padrão foi feita utilizando um plasmídeo (PTZ57R/T CloneJet™ Cloning Kit Thermo Fisher®) onde clonamos o amplicon de

944pb, começando do nucleotídeo 14 do gene *N*, de maneira a incluir toda a região coberta pelas sondas utilizadas pelo protocolo da CDC (N1, N2 e N3). Para quantificação, foram feitas diluições seriadas na proporção de 1:10 do plasmídeo para geração da curva padrão. O número de cópias do primeiro ponto da curva é determinado pela seguinte fórmula: input de plasmídeo (ng) x constante de avogadro / número de pares de bases do plasmídeo x peso de um par de base x constante ( $1 \times 10^9$ ). Os primers e probes para o gene N1 e RNase P (endógeno – controle da integridade e qualidade das amostras) são comerciais (2019-nCov CDC EUA Kit, IDT), e foram desenvolvidos segundo protocolos estabelecidos e publicados pela CDC. A reação de qPCR foi feita utilizando aproximadamente 5-10 ng/ul de cDNA, 20  $\mu$ M de primers, 5  $\mu$ M de probe (5  $\mu$ M) mais o Taqman Universal Master Mix 1x (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O protocolo de amplificação foi 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C for 15 s, e 60 °C por 1 min.

### 3.13 Coloração de Hematoxilina – Eosina

Após eutanásia, o pulmão esquerdo foi coletado em solução PFA 4%. Após 48h, o tecido foi transferido para solução de álcool 70%, seguida de bateria de desidratação e inclusão em parafina. A bateria consistiu dos seguintes passos:

Solução	Tempo
Álcool 70%	1 hora
Álcool 80%	1 hora
Álcool 90%	1 hora
Álcool 100% I	1 hora
Álcool 100% II	1 hora
Álcool 100% III	1 hora
Álcool + Xilol	1 hora

(1:1)	
Xilol I	1 hora
Xilol II	1 hora
Xilol III	1 hora
Parafina líquida I	2 horas
Parafina líquida II	2 horas

Após a impregnação em parafina líquida, os tecidos foram incluídos com auxílio de um inclusor de parafina e mantidos em uma placa fria para solidificação da resina. Blocos de pulmão foram cortados em espessura de 5 µm com auxílio de um micrótomo. Os tecidos foram transferidos para um lâmina de histologia e desparafinizados e corados de acordo com a seguinte bateria:

<b>Solução</b>	<b>Tempo</b>
Xilol I	10 min
Xilol II	10 min
Xilol III	10 min
ABS I	5 min
ABS II	5 min
Álcool 90%	5 min
Álcool 80%	5 min

Álcool 70%	5 min
Água	1 min
Hematoxilina	3 min
Água corrente	10 min
Eosina	1,5 min
Água corrente	5 min
Álcool 95%	3 min
Álcool 100% I	3 min
Álcool 100% II	3 min
Álcool + Xilol (1:1)	3 min
Xilol I	4 min
Xilol II	4 min
Xilol III	4 min

Por fim, as lâminas foram montadas utilizando-se meio de montagem Entellan e visualizadas em microscópio de campo claro.

### 3.14 Análise estatística

Foi utilizado análise de variância ANOVA de uma via (*one way*), seguido do teste (*post-hoc*) de Tukey para comparação entre os diferentes grupos. ANOVA de duas vias (*two way*), seguindo do teste de Bonferroni, foi utilizada para avaliação do curso

temporal do *score* clínico dos animais infectado. Para se comparar dois grupos de variáveis não-pareadas, utilizou-se o teste t de *student*. Os dados foram expressos como Média  $\pm$  S.E.M., sendo representativos de 1-2 experimentos independentes. Diferenças estatísticas foram consideradas quando  $P < 0,05$ . As análises estatísticas e confecção gráfica foram realizadas através do programa estatístico *GraphPad Prism 7.0*.

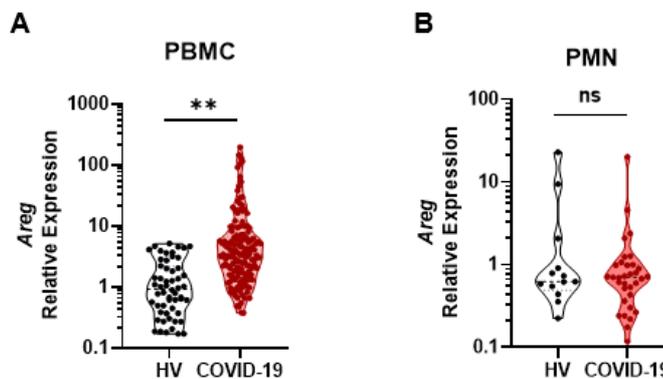
## **4. Resultados**

#### 4.1 O PBMC de pacientes com COVID-19 possui níveis de mRNA de *Areg* mais elevados em comparação aos doadores saudáveis

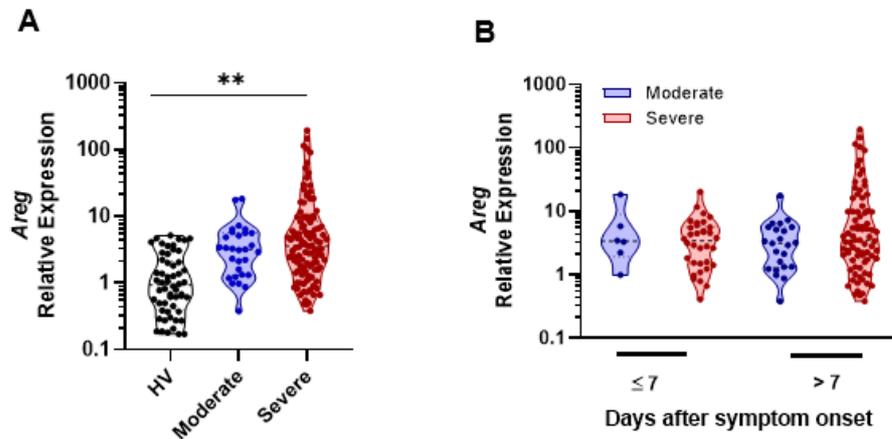
Como diversos estímulos inflamatórios são capazes de regular a expressão de AREG tanto em nível transcricional quanto proteico (Zaiss *et al.*, 2015), inicialmente decidimos verificar os níveis de expressão gênica por RT-PCR em PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells) e PMNs (*Polymorphonuclear Leukocytes*) de pacientes acometidos por COVID-19 em relação a doadores saudáveis.

Verificamos que no PBMC dos pacientes portadores de COVID-19 a expressão gênica de *Areg* estava aumentada em comparação aos doadores saudáveis (Fig. 4A). Entretanto, não conseguimos observar alteração na população de PMNs (Fig. 4B). Dessa forma, decidimos nos concentrar na população de PBMCs.

Nesse sentido, analisamos a expressão conforme gravidade da doença, contudo, não encontramos diferenças entre indivíduos em estado grave (suplementação de O<sub>2</sub> por ventilação mecânica) em comparação aos pacientes moderados (suplementação de O<sub>2</sub> por ventilação não invasiva) (Fig. 5A). Como poderia existir variação da expressão gênica em relação ao tempo da doença, analisamos os níveis de mRNA com base no relato do início dos sintomas, contudo, não encontramos diferença ao longo dos dias (Fig. 5B).

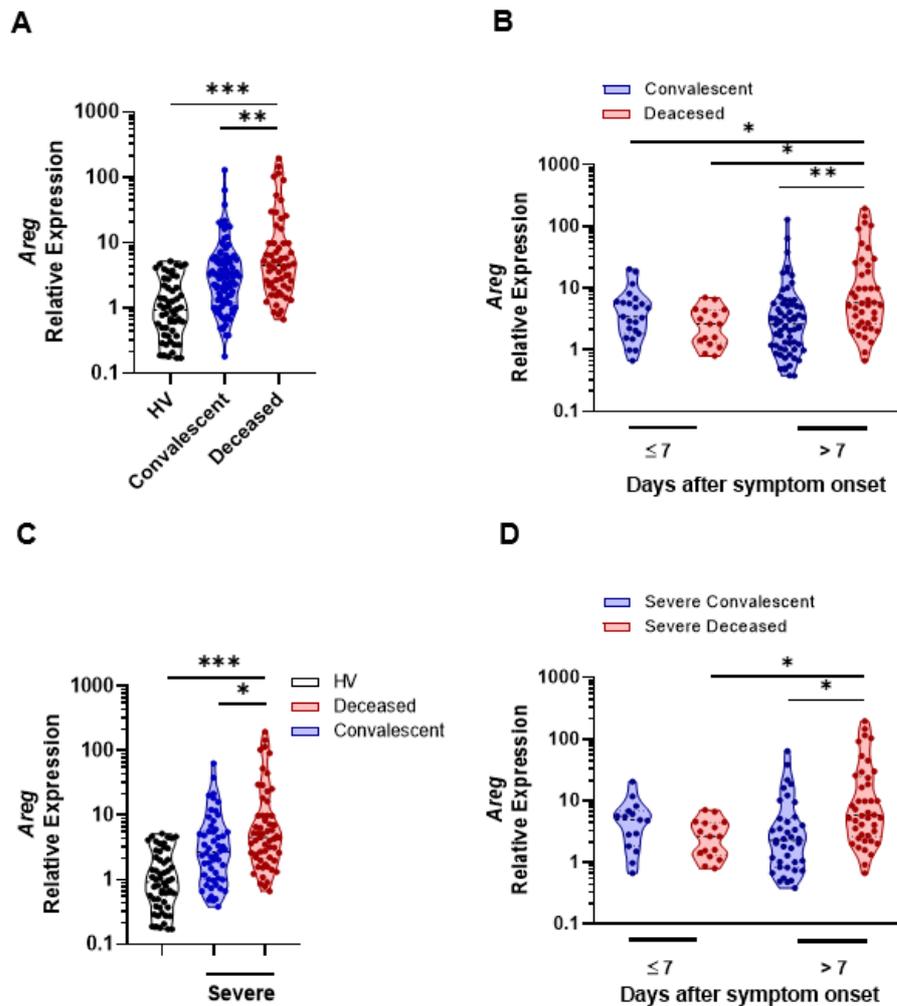


**Figura 4 - PBMCs de pacientes com COVID-19 e doadores voluntários saudáveis diferem na expressão gênica de *Areg*.** PBMCs e PMNs foram isolados de pacientes com COVID-19 e doadores saudáveis. **(A)** Quantificação de *Areg* por RT-PCR no PBMC de pacientes com COVID-19 ( $n = 147$ ) e doadores saudáveis ( $n = 56$ ). **(B)** Quantificação de *Areg* por RT-PCR no PMN de pacientes com COVID-19 ( $n = 33$ ) e doadores saudáveis ( $n = 13$ ). A expressão gênica foi normalizada pelo *Gapdh* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e as mudanças são mostradas em relação aos doadores saudáveis. Os dados foram analisados através da ANOVA, seguido do teste de Tukey. Os resultados estão expressos em Média. \*\* $P < 0,01$ , ns - não significativo.



**Figura 5 - PBMC de pacientes graves com COVID-19 diferem na expressão gênica de *Areg* em relação a doadores voluntários saudáveis.** PBMCs foram isolados de pacientes com COVID-19 e doadores saudáveis. Diferenças de expressão de *Areg* entre (A) casos moderados ( $n = 29$ ) e graves ( $n = 114$ ), e também em relação ao (B) dias do aparecimento dos primeiros sintomas ( $\leq 7$  dias: moderados ( $n = 6$ ) graves ( $n = 34$ ),  $> 7$  dias: moderados ( $n = 23$ ) graves ( $n = 80$ )). A expressão gênica foi normalizada pelo *Gapdh* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e as mudanças são mostradas em relação aos doadores saudáveis. Os dados foram analisados através da ANOVA, seguido do teste de Tukey. Os resultados estão expressos em Média. \*\* $P < 0,01$ .

Em seguida, investigamos se o nível de expressão gênica do *Areg* poderia ter relação com o desfecho dos pacientes, nesse caso, observamos que os indivíduos que evoluíram para óbito possuíam concentrações mais elevadas de *Areg* no PBMC, em comparação aos pacientes convalescentes (Fig. 6A) e que esse padrão era mais proeminente em fases mais tardias da doença (Fig. 6B). Quando comparamos o desfecho somente entre os pacientes graves esse padrão também se repetiu (Fig. 6C e 6D).



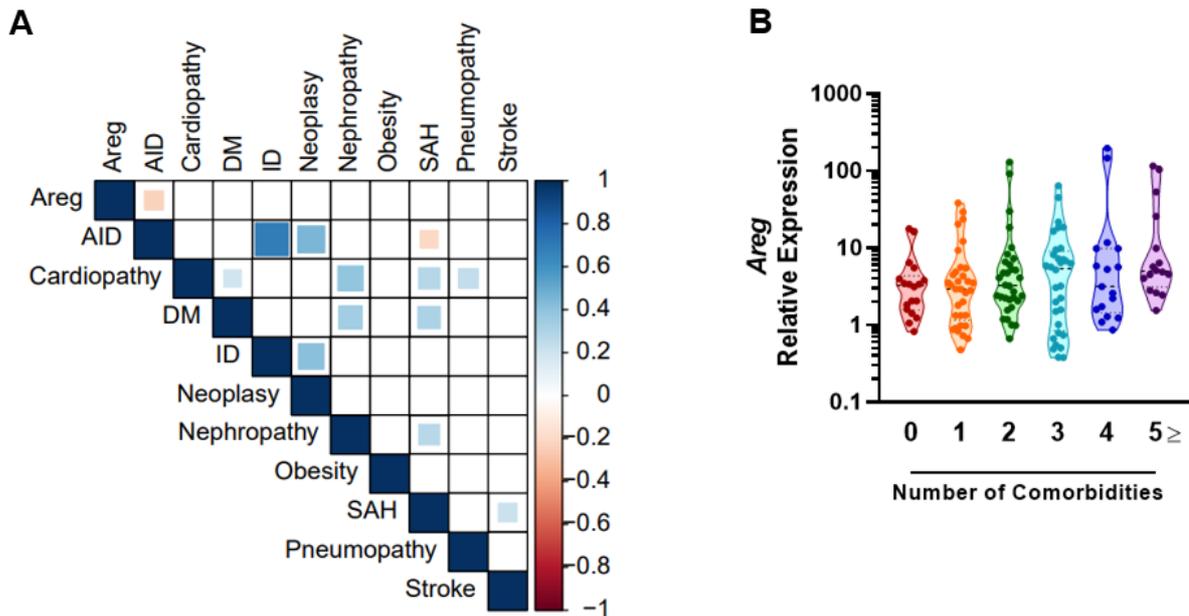
**Figura 6 - Pacientes com COVID-19 que evoluíram para óbito apresentam maior expressão de *Areg* no PBMC.** PBMCs foram isolados de pacientes com COVID-19 e doadores saudáveis. **(A)** Quantificação de *Areg* por RT-PCR no PBMC de pacientes convalescentes ( $n = 89$ ), que evoluíram para óbito ( $n = 58$ ) e voluntários saudáveis ( $n = 56$ ), **(B)** além de sua distribuição em relação ao início dos sintomas ( $\leq 7$  dias: convalescentes ( $n = 24$ ) óbitos ( $n = 16$ )  $> 7$  dias: convalescentes ( $n = 65$ ) óbitos ( $n = 42$ ). **(C)** Expressão de *Areg* entre pacientes graves que evoluíram para óbito ( $n = 58$ ), convalescentes ( $n = 54$ ) e voluntários saudáveis ( $n = 56$ ), **(D)** bem como sua distribuição em relação ao início dos sintomas ( $\leq 7$  dias: convalescentes ( $n = 15$ ) óbitos ( $n = 16$ )  $> 7$  dias: convalescentes ( $n = 39$ ) óbitos ( $n = 42$ ). A expressão gênica foi normalizada pelo *Gapdh* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e as mudanças são mostradas em relação aos doadores saudáveis. Os dados foram analisados através da ANOVA, seguido do teste de Tukey. Os resultados estão expressos em Média. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Posteriormente, investigamos a relação entre os níveis de *Areg* no PBMC dos pacientes com COVID-19 com as características clínicas e comorbidades. Encontramos correlação negativa com AID (*autoimmune disease*) (Fig. 7A). Também analisamos os pacientes de acordo com o número de comorbidades e não detectamos diferenças estatisticamente significativas nos níveis de *Areg* de acordo com o número de comorbidades dos pacientes (Fig. 7B).

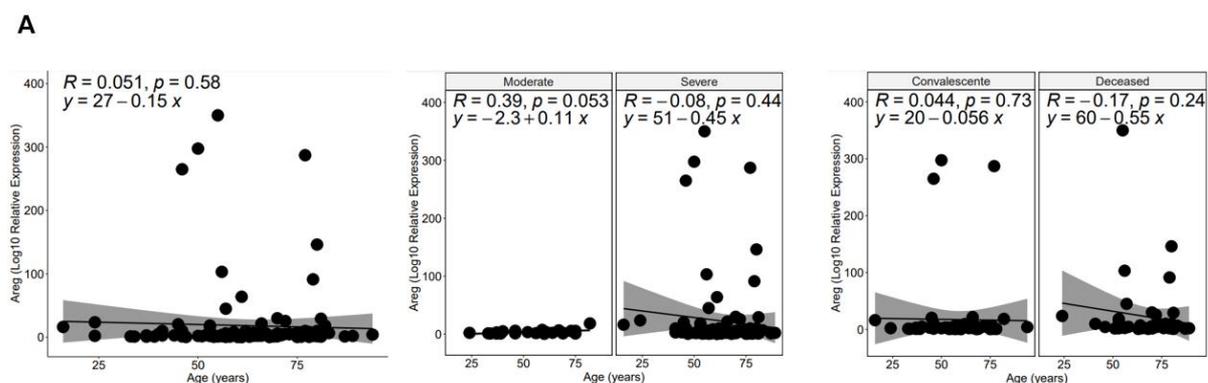
Como os fatores de idade e sexo contribuem com o desfecho da doença (Scully *et al.*, 2020), analisamos a possibilidade de haver alguma correlação entre essas

características clínicas e os níveis de *Areg* nos pacientes, entretanto não conseguimos encontrar nenhuma associação significativa (Fig. 8A E 9A).

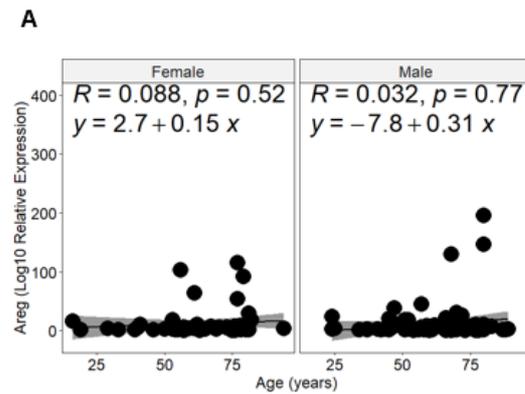
No geral, vimos que os níveis de *Areg* no PBMC de indivíduos com COVID-19 estavam elevados em comparação aos controles saudáveis e que esse aumento estava associado a quadros clínicos mais graves com provável evolução de óbito. Além disso, esse aumento parece ser independente de características clínicas e comorbidades prévias dos pacientes.



**Figura 7 - Associação entre os níveis de expressão de *Areg* com características clínicas e comorbidades. (A)** Correlação de matriz entre os níveis de *Areg* no PBMC dos pacientes com COVID-19 com parâmetros clínicos e comorbidades ( $n = 147$ ) as análises foram realizadas em R para gerar a matriz de correlação e a função *corrplot* para gerar a exibição gráfica. Relatamos as correlações que compreendem os valores de  $P < 0,05$ . **(B)** Níveis de *Areg* no PBMC dos pacientes com COVID-19 associados ao número de comorbidades de cada indivíduo, variando de nenhuma comorbidade (0) a maior/igual a cinco ( $\geq 5$ ) ( $n = 147$ ). AID - *autoimmune disease*, ID - *immunodeficiency*, DM - *diabetes mellitus*, SAH - *systemic arterial hypertension*.



**Figura 8 - Associação entre os níveis de expressão de *Areg* com idade. (A)** Correlação entre os níveis de *Areg* no PBMC dos pacientes com COVID-19 no dia da internação com a idade ( $n = 147$ ).

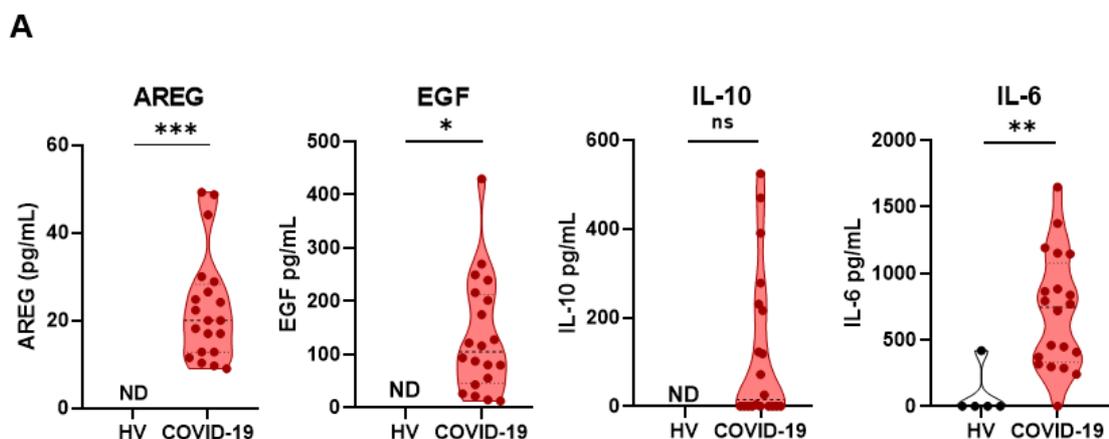


**Figura 9 - Associação entre os níveis de expressão de Areg com o sexo. (A)** Correlação entre os níveis de Areg no PBMC dos pacientes com COVID-19 no dia da internação com o sexo ( $n = 147$ ).

#### 4.2 Amostras de pulmão de pacientes com COVID-19 (+) apresentam níveis elevados de AREG em comparação aos doadores COVID-19 (-)

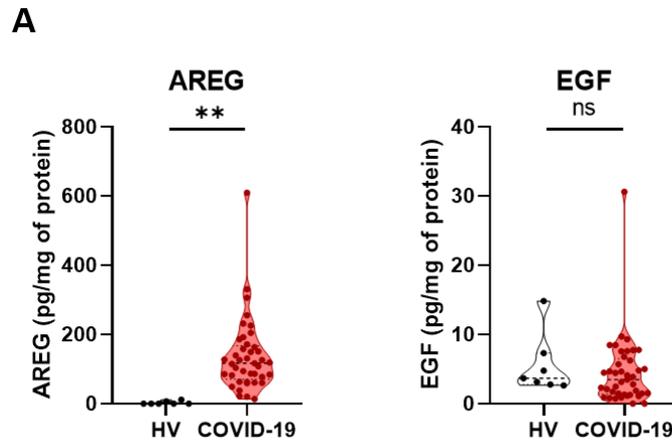
Embora tenhamos observado a expressão diferencial de Areg no PBMC dos pacientes, nos perguntamos se esse aumento era visto também a nível proteico. Para isso, verificamos a concentração de AREG e outros mediadores no lavado traqueal dos indivíduos saudáveis e naqueles acometidos por COVID-19. Conforme (Fig. 10A), vemos que há um aumento de AREG solúvel, além de outros marcadores como EGF, IL-10 e IL-6.

Posteriormente investigamos os níveis de AREG em amostras pulmonares provenientes de autópsias de pacientes, de maneira similar, notamos aumento na concentração de AREG e EGF por ELISA (Fig. 11A). Observamos também um maior número células expressando AREG nas seções marcadas por imunofluorescência. Em conjunto esses dados sugerem que há alteração nos níveis proteicos de AREG ao longo da infecção pelo SARS-CoV-2.

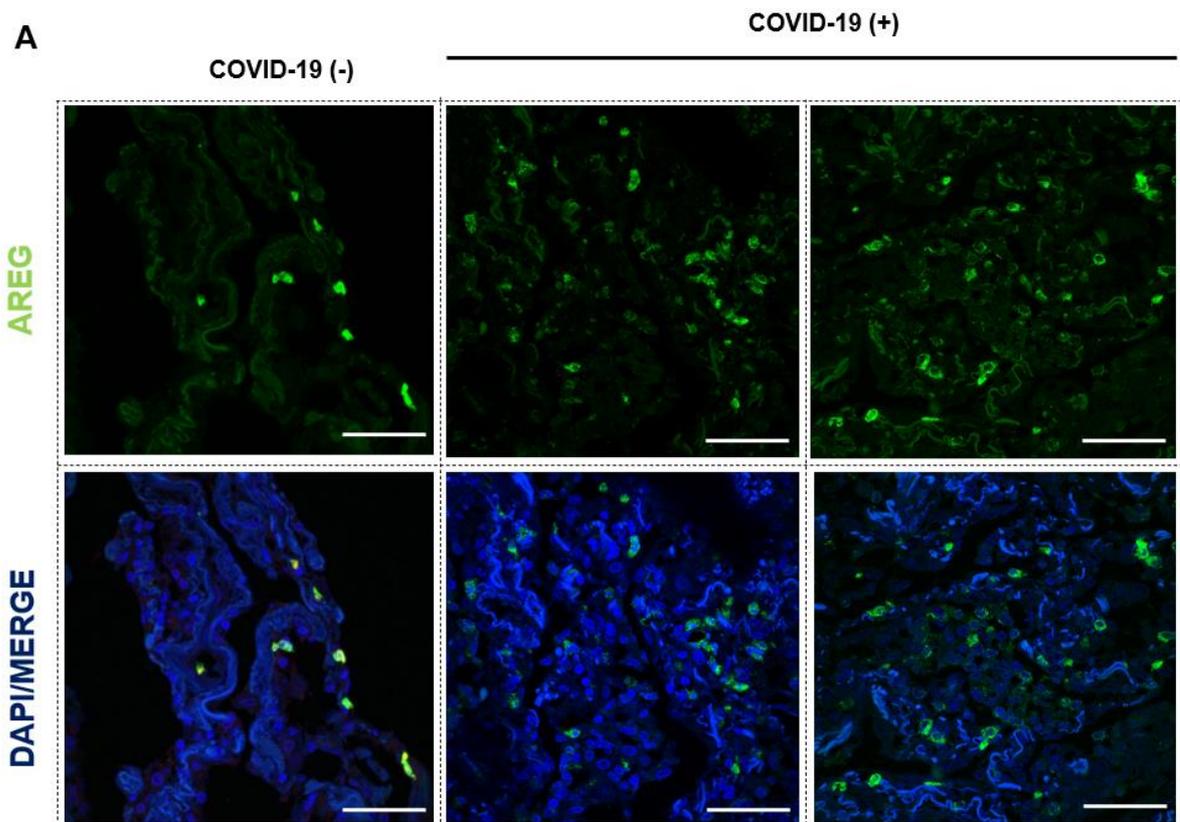


**Figura 10. Níveis de citocinas no lavado traqueal de pacientes com COVID-19. (A)** O lavado traqueal de pacientes acometidos de COVID-19 ( $n = 20$ ) e doadores voluntários ( $n = 5$ ) tiveram seus

níveis de citocinas avaliados por ELISA (A). Os dados foram analisados através de teste T pareado. Os resultados estão expressos em Média. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001, ns = não significativo.



**Figura 11. Níveis de citocinas em autópsias pulmonares de pacientes com COVID-19.** O homogenato das biópsias pulmonares de pacientes acometidos de COVID-19 (n = 41) e doadores COVID-19 (-) (n = 7) tiveram seus níveis de citocinas avaliados por ELISA (A). Os dados foram analisados através de teste T pareado. Os resultados estão expressos em Média. \*\*P < 0,01, ns = não significativo.



**Figura 12 - AREG está aumentado em autópsias de pulmão de pacientes com COVID-19.** Imagens representativas de confocal da presença de AREG no tecido pulmonar de autópsias de pacientes COVID-19 negativo (n = 2) ou pacientes COVID-19 (n = 3). As células foram marcadas para núcleo (DAPI, azul) e AREG (verde). A barra de escala indica 50 μm.

### 4.3 No modelo experimental de COVID-19 há aumento de produção de AREG e macrófagos/monócitos F4/80+ parecem ser a fonte geradora

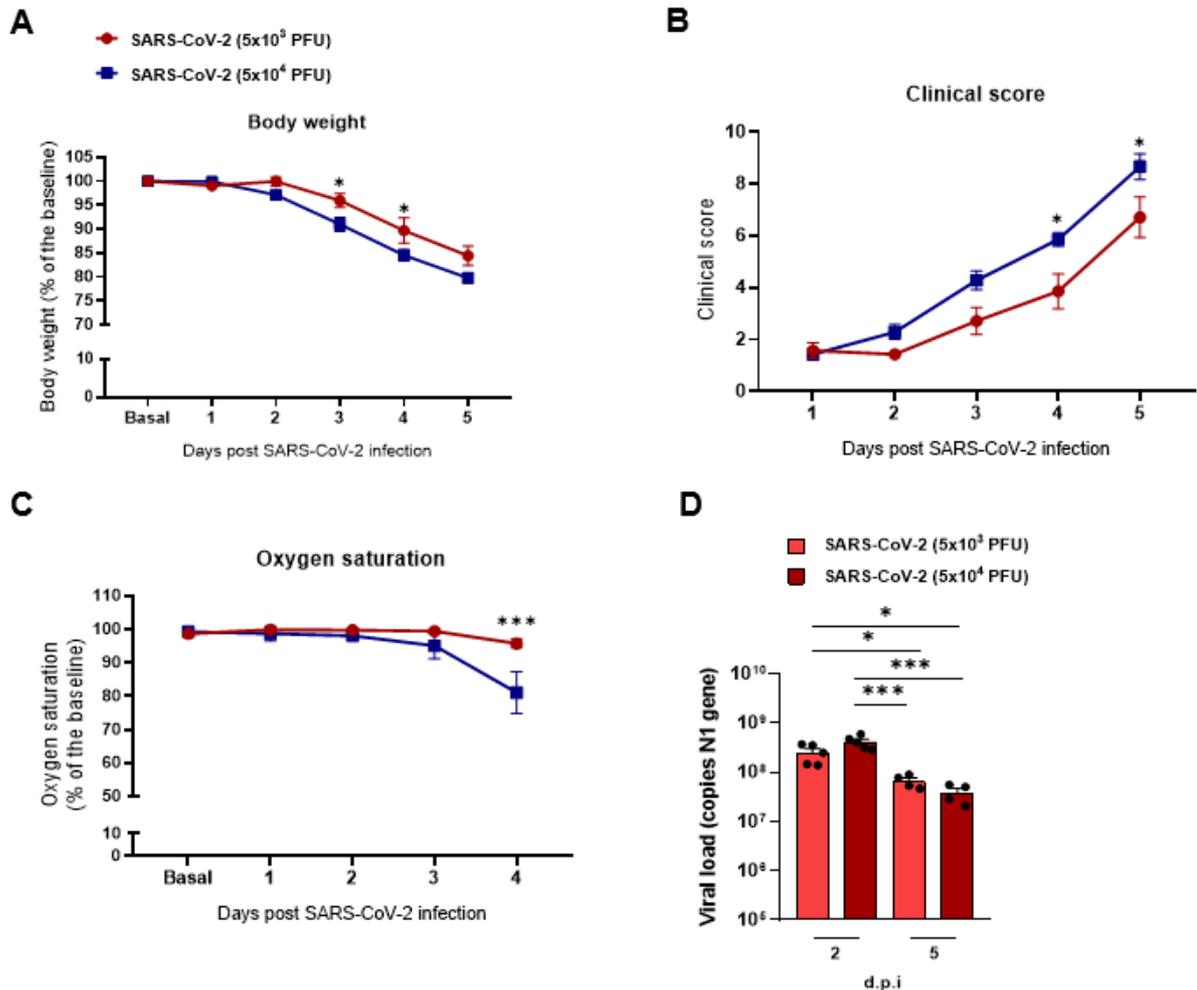
Para melhor investigar a participação do AREG na fisiopatologia da COVID-19, utilizamos o modelo experimental de infecção pelo SARS-CoV-2 em animais K18-hACE-2. Esses camundongos possuem o gene da *Ace2* (*Angiotensin-converting enzyme 2*) humana governado pelo promotor da *K18* (*Keratin 18*), permitindo uma infecção produtiva do vírus (Mccray *et al.*, 2006; Winkler *et al.*, 2020).

Como vimos que os níveis de AREG estavam elevados nas amostras pulmonares e que no PBMC, esse aumento tinha associação com uma forma grave da doença, nos perguntamos se esse padrão poderia se repetir experimentalmente e qual poderia ser a provável fonte produtora.

Para isso, infectamos animais K18-hACE-2 com  $5 \times 10^3$  ou  $5 \times 10^4$  PFU de SARS-CoV-2 por via intranasal, nessas condições, com base em experimentos anteriores há o desenvolvimento de doença moderada e letal respectivamente. Após infecção os animais foram acompanhados diariamente com eutanásia no dia 2 e 5 dpi. No terceiro dia de infecção, conforme (Fig. 13A), os camundongos apresentam aumento no *score* clínico e diminuição do peso corporal. No 5 dpi temos uma diminuição consistente da saturação de O<sub>2</sub>. Esses sinais clínicos alterados são condizentes com a carga viral encontrada no pulmão (Fig. 13B).

De maneira compatível com os mediadores dosados, as análises histopatológicas evidenciaram um progressivo processo inflamatório nos pulmões (Fig. 14A). Observamos um acúmulo de leucócitos nos espaços perivasculares, com infiltrado de células imunes nos espaços adjacentes aos alvéolos, além de espessamento na arquitetura alveolar (Fig. 14B).

No modelo experimental, similar aos dados de humanos, verificamos na dose letal um aumento na concentração de AREG, além de outros marcadores envolvidos em respostas de reparo como o IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) (Fig. 15C). Já para os mediadores pró-inflamatórias como IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17, CXCL1 e Endocan não observamos grandes diferenças entre as concentrações virais (Fig. 15A). Padrão similar também para citocinas de caráter mais anti-inflamatório, como IL-10, IL-13, IL-25 e IL-33, excetuando-se IL-4 (Fig. 15B).



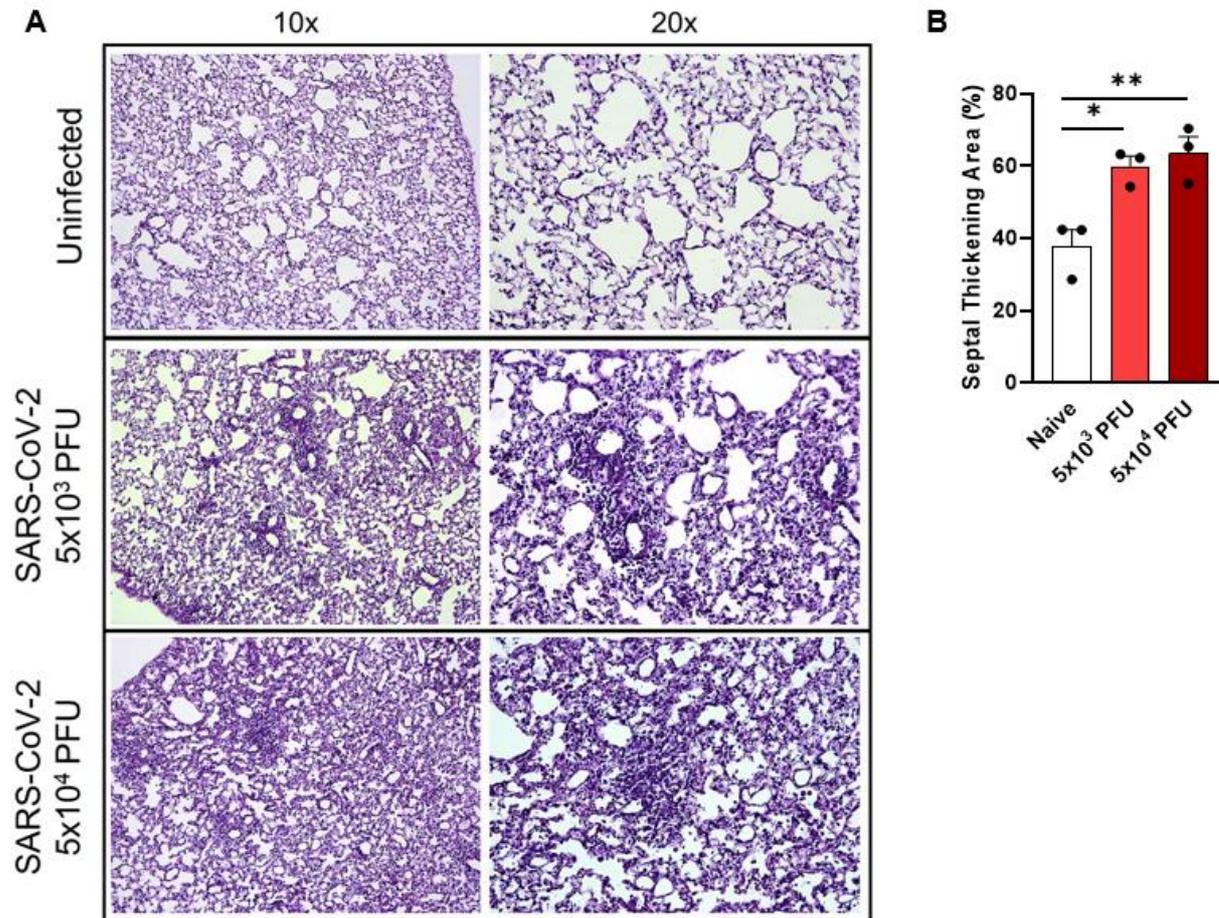
**Figura 13 - Infecção com concentrações diferentes de SARS-CoV-2 em camundongos K18-hACE-2 produz sinais clínicos distintos.** Camundongos K18-hACE2 foram inoculados por via intranasal com  $5 \times 10^3$  ( $n = 8$ ) ou  $5 \times 10^4$  ( $n = 10$ ) PFU de SARS-CoV-2, os sinais clínicos foram acompanhados até a eutanásia no 2 e 5 dpi, além disso, as cópias de RNA viral no pulmão após infecção foram determinadas por RT-PCR tendo como base o grupo *naive* ( $n = 6$ ). Efeitos da infecção nas características clínicas dos animais como **(A)** peso corporal, **(B)** score clínico e **(C)** saturação de oxigênio. **(D)** Carga viral nos pulmões após infecção. Os dados foram analisados através da ANOVA de duas vias (A) seguido do teste de Bonferroni ou uma via seguida por Tukey (B). Os resultados estão expressos em Média  $\pm$  SEM. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001.

Para identificar as prováveis fontes produtoras de AREG, recorremos a citometria de fluxo. As células pulmonares processadas no 2 e 5 d.p.i foram marcadas e analisadas conforme estratégia de *gate* disponível nas figuras 16A e 19A.

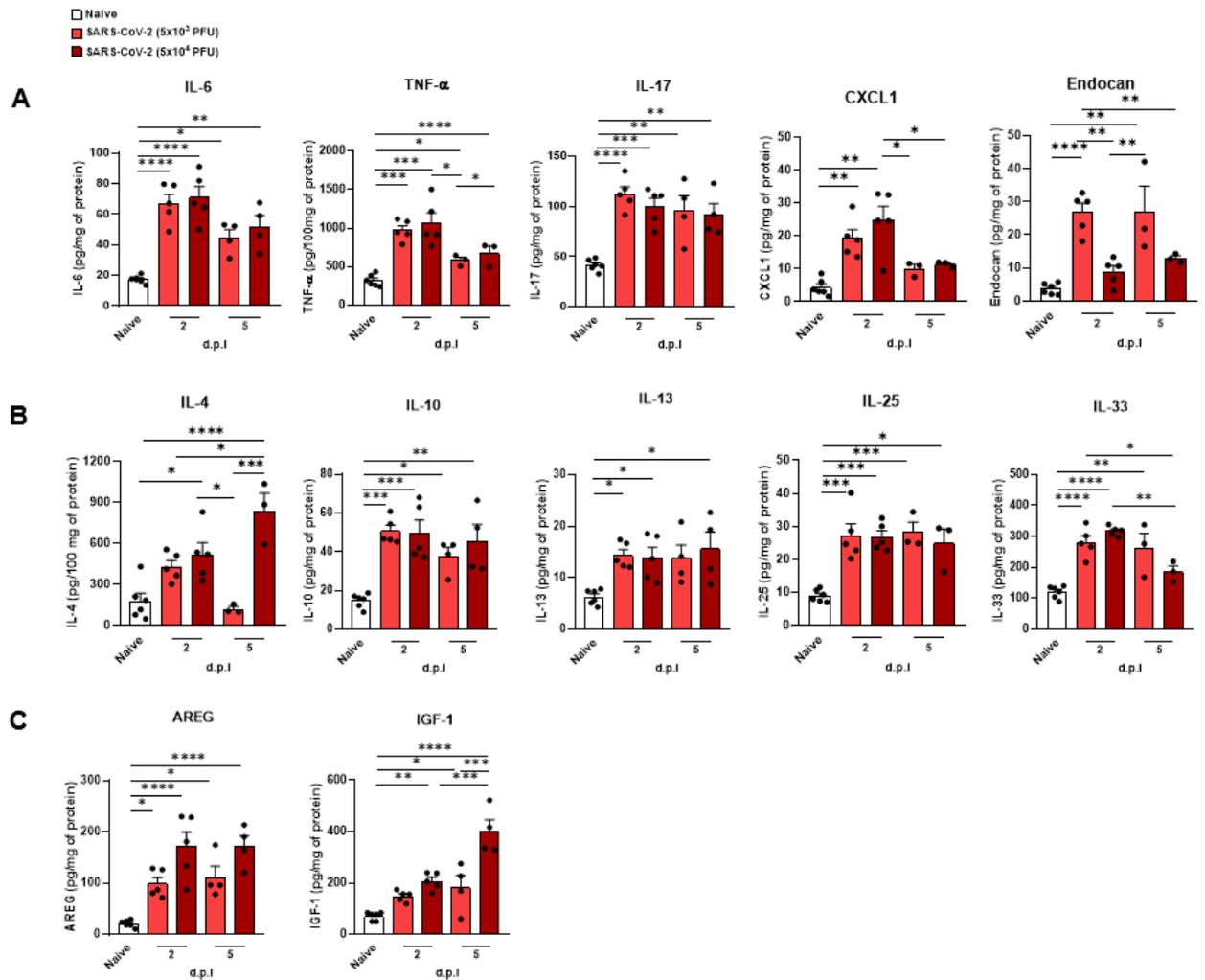
Embora vários tipos celulares são capazes de produzir AREG (Zaiss *et al.*, 2015), vimos que no 2 d.p.i os maiores produtores em nosso modelo experimental eram populações CD45+ (Fig. 17 A e B). Dentre os leucócitos, identificamos os monócitos-macrófagos F4/80+ como principal fonte produtora tanto no 2 dpi (Fig. 18A e B) quanto 5 dpi (Fig. 20A e B).

Em conjunto, conseguimos reproduzir no modelo experimental de COVID-19 que, como em humanos, o AREG se encontra elevado no pulmão dos animais

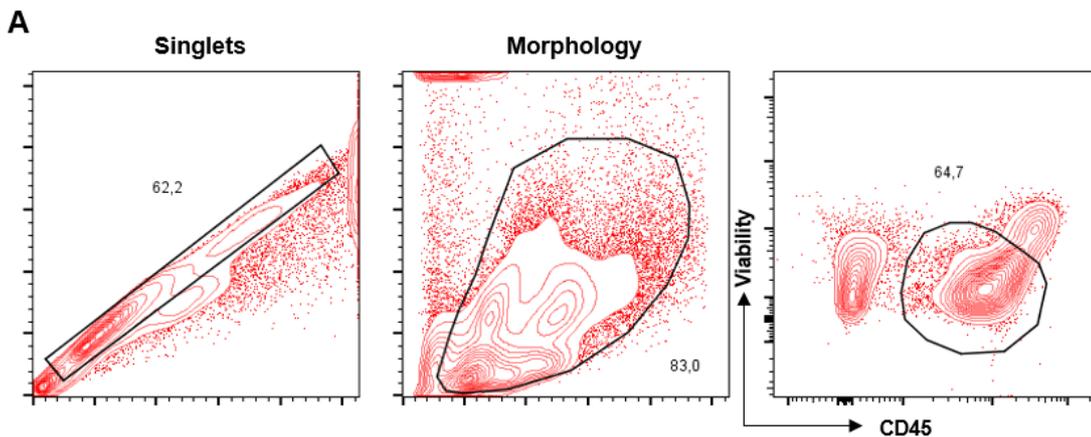
infectados e que esse aumento também se refletia na gravidade da doença. Além disso, identificamos a provável fonte produtora.



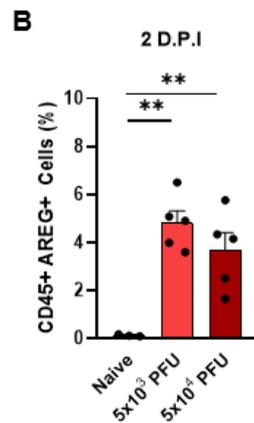
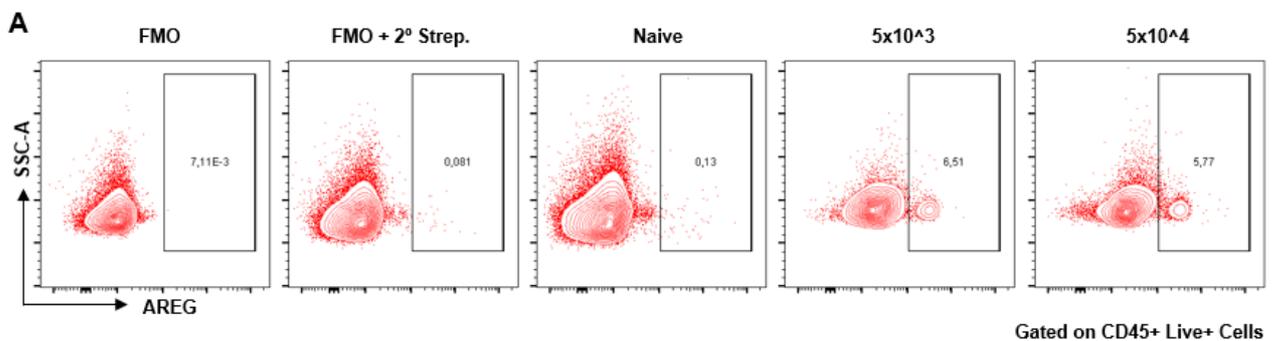
**Figura 14 - Análises histopatológicas de animais K18-ACE-2 infectados com SARS-CoV-2.** Camundongos K18-hACE2 foram inoculados por via intranasal com  $5 \times 10^3$  ( $n = 3$ ) ou  $5 \times 10^4$  ( $n = 3$ ) PFU de SARS-CoV-2 sofrendo eutanásia no 5 dpi com posterior coleta do pulmão para análises histopatológicas. **(A)** Imagens representativas das análises histopatológicas. **(B)** Dados morfológicos mostrando porcentagem do espessamento septal pulmonar 5dpi após a infecção. Os dados foram analisados através da ANOVA, seguido do teste de Tukey. Os resultados estão expressos em Média  $\pm$  SEM. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01.



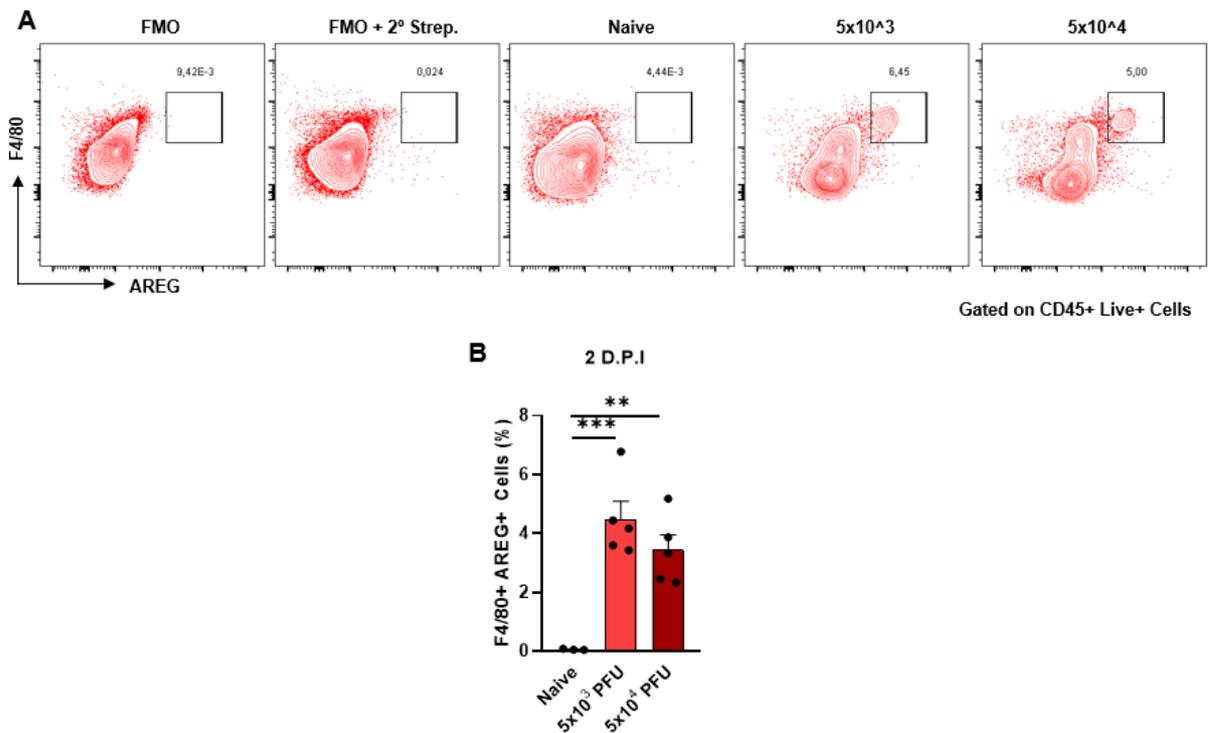
**Figura 15 - Produção de citocinas no pulmão durante infecção experimental por SARS-CoV-2.** (A) Camundongos K18-hACE2 foram inoculados por via intranasal com  $5 \times 10^3$  ( $n = 8$ ) ou  $5 \times 10^4$  ( $n = 10$ ) PFU de SARS-CoV-2 sofrendo eutanásia no 2 e 5 dpi, o pulmão foi coletado para quantificação de citocinas por ELISA. (A) Concentração de citocinas pró-inflamatórias no pulmão dos animais infectados. (B) Concentração de citocinas anti-inflamatórias no pulmão dos animais infectados. (C) Concentração de citocinas de reparo no pulmão dos animais infectados. Os dados foram analisados através da ANOVA, seguido do teste de Tukey. Os resultados estão expressos em Média  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ , IL-6 (*interleukin 6*), TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*), IL-17 (*interleukin 17*), CXCL1 (*C-X-C motif chemokine ligand 1*), IL-4 (*interleukin 4*), IL-10 (*interleukin 10*), IL-13 (*interleukin 13*), IL-25 (*interleukin 25*) e IL-33 (*interleukin 33*).



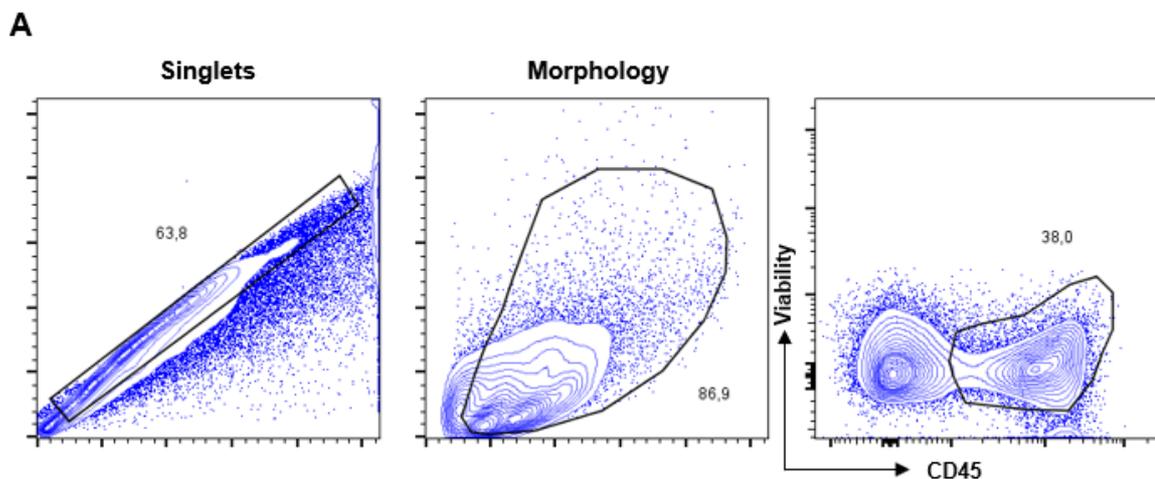
**Figura 16 - Protocolo representativo das estratégias de gate.** Células pulmonares de animais infectados com SARS-CoV-2 foram marcadas com anticorpos específicos e analisadas para **(A)** exclusão de eventos duplos (*singlets*), selecionados conforme morfologia geral (*morphology*) e diferenciadas em leucócitos vivos (*Viability* x *CD45*).



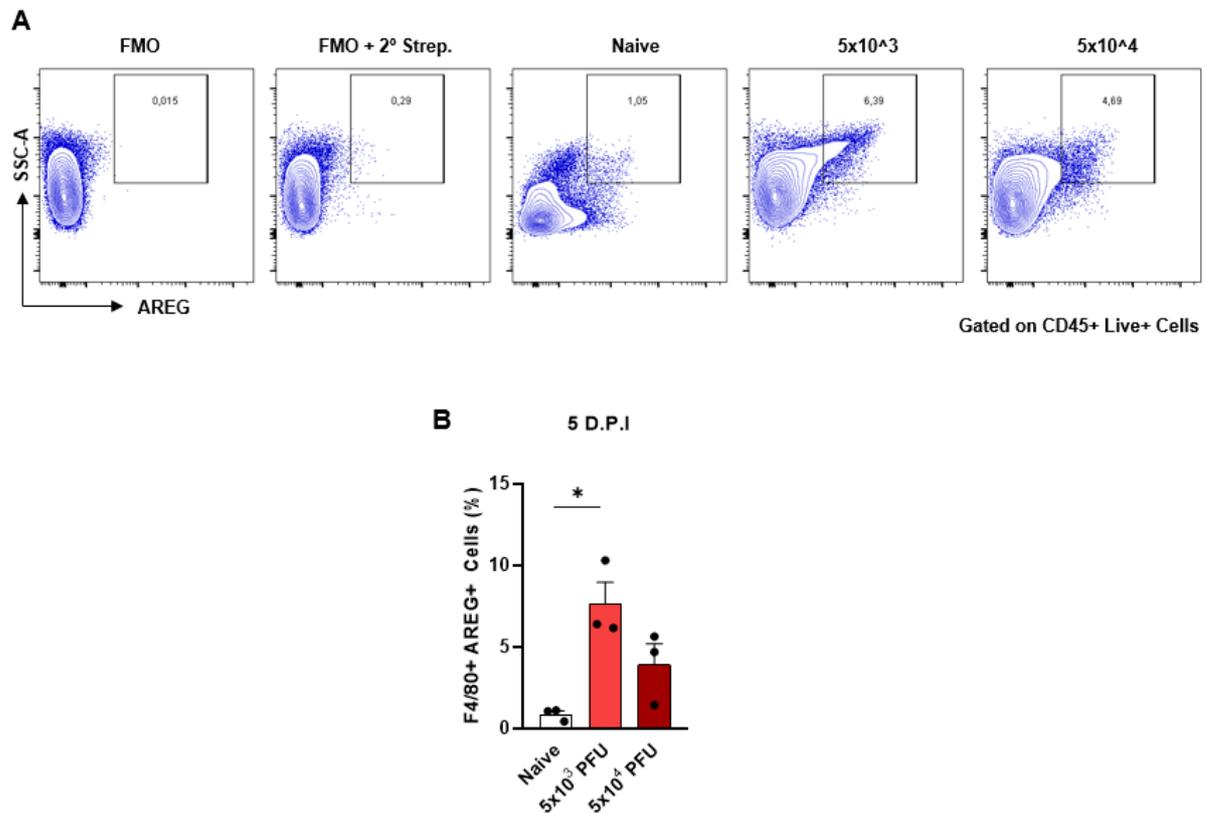
**Figura 17 - Leucócitos são os produtores de AREG no pulmão.** Camundongos K18-hACE2 foram inoculados por via intranasal com  $5 \times 10^3$  ( $n = 5$ ) ou  $5 \times 10^4$  ( $n = 5$ ) PFU de SARS-CoV-2 sofrendo eutanásia no 2 dpi. O pulmão foi coletado e processado para formar uma suspensão, em seguida as células foram marcadas com anticorpos anti-CD45, anti-AREG biotilado e estreptavidina conjugada com fluoróforo. **(A)** Imagens representativas da citometria de fluxo das células marcadas e a **(B)** frequência de células CD45+ AREG+. Os dados foram analisados através da ANOVA, seguido do teste de Tukey. Os resultados estão expressos em Média  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0,01$ , FMO (*fluorescence minus one*), 2º strep. (*streptavidin fluorophore conjugate*).



**Figura 18 - Os monócitos-macrófagos F4/80+ são os produtores de AREG nos pulmões.** Camundongos K18-hACE2 foram inoculados por via intranasal com  $5 \times 10^3$  ( $n = 5$ ) ou  $5 \times 10^4$  ( $n = 5$ ) PFU de SARS-CoV-2 sofrendo eutanásia no 2 dpi. O pulmão foi coletado e processado para formar uma suspensão, em seguida as células foram marcadas com anticorpos anti-CD45, anti-F4/80, anti-AREG biotilado e estreptavidina conjugada com fluoróforo. **(A)** Imagens representativas da citometria de fluxo das células marcadas e a **(B)** frequência de células F4/80+ AREG+. Os dados foram analisados através da ANOVA, seguido do teste de Tukey. Os resultados estão expressos em Média  $\pm$  SEM. \*\* $P < 0,01$ , FMO (*fluorescence minus one*), 2° strep. (*streptavidin fluorophore conjugate*), F4/80+ (*EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*).



**Figura 19 - Protocolo representativo das estratégias de gate.** Células pulmonares de animais infectados com SARS-CoV-2 foram marcadas com anticorpos específicos e analisadas para **(A)** exclusão de eventos duplos (*singlets*), selecionados conforme morfologia geral (*morphology*) e diferenciadas em leucócitos vivos (*Viability* x *CD45*).



**Figura 20 - Os monócitos-macrófagos F4/80+ são os produtores de AREG nos pulmões.** Camundongos K18-hACE2 foram inoculados por via intranasal com  $5 \times 10^3$  ( $n = 3$ ) ou  $5 \times 10^4$  ( $n = 3$ ) PFU de SARS-CoV-2 sofrendo eutanásia no 5 dpi. O pulmão foi coletado e processado para formar uma suspensão, em seguida as células foram marcadas com anticorpos anti-CD45, anti-F4/80, anti-AREG biotinilado e estreptavidina conjugada com fluoróforo. **(A)** Imagens representativas da citometria de fluxo das células marcadas e **(B)** frequência de células F4/80+ AREG+. Os dados foram analisados através da ANOVA, seguido do teste de Tukey. Os resultados estão expressos em Média  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$ , FMO (*fluorescence minus one*), 2° strep. (*streptavidin fluorophore conjugate*), F4/80+ (*EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*).

#### 4.4 O bloqueio da sinalização do EGFR melhora sinais clínicos e histopatológicos dos animais K18-ACE2 infectados com SARS-CoV-2

Para entender como o aumento de AREG se relacionava com a fisiopatologia da COVID-19, utilizamos o bloqueio farmacológico do EGFR durante a infecção experimental. Para isso, tratamos oralmente os animais com gefitinib, um inibidor do domínio quinase do receptor.

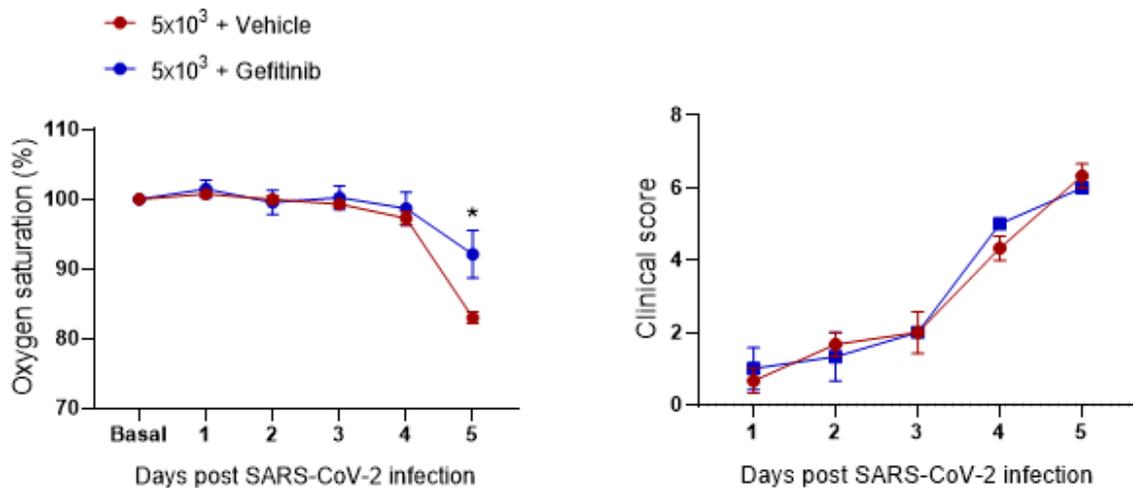
Conforme (Fig. 21A), o gefitinib foi capaz de retardar a perda de saturação de oxigênio dos animais infectados com a menor dose de vírus, embora não tenha melhorado o *score* clínico. Na maior dose viral (Fig. 21A), a administração oral da droga não foi capaz de amenizar os sinais clínicos.

O bloqueio do EGFR parece não ter alterado a resistência dos animais, isso é compatível com as concentrações semelhantes de IL-6 em todos os tratamentos (Fig. 22A) avaliados. Todavia, os níveis de IL-10 e IGF-1 se mantiveram menores com a

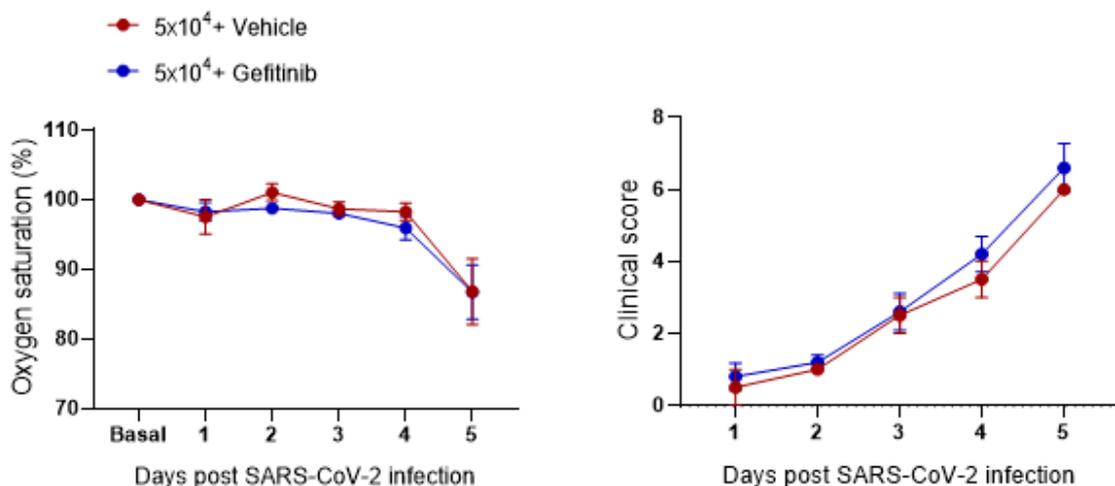
aplicação do gefitinib.

Já as análises histopatológicas indicam provável diminuição do dano encontrado nos pulmões (Fig. 23A). Isso fica nítido com uma melhora no aspecto geral do tecido, menor espessamento septal e queda no infiltrado inflamatório em comparação aos animais veículo. Reunidos, esses dados indicam que o bloqueio de EGFR no modelo experimental de COVID-19, retarda a perda de saturação na menor dose e protege os animais de um dano pulmonar excessivo.

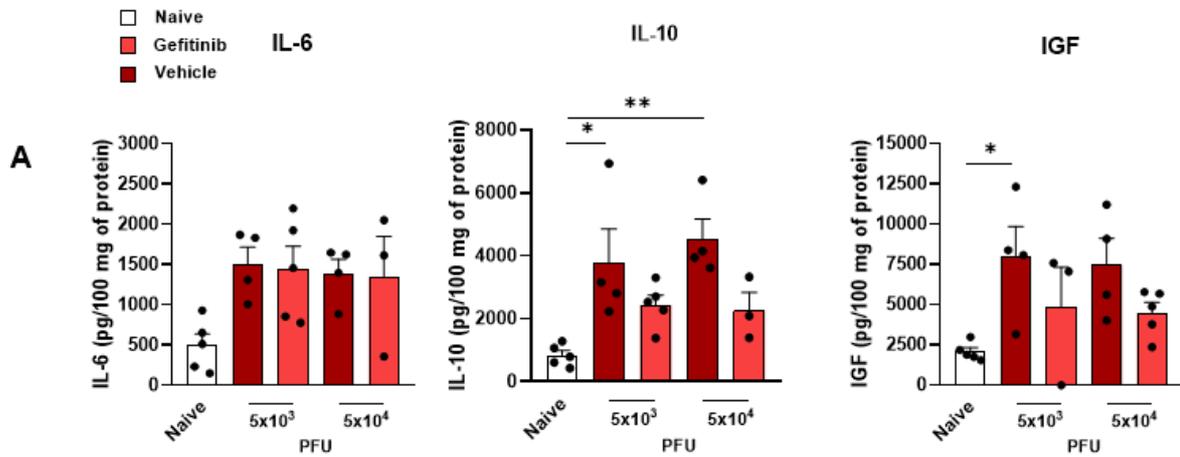
**A**



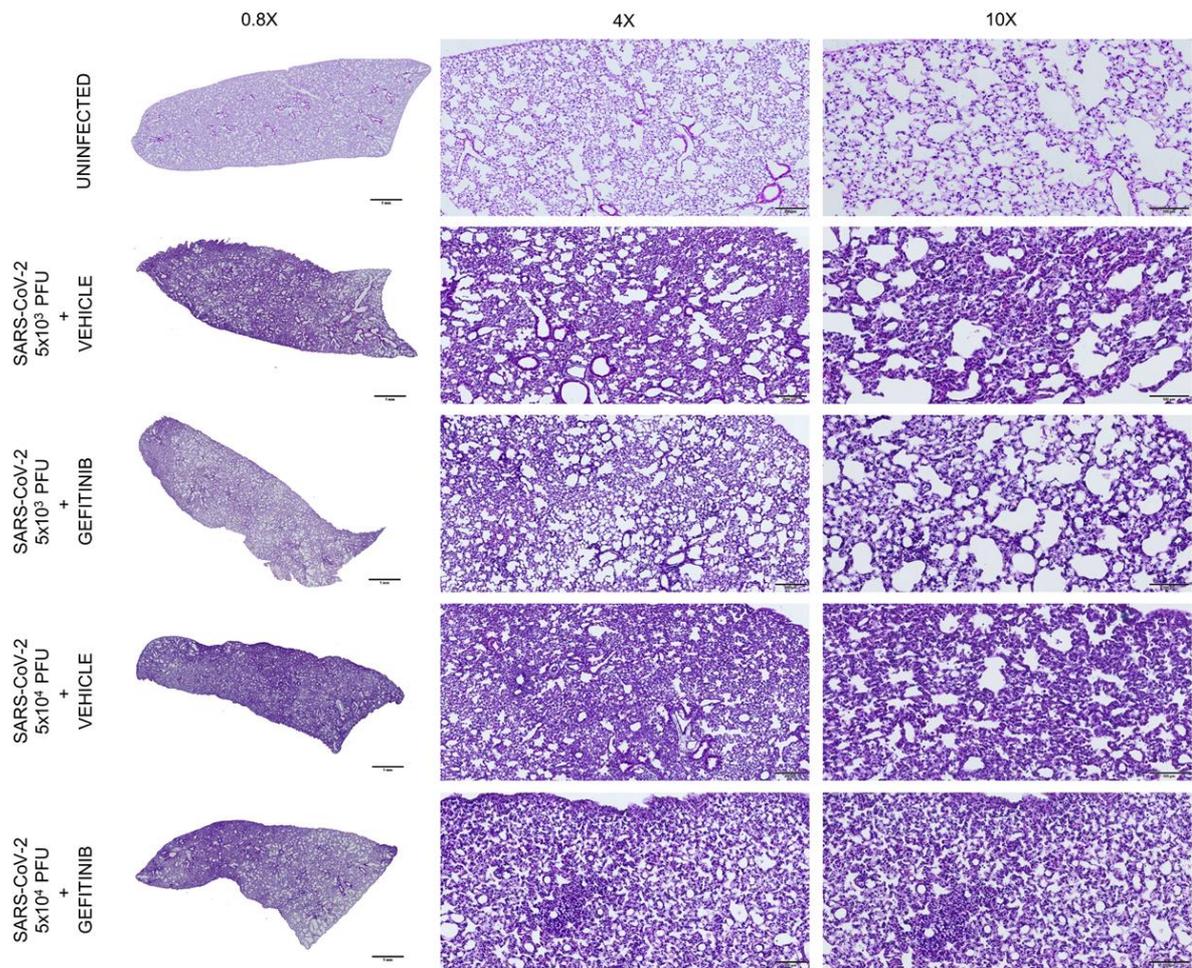
**B**



**Figura 21 - A inibição do EGFR melhora a saturação de oxigênio em modelo de infecção experimental.** Camundongos K18-hACE2 foram tratados (-1 dpi até 4 dpi) com gefitinib oral (30 mg/kg) ou veículo (CMC 1%) e infectados com SARS-CoV-2 nas doses de  $5 \times 10^3$  (gefitinib  $n = 3$  / veículo  $n = 4$ ) ou  $5 \times 10^4$  (gefitinib  $n = 5$  / veículo  $n = 4$ ) PFU de SARS-CoV-2. Os sinais clínicos foram acompanhados até a eutanásia no 5 dpi. **(A)** Efeitos clínicos do tratamento de gefitinib ou veículo nos animais infectados com  $5 \times 10^3$  PFU de SARS-CoV-2. **(B)** Efeitos clínicos do tratamento de gefitinib ou veículo nos animais infectados com  $5 \times 10^4$  PFU de SARS-CoV-2. Os dados foram analisados através da ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. Os resultados estão expressos em Média  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$ . CMC (carboximetilcelulose).



**Figura 22 - O bloqueio do EGFR não modifica a resistência dos animais K18-ACE-2 infectados com SARS-CoV-2.** Camundongos K18-hACE2 foram tratados (-1dpi até 4 dpi) com gefitinib oral (30 mg/kg) ou veículo (CMC 1%) e infectados com SARS-CoV-2 nas doses de  $5 \times 10^3$  (gefitinib  $n = 3$  / veículo  $n = 4$ ) ou  $5 \times 10^4$  (gefitinib  $n = 5$  / veículo  $n = 4$ ) PFU de SARS-CoV-2. O pulmão foi coletado para quantificação de citocinas por ELISA. **(A)** Concentração de citocinas no pulmão dos animais infectados e tratados com gefitinib ou veículo. Os dados foram analisados através da ANOVA, seguido do teste de Tukey. Os resultados estão expressos em Média  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , IL-6 (*interleukin 6*), IL-10 (*interleukin 10*), IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*).



**Figura 23 - O bloqueio da sinalização do EGFR melhora aspectos histopatológicos do pulmão dos animais K18-ACE-2 infectados com SARS-CoV-2.** Camundongos K18-hACE2 foram tratados (-1 dpi até 4 dpi) com gefitinib oral (30 mg/kg) ou veículo (CMC 1%) e infectados com SARS-CoV-2 nas doses de  $5 \times 10^3$  (gefitinib  $n = 3$  / veículo  $n = 4$ ) ou  $5 \times 10^4$  (gefitinib  $n = 5$  / veículo  $n = 4$ ) PFU de SARS-CoV-2. Os animais foram eutanasiados no 5 dpi e o pulmão processado para análises histológicas. **(A)** Imagens representativas das análises histopatológicas dos animais *naïve* e infectados com SARS-CoV-2 após tratamento com gefitinib ou veículo.

## **5. Discussão**

O AREG é uma citocina que está envolvida em múltiplos processos inflamatórios desencadeados por patógenos. No âmbito de infecções virais, ainda há poucos dados que elucidam a participação dessa proteína ao longo da patogênese. Nesse sentido, nosso trabalho oferece contribuições valiosas para esse entendimento.

Vimos que há uma alteração na expressão de *Areg* no PBMC de pacientes com COVID-19, essa *up*-regulação pode acontecer por múltiplos mecanismos. Não existe um consenso acerca dos fatores de transcrição envolvidos na indução deste gene. Entretanto, em humanos, alguns fatores são descritos como sendo capazes de agir no promotor do *Areg*, dentre os conhecidos destaca-se: elementos de resposta ao cAMP (CRE) e ao WT1 (WRE), elementos de ligação SP1, sítios de ligação ao AP-1 e também HIF-2 (Berasain & Avila, 2014).

O recrutamento desses fatores de transcrição pode ser desencadeado por uma série de sinais dependendo do contexto celular. A expressão de *Areg* pode ser induzida por vias como cAMP/PKA, PKC, pela ativação de receptores de citocinas e alguns tipos de PRRs (como TLR4) (Berasain & Avila, 2014; Meng *et al.*, 2015).

No contexto da COVID-19, outro importante indutor poderia ser a sinalização de interferon do tipo I (IFN-I) induzido em resposta ao reconhecimento viral. Nesse sentido, fomos capazes de detectar a produção de *Areg* em células de linhagem (dados não mostrados) estimuladas com ativadores de STING (*Stimulator of interferon genes*) (Barber *et al.*, 2015).

A via cGAS/STING é conhecida por ser uma importante fonte de indução de IFN-I, desse modo, Unterman *et al.* (2022) comenta que embora não seja conhecido como um ISG (*Interferon-stimulated gene*), provavelmente esse é um dos mecanismos da indução de *Areg*. Essa conjectura está de acordo com estudos publicados recentemente, que identificaram uma forte resposta do IFN-I em várias subpopulações de PBMCs derivadas de pacientes com COVID-19 (Huang *et al.*, 2021).

Em consonância com nossos achados, o aumento de *Areg* também foi descrito por Xiong *et al.* (2020) em análises de *bulk RNAseq* no PBMC de indivíduos com COVID-19. Essas evidências, em conjunto, nos mostram que a alteração nos níveis de *Areg* ocorre de maneira consistente e fundamentada por outros estudos.

Além disso, o aumento da expressão de moléculas reguladoras (como o *Areg*), nas coortes mais graves não é uma particularidade de nosso trabalho. Wilk *et al.*, (2020) descreve um fenótipo distorcido de células mielóides em direção a uma assinatura mais imunossupressora, essa alteração estava associada também a uma maior gravidade (Wilk *et al.*, 2020).

Nesse sentido, foi descrita também a presença de *clusters* de monócitos anti-inflamatórios em pacientes com COVID-19 que tendem a evoluir para doença grave. Essas populações celulares, possuem mudanças na expressão gênica rumo a um perfil supressivo/reparador, e inclusive, expressam mais *Areg* em comparação aos indivíduos com doença não progressiva (Unterman *et al.*, 2022).

Esses resultados estão alinhados ao aumento de expressão gênica no PBMC dos pacientes graves que descrevemos neste estudo. Isso indica uma potencial participação do AREG, produzido principalmente por células mielóides/linfóides, na progressão da doença.

A idade, sexo e presença de comorbidades prévias são particularidades relevantes na definição do rumo da COVID-19 (Dolan *et al.*, 2020). Entretanto, não conseguimos identificar um padrão claro entre os níveis de *Areg* e essas características. Isso nos sugere que a expressão desse gene ocorre de forma independente a esses fatores.

A expressão gênica diferencial se refletiu nas concentrações proteicas. Encontramos níveis elevados de AREG em amostras de lavado traqueal, em autópsias e homogenato pulmonar. O EGF, outro ligante do EGFR, aumentou de maneira expressiva no lavado traqueal, contudo, no contexto pulmonar seus níveis foram inferiores ao AREG. Mesmo que sinalizem pelo mesmo receptor, ambos os fatores desempenham papéis fisiológicos distintos (discutidos adiante) (McCarville & Ayres, 2017).

O aumento de citocinas inflamatórias (como IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10) vistas neste trabalho, já são descritas pela literatura. Esses mediadores são importantes pois integram o processo de tempestade de citocinas. A tempestade de citocinas é uma síndrome inflamatória sistêmica que envolve níveis elevados de citocinas circulantes, além de uma hiperativação de células imunes. Esse fenômeno pode ser desencadeado por vários tipos de patógenos, e no contexto da COVID-19, é um dos fatores que mais contribui na indução da imunopatologia (Yang *et al.*, 2020).

Como os dados que podemos extrair de amostras humanas são limitados, decidimos avançar em nossa história utilizando o modelo experimental. O principal impedimento à infecção das células de camundongos (*Mus musculus*) com SARS-CoV-2 é a falta de receptores apropriados para iniciar a infecção viral. O vírus se utiliza da ACE-2 para se ligar e entrar nas células alvo, contudo, o mesmo receptor em camundongos não liga se efetivamente a proteína à proteína *Spike* (Muñoz-Fontela *et al.*, 2020).

Várias estratégias foram elaboradas para resolver este problema. Uma delas é a

modificação genética dos animais para expressarem a hACE-2. Nesse sentido, existem atualmente três modelos de camundongos transgênicos, nos quais o ACE2 humano tem sua expressão controlada por um promotor específico para tecidos (por exemplo, o promotor *Krt18* para células epiteliais, K18-hACE2), um promotor universal (*cytomegalovirus enhancer* seguido pelo promotor de  $\beta$ -actina) ou um promotor endógeno de hACE-2 (McCray *et al.*, 2007; Muñoz-Fontela *et al.*, 2020). Decidimos utilizar animais C57BL/6 K18-hACE2 (*M. musculus*) para o desenvolvimento dos experimentos.

A escolha se deve ao nosso interesse pelo *background* genético dessa linhagem e por ser um modelo bem aceito (Winkler *et al.*, 2020; Muñoz-Fontela *et al.*, 2020). Assim, o animal K18-hACE2 é uma modelo experimental atraente para investigar mecanismos fisiopatológicos da COVID-19.

Nesse contexto, conseguimos reproduzir uma infecção produtiva, evidenciado pela perda de peso corporal, respiração rápida, postura curvada e inatividade dos animais. A carga viral detectada nos pulmões mostra que houve uma replicação produtiva. Outros órgãos também podem ser infectados, rna viral foi encontrado nos pulmões, cérebro, rim, fígado e baço (Winkler *et al.*, 2020). Os animais *naive* não mostraram sinais de doença ganhando peso com uma aparência normal.

Além disso, mudanças histopatológicas que observamos nos pulmões dos animais K18-hACE2 infectados estão correlacionadas com a função pulmonar comprometida. Os pneumócitos são infectados em estágios iniciais, o processo replicativo disponibiliza PAMPs e DAMPs que favorecem o recrutamento de leucócitos para o interstício pulmonar. O aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias contribui com o desenvolvimento da imunopatologia, levando a lesão de células parenquimatosas, colapso do espaço alveolar e comprometimento das trocas gasosas (Dong *et al.*, 2022).

Essas características são consistentes com a doença humana, na qual, replicação viral precoce e exacerbada, é seguida por respostas inflamatórias exageradas. Agindo em sinergismo esses dois fatores contribuem para a patologia, morbidade e mortalidade (Pan *et al.*, 2020).

No modelo experimental vemos um aumento da produção de AREG nos pulmões dos animais infectados, além disso, os níveis mais elevados estavam correlacionados com a dose viral  $5 \times 10^4$  PFU (gravidade maior). Esses dados indicam uma associação entre os níveis AREG com a doença mais grave, se assemelhando ao observado nas amostras de PBMC humano.

Notavelmente, outras citocinas de reparo/imunossupressoras como o IGF-1, IL-4 e

IL-10, mantêm concentrações crescentes no 5 dpi, ao contrário dos mediadores inflamatórios como IL-6 e TNF- $\alpha$  que tendem a diminuir. Embora seja um fenômeno esperado, a maior dose de vírus levou a concentrações superiores dessas moléculas, em comparação a menor dose, mesmo tendo níveis similares de inflamação.

Esse padrão não é particular do nosso estudo, Oladunni *et al.* (2020) comenta que moléculas de reparo, como AREG, desempenham um papel importante na promoção de regeneração tecidual, contudo, a produção exagerada somada a manutenção da sinalização por longos períodos, podem levar ao desenvolvimento de fibrose.

Várias populações celulares poderiam ser responsáveis pelo aumento do AREG no tecido pulmonar, contudo, nossos dados revelam que os monócitos/macrófagos F4/80+ respondem por quase toda produção dessa proteína no pulmão.

Nos estágios iniciais de infecção um grande número de monócitos e macrófagos são recrutados para o tecido pulmonar. De acordo ao microambiente que se encontram, podem sofrer alterações fenotípicas e adquirir papéis funcionais diversos (Ko *et al.*, 2020). Embora não saibamos o perfil de ativação dessa população, sabemos que tanto uma polarização M1 ou M2 é capaz de promover a produção de AREG (Meng *et al.*, 2015).

Os macrófagos são células conhecidas por serem uma fonte de AREG em contextos de doenças inflamatórias, sendo importantes no processo de resolução produzindo múltiplos fatores de reparo (Minutti *et al.*, 2019). No contexto da infecção por SARS-CoV-2, diversos estímulos poderiam mediar a geração de AREG por essas células. Os PAMPs virais poderiam ativar receptores Toll que conhecidamente levam produção e liberação dessa proteína (Meng *et al.*, 2015). Ou ainda, o processo de dano tecidual pode liberar DAMPs como o ATP, que também é capaz de estimular produção de AREG em macrófagos (Minutti *et al.*, 2019).

Para entender como esse aumento de AREG se relacionava com a fisiopatologia causada pelo SARS-CoV-2, utilizamos o gefitinib, um inibidor do EGFR. O gefitinib compete pelo domínio de ligação ao ATP nas regiões quinase do EGFR1 e EGFR2, impedindo a fosforilação e a subsequente ativação das vias de transdução de sinal, levando à apoptose e diminuindo a proliferação celular.

O tratamento com a droga diminuiu a perda de saturação de oxigênio na doença moderada, embora não tenha levado diferenças clínicas em comparação ao veículo. Já os achados histopatológicos revelaram um menor dano tecidual nos pulmões, com menor infiltrado inflamatório e manutenção da arquitetura do tecido.

Como o EGFR possui outras moléculas sinalizadoras diferentes do AREG, não

podemos isolar o papel dessa proteína em relação aos outros ligantes. Entretanto, algumas particularidades da interação AREG/EGFR e o contexto da infecção, nos permite supor um papel mais preponderante dessa molécula.

Um aspecto importante na biologia do EGFR é como a especificidade do sinal disparado pelos diferentes ligantes determinam funções fisiológicas distintas. O primeiro determinante, seria o papel específico de cada molécula com base nas diferenças espaço/temporais em resposta a um estímulo (Berasain & Avila, 2014).

Por exemplo, o AREG é descrito como um dos ligantes do EGFR que mais é *up*-regulado no contexto inflamatório (Hsu *et al.*, 2010). De maneira similar, conseguimos identificar diferenças entre os níveis de AREG e EGF no pulmão dos pacientes com COVID-19.

Além disso, a própria sinalização pelo receptor EGFR promove diversas alterações na estabilidade do mRNA dos seus ligantes, nesse sentido, o *Areg* é conhecido por possuir o transcrito mais estável, aumentando a taxa de tradução (Stoll & Elder, 1999).

No entanto, a especificidade dentro do sistema de sinalização do EGFR não pode ser exclusivamente atribuída às diferenças temporais na disponibilidade de seus ligantes. Algumas características moleculares são capazes de levar a uma sinalização diferente (Zaiss *et al.*, 2015).

Algumas particularidades da interação com EGFR é a baixa afinidade de ligação exibida pelo AREG em comparação aos outros ligantes. Além disso, essa proteína possui uma capacidade de ligação diferente ao EGFR, em conjunto essas características podem explicar como o AREG medeia consequências fisiológicas distintas aos outros ligantes (Berasain & Avila, 2014).

Outra característica importante é a manutenção da sinalização em resposta a cada molécula sinalizadora. Por exemplo, o EGF é conhecido por ser um dos ligantes de maior afinidade ao EGFR, entretanto, essa forte interação leva a rápida dessensibilização do receptor. Como consequência, o sinal é transduzido de modo oscilatório. Como o AREG interage fracamente com o EGFR, ocorre uma sinalização tônica e consistente ao longo do tempo (Zaiss *et al.*, 2015). Essa característica está associada também à competição dos ligantes, como o AREG mantém sua interação por mais tempo, isso limita a disponibilidade do receptor (Berasain & Avila, 2014).

Embora a sinalização ocorra pelo mesmo receptor de outros sinalizadores, reunidos, essas evidências apontam um papel preponderante do AREG no contexto estudado. Para confirmar essa associação, pretendemos utilizar um nocaute condicional de AREG em macrófagos. Também pretendemos caracterizar as populações produtoras

---

de AREG e investigar melhor a associação de AREG com fibrose pulmonar.

## **6. Conclusão**

Em conjunto, nossos dados revelam que o AREG se encontra elevado no pulmão, tanto no modelo experimental, quanto em amostras humanas. Esse aumento a nível de mRNA está associado a uma maior gravidade da doença. Além disso, o bloqueio de sinalização do EGFR melhora o aspecto histopatológico dos animais infectados, bem como retarda a perda de saturação de oxigênio na menor dose viral de SARS-CoV-2.

## **7. Referências**

- ABBOTT, N. J. et al. Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 1, p. 13–25, 2010.
- BARBER, G. STING: infection, inflammation and cancer. **Nature Reviews Immunology**. v. 15, p. 760–770, 2015.
- BELLINI, A. et al. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. **Laboratory Investigation**. v. 87, p. 858–870, 2007.
- BERASAIN, C. et al. Amphiregulin. *Seminars in Cell & Developmental Biology. Physiology*. v. 28, n. 31–41. p. 1–14, 2014.
- DHAR C. S. et al. Epidemiology of COVID-19. **Journal of Digestive Endoscopy**. v. 11 n.1, p. 03-07, 2020.
- DOLAN, M. E. et al. Investigation of COVID-19 comorbidities reveals genes and pathways coincident with the SARS-CoV-2 viral disease. **Science Reports**. v. 10, p. 20848, 2020.
- Dong, W. et al. The K18-Human ACE2 Transgenic Mouse Model Recapitulates Non-severe and Severe COVID-19 in Response to an Infectious Dose of the SARS-CoV-2 Virus. **Journal of Virology**. v. 12, n. 96, p. e0096421, 2022.
- EUROSURVEILLANCE EDITORIAL TEAM. Note from the editors: World Health Organization declares novel coronavirus (2019-nCoV) sixth public health emergency of international concern. **Eurosurveillance editorial team**. v. 25 n. 5, p. 200131e, 2020.
- HSU, D. et al. Toll-like receptor 4 differentially regulates epidermal growth factor-related growth factors in response to intestinal mucosal injury. **Laboratory Investigation**. v. 90, p. 1295–1305, 2010.
- Hu B, Guo H, Zhou P, Shi Z. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**. v. 19, n. 3, p. 141-154, 2020.
- HUANG, L. et al. Dynamic blood single-cell immune responses in patients with COVID-19. **Signal Transduction Targeting Therapy**. v. 6, n. 6, p.110, 2021.
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**. v. 5 n. 4, p. 536-544, 2020.
- JAN-ERIC, T. et al. IL-9–mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. **Journal Experimental Medicine**. v. 210, n. 13, p. 2951–2965, 2013.
- JILL, A. et al. Amphiregulin modulates murine lung recovery and fibroblast function following exposure to agriculture organic dust **Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**. v. 318, n. 1, p. L180-L191, 2020
- KO, J. H. Mesenchymal Stem and Stromal Cells Harness Macrophage-Derived Amphiregulin to Maintain Tissue Homeostasis. **Cell Reports**. v. 30, n. 11, p. 3806–3820.e6, 2020.
- KO, J. H., et al. Mesenchymal Stem and Stromal Cells Harness Macrophage-Derived

- Amphiregulin to Maintain Tissue Homeostasis. **Cell Reports**. v. 30, n. 11, p. 3806–3820, 2020.
- LUCAS, C. et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**. 2020.
- MALONE, B. et al. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 23, p. 21–39, 2022.
- MCCARVILLE, J. L. et al. Disease tolerance: concept and mechanisms. **Current Opinion in Immunology**, v. 50, p. 88–93, 2018.
- MCCRAY, P. B. et al. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. **Journal Virology**. v. 81, p. 813–821, 2007.
- MEDZHITOV, R. et al. Disease tolerance as a defense strategy. **Science**. v. 335, n. 6071, p. 936-941, 2012.
- MENG, C. et al. Amphiregulin may be a new biomarker of classically activated macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 466, n. 3, p. 393–399, 2015.
- MINUTTI, C. M. et al. A Macrophage-Pericyte Axis Directs Tissue Restoration via Amphiregulin-Induced Transforming Growth Factor Beta Activation. **Immunity**. p. S1074761319300317, 2019.
- MOK, D. Z. L.; et al. The effects of aging on host resistance and disease tolerance to SARS-CoV-2 infection. **The FEBS Journal**. 2020.
- MUÑOZ-FONTELA, C. et al. Animal models for COVID-19. **Nature**. v. 586, p. 509–515, 2020.
- OLADUNNI, F.S. et al. Lethality of SARS-CoV-2 infection in K18 human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice. **Nature Communications**. v. 11, p. 6122, 2020.
- OWD**. Coronavirus Pandemic (COVID-19). Fevereiro, 2022. Acesso em: 26 de janeiro de 2022. Disponível em: <https://ourworldindata.org/coronavirus>.
- PAN, F. et al. Time course of lung changes at chest CT during recovery from coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Radiology**. v. 295, p. 715–721, 2020.
- PARASHER, A. COVID-19: Current understanding of its Pathophysiology, Clinical presentation and Treatment. **Postgraduate Medical Journal**. v. 97, p. 312-320, 2021.
- PINES, G. et al. Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. **FEBS Letters**. v.18, n. 12, p. 2699-706, 2010.
- SCULLY, E. P. et al. Considering how biological sex impacts immune responses and COVID-19 outcomes. **Nature Reviews Immunology**. v. 20, p. 442–447, 2020.
- SINGH, S. S. et al. Amphiregulin in cellular physiology, health, and disease: Potential use as a biomarker and therapeutic target. **Journal of Cell**. 2021.
- SOARES, M. et al. Disease tolerance and immunity in host protection against infection.

**Nature Reviews Immunology**. v. 17, p. 83–96, 2017.

Stoll, S. W. et al. Differential Regulation of EGF-like Growth Factor Genes in Human Keratinocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 265, n. 1, p. 0–221, 1999.

SUGA, H. et al. Tracking the elusive fibrocyte: identification and characterization of collagen-producing hematopoietic lineage cells during murine wound healing. **Stem Cells**. v. 32, n. 5, p.1347-1360, 2014.

TAY, M. Z. et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**. V. 20, p. 363–374, 2020.

V'KOVSKI, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**. v. 19, p. 155–170, 2021.

**WHO**. Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19. Março, 2020. Acesso em: 26 de janeiro de 2022. Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>

WIERSINGA, W. et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **The Journal of the American Medical Association**, 2020.

WILK, A. J. et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. **Nature Medicine**. v. 26, p. 1070–1076, 2020.

WILLMARTH, N. E. et al. Autocrine and Juxtacrine Effects of Amphiregulin on the Proliferative, Invasive, and Migratory Properties of Normal and Neoplastic Human Mammary Epithelial Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 49, p. 37728–37737, 2006.

WINKLER, E. S. et al. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. **Nature Immunology**, v. 21, p. 1327–1335, 2020.

WU, Z. et al. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. **The Journal of the American Medical Association**. v. 323, n. 13, p. 1239, 2020.

XIAOJING, Z. et al. Th17 cell production of amphiregulin contributes to the intestinal homeostasis. **The Journal of Immunology**. p. 204, 2020.

XIONG, Y. et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. **Emergency Microbes Infection**. v. 9, n. 1, p. 761-770, 2020.

XU, Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 4, p. 420-422, 2020.

YADAV, R. et al. Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. **Cells**. v. 10, p. 821, 2021.

YAMANE, S. Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family

- member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients. **Journal of Inflammation**. v. 27, n. 5, p. 5, 2008.
- YANG, Y. et al. Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2020.
- YOUNIAN, X. et al. Classically Activated Macrophages Protect against Lipopolysaccharide-induced Acute Lung Injury by Expressing Amphiregulin in Mice. **Anesthesiology**. v. 124, p. 1086–1099, 2016.
- YUKI, K. et al. (2020). COVID-19 pathophysiology: A review. **Clinical Immunology**, v. 215, p. 108427, 2020.
- ZAISS, D. Amphiregulin Enhances Regulatory T Cell-Suppressive Function via the Epidermal Growth Factor Receptor. **Immunity**. v. 38, n. 2, p. 275–284, 2013.
- ZAISS, D. et al. Emerging Functions of Amphiregulin in Orchestrating Immunity, Inflammation, and Tissue Repair. **Immunity**, v. 42, n. 2, p. 216–226, 2015.
- ZAISS, D. M. et al. Amphiregulin, a TH2 Cytokine Enhancing Resistance to Nematodes. **Science**. v. 314, n. 5806, p. 1746–1746, 2006.
- ZHU, N. A. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 2020.
- ZOU, J. N. et al. The characteristics and evolution of pulmonary fibrosis in COVID-19 patients as assessed by AI-assisted chest HRCT. **PLoS ONE**. v. 16, n. 3, p. e0248957, 2021.

## **8. Anexos**

## 8.1 Anexo 1. Características dos pacientes com COVID-19

Demografia		%
Número	147	
Age (Ano)	62.50 ± 15.43	
Mulheres	58	40%
Comorbidades		
Hipertensão	91	62%
Obesidade	80	54%
Diabetes	54	37%
Histórico de tabagismo	14	10%
Doença cardíaca	37	25%
Doença pulmonar	27	18%
Doença renal	16	10%
Câncer	12	8%
Histórico de AVC	9	7%
Imunodeficiência	1	0,7%
Doença Autoimune	1	0,7%
Achados Laboratoriais		
CRP (mg/dl)*	12.55+8.95	
Dímero D (µg/ml)**	2.47+2.59	
LDH (U/litro)#	565.147+325.9	
Ferritina (ng/ml)&	1,225.07+1,762.9	
Hemoglobina (g/dl)	12.31+2.34	
Neutrófilos (célula/mm <sup>3</sup> )	6,728.443+3,903.57	
Linfócitos (célula/mm <sup>3</sup> )	1307.37+789.1	
Plaquetas (contagem/mm <sup>3</sup> )	253,426.2+111,616.3	
Medicações		
Heparina	140	95.2%
Antibióticos	143	97%
Glicocorticoides	83	56%
Oseltamivir	38	25%
Antimalárico	10	6.8%
Status Respiratório		
Ventilação Mecânica	56	45%
Oxigênio por Cânula Nasal	111	89%
pO <sub>2</sub>	77.77+29.17	
SatO <sub>2</sub>	93.37+5.72	
Gravidade da Doença		
Leve	4	3%
Moderado	29	19%
Grave	114	78%
Desfecho		
Óbitos	58	40%

\*CRP: C-reactive protein (valores normais <0.5 mg/dl); \*\*D-dimers (valores normais <0.5 µg/ml);

#LDH: lactate dehydrogenase (valores normais: 120–246 U/litro); &Ferritin (valores normais: 10-291 ng/ml)

## 8.2 Anexo 2. Aprovação do comitê de ética em experimentação animal



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



## A U T O R I Z A Ç Ã O

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: “*Avaliação da participação da anfiregulina na fisiopatologia do COVID-19*”, registrado com o número do protocolo **071/2020**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO ad referendum** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em 08 de junho de 2020.

Colaboradores: Daniele Carvalho Bernardo Nascimento

Diego Brito Caetité

Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

**Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.**

Finalidade		() Ensino (X) Pesquisa Científica		
Vigência da autorização		08/06/2020 a 01/09/2024		
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Camundongo / K18-hACE2	140	23g / 60 dias	Fêmea	Biotério da Cirurgia Experimental
Camundongo / ZP3Cre	84	23g / 60 dias	Macho	Biotério da Cirurgia Experimental
Camundongo / AREGfloxflox	168	23g / 60 dias	Macho	Biotério da Cirurgia Experimental
Camundongo / AREGfloxfloxZP3Cre	84	23g / 60 dias	Macho	Biotério da Cirurgia Experimental
Camundongo / AREGfloxfloxLysmCre	84	23g / 60 dias	Macho	Biotério da Cirurgia Experimental
Camundongo / LysmCre	84	23g / 60 dias	Macho	Biotério da Cirurgia Experimental
Camundongo / K18-hACE2	144	23g / 60 dias	Macho	Biotério da Cirurgia Experimental
Camundongo / C57Bl 6	15	23g / 60 dias	Fêmea	Serviço de Biotério



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

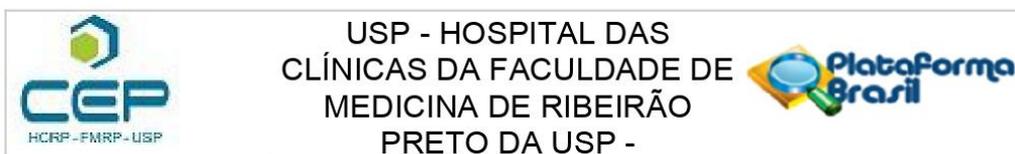


Camundongo / C57Bl 6	29	23g / 60 dias	Macho	Serviço de Biotério
Camundongo / K18-hACE2	40	23g / 60 dias	Macho	Biotério da Cirurgia Experimental
Camundongo / Swiss	20	23g / 60 dias	Fêmea	Serviço de Biotério
Camundongo / AREG-/ (AREGKO)	84	23g / 60 dias	Macho	Biotério da Cirurgia Experimental
Camundongo / C57Bl 6	228	23g / 60 dias	Macho	Serviço de Biotério

Ribeirão Preto, 08 de junho de 2020

**Prof. Dra. Katiuchia Uzzun Sales**  
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP

### 8.3 Anexo 3. Aprovação do comitê de ética em experimentação humana.



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Biomarcadores Plasmáticos Diagnósticos e Prognósticos de COVID-19

**Pesquisador:** ALEXANDRE TODOROVIC FABRO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 32475220.5.0000.5440

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.089.567

##### Apresentação do Projeto:

A COVID-19 atingiu rapidamente níveis pandêmicos desde que relatada pela primeira vez em dezembro de 2019. O vírus responsável pela doença, SARS-CoV-2, é um vírus de RNA envelopado de fita positiva. Durante sua replicação, seu genoma viral é transcrito em diversas proteínas, sendo a estrutural spike S1 a responsável por ligar-se ao receptor celular ACE2 das células hospedeiras. Parte das pessoas infectadas pelo vírus podem apresentar sintomas gripais típicos; contudo, algumas delas podem evoluir rapidamente para um quadro grave de lesão pulmonar, chamada de síndrome do desconforto respiratório agudo. Esta se caracteriza por um dano inflamatório agudo e difuso dos alvéolos pulmonares associado a um aumento da permeabilidade vascular, bem como redução da complacência, comprometendo as trocas gasosas e causando hipoxemia.

Histopatologicamente, este quadro é conhecido por dano alveolar difuso que consiste em um dano permanente nas células epiteliais dos alvéolos e endoteliais dos capilares, com consequente formação de membrana hialina e eventualmente trombose intracapilar. Todos estes mecanismos envolvidos na COVID-19 envolvem a expressão fenotípica da transcrição de diferentes proteínas moduladas pela infecção viral em específicos microambientes pulmonares. Sendo assim, compreender estas sequências é de fundamental importância para o entendimento fisiopatológico e identificação das principais vias moleculares associadas com a evolução da doença. Paralelamente, esses conhecimentos integrados translacionalmente com o perfil clínico-radio-laboratorial pode propiciar a descoberta de críticos biomarcadores diagnósticos e prognósticos.

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
**Bairro:** MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.089.567

Com isto em vista e diante do grande impacto socioeconômico que a COVID-19 está representando, a caracterização do perfil transcriptômico célula específica possibilitaria a identificação de uma ampla gama de potenciais candidatos biomarcadores com fundamental relevância à medicina translacional. Com eles, o diagnóstico será rápido e simples, possibilitando uma maior acurácia, além de proporcionar um melhor manejo e tratamento dos pacientes infectados, uma vez que poderão prever a futura necessidade de intubação orotraqueal e/ou óbito. Diante disso, o objetivo deste projeto é determinar biomarcadores plasmáticos, moleculares e radiogenômicos para aplicação clínica diagnóstica e prognóstica após triagem translacional de potenciais candidatos confirmados com COVID-19 através da autópsia minimamente invasiva.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo deste projeto é identificar biomarcadores plasmáticos, moleculares e radiogenômicos para aplicação clínica diagnóstica e prognóstica após triagem translacional de potenciais candidatos através da autópsia minimamente invasiva dos óbitos pelo COVID-19.

**Objetivo Secundário:**

Os objetivos específicos deste projeto são:

- 1) Caracterizar o perfil clínico, radiológico e patológico dos pacientes;
- 2) Determinar o perfil transcriptômico das áreas pulmonares microdissecadas;
- 3) Demonstrar o papel ultraestrutural das proteínas relacionadas;
- 4) Prever o desfecho clínico por radiogenômica e teste molecular;
- 5) Testar os potenciais biomarcadores como diagnósticos e prognósticos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

De acordo com o pesquisador, não há riscos previstos decorrentes da participação no estudo, embora tenha sido dada a garantia de sigilo dos dados dos participantes.

Em relação aos benefícios, o pesquisador afirma que estes serão decorrentes da identificação de pequenos marcadores presentes no pulmão, que servirão para identificação mais precoce da gravidade do COVID-19 e do seu diagnóstico, após análise do seu pulmão normal em comparação com pulmões afetados pelo COVID-19

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A hipótese de trabalho é que todos os processos fisiopatológicos e histopatológicos envolvidos no dano alveolar difuso (DAD) secundário ao SARS-CoV-2 estão relacionados com a expressão

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
**Bairro:** MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO  
**Telefone:** (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.089.567

fenotípica de diferentes proteínas moduladas pela infecção viral em microambientes pulmonares específicos. Diante do grande impacto socioeconômico que a COVID-19 representa, o presente projeto baseia-se na hipótese que a lesão inicial da barreira alvéolo-capilar pelo SARS-CoV-2 permite expressão plasmática de alguns biomarcadores que possam predizer de maneira diagnóstica e prognóstica a COVID19.

O projeto constará com 2 etapas: i.1) Triagem molecular profunda: 30 amostras pulmonares parafinada e congelada obtidas previamente pela autópsia minimamente invasiva dos pacientes que foram à óbito pelo COVID-19, sob responsabilidade do Serviço de Patologia (SERPAT- HCFMRP/USP). Como controle, serão obtidas 30 amostras de tecido pulmonar não neoplásico de lobectomia por câncer de pulmão no Hospital Estadual de Bauru (HEB), sob responsabilidade do Prof Dr Tales Rubens de Nadaí.i.1.1) Coleta de dados clínicos, laboratoriais, exames de radiografia do tórax (RX) e tomografia computadorizada com alta resolução (TCAR)serão obtidos de todos os pacientes diagnosticados com COVID- 19, a partir do prontuário eletrônico do HCFMRP/USP, UE e HES. 1.2) Minuciosa Avaliação Histomorfológica por 3 experientes patologistas pulmonares (ATF) de lâminas de H&E escaneadas. Estudo histomorfológico dos achados patológicos será realizado conforme padronizado em nosso laboratório e recomendado pela ATS/ERS.i.1.3) A microdissecção à laser das células endoteliais e dos pneumócitos será realizada pelo Leica LMD6500, de acordo com protocolo do Laboratorio Multiusuário de Microscopia de Microdissecção da FMRP/USP (Equipamento Multiusuários da FAPESP 2011/10753-0).i.1.4) O transcriptoma será determinados após extração de RNA com subsequente RNA-seq por sequenciamento de nova geração (NGS) através de kits comerciais de extração de RNA e construção da biblioteca para RNA-Seq, conforme as instruções dos fabricantes. O sequenciamento será no Illumina HiSeq 2000 para produzir 50 milhões de reads, com 50 pares de base pareados. A análise bioinformática será realizada na busca do nível de expressão gênica.i.1.5) A microscopia eletrônica de transmissão (MET) com marcaçãode imunogold será realizada no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica da FMRP/USP para de localizar ultraestruturalmente in situ as proteínas relacionadas com os altos níveis de expressão gênica do item anterior. i.2) Busca de biomarcadores: 300 mL de plasma de 300 pacientes com COVID19 em aleatórios desfechos clínicos serão obtidos da soroteca do HCFMRP/USP da primeira coleta de sangue de cada paciente. Os potenciais biomarcadores escolhidos para a testagem serão aqueles determinados pelo transcriptoma, excluindo-se os presentes no plasma de pacientes normais publicados na literatura. Será utilizado um sistema da Luminex por imunoenensaio magnéticomultiplexado, conforme recomendações do fabricante.i.2.1) A

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
**Bairro:** MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MÉDICA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.089.567

radiogenômica será realizada com raios-X e tomografias computadorizadas por segmentação para obtenção de volumes de interesse (VOIs), utilizando-se o algoritmo 3D GrowCut do 3DSlicer. Atributos de níveis de cinza e de textura de diferentes ordens serão extraídos da biblioteca pyradiomics do 3DSlicer. O pacote de software Weka (Waikato Environment for Knowledge Analysis) será utilizado para a seleção/redução de atributos e classificação multivariada na abordagem associativa de radiogenômica.

O projeto está adequadamente justificado e foi apresentado da maneira adequada, contendo referências bibliográficas pertinentes ao tema.

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

A Folha de Rosto está apresentada de forma adequada.

Foram apresentadas várias anuências para a realização do projeto de pesquisa: da própria instituição, dos Departamentos de Clínica Médica, do Departamento de Patologia, do Departamento de Imagens Médicas, Hematologia e Oncologia, além das anuências da Direção da Unidade de Emergência do HCRP-USP, do Hospital Estadual de Serrana e do Hospital Estadual de Bauru, além da concordância do Dr Tales de Nadai do Hospital de Bauru que será o responsável pela coleta de amostras de pulmão sem tumor em Bauru.

O pesquisador responsável solicita e justifica a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido nos pacientes com COVID uma vez que se trata de estudo retrospectivo de paciente submetidos a autopsia minimamente invasiva, de consulta de prontuários e utilização de amostras armazenadas em biorrepositório já existente, sob a responsabilidade do Professor Doutor Paulo Louzada.

Foi solicitada a criação de biorrepositório vinculado a este projeto de pesquisa.

Foi apresentado termo de consentimento livre e esclarecido com solicitação de guarda de material biológico para aqueles indivíduos que constituirão o grupo controle do estudo (pacientes com tumor de pulmão submetidos a lobectomia para a retirada da lesão pulmonar).

O termo de consentimento livre e esclarecido está redigido em linguagem adequada, garantindo-se o sigilo e a identidade dos dados dos participantes.

Foram apresentados o cronograma e o orçamento do estudo.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
**Bairro:** MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.089.567

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

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1544835.pdf	26/05/2020 21:41:38		Aceito
Outros	UPC.pdf	26/05/2020 21:38:19	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXO2.pdf	26/05/2020 21:32:34	ALEXANDRE TODOROVIC FABRO	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	07/05/2020 17:58:32	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_COVID19_CEP_FINAL.pdf	07/05/2020 17:58:09	ALEXANDRE TODOROVIC FABRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorepositorio.pdf	04/05/2020 19:20:58	ALEXANDRE TODOROVIC FABRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia6.pdf	04/05/2020 19:20:46	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia5.pdf	04/05/2020 19:20:40	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia4.pdf	04/05/2020 19:20:32	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia3.pdf	04/05/2020 19:20:25	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia2.pdf	04/05/2020 19:20:17	ALEXANDRE TODOROVIC	Aceito
Declaração de	Anuencia1.pdf	04/05/2020	ALEXANDRE	Aceito

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
**Bairro:** MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.089.567

Pesquisadores	Anuencia1.pdf	19:20:11	TODOROVIC	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXO1.pdf	04/05/2020 19:18:45	ALEXANDRE TODOROVIC FABRO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIBEIRAO PRETO, 16 de Junho de 2020

---

Assinado por:

**MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO

**Bairro:** MONTE ALEGRE

**CEP:** 14.048-900

**UF:** SP

**Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3602-2228

**Fax:** (16)3633-1144

**E-mail:** cep@hcrp.usp.br

**PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Ensaio clínico randomizado para o tratamento de casos moderados a graves da doença causada pelo novo coronavírus-2019 (COVID19) com cloroquina e colchicina

**Pesquisador:** Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira

**Área Temática:** A critério do CEP

**Versão:** 3

**CAAE:** 30248420.9.0000.5440

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.954.378

**Apresentação do Projeto:**

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1530785.pdf, de 01/04/2020) e/ou do Projeto Detalhado (projeto\_SARS\_CoV\_2\_01042020\_versao\_2.docx, de 01/04/2020).

**INTRODUÇÃO**

A doença por coronavírus de 2019 (COVID19), causada pelo coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), tornou-se importante problema de saúde em todo o mundo. As manifestações clínicas mais frequentes incluem febre, tosse, fadiga, expectoração, dispneia, dor na orofaringe e cefaleia. Idosos e indivíduos com doenças crônicas constituem o grupo de maior risco para as formas moderadas e graves da doença e para o desenvolvimento de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). O diagnóstico baseia-se na epidemiologia, presença de febre e sintomas respiratórios, exame de imagem dos pulmões (infiltrado em vidro fosco na tomografia computadorizada) e detecção de RNA viral por RT-PCR (reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa) em secreções das vias aéreas. Não há tratamento específico para a doença por COVID-19, sendo este de suporte quando os pacientes apresentam pneumonia

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

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-040

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

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

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

Continuação do Parecer: 3.954.378

com necessidade de internação hospitalar. Alguns locais no mundo todo estão estudando o uso de cloroquina (CQ) como possível terapia, com alguns relatos de sucesso. Mesmo que não tenhamos uma terapia específica que atue diretamente no vírus, são justificáveis tentativas que ou diminuem a multiplicação viral, como parece ser o caso da cloroquina, ou diminuem a magnitude da resposta inflamatória sistêmica. Propomos, também, o uso da colchicina (COL) como intervenção racional, com potencial de eficácia e diminuto risco de eventos adversos, nos casos de SARS-CoV-2, com intuito de diminuir o processo inflamatório sistêmico, em especial o pulmonar. Objetivos. Avaliar eficácia e segurança do uso da cloroquina e da colchicina no tratamento de pacientes com SARS-CoV-2 que necessitem de tratamento hospitalar; traçar perfil clínico e laboratorial dos casos de SARS-CoV-2 hospitalizados em nosso meio e avaliar carga viral em secreções das vias aéreas, na admissão e durante evolução. Pacientes e métodos. Será um estudo prospectivo, duplo-cego para avaliar 60 pacientes internados por SARS-CoV-2, com randomização simples em dois grupos: um que receberá cloroquina e placebo (Grupo CQ-PCB; n=30; dose de 30 – 44 mg/kg em 10 dias) e outro grupo que receberá cloroquina e colchicina (Grupo CQ-COL; n=30; mesma dose de CQ mais COL na dose de 0,015-0,033 mg/kg/dia por 5 dias). Serão coletadas amostras de soro – para avaliação de citocinas, caspases extracelulares – e secreção de vias aéreas – para carga viral e NETose – na admissão e nos dias 3, 7 e 14 de internação. Consideraremos os seguintes desfechos primários: clareamento do RNA viral nas secreções de vias aéreas, necessidade e tempo de suporte ventilatório não-invasivo e invasivo, tempo de internação, tempo de permanência em UTI e taxa de óbito. Como desfechos secundários, observaremos: frequência de eventos adversos e frequência de interrupção do uso de CQ e/ou COL por evento adverso.

#### HIPÓTESE

O objetivo desta intervenção, a ser realizada nos primeiros dez dias de internação, é diminuir o processo inflamatório sistêmico, em especial o pulmonar, na intenção de reduzir a necessidade de suporte ventilatório (SDRA) e melhorar o estado hemodinâmico (choque séptico) dos pacientes com SARS-CoV-2, evitando assim internações em Unidade de Terapia Intensiva, reduzindo o tempo de internação.

#### METODOLOGIA

Tratar-se-á de um estudo clínico controlado, duplo-cego, com randomização simples para dois grupos: Tratamento com cloroquina e placebo (CQPCB) e Tratamento com cloroquina e colchicina (CQ-

**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

Continuação do Parecer: 3.954.378

COL). Serão avaliados 60 pacientes internados para receber a terapia de suporte padrão para a SARS-CoV-2, ventilatória e circulatória, de acordo com o grau de afecção sistêmica, e que serão divididos em dois grupos: um que receberá cloroquina e placebo (Grupo CQ; n=30-PCB) e outro grupo que receberá cloroquina e colchicina (Grupo CQ-COL; n=30). Cada comprimido de sulfato de hidroxicloroquina 400 mg tem 155 mg de cloroquina base, cada comprimido de difosfato de cloroquina 250 mg tem 150 mg de cloroquina base. Ambas as apresentações poderão ser utilizadas no estudo, sem haver permuta de apresentações para um mesmo indivíduo. A cloroquina base será utilizada para cálculo de doses, de acordo com a faixa de peso, visando dose acumulada entre 30 e 44 mg/kg ao final de 10 dias de terapia. Nenhum paciente receberá dose acima de 17 mg/kg nas primeiras 48 horas ou de 34 mg/kg até o dia 7 e a maioria dos pacientes terá recebido entre 30 e 40 mg/kg ao longo de 10 dias. Pacientes do grupo CQ-COL receberão cloroquina com a mesma posologia do grupo CQ-PCB mais colchicina na dose de 0,020 a 0,033 mg/kg nas primeiras 24 horas, seguido de 0,015 a 0,033 mg/kg/dia por mais quatro dias. Haverá checagem diária dos dados clínicos (gerais e relativos à ventilação) e laboratoriais gerais, e da ocorrência de eventos adversos relacionados às medicações do estudo.

Haverá checagem diária dos dados clínicos (gerais e relativos à ventilação) e laboratoriais gerais, e da ocorrência de eventos adversos relacionados às medicações do estudo. A solicitação de exames de rotina para seguimento assistencial diário (item 6.4) ficará a cargo da equipe médica de avaliação rotineira dos pacientes. As avaliações laboratoriais experimentais ocorrerão nos dias zero (inclusão), 3, 7 e 14, com coleta de material biológico (sangue e secreção de vias aéreas), sendo apresentadas na Figura 1, que mostra o delineamento do estudo experimental. Após o dia 14, será mantido seguimento observacional dos pacientes a cada sete dias, até o final da internação, tendo em vista os desfechos primários e secundários.

#### Quantificação de RNA viral nas secreções de vias aéreas

A técnica é apresentada em Wang et al (50). Após a coleta, a secreção será armazenada em tubo coletor com 150 µL de solução de preservação para extração do RNA em até duas horas através de um respiratory sample RNA isolation kit (Zhongzhi, Wuhan, China). Em resumo, 40 L do lisado celular será transferido para tubo de coleta e agitado em vórtex por 10 segundos. Após permanecer 10 minutos em temperatura ambiente, o tubo será centrifugado a 1000 rpm por cinco minutos. A suspensão será usada para RT-PCR em tempo real, testando dois genes do COVID-19, orf1ab e da proteína do capsídeo nuclear, de acordo com instruções do fabricante (Shanghai bio-germ Medical Technology Co Ltd). RT-PCR será realizada sob as seguintes condições: incubação 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

Continuação do Parecer: 3.954.378

50 °C por 15 minutos e 95 °C por cinco minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos e extensão e aquisição de fluorescência a 55 °C por 45 segundos. O valor de limiar de ciclo (Ctvalue) abaixo de 37 será tido como positivo, de 37 a 39, indefinido, e 40 ou mais será tido como negativo.

#### Quantificação de citocinas e caspases extracelulares

Serão coletados 4 mL de sangue periférico em tubo com gel separador. Após centrifugação a 4°C, 1000xg por 15 minutos, o soro será utilizado imediatamente para os experimentos ou será estocado a -80°C até o momento do uso. A determinação de citocinas e quimiocinas no soro será realizada por quimioluminescência, utilizando aparelho Milliplex (kit comercial HCYTOMAG-60K-10, Merck). As caspases extracelulares (Caspase 1 - p20 subunit) em amostras de soro de pacientes serão determinados por ELISA usando kits específicos, conforme recomendação do fabricante R&D Systems.

#### Avaliação de NET (armadilhas extracelulares de neutrófilos)

A produção de NET em amostras de lavado broncoalveolar será realizada através da mensuração de DNA celular livre (Quant-it Picogreen dsDNA Invitrogen Thermofisher) conjugado com mieloperoxidase (em placas previamente sensibilizadas com anticorpo anti-mieloperoxidase - kit comercial Myeloperoxidase Antibody PA5 – 16672 Thermofischer Scientific) por espectofotometria. ). A fluorescência será lida a 525 nm (com excitação em 488 nm).

#### CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Serão inclusos pacientes maiores de 18 anos e com pelo menos 45 kg de peso corpóreo, com diagnóstico de SARS-CoV-2 em sua forma moderada ou mais grave e que necessitem de tratamento em ambiente hospitalar. (Definição sintomas mínimos para forma moderada da doença - febre, tosse e respiração curta, com sinais de pneumonia no exame de imagem dos pulmões).

#### CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Alergia a qualquer uma das medicações em estudo;
- Diagnóstico de porfiria, miastenia gravis ou arritmia não controlada no momento da admissão;
- Fazer uso de digoxina, amiodarona, verapamil ou metoprolol;
- Fazer uso de inibidores de proteases;
- Antecedente de hepatopatia crônica com disfunção hepática;

**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

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.954.378

- Não consigam entender as informações contidas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### **Objetivo da Pesquisa:**

#### OBJETIVO PRIMÁRIO

1. Avaliar eficácia e segurança do uso da cloroquina e da colchicina no tratamento de pacientes com SARSCoV-2 que necessitem de tratamento hospitalar.

#### OBJETIVO SECUNDÁRIO

1. Traçar perfil clínico e laboratorial dos casos de SARS-CoV-2 hospitalizados em nosso meio.
2. Avaliar carga viral em secreções das vias aéreas, na admissão e durante evolução.
3. Avaliar perfil de citocinas e caspases extracelulares no soro e no lavado broncoalveolar na admissão e durante o tratamento.
4. Avaliar ativação neutrofílica através de produtos de NET (neutrophil extracellular traps) em aspirado traqueobrônquico ou lavado broncoalveolar em pacientes que eventualmente necessitem de assistência ventilatória mecânica.

### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

#### RISCOS

Com relação ao uso da cloroquina, a maior parte dos eventos adversos é descrito com o uso crônico da medicação. Há relatos de toxicidade cardíaca e de musculatura esquelética, sempre após uso crônico e com alta dose acumulada; a toxicidade ocular é bem reconhecida e documentada, também ocorrendo após uso crônico e com altas doses acumuladas. Dessa forma, os riscos para o uso por 10 dias, como propõe o estudo, seriam principalmente os eventos adversos leves, como hiporexia, náusea, vômito, cefaleia e, eventualmente, distensão abdominal. Com relação ao uso da colchicina, o mais frequente evento adverso é a diarreia, também podendo ocorrer, mais raramente, náuseas e vômitos. Propomos o uso por apenas cinco dias, respeitando a dose diária recomendada, o que representa baixo risco para outros eventos adversos.

#### BENEFÍCIOS

Alguns dados de uso da cloroquina em outros países aventam o potencial benefício para o tratamento do COVID-19. Acreditamos que seu mecanismo de ação contribua para reduzir a replicação viral e a produção de citocinas pro-inflamatórias.

**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

Continuação do Parecer: 3.954.378

Atuando por mecanismo diferente, a colchicina tem reconhecido efeito em reduzir a superprodução de citocinas em casos de inflamação aguda (gota e crises de febre familiar do mediterrâneo, por exemplo), tendo potencial real de benefício nos casos de SARS-CoV-2 ao reduzir a inflamação sistêmica característica das formas mais graves da doença.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Tratar-se-á de um estudo clínico controlado, duplo-cego, com randomização simples para dois grupos: Tratamento com cloroquina e placebo (CQPCB) e Tratamento com cloroquina e colchicina (CQ-COL). Serão avaliados 60 pacientes internados para receber a terapia de suporte padrão para a SARS-CoV-2 e que serão divididos em dois grupos: um que receberá cloroquina e placebo (Grupo CQ-PCB; n=30) e outro grupo que receberá cloroquina e colchicina (Grupo CQ-COL; n=30).

Cada comprimido de sulfato de hidroxicloroquina 400 mg tem 155 mg de cloroquina base, cada comprimido de difosfato de cloroquina 250 mg tem 150 mg de cloroquina base. Ambas as apresentações poderão ser utilizadas no estudo, sem haver permuta de apresentações para um mesmo indivíduo. A cloroquina base será utilizada para cálculo de doses, de acordo com a faixa de peso, visando dose acumulada entre 30 e 44 mg/kg ao final de 10 dias de terapia. Nenhum paciente receberá dose acima de 17 mg/kg nas primeiras 48 horas ou de 34 mg/kg até o dia 7 e a maioria dos pacientes terá recebido entre 30 e 40 mg/kg ao longo de 10 dias. Pacientes do grupo CQ-COL receberão cloroquina com a mesma posologia do grupo CQ-PCB mais colchicina na dose de 0,020 a 0,033 mg/kg nas primeiras 24 horas, seguido de 0,015 a 0,033 mg/kg/dia por mais quatro dias. Haverá checagem diária dos dados clínicos (gerais e relativos à ventilação) e laboratoriais gerais, e da ocorrência de eventos adversos relacionados às medicações do estudo. A solicitação de exames de rotina para seguimento assistencial diário ficará a cargo da equipe médica de avaliação rotineira dos pacientes. As avaliações laboratoriais experimentais ocorrerão nos dias zero (inclusão), 3, 7 e 14, com coleta de material biológico (sangue e secreção de vias aéreas). Após o dia 14, será mantido seguimento observacional dos pacientes a cada sete dias, até o final da internação, tendo em vista os desfechos primários e secundários.

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

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

**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

Continuação do Parecer: 3.954.378

**Recomendações:**

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

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

Trata-se de análise de respostas ao parecer pendente nº 3.944.642 emitido pela Conep em 31/03/2020:

1. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, documento intitulado "TERMO\_DE\_CONSENTIMENTO\_SARS\_CoV\_2.docx":

1.1. Solicita-se que seja exposto de modo claro e afirmativo no TCLE que, caso necessário, será garantido o direito à assistência integral e gratuita ao participante, devido a danos decorrentes da participação na pesquisa e pelo tempo que for necessário (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.3.1 e II.3.2).

RESPOSTA: Foi adicionado de forma clara no TCLE que, caso haja danos decorrentes da participação na pesquisa, será garantido o direito à assistência integral e gratuita ao participante, pelo tempo que for necessário.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.2. Para melhor esclarecer o participante da pesquisa solicita-se que seja incluído no TCLE que todas as despesas tidas com a pesquisa serão de responsabilidade do pesquisador responsável/ patrocinador, isto é, o participante da pesquisa e seu acompanhante não arcarão com nenhum custo referente a procedimentos e/ou exames do estudo (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.11 e II.16).

RESPOSTA: Foi incluído no TCLE que todas as despesas tidas com a pesquisa (procedimentos e/ou exames) serão de responsabilidade do pesquisador responsável ou do patrocinador.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.3. Solicita-se que conste de maneira clara e afirmativa no TCLE que o pesquisador responsável dará acesso aos resultados de exames e do tratamento ao médico do participante ou ao próprio participante sempre que solicitado e/ou indicado (Resolução CNS nº 251 de 1997, item III.2.i).

RESPOSTA: Foi adicionado ao TCLE que o pesquisador responsável dará acesso aos resultados de exames e do tratamento ao médico do participante ou ao próprio participante sempre que solicitado.

**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

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.954.378

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.4. Solicita-se que o pesquisador insira no TCLE, em linguagem clara e acessível a um leigo, os efeitos adversos dos medicamentos em investigação, discriminando-os pelo tipo de medicamento (cloroquina e colchicina).

RESPOSTA: Foi incluído no TCLE, em linguagem clara e acessível a um leigo, os efeitos adversos de cada medicação do estudo separadamente (cloroquina e colchicina).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. O projeto de pesquisa não prevê a realização de análise interina para análise de segurança e eficácia das intervenções, nem critérios para interrupção do estudo. Solicita-se adequação do protocolo de pesquisa, considerando-se o previsto nos itens V.3 e V.4 da Resolução CNS nº466 de 2012.

V.3 - O pesquisador responsável, ao perceber qualquer risco ou dano significativos ao participante da pesquisa, previstos, ou não, no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, deve comunicar o fato, imediatamente, ao Sistema CEP/CONEP, e avaliar, em caráter emergencial, a necessidade de adequar ou suspender o estudo.

V.4 - Nas pesquisas na área da saúde, tão logo constatada a superioridade significativa de uma intervenção sobre outra(s) comparativa( s), o pesquisador deverá avaliar a necessidade de adequar ou suspender o estudo em curso, visando oferecer a todos os benefícios do melhor regime.

RESPOSTA: Foram inseridas novas seções na brochura do pesquisador (Itens 6.9 a 6.11, páginas 14 e 15), no documento intitulado "projeto\_SARS\_CoV\_2\_01042020\_versao2.docx", referentes à realização de análise interina de segurança e eficácia das intervenções, às situações de retirada do estudo e aos critérios de interrupção do estudo.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

### **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.

**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

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.954.378

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1530785.pdf	01/04/2020 18:44:16		Aceito
Outros	Carta_resposta_pendencia_doc_CONEP_01042020.docx	01/04/2020 18:41:41	Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_SARS_CoV_2_versao_2_realcado.docx	01/04/2020 18:41:03	Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_SARS_CoV_2_versao_2.docx	01/04/2020 18:40:53	Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_SARS_CoV_2_01042020_versao_2_realcado.docx	01/04/2020 18:37:28	Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_SARS_CoV_2_01042020_versao_2.docx	01/04/2020 18:35:17	Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira	Aceito
Cronograma	Cronograma_versao_2.docx	01/04/2020 09:40:15	Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio_SARS_CoV_2.pdf	25/03/2020 18:02:23	Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_1.pdf	25/03/2020 17:59:02	Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

BRASILIA, 04 de Abril 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