

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E  
BIOAGENTES PATOGÊNICOS

MARLON FORTES ROCHA

**Avaliação do sCD163 como biomarcador prognóstico para  
gravidade em pacientes hiperinflamatórios de COVID-19**

RIBEIRÃO PRETO

2023

MARLON FORTES ROCHA

**Avaliação do sCD163 como biomarcador prognóstico para  
gravidade em pacientes hiperinflamatórios de COVID-19**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como  
requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências,  
área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Larissa Dias da Cunha

RIBEIRÃO PRETO

2023

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

Fortes-Rocha, Marlon

Avaliação do sCD163 como biomarcador prognóstico para gravidade em pacientes hiperinflamatórios de COVID-19

Ribeirão Preto, 2023.

69 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Larissa Dias da Cunha.

1. sCD163. 2. Hiperinflamação. 3. Biomarcador. 4. COVID-19. 5. inflamação

**Nome:** Marlon Fortes Rocha

**Título:** Avaliação do sCD163 como biomarcador prognóstico para gravidade em pacientes hiperinflamatórios de COVID-19.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### **Banca Examinadora**

Prof.(a) Dr.(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

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

Prof.(a) Dr.(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

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

Prof.(a) Dr.(a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

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

## **APOIO FINANCEIRO**

Trabalho realizado no Laboratório Sinalização Celular na Resposta Inflamatória, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão – Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) processos 2020/13120-8, 2018/25559-5, 2020/05288-6, apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) processo 0637/2020 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) processo 404538/2018-3.

## 1. DEDICATÓRIA

*Às vítimas e as pessoas que perderam entes queridos para a COVID-19 em meio a essa crise sanitária, econômica e social*

*À Rogéria e Marlon, meus pais, que edificaram todas as possibilidades para realizar meus sonhos*

*Às pessoas LGBTQIA+ que abriram e trilharam caminhos para que eu e muitas que virão sejam reconhecidas com respeito enquanto cientistas LGBTQIA+*

## 2. AGRADECIMENTOS

Esse projeto não seria possível sem o trabalho conjunto de diversos grupos de pesquisa. Agradeço ao Dr. Mikhael Haruo Fernandes de Lima pela contribuição na execução dos experimentos de citometria e à Dra. Tamara Rodrigues pelas contribuições nos experimentos desse projeto. Agradeço aos Profs. Drs. Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira e Paulo Louzada Júnior pelas contribuições associadas aos estudos clínicos. Agradeço também aos docentes e demais pesquisadores associados ao CRID pelas discussões e contribuições nos projetos em andamento, em especial ao grupo do Profs. Drs. Dario Zamboni. Agradeço imensamente aos companheiros do Laboratório de Sinalização Celular na Resposta Inflamatória: Dra. Ana Salina, Dr. Edismauro Filho, Douglas Santos e Ms. Daniel Alzamora, Laís Nascimento Amaral, Adryan dos Santos, Laís Ruiz, Catarina Candido de Salles pela colaboração na realização dos experimentos, na coordenação das atividades e nas múltiplas discussões que me enriqueceram enquanto cientista e nos fortaleceram enquanto grupo de pesquisa. É com muito orgulho que eu venho reforçar minha admiração e agradecer às docentes que contribuíram imensamente para minha formação. São todas essas mulheres que produzem com Ciência de qualidade mesmo diante das estruturas patriarcais e machistas. Agradeço a Prof. Dra. Mariana Kiomy Osako pelas incontáveis discussões, oportunidades, contribuições e orientações ao longo de todo o mestrado. Agradeço às Profs. Dras. Ângela Kaysel Cruz, Lucila Leiko, Vânia Bonato e Alline Campos pelos ensinamentos dentro do curso de Ciências Biomédicas. E por fim, a minha orientadora Profa. Dra. Larissa Dias da Cunha que me confiou a grande responsabilidade de tocar parte dos projetos de COVID-19 e que vem me ensinando a reconhecer os grandes potenciais da carreira científica. Por fim, agradeço o suporte financeiro das agências de fomento FAPESP, CNPq e CAPES que possibilitaram a realização desse projeto.

**Título:** Avaliação do sCD163 como biomarcador prognóstico para gravidade em pacientes hiperinflamatórios de COVID-19.

### 3. RESUMO

A gravidade de COVID-19 é uma manifestação multifatorial, frequentemente causada por uma resposta imune disfuncional que pode estar associada à hiperinflamação. Ativação excessiva de monócitos/macrófagos que acontece durante a imunopatologia de COVID-19 contribui para o estado de hiperinflamação associado com a morbidade e mortalidade em pacientes graves. Como a gravidade de COVID-19 pode se dar por diferentes razões, identificar a causa primária associada à piora clínica pode auxiliar na escolha das melhores abordagens terapêuticas. O sCD163 é um potencial biomarcador de ativação macrofágica associado com a evolução grave de síndromes hiperinflamatórias, incluindo aquelas associadas a infecções virais. A partir dessas evidências, nós avaliamos se o sCD163 é um potencial biomarcador associado a gravidade de COVID-19. Para essa avaliação, os níveis séricos de sCD163 foram quantificados por ELISA em amostras coletadas no dia da admissão hospitalar de 181 pacientes de COVID-19. A partir disso, nós estratificamos os pacientes de acordo com o prognóstico (gravidade, ventilação mecânica, sobrevivência e hiperinflamação). Nós observamos um aumento dos níveis séricos de sCD163 nos pacientes com pior prognóstico, especialmente os pacientes hiperinflamados. Nós encontramos que os níveis de sCD163 se correlacionam com os níveis séricos de IL-6 e IL-18 em pacientes hiperinflamados. Destacadamente, a mediana dos níveis de sCD163 estavam elevadas em pacientes hiperinflamados que vieram a óbito quando comparados aos hiperinflamados que receberam alta hospitalar. No entanto, os níveis séricos de sCD163 na admissão hospitalar não predizem a resposta ao tratamento com colchicina, mas parecem indicar a redução de IL-18 após tratamento com colchicina. Dessa forma, sCD163 é um potencial biomarcador prognóstico de gravidade de COVID-19 e possivelmente atua como discriminante dos pacientes hiperinflamados com maior risco de mortalidade. Além disso, sCD163 pode indicar pacientes com redução de IL-18 mediante tratamento com colchicina.

**Palavras chaves:** sCD163, hiperinflamação, biomarcador, COVID-19, inflamação.

**Title:** Evaluation of sCD163 as a prognostic biomarker for severity in hyperinflammatory COVID-19 patients.

#### 4. ABSTRACT

Severe COVID-19 is a multifactorial manifestation, often caused by a dysfunctional immune response that can be associated with hyperinflammation. Excessive monocyte/macrophage activation that occurs during COVID-19 immunopathology and contributes to the hyperinflammation associated with morbidity and mortality in severe patients. As COVID-19 severity can be due to different reasons, identifying the primary cause associated with the clinical worsening can guide the best therapeutic approaches. sCD163 is a potential macrophage activation biomarker associated with the severe evolution of hyperinflammatory syndromes, including the ones related to viral infections. Based on these evidences, we evaluated if sCD163 is a potential biomarker associated with COVID-19 severity. For this evaluation, serum sCD163 was quantified through ELISA in samples collected on the hospital admission day from 181 COVID-19 patients. First, we stratified patients based on clinical prognosis (severity, mechanical ventilation, survivor and hyperinflammation). We observed an increase in sCD163 serum levels in patients with worse prognosis, especially the hyperinflammatory patients. We found that sCD163 positively correlates with IL-6 and IL-18 levels in hyperinflammatory patients. Importantly, the median of sCD163 levels were significantly higher in hyperinflammatory patients that deceased when compared to hyperinflammatory patients that were discharged. However, the sCD163 serum levels at hospital admission did not predict responsiveness to colchicine treatment, but it might indicate the IL-18 reduction after colchicine treatment. Thus, sCD163 is a potential prognostic biomarker associated with worse prognosis in COVID-19 and might discriminate hyperinflammatory patients at higher risk of mortality. In addition to that, sCD163 might indicate IL-18 reduction by colchicine treatment in COVID-19 patients.

**Keywords:** sCD163, hyperinflammation, biomarker, COVID-19, inflammation.

## 5. LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** A expressão de CD163 na superfície dos monócitos é aumentada em pacientes de COVID-19 e se correlaciona com os níveis de LDH.

**Figura 2.** Os níveis séricos de sCD163 na coorte 1 independem de fatores de risco epidemiológicos, da evolução temporal da doença e da expressão de CD163 na superfície dos monócitos.

**Figura 3.** Os níveis séricos de IL-6 e IL-18 estão elevados nos pacientes de COVID-19 que apresentam pior prognóstico clínico.

**Figura 4.** Os níveis séricos de sCD163 estão elevados nos pacientes de COVID-19 que apresentam pior prognóstico clínico.

**Figura 5.** sCD163 é capaz de distinguir pacientes de COVID-19 que apresentam pior prognóstico clínico.

**Figura 6.** Os níveis séricos de sCD163 se correlacionam com marcadores laboratoriais e citocinas associadas a quadros inflamatórios.

**Figura 7.** Os níveis séricos de sCD163 na coorte 2 são afetados pelo tratamento com colchicina.

**Figura 8.** Os níveis séricos de sCD163 na admissão hospitalar não predizem a resposta ao tratamento com colchicina.

**Figura 9.** A redução dos níveis de IL-18 após tratamento com colchicina pode ser predito pelos níveis sCD163.

## 6. LISTA DE QUADROS

**Quadro 1.** Fatores que influenciam a expressão de CD163 em macrófagos/monócitos.

## 7. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC:	Area Under the ROC Curve
AIM:	Ausente no Melanoma
CCL:	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
CD:	Cluster of Differentiation
cHIS:	Síndrome hiperinflamatória associada à COVID-19
COVID-19:	Doença do coronavírus 2019
CRP:	Proteína C Reativa
CXCL:	Ligante de quimiocina CXC
ELISA:	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FcγR:	Receptor Fc (fragmento cristalizável) gama
FiO <sub>2</sub> :	Fração Inspirada de Oxigênio
GM-CSF:	Fator Estimulador de Colônias De Macrófagos e Granulócitos
Hb:	Hemoglobina
HC-FMRP:	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HIV:	Vírus Da Imunodeficiência Humana
HLH:	Linfocitose Hemofagocítica
IFN:	Interferon
Ig:	Imunoglobulina
IL:	Interleucina
Hyp Infl:	Hiperinflamados
HLA:	Antígeno Leucocitário Humano
LDH:	Lactato desidrogenase
MAS:	Síndrome de Ativação Macrofágica

M-CSF:	Fator estimulador de colônias de macrófagos
NET:	Armadilha extracelular dos neutrófilos
NLR:	Razão Neutrófilo-Linfócito
NLRC:	NLR family, CARD domain containing
NLRP:	NLR family pyrin domain
Non Infl:	Não Hiperinflamados
PaO <sub>2</sub> :	Pressão Parcial de Oxigênio
PBS:	Tampão Fosfato-Salino
PFA:	Paraformaldeído,
qPCR:	PCR quantitativo
SARS-CoV-2:	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
sCD163:	CD163 solúvel
SDRA:	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
sJIA:	Artrite Idiopática Juvenil Sistêmica
SLE:	Lúpus Eritematoso Sistêmico
ROC:	Receiver Operating Characteristic
TNF:	Tumor Necrosis Fator
TLR:	Receptor do tipo Toll
TWEAK:	TNF-like weak inducer of apoptosis
UTI:	Unidade de Terapia Intensiva

## 8. SUMÁRIO

1. DEDICATÓRIA.....	6
2. AGRADECIMENTOS .....	7
3. RESUMO .....	8
4. ABSTRACT .....	9
5. LISTA DE FIGURAS.....	10
6. LISTA DE QUADROS .....	11
7. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
8. SUMÁRIO .....	14
9 INTRODUÇÃO .....	17
10 OBJETIVOS .....	26
10.1 Objetivo geral.....	26
10.2 Objetivos específicos.....	26
11 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
11.1 Amostras de pacientes com COVID-19.....	28
11.2 Dosagem de sCD163 e de IL-6 sérico.....	29
11.3 Dosagem de citocinas e quimiocinas inflamatórias.....	29
11.4 Imunofenotipagem e avaliação de marcadores associados à inflamação nos monócitos.....	29
11.5 Análise dos dados clínicos e laboratoriais.....	30
11.6 Análise estatística.....	30
12 RESULTADOS.....	33
12.1 sCD163 é um potencial biomarcador associado à gravidade em pacientes hiperinflamatórios de COVID-19.....	33
12.2 Pacientes com altos níveis de sCD163 podem não ser responsivos à modulação do inflamassoma pelo tratamento com colchicina .....	43
13 DISCUSSÃO .....	50
14 CONCLUSÃO.....	55

15 REFERÊNCIAS.....57

# ***Introdução***

## 9 INTRODUÇÃO

Já se passaram mais de dois anos após o início da pandemia de COVID-19 (do inglês *Coronavirus Disease 2019*), mas essa doença continua tendo relevância no contexto de saúde pública mundial, especialmente com o surgimento de novas variantes (CHEN et al., 2022). A COVID-19 tem manifestação clínica bastante diversa: enquanto a maioria dos pacientes evolui com sintomas leves a moderados, uma parcela dos pacientes desenvolve pneumonia e uma doença grave (GUO et al., 2020). A taxa de letalidade dessa doença fica em torno de 1%. Por volta de 3-20% das pessoas com COVID-19 requerem hospitalização, das quais uma proporção considerável (entre 10-30%) necessita de internação em UTI, o que sobrecarrega os sistemas de saúde (LAMERS; HAAGMANS, 2022). Essa gravidade observada na COVID-19 está associada a alguns fatores de risco: idade avançada, ser do sexo masculino e presença de comorbidades como diabetes mellitus, hipertensão, doenças cardiovasculares, obesidade e tabagismo (MEHTA et al., 2021; O'DRISCOLL et al., 2021). Esse contexto evidencia a necessidade do melhor entendimento sobre a gravidade da doença e de formas de identificar previamente os pacientes em maior risco, de forma a determinar um melhor acompanhamento desses pacientes.

A evolução clínica da COVID-19 tem padrão bastante característico. Os pacientes acometidos apresentam uma fase inicial leve que pode progredir para uma fase pulmonar que varia de moderada a grave. Essas duas fases são marcadas por uma rápida replicação viral seguida do declínio da carga viral, e manifestações clínicas moderadas que podem evoluir para pneumonia e dispneia. A progressão da doença para sua forma grave é marcada pela síndrome de desconforto respiratório agudo (SDRA) e surgimento de sintomas condizentes com um quadro hiperinflamatório: hipercitocinemia (com destacado aumento de IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL1, IL-10, entre outras) e altos níveis de marcadores inflamatórios (como dímero-D, proteína C reativa [CRP], ferritina e lactato desidrogenase [LDH]) (LAMERS; HAAGMANS, 2022; SIDDIQI; MEHRA, 2020). Portanto, mesmo que as vias aéreas sejam o foco inicial da infecção de SARS-CoV-2 e representem o primeiro sistema acometido no hospedeiro, as condições inflamatórias e estado imunológico dos pacientes são críticos em determinar o curso da progressão da doença (LI et al., 2022; MARTINEZ et al., 2020).

As respostas imunes associadas à infecção por SARS-CoV-2 são centrais para a patogênese de COVID-19 (LI et al., 2022). O quadro de hipercitocinemia observado na COVID-19 reforça o caráter inflamatório dessa doença e sugere que a gravidade da patologia está associado à hiperinflamação e imunopatologia, e não necessariamente ao descontrole da replicação viral (MANSON et al., 2020). A disfunção imune é evidenciada pela linfocitopenia de linfócitos T induzida por apoptose e formação de sincício e imunossenescência dessas células. Além disso, é observada neutrofilia com presença de neutrófilos imaturos (SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020; SILVIN et al., 2020) e fortes evidências da contribuição de NETs para a fisiopatologia (VERAS et al., 2020; ZUO et al., 2020).

O sistema imune inato tem um papel crítico na defesa contra o SARS-CoV-2 (LI et al., 2022). No entanto, a imunidade inata também pode gerar efeitos deletérios quando ativada erroneamente durante a infecção pelo vírus (SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020). Monócitos e macrófagos, células da imunidade inata, desempenham um importante papel na defesa contra infecções virais (KNOLL; SCHULTZE; SCHULTE-SCHREPPING, 2021). Essas células produzem mediadores inflamatórios que atuam no controle da replicação do patógeno e ativação de mecanismos de reparo tecidual. Contudo, a disfuncionalidade dessas células também pode induzir a patogênese durante COVID-19 por meio da produção exacerbada de citocinas e quimiocinas inflamatórias, interação excessiva com células da imunidade adaptativa e acúmulo de dano tecidual. Nesse contexto, monócitos e macrófagos estão associados ao quadro de hipercitocinemia e a complicações fibróticas, o que gera ainda mais complicações nos casos graves de COVID-19 (GUSTINE; JONES, 2021; MEIDANINIKJEH et al., 2021; MERAD; MARTIN, 2020; SALINA et al., 2022).

No contexto da imunidade inata, a exacerbação do processo inflamatório pode ser causada pela disfunção na ativação dos inflamassomas, complexos moleculares que atuam na célula hospedeira em resposta a estresse celular e patógenos intracelulares. Os inflamassomas são complexos multiproteicos montados a partir da sinalização por receptores citoplasmáticos de reconhecimento de padrões moleculares, capazes de detectar microrganismos patogênicos e sinais de perigo no citosol da célula hospedeira (BROZ; DIXIT, 2016). Os inflamassomas são nomeados de acordo com as diferentes proteínas sensoras, sendo os principais tipos: NLRP1, NLRP3, NLRC4 e AIM2. Dentre esses, o inflamassoma de NLRP3 é um dos mais

estudados e apresenta importante função na resposta inata a infecções virais. A ativação do inflamassoma de NLRP3 induz a ativação por autólise da cisteína protease caspase-1. Caspase-1 ativa catalisa a ativação de outros substratos, incluindo as formas maduras das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL18, além de gasdermina-D, proteína formadora de poro que induz a morte celular inflamatória chamada de piroptose. Níveis exacerbados de citocinas da família IL-1 induzem respostas sistêmicas inflamatórias, incluindo produção excessiva de IL-6, TNF, INF $\alpha$  e IFN $\beta$ , que podem levar ao quadro de hipercitocinemia em doenças inflamatórias agudas. Diversos estudos têm demonstrado que SARS-CoV-2 é capaz de induzir a ativação do inflamassoma de NLRP3 e que essa ativação desse inflamassoma e produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 estão associadas à gravidade de COVID-19 (PAN et al., 2021; RODRIGUES et al., 2021; SEFIK et al., 2022). Isso demonstra a importância de avaliar a ativação do inflamassoma em contextos hiperinflamatórios de COVID-19.

A disfunção imune associada à gravidade de COVID-19 reforça a necessidade de buscar por novos tratamentos para essa doença (GUSTINE; JONES, 2021). Mesmo com grande sucesso no desenvolvimento de múltiplas vacinas preventivas contra o SARS-CoV-2, ainda se faz necessário desenvolver tratamentos adicionais para populações vulneráveis e pacientes graves (CHEN et al., 2022). Logo, têm sido propostos agentes imunomodulatórios incluindo pequenas moléculas (LOPES et al., 2021; The RECOVERY Collaborative Group, 2021) e anticorpos monoclonais direcionados a citocinas (KYRIAZOPOULOU et al., 2021; REMAP-CAP Collaborative Group, 2021) que mitiguem a resposta imune e a indução da inflamação e, dessa maneira, induzam uma melhora no prognóstico dos pacientes (DEL VALLE et al., 2020).

Um dos fármacos propostos para o tratamento de COVID-19 é a colchicina, um alcaloide extraído da planta *Colchicum autumnale* que é atualmente usado no tratamento de gota, febre familiar do Mediterrâneo, doença de Behçet e pericardite aguda e recorrente. O seu mecanismo de ação está associado à interferência da polimerização de microtúbulos que bloqueia a quimiotaxia de monócitos e neutrófilos, mas também é capaz de inibir a ativação do inflamassoma de NLRP3 e a indução de NETs. Visto que a colchicina é capaz de modular o inflamassoma de NLRP3, estudos observacionais foram propostos para avaliar seu potencial no tratamento de COVID-19 e tem apresentado resultados positivos (LOPES et al., 2021; POTERE et al., 2022).

No entanto, apesar de apresentarem resultados promissores, as terapias imunomodulatórias não conseguiram atingir melhores resultados uma vez que parte dos pacientes não são responsivos ao tratamento (The RECOVERY Collaborative Group, 2021). Essa limitação dos resultados pode se dar devido ao não aprofundamento nas evidências associadas à hiperinflamação nos ensaios clínicos dessas terapias (WEBB et al., 2020), visto que há evidências de que pacientes com altos níveis de biomarcadores associados à hiperinflamação respondem melhor a tratamento imunomodulatórios (KELLER et al., 2020; TRAN et al., 2021). Logo, diante dos efeitos colaterais já relatados associados ao uso de imunoterapias e da necessidade de identificar pacientes hiperinflamados, é urgente encontrar biomarcadores que consigam prever quais pacientes vão apresentar piora clínica relacionada a uma resposta inflamatória descontrolada e que auxiliem a definir quais pacientes melhor se beneficiarão de estratégias terapêuticas imunomoduladoras (DEL VALLE et al., 2020).

A gravidade de COVID-19 pode se dar devido ao desenvolvimento de um quadro hiperinflamatório (GUSTINE; JONES, 2021). Condições hiperinflamatórias são complicações com risco fatal resultantes de uma resposta pró-inflamatória sistêmica desencadeada por infecção, lesão ou inflamação crônica (KESSEL et al., 2021). Essa hiperinflamação pode se dar em um contexto de hiperativação de macrófagos e monócitos, por exemplo, em complicações da linfocitose hemofagocítica (HLH) (LERKVALEEKUL; VILAIYUK, 2018).

A HLH pode ser primária ou familiar (pHLH), tratando-se de um grupo de doenças genéticas em que mutações afetam a função lítica das células T citotóxicas e das células NK, prejudicando assim o controle de patógenos e de células T ativadas. Já a HLH secundária (sHLH) é desencadeada em contexto de infecção, trauma, doença metabólica, autoimunidade e auto-inflamação. O termo Síndrome de Ativação Macrofágica (MAS) é frequentemente utilizado para se referir a sHLH no contexto de doenças autoimunes como artrite idiopática juvenil sistêmica (sJIA) e lúpus eritematoso sistêmico (SLE), mas também tem sido usado em contexto de infecções virais (KESSEL et al., 2021; LERKVALEEKUL; VILAIYUK, 2018).

MAS é uma síndrome hiperinflamatória associada a disfunção de múltiplos órgãos e altas taxas de mortalidade. Os principais sintomas clínicos observados são:

febre persistente, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, anemia, disfunção hepática e coagulopatia. No contexto laboratorial, as principais alterações observadas são altos níveis de triglicérides, hiperferritinemia (marca de ativação macrofágica), elevados níveis séricos de LDH, CRP e citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-6, sendo essa última a principal contribuinte para a patogênese da doença (CRAYNE et al., 2019; GROM; HORNE; DE BENEDETTI, 2016; MCGONAGLE et al., 2020; RAMOS-CASALS et al., 2014).

O quadro hiperinflamatório associado à hiperestimulação persistente dos macrófagos já tem sido descrito em diferentes infecções virais, como vírus Epstein-Barr (MARSH, 2018), influenza H1N1 (MORRIS et al., 2021), hepatites B e C (KAZANKOV et al., 2014), Ebola (MCELROY et al., 2019) e HIV (PORCHERAY et al., 2006). Curiosamente, quadros hiperinflamatórios com uma resposta inflamatória descontrolada, retroalimentada positivamente e com presença de extenso dano tecidual também já foram relatados na patogênese de outras infecções por coronavírus humanos (MANSON et al., 2020).

De fato, pacientes graves de COVID-19 apresentam manifestações fisiopatológicas similares a de outras síndromes hiperinflamatórias como: elevados níveis de ferritina, CRP, dímero-D e LDH; disfunção hepática, coagulopatia e marcado aumento de diversas citocinas inflamatórias. No entanto, apesar da existência de algumas tentativas de caracterizar a hiperinflamação em COVID-19, ainda não há completa elucidação sobre a hiperinflamação e os ensaios clínicos não se aprofundaram em consideração a hiperinflamação na sua definição (HASAN et al., 2022; MANSON et al., 2020; WEBB et al., 2020).

Um estudo recente propôs uma robusta caracterização para a hiperinflamação de COVID-19 que leva em conta as similaridades com outras síndromes hiperinflamatórias, mas indica a existência de características singulares. Essa caracterização considera 6 parâmetros: ativação macrofágica, disfunção hematológica, hipercitocinemia, lesão hepática, febre e coagulopatia. Sendo assim, foi proposto a síndrome hiperinflamatória associada à COVID-19 (cHIS) e uma escala associada com progressão com ventilação mecânica e óbito baseada em marcadores inflamatórios (WEBB et al., 2020).

Visto a importância da hiperinflamação na gravidade de COVID-19, é crucial encontrar biomarcadores associados a esse contexto. Um biomarcador é uma característica definida que é mensurada como indicador de processos biológicos normais, processos patológicos ou resposta a uma exposição ou intervenção (CALIFF, 2018). De forma geral, os biomarcadores podem ser de dois tipos: prognóstico, quando permite avaliar a maior probabilidade de um desfecho clínico, ou preditivo quando permite prever se aquele indivíduo será responsivo a um determinado tratamento (BALLMAN, 2015).

Nesse contexto, a forma solúvel da molécula CD163 (sCD163) tem sido apontado como potencial biomarcador de síndromes hiperinflamatórias associadas à ativação macrofágica (BLEESING et al., 2007). CD163 é um receptor transmembrana endocítico do tipo “scavenger”, expresso exclusivamente em monócitos e macrófagos. Sua primeira função descrita foi a de se ligar a complexos de hemoglobina-haptoglobina, resultando na internalização desses complexos. Além disso, essa proteína está envolvida na adesão de eritroblastos, na detecção de bactérias e vírus e na ligação da citocina TWEAK. A alta expressão de CD163 também está associada a macrófagos e monócitos que desempenham funções anti-inflamatórias. Sua expressão é influenciada por diversos fatores como descrito na tabela 1. Em contextos pró-inflamatórios, CD163 pode ser clivado dando a forma solúvel de CD163 (sCD163) (ETZERODT; MOESTRUP, 2013; KNUDSEN et al., 2016; KOWAL et al., 2011; KRISTIANSEN et al., 2001).

**Quadro 1** - Fatores que influenciam a expressão de CD163 em macrófagos/monócitos (ETZERODT; MOESTRUP, 2013; KOWAL et al., 2011)

Fatores que induzem a expressão de CD163	Fatores que reduzem a expressão de CD163
Glicocorticoides	IL-4
IL-10	TNF $\alpha$
IL-6	IL-1 <sup>a</sup>
Fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF)	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF)
Hemoglobina (Hb)	IL-13
	IL-1 $\beta$
	LPS
	Estímulo de TLR2, TLR4, TLR5
	Estresse oxidativo
	Hipóxia
	Ligação cruzada de receptor Fc $\gamma$ (Fc $\gamma$ R)
	8-iso-prostaglandin F2 $\alpha$
	CCL-3 (MIP-1a)
	Ligante de quimiocina CXC (CXCL)4
	CXCL8 (IL-8)
	Interferon $\gamma$ (IFN $\gamma$ )

Estímulos inflamatórios, como a ativação de receptores do tipo Toll por LPS, induzem a clivagem do CD163 por metaloproteinases, como MMP9 e pela enzima conversora de TNF $\alpha$  (TACE/ADAM17), e sua liberação da membrana celular na forma de sCD163 (CHAUVIN et al., 2022; ETZERODT et al., 2010, 2014; HINTZ et al., 2002; WEAVER et al., 2007). A função fisiológica do sCD163 ainda é desconhecida, mas algumas funções são sugeridas. Uma possível função é que o sCD163 interfira na disponibilidade de ferro para potenciais patógenos devido a sua ligação com haptoglobina-hemoglobina (VANHOLLEBEKE et al., 2008; WEAVER et al., 2006). No entanto, o sCD163 tem baixa afinidade por esses complexos, quando comparado ao CD163 na membrana (MØLLER et al., 2010), o que sugere que o sCD163 apresente funções não relacionadas a hemoglobina. Alguns estudos também sugerem que o sCD163 se ligue a linfócitos T e que possa inibir a proliferação e ativação dessas células (FRINGS; DREIER; SORG, 2002; HÖGGER; SORG, 2001; TIMMERMANN et al., 2004). Além disso, há evidências do papel do sCD163 no reconhecimento e fagocitose de bactérias (KNEIDL et al., 2012).

A elevação dos níveis de sCD163 tem sido utilizada como indicador de ativação macrofágica e como importante dado clínico para monitorar o agravamento de diversas doenças associadas à essa ativação (LERKVALEEKUL; VILAIYUK, 2018; NIELSEN et al., 2020). Esse aumento não necessariamente está relacionado à patogênese, mas possivelmente ocorre como um efeito secundário da desregulação da atividade fagocítica dos macrófagos (CRAYNE et al., 2019). O potencial de sCD163 como biomarcador foi destacado no contexto de doenças reumatológicas (COLAFRANCESCO et al., 2014; SCHAER et al., 2005), na evolução do quadro em doenças hepáticas (KAZANKOV et al., 2016) e de sepse (MØLLER et al., 2006). De forma importante, sCD163 tem sido caracterizado como um possível marcador da gravidade na evolução clínica e desfecho de algumas infecções virais, como as causadas pelo vírus da dengue (AB-RAHMAN et al., 2016), pelo vírus do Ebola (MCELROY et al., 2019) e pelo HIV (KNUDSEN et al., 2016) - o que reforça seu potencial como um promissor biomarcador associado a gravidade e que pode contribuir na identificação de pacientes hiperinflamados em contextos virais.

A hipótese do nosso estudo é que *sCD163 funciona como biomarcador de gravidade de COVID-19 associada a hiperativação da resposta imune inata*. Dessa maneira, avaliamos no presente trabalho o potencial de sCD163 como biomarcador prognóstico e preditivo em pacientes de COVID-19.

# ***Objetivos***

## 10 OBJETIVOS

### 10.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de sCD163 como biomarcador de gravidade de COVID-19

### 10.2 Objetivos específicos

10.2.1. Avaliar o potencial de sCD163 como biomarcador prognóstico da gravidade de COVID-19 em pacientes com hiperinflamação.

**Meta 1:** Caracterizar a expressão de CD163 em monócitos por citometria de fluxo e correlacionar com dados laboratoriais e clínicos.

**Meta 2:** Dosar os níveis séricos de sCD163 em pacientes de COVID-19 por ELISA e correlacionar com dados clínicos e laboratoriais

**Meta 3:** Avaliar correlação de sCD163 com marcadores laboratoriais e citocinas inflamatórias

10.2.2. Avaliar o potencial de sCD163 como biomarcador preditivo para tratamento de colchicina em pacientes graves de COVID-19.

**Meta 1:** Dosar os níveis séricos de sCD163 em pacientes de COVID-19 por ELISA do ensaio clínico de colchicina e correlacionar com dados clínicos e laboratoriais.

**Meta 2:** Avaliar correlação de sCD163 com produtos da ativação do inflamassoma

# ***Material e Métodos***

## 11 MATERIAL E MÉTODOS

### 11.1 Amostras de pacientes com COVID-19

As amostras de pacientes foram obtidas a partir do biorrepositório mantido pelos pesquisadores Profs. Drs. Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira e Paulo Louzada Júnior, ambos pertencentes ao corpo docente do Hospital das Clínicas da FMRP/USP (HC-FMRP). O biorrepositório consta do estudo 'Ensaio clínico randomizado para o tratamento de casos moderados a graves da doença causada pelo novo coronavírus-2019 (COVID-19) com cloroquina e colchicina', aprovado em 01/04/2020 pela CONEP (CAAE: 30248420.9.0000.5440) sendo colhido o termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes recrutados. As análises foram feitas em duas coortes: a coorte 1 que consta com amostras de 181 pacientes coletadas entre abril e julho de 2020; e a coorte 2 que consta de amostras de 103 pacientes coletadas entre abril de 2020 e agosto de 2021. Foram utilizadas amostras do biorrepositório em que a infecção por SARS-CoV-2 tenha sido confirmada por PCR quantitativo (qPCR) (CORMAN et al., 2020; WANG et al., 2020). Pacientes foram classificados de acordo com suas manifestações clínicas em: i) casos leves: sintomas clínicos eram leves e não havia indícios de manifestação de pneumonia nos exames de imagem; ii) casos moderados: pacientes apresentam sintomas como febre e sintomas do trato respiratório e havia manifestações de pneumonia nos exames de imagem; iii) casos graves: adultos que atendiam a qualquer um dos critérios a seguir: frequência respiratória > 30 incursões/min; saturação de oxigênio < 93% em repouso; pressão parcial de oxigênio (PaO<sub>2</sub>)/fração inspirada de oxigênio (FiO<sub>2</sub>) < 300 mmHg (10.1001/jama.2020.1585). Também foram coletadas amostras de indivíduos saudáveis que testaram negativo para COVID-19 por qPCR e/ou por sorologia (anticorpos IgM e IgG específicos; Asan Easy Test COVID-19 IgM/IgG kits; Asan Pharmaceutical Co.)

Todo o processamento e procedimentos que utilizaram amostras de pacientes infectados foram realizados em nível de biossegurança 2, em laboratório nível de biossegurança 2+ do Centro de Virologia da FMRP/USP.

### **11.2 Dosagem de sCD163 e de IL-6 sérico**

A partir de amostras de soro provenientes do biorrepositório, checamos os níveis séricos de IL-6 (DY206-05, R&D Systems) e sCD163 (DY1607-05, R&D Systems) por ELISA seguindo as instruções do fabricante, mas alterando o tempo de incubação das amostras para 18h. Os níveis de caspase-1 ativa (Casp1p20) e IL-18 (R&D Systems) também foram avaliados por ELISA seguindo as instruções do fabricante.

### **11.3 Dosagem de citocinas e quimiocinas inflamatórias**

A partir de amostras de plasma, checamos a produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  em 18 pacientes com COVID-19 e 21 indivíduos saudáveis por CBA (Human Inflammatory Cytokine kit 551811, BD Biosciences) seguindo as instruções do fabricante.

### **11.4 Imunofenotipagem e avaliação de marcadores associados à inflamação nos monócitos**

Amostras de sangue total de doadores saudáveis e pacientes com infecção por SARS-CoV-2 foram coletadas e os leucócitos foram separados utilizando gradiente de Ficoll. Após a eliminação das hemácias, as células foram marcadas para análise por citometria de fluxo com marcadores de exclusão CD3-PE-Cy7 (SK7, BD, cat. 557851, 1:200), CD19-PE-Cy7 (SJ25CQ, BD, cat. 557835, 1:200), CD56-PE-Cy7 (NCAM16.2, BD, cat. 335791, 1:50) definidos como Lin-PE-Cy7-, CD15-(APC) (W6D3, BD, cat. 563141, 1:200) e Fixable Viability Dye eFluor 780 (eBioscience; cat. 65-0865-14; 1:3.000) e marcadores de caracterização fenotípicos das células imunes CD14-FITC (M5E2; BD; cat. 557153; 1:50), CD14-APC (M5E2; BD; cat. 555399; 1:50); CD16-FITC (ebioCB16(CB16); eBioscience; cat. 12-0168-42; 1:200), CD163-PE (GHI/61, Biolegend, cat. 333606; 1:50), HLA-DR (L243, BD, cat. 642276, 1:50) por 30 minutos a 4°C. Após marcação, as células foram fixadas com 2% paraformaldeído (PFA) em tampão fosfato-salino (PBS) por 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente adquiridas no citômetro FACSVerse II (BD Bioscience) e analisadas no software

FlowJo (Tree Star). Todo o procedimento de manipulação de células de pacientes até fixação foi conduzido em NB2.

### **11.5 Análise dos dados clínicos e laboratoriais.**

Os grupos dos Profs. Drs. Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira e Paulo Louzada Júnior coletaram e revisaram os prontuários hospitalares dos pacientes com COVID-19 para aquisição dos dados clínicos e laboratoriais relevantes. Os dados foram compilados a partir do sistema eletrônico hospitalar e dos registros de enfermagem. Obtivemos dados laboratoriais relativos aos níveis séricos de LDH, CRP, dímero D, ferritina, hemoglobina, contagem de plaquetas, de neutrófilos e de linfócitos. Além disso, coletamos dados epidemiológicos como idade e sexo e histórico clínico do paciente relativo à ocorrência de comorbidades: diabetes mellitus, cardiopatia, hipertensão arterial sistêmica, obesidade, neoplasia e tabagismo. Com relação à evolução clínica de COVID-19, colhemos informação sobre o dia de admissão hospitalar, desfecho (óbito ou sobrevivência), necessidade de ventilação mecânica e data de início dos sintomas (a partir da qual analisamos a quantidade de dias de sintomas até a coleta da amostra). A partir desses dados, foi feita estratificação dos pacientes para avaliar possíveis efeitos desses parâmetros na evolução da doença e nos níveis de sCD163.

### **11.6 Análise estatística**

Utilizamos o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc, USA) nas análises dos dados e obtenção dos gráficos referentes às dosagens longitudinais da coorte 2. Todos os demais dados foram analisados no R (versão 4.1.2) utilizando RStudio (versão 1.4.1717) aplicando os pacotes dplyr, ggplot2, ggpubr, tidyverse, EnvStats, corrplot, FSA e Hmisc. Os dados de dosagem de marcadores séricos e quantificação de citometria quando estratificados estão apresentados por mediana e intervalo interquartil. Grupos 2 a 2 foram analisados pelo teste t student (two tailed) se apresentaram distribuição normal e pelo teste não paramétrico de U-Mann Whitney para os que não apresentavam essa distribuição. A análise simultânea de mais de dois grupos foi feita por múltiplos de U-Mann Whitney. Para avaliar a relação entre os

parâmetros, avaliamos o coeficiente de correlação de Spearman entre os parâmetros analisados. Esses dados foram apresentados na forma de matriz de correlação ou no plano cartesiano, nesse último obtivemos a raiz do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e o intervalo de confiança de 95%. Para análise longitudinal dos dados de dosagens de marcadores séricos, os dados estão apresentados como pontos individuais e a significância estatística foi feita a partir de teste pareado de U-Mann Whitney. Em todos os casos, foram considerados como estatisticamente significativos resultados com  $p < 0.05$ .

# ***Resultados***

## 12 RESULTADOS

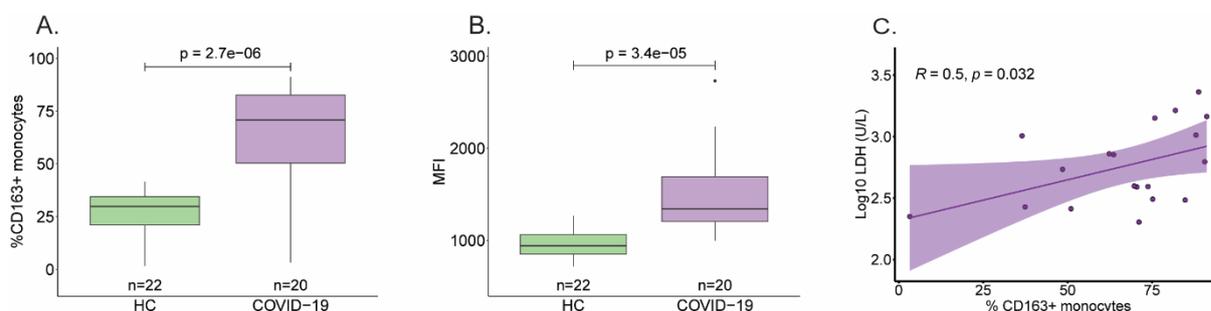
### 12.1 sCD163 é um potencial biomarcador associado à gravidade em pacientes hiperinflamatórios de COVID-19

A gravidade da manifestação da COVID-19 tem causas heterogêneas e pode ser multifatorial. Nesse sentido, identificar a potencial causa primária associada à piora clínica deve auxiliar a definir as melhores abordagens terapêuticas (LAMERS; HAAGMANS, 2022; LI et al., 2022; MARTINEZ et al., 2020). Considerando-se que disfunções da resposta imune inata e o grau de hiperinflamação estão relacionados com a gravidade de COVID-19 (LUCAS et al., 2020; SILVIN et al., 2020; WEBB et al., 2020), buscamos, primeiramente, caracterizar os monócitos circulantes de pacientes com COVID-19. Estudos recentes têm descrito a presença de monócitos disfuncionais e não-resolutivos nos pacientes de COVID-19 (SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020; SILVIN et al., 2020). Iniciamos nosso estudo avaliando previamente a população de monócitos em uma coorte de pacientes admitidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da FMRP/USP entre abril e junho de 2020. Resumidamente, havíamos observado aumento na porcentagem de monócitos inflamatórios e redução de monócitos associados ao perfil resolutivo (FORTES-ROCHA, 2020). Associado a isso, observamos redução da expressão de HLA-DR na superfície desses monócitos como descrito na literatura (FORTES-ROCHA, 2020; LUCAS et al., 2020; SILVIN et al., 2020).

A partir dessa caracterização, foi avaliado os níveis de CD163 na superfície dos monócitos. Macrófagos com altos níveis de expressão de CD163 na sua superfície estão associados aos estágios finais da inflamação, e esse fenótipo parece desempenhar um papel relevante no reparo tecidual e resolução da inflamação (ETZERODT; MOESTRUP, 2013). Por outro lado, há relatos na literatura de aumento de CD163 associado a outros eventos, como a redução de HLA-DR, são indicativos de disfunção dos monócitos e ocorrência de imunoparálise em quadros de sepse (CUI et al., 2019; KJÆRGAARD et al., 2014).

Dada a importância do CD163 para avaliar a função monocítica, e potencialmente corroborar a avaliação do sCD163 como biomarcador, o primeiro

passo do nosso estudo foi analisar a expressão de CD163 na superfície de monócitos. Em análise de citometria de fluxo, nós encontramos um aumento da expressão de CD163 na superfície dos monócitos dos pacientes com COVID-19 em relação aos controles saudáveis (HC) (**fig. 1A e 1B**). Além disso, observamos que a expressão de CD163 está positivamente correlacionada com os níveis séricos de lactato desidrogenase (LDH) (**fig. 1C**), um marcador inflamatório associado ao dano tecidual aumentado nos pacientes com COVID-19 (WU et al., 2020). No entanto, essas análises - em conjunto com dados obtidos anteriormente (FORTES-ROCHA, 2020) - permitiram concluir que o aumento na expressão de CD163 na superfície dos monócitos dos pacientes com COVID-19 está associado a quadros graves de COVID-19 e aos níveis séricos de LDH, mas não permite diferenciar os diferentes desfechos clínicos.



**Figura 1. A expressão de CD163 na superfície dos monócitos é aumentada em pacientes de COVID-19 e se correlaciona com os níveis de LDH.** Análise da expressão de CD163 na superfície de monócitos circulantes por porcentagem (**A**) e intensidade média de fluorescência (**B**), em controles saudáveis (HC) e indivíduos com COVID-19 (**COVID-19**); (**C**) Correlação da porcentagem de monócitos CD163+ com os níveis séricos de LDH em pacientes COVID-19. (A-B) Dados referentes a quantificação por citometria de fluxo e estão expressos em boxplot com valores de mediana e intervalos interquartis. (C) Dados referentes à quantificação por citometria de fluxo da porcentagem de monócitos CD163+ no eixo x e dosagem de LDH no eixo y e apresentados como pontos individuais no plano cartesiano da correlação, reta da regressão linear e área do intervalo de confiança de 95%. São indicados os valores de R (coeficiente de regressão linear) e de p. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

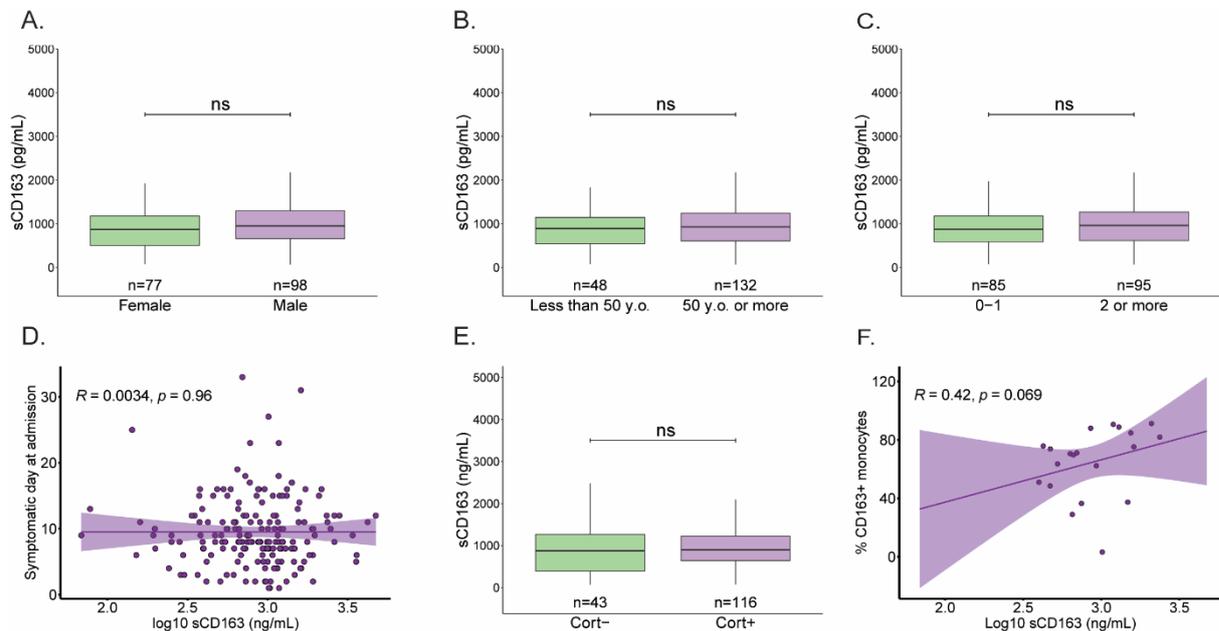
Os elevados níveis de CD163 na superfície dos monócitos de pacientes com COVID-19 reforçam nossa proposição de que o sCD163, biomarcador em patologias

associadas à disfunção do sistema monofagocitário (LERKVALEEKUL; VILAIYUK, 2018; NIELSEN et al., 2020), também possa funcionar como biomarcador de gravidade em COVID-19. Assim, avaliamos os níveis séricos de sCD163 nos pacientes com COVID-19. No nosso estudo, dosamos por ELISA os níveis séricos de sCD163 em 181 pacientes de COVID-19 admitidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da FMRP/USP entre abril e junho de 2020 (desse ponto em diante, identificada como coorte 1).

Dentro do contexto da COVID-19, três fatores epidemiológicos estão associados ao maior risco de gravidade: progressão da idade, especialmente após os 50 anos; ser do sexo masculino, e possuir um acúmulo de condições médicas prévias como diabetes, câncer, obesidade, hipertensão e doenças cardiovasculares (DE SOUZA et al., 2020; SILVIN et al., 2020). Além disso, já foram descritas diferenças no perfil imunológico ao longo do curso da doença associadas com a gravidade (LUCAS et al., 2020). Nesse contexto, caracterizamos inicialmente a coorte 1 para avaliar se os níveis de sCD163 estão relacionados a fatores epidemiológicos associados ao maior risco de gravidade em COVID-19. Observamos que não há diferença dependente de sexo (**fig. 2A**) e idade avançada (**fig. 2B**). Também não houve diferença em relação ao acúmulo de comorbidades, a partir da divisão dos pacientes entre os que tiveram até 1 comorbidade e os que apresentaram 2 ou mais comorbidades (**fig. 2C**). Além disso, não observamos diferenças nos níveis de sCD163 relacionadas ao dia sintomatológico em que o paciente se encontrava quando admitido no hospital (**fig. 2D**). Dessa forma, os níveis séricos de sCD163 nos pacientes com COVID-19 da coorte 1 não foram afetados pelos fatores epidemiológicos analisados e não estão diretamente associados ao estágio de manifestação da doença.

Além dos fatores epidemiológicos, já é conhecido que o tratamento com dexametasona é capaz de influenciar os níveis de CD163 na superfície dos monócitos (BUECHLER et al., 2000; HÖGGER et al., 1998; SCHAER et al., 2002; ZWADLO-KLARWASSER et al., 1990). Esse fármaco foi o primeiro tratamento que induziu melhora clínica nos pacientes graves de COVID-19 e foi amplamente utilizado nas abordagens terapêuticas desses pacientes (RECOVERY Collaborative Group, 2021). Logo, para aprofundar essa caracterização inicial da coorte em relação aos níveis de sCD163, avaliamos o efeito do tratamento com corticoides nos níveis de sCD163.

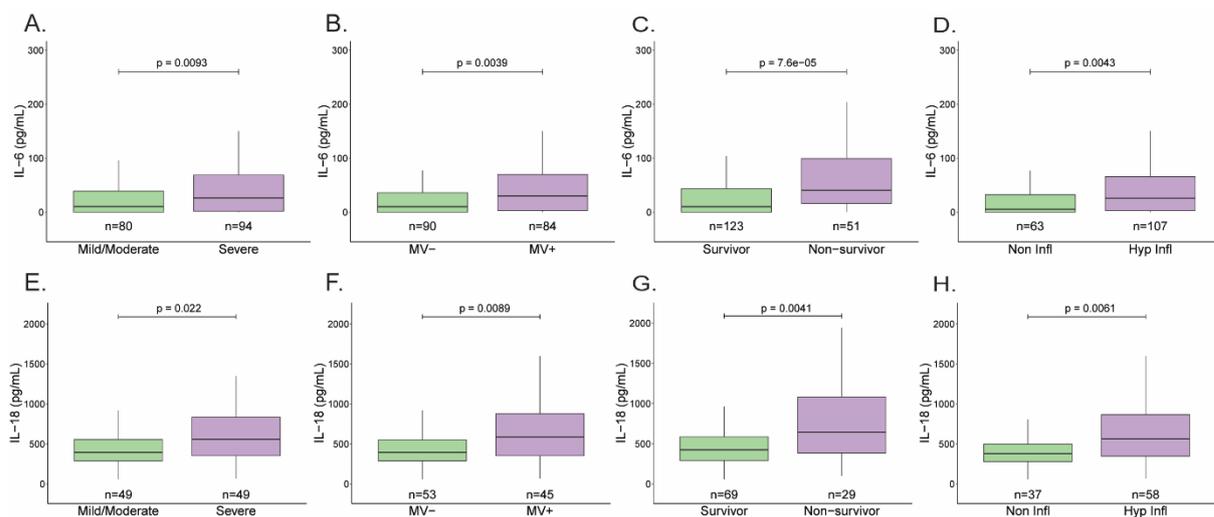
Observamos que não houve diferença significativa nos níveis de sCD163 entre os pacientes tratados ou não com corticoides (**fig. 2E**). Por fim, avaliamos a relação entre os níveis de sCD163 séricos e a expressão de CD163 na superfície dos monócitos (**fig. 1A**). Não foi observada relação significativa entre os níveis séricos de sCD163 e a expressão de CD163 na superfície dos monócitos em pacientes com COVID-19 (**fig. 2F**).



**Figura 2. Os níveis séricos de sCD163 na coorte 1 independem de fatores de risco epidemiológicos, do dia sintomático e da expressão de CD163 na superfície dos monócitos.** Estratificação dos níveis séricos de sCD163 em pacientes de COVID-19 da coorte 1 de acordo com o sexo (**A**), com a idade (**B**), acúmulo de comorbidades (**C**). Correlação dos níveis séricos de sCD163 com dia sintomático na admissão hospitalar (**D**). Estratificação dos níveis séricos de sCD163 em pacientes de COVID-19 da coorte 1 de acordo com tratamento com corticoide (**E**). Correlação dos níveis séricos de sCD163 com a porcentagem de monócitos CD163<sup>+</sup> (**F**). (**A, B, C e E**) Dados referentes a dosagem de sCD163 por ELISA e estão expressos em boxplot com valores de mediana e intervalos interquartis. (**D e F**) Dados referentes ao dia sintomático na admissão hospitalar e da quantificação por citometria de fluxo da porcentagem de monócitos CD163<sup>+</sup> no eixo y, respectivamente, e da dosagem por ELISA dos níveis séricos de sCD163 em log<sub>10</sub> no eixo x apresentados como pontos individuais no plano cartesiano da correlação, reta da regressão linear e área do intervalo de confiança de 95%, sendo indicados os valores de R (coeficiente de regressão linear) e de p. Foram considerados significativos valores de p < 0,05.

Na COVID-19, está bem estabelecido que a gravidade da manifestação está associada à hipercitocinemia, definida como um aumento dos níveis séricos de diversas citocinas inflamatórias. Portanto, confirmamos se a hipercitonemia está associada a gravidade nos pacientes do nosso estudo, como previamente descrito (CRAYNE et al., 2019; LERKVALEEKUL; VILAIYUK, 2018; RAMOS-CASALS et al., 2014; WEBB et al., 2020). Para isso, utilizamos os níveis séricos de interleucina (IL)-6, citocina que tem sido associada a gravidade de COVID-19, e IL-18 - citocina também aumentada nos pacientes graves de COVID-19 e associada à ativação do inflamassoma (RODRIGUES et al., 2021). Para análise, os pacientes foram estratificados a partir dos seguintes parâmetros: gravidade, necessidade de ventilação mecânica e sobrevida. Observamos um aumento significativo dos níveis séricos de IL-6 nos grupos nos grupos de pacientes com pior prognóstico clínico: aumento nos pacientes graves (**fig. 3A**), nos pacientes que precisaram de ventilação mecânica (**fig. 3B**) e nos pacientes que vieram a óbito (**fig. 3C**).

Um estudo anterior demonstrou que a síndrome hiperinflamatória associada a COVID-19 (cHIS) pode ser estratificada de acordo com critérios clínicos característicos do quadro hiperinflamatório, definindo uma escala de classificação crescente de hiperinflamação e pior prognóstico variando de 0 a 6 (WEBB et al., 2020). De forma similar ao que observamos anteriormente, os pacientes que apresentavam valores de cHIS maiores ou iguais a 2 (pacientes hiperinflamados) também apresentam maiores níveis de IL-6 em relação aos que apresentam cHIS 0-1 (pacientes não hiperinflamados) (**fig. 3D**). De forma similar, observamos que os níveis séricos de IL-18 também estavam aumentados nos grupos de pior prognóstico clínico (**fig. 3E - H**). Isso nos sugere uma caracterização de que os pacientes com pior prognóstico apresentam elevado grau de inflamação.

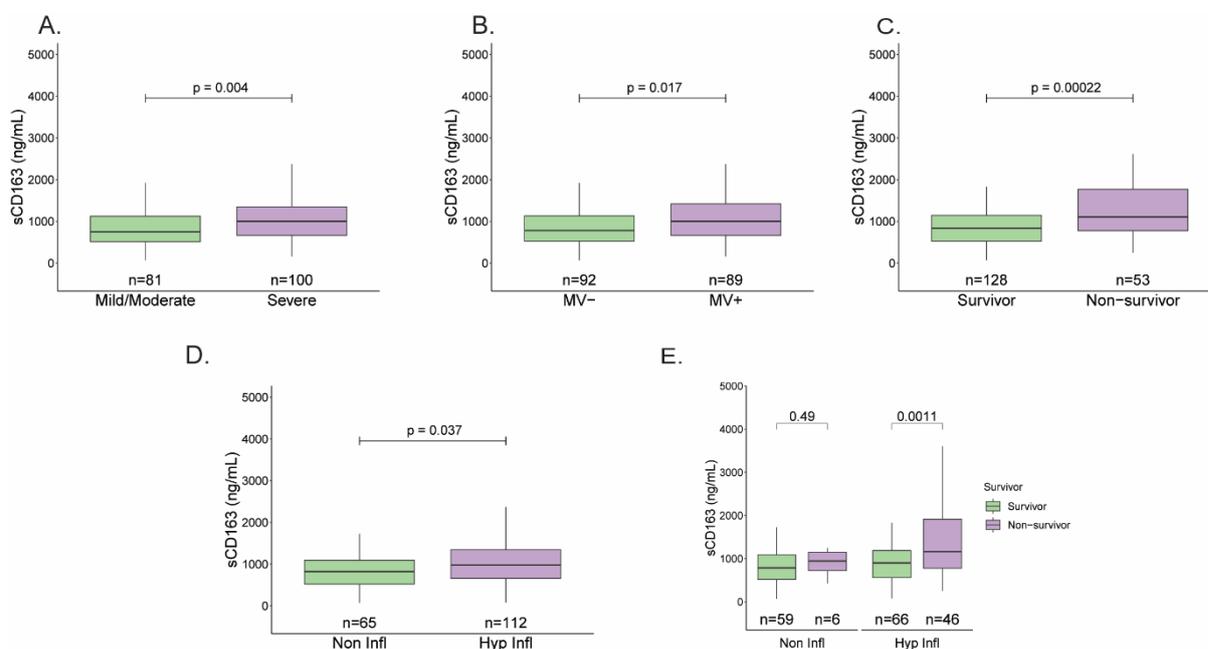


**Figura 3. Os níveis séricos de IL-6 e IL-18 estão elevados nos pacientes de COVID-19 que apresentam pior prognóstico clínico. (A)** Estratificação dos níveis séricos de IL-6 (A-D) e IL-18 (E-H) em pacientes de COVID-19 da coorte 1 de acordo com gravidade (A, E), necessidade de ventilação mecânica (B, F), sobrevivência (C, G) e grau de hiperinflamação (não hiperinflamados [Non Infl] e hiperinflamados [Hyp Infl]) (D, H). Dados referentes à dosagem das citocinas por ELISA e estão expressos em boxplot com valores de mediana e intervalos interquartis. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

Uma vez realizada essa caracterização inicial da coorte 1, prosseguimos com a avaliação do potencial de sCD163 como biomarcador associado a gravidade de COVID-19. Nessa análise, observamos um aumento significativo dos níveis séricos de sCD163 nos grupos de pacientes com pior prognóstico clínico: aumento nos pacientes graves (**fig. 4A**), nos pacientes que precisaram de ventilação mecânica (**fig. 4B**) e nos pacientes que vieram a óbito (**fig. 4C**). Dessa forma, os dados indicam que sCD163 possa atuar como um marcador associado a gravidade de COVID-19.

Adicionalmente, analisamos se os níveis séricos de sCD163 estão associados com a presença de hiperinflamação nos pacientes da coorte 1. Observamos que os pacientes hiperinflamados também apresentam maiores níveis de sCD163 em relação aos pacientes não hiperinflamados (**fig. 4D**). Ao subdividir os grupos de pacientes hiperinflamados e não hiperinflamados por sobrevivência, foi observado que o aumento dos níveis de sCD163 se dá especificamente nos pacientes hiperinflamados que vieram a óbito, mas não há diferença entre esses subgrupos quando avaliamos os pacientes não hiperinflamados (**fig. 4E**). Dessa forma, esses dados indicam o

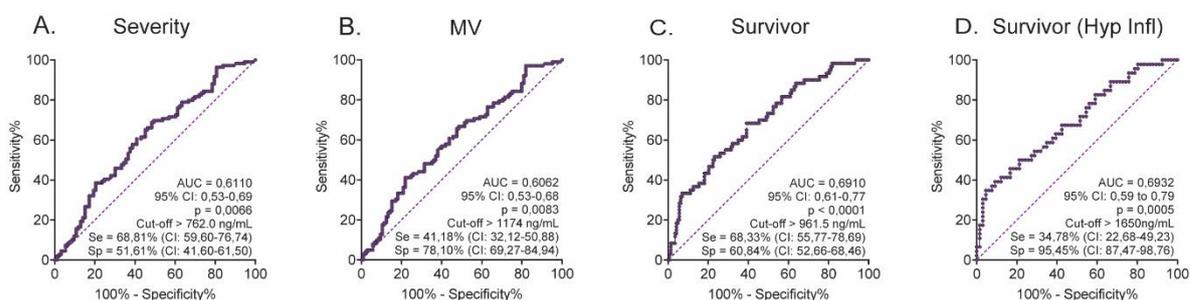
potencial de sCD163 como biomarcador associado a gravidade em quadros hiperinflamatórios de COVID-19.



**Figura 4. Os níveis séricos de sCD163 estão elevados nos pacientes de COVID-19 que apresentam pior prognóstico clínico.** Estratificação dos níveis séricos de sCD163 em pacientes de COVID-19 da coorte 1 de acordo com gravidade (A), necessidade de ventilação mecânica (B), sobrevivência (C), grau de hiperinflamação (não hiperinflamados [Non Infl] e hiperinflamados [Hyp Infl]) (D) e grau de hiperinflamação por sobrevivência (E). Dados referentes à dosagem de sCD163 por ELISA e estão expressos em boxplot com valores de mediana e intervalos interquartis. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

A associação observada entre os níveis séricos de sCD163 no dia da admissão hospitalar com pior prognóstico clínico sugere que essa molécula seja capaz de atuar como biomarcador prognóstico associado à gravidade nos pacientes de COVID-19. Diante disso, buscamos validar esse potencial como biomarcador prognóstico. Para isso, avaliamos o valor prognóstico do sCD163 por curva de ROC para os diferentes desfechos clínicos previamente avaliados. Observamos que os níveis séricos de sCD163 foram capazes de distinguir de maneira satisfatória os pacientes graves (Fig. 5A) com valor de cut-off de 762,0 ng/mL. Também obtemos que sCD163 distingue os pacientes que precisaram de ventilação mecânica (Fig. 5B) com valor de cut-off de

1174,0 ng/mL e os que vieram à óbito (**Fig. 5C**) com valor de cut-off de 961,5 ng/mL. Em todos esses casos, as curvas ROC apresentaram valores de AUC maiores que o necessário para serem considerados relevantes clinicamente (AUC > 0,5). Adicionalmente, também avaliamos se sCD163 distingue os pacientes classificados como hiperinflamados quanto a sobrevivência, dada a associação observada na **fig. 4E**. Obtivemos que o sCD163 sérico também foi capaz de distinguir os sobreviventes dos não-sobreviventes nos pacientes hiperinflamados de COVID-19 (**Fig. 5D**), com valor de cut-off de 1650,0 ng/mL. Dessa forma, os resultados demonstram que os níveis séricos de sCD163 podem ser utilizados como potencial biomarcador preditivo de gravidade em pacientes hiperinflamados de COVID-19.



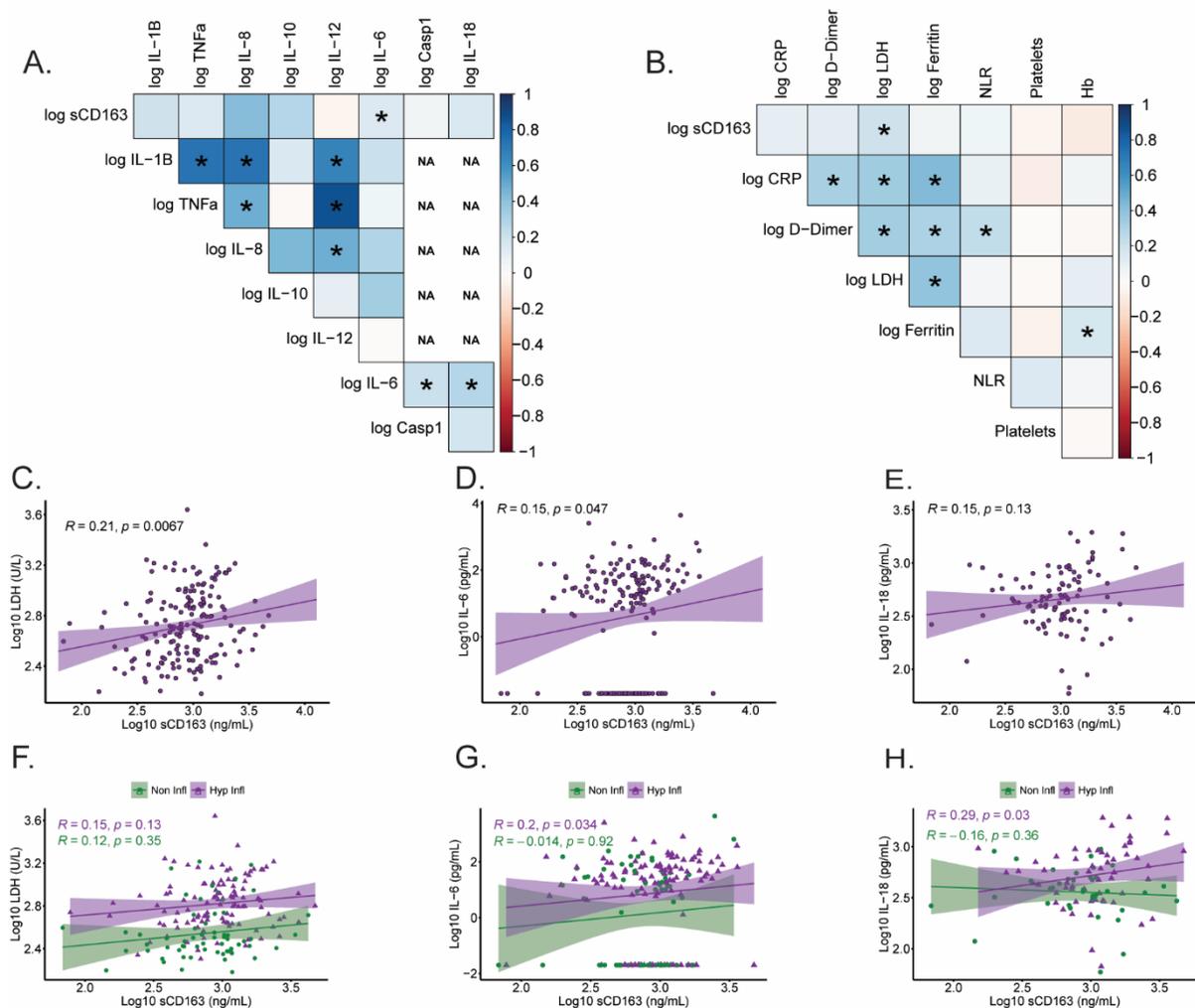
**Figura 5. sCD163 é capaz de distinguir pacientes de COVID-19 que apresentam pior prognóstico clínico.** Curva de Característica de Operação do Receptor (ROC) dos níveis séricos de sCD163 de pacientes de COVID-19 da coorte 1 para prever gravidade (**A**), necessidade de ventilação mecânica (**B**), sobrevivência (**C**) e sobrevivência em pacientes hiperinflamados (**D**). Dados apresentados em gráficos com a taxa de verdadeiro positivo (sensibilidade) no eixo y e a taxa de verdadeiro negativo (100% - especificidade) no eixo x. Em cada gráfico é indicado o valor da área abaixo da curva (AUC), intervalo de confiança (CI) de 95%, p, valor de limiar de cada predição (cut-off) e respectivos valores de sensibilidade (Se), especificidade (Sp) previsto com base nesse valor. Os valores de limiar escolhidos foram aqueles que apresentavam maior valor da soma da sensibilidade e especificidade para cada predição.

Os pacientes da COVID-19 apresentam características associadas a síndromes hiperinflamatórias, como hipercitocinemia, elevação de marcadores laboratoriais associados à inflamação e disfunção imune (GUSTINE; JONES, 2021; MERAD; MARTIN, 2020). Nós observamos que sCD163 sérico está aumentado em pacientes de COVID-19 hiperinflamados sugerindo uma associação de sCD163 com

hiperinflamação. Visto essa potencial relação, buscamos então correlacionar os níveis séricos de sCD163 com diferentes marcadores laboratoriais e citocinas associadas a quadros inflamatórios.

Para isso, geramos duas matrizes de correlação a partir dos valores de coeficiente de Spearman na qual estão indicadas apenas as interações significativas ( $p < 0,05$ ). A primeira matriz de correlação apresenta as potenciais interações entre sCD163, citocinas associadas à inflamação e marcadores associados à ativação do inflamassoma (**fig. 6A**). A segunda matriz foca nas potenciais interações com marcadores laboratoriais associados à inflamação corriqueiramente analisados em contextos hiperinflamatórios (**fig. 6B**). Foi possível observar correlação significativa entre sCD163 e dois marcadores: LDH (**fig. 6B e 6C**) e IL-6 (**fig. 6A e 6D**). No entanto, vale destacar que não houve correlação significativa entre sCD163 e a citocina IL-18, associada a ativação do inflamassoma (**fig. 6A e 6E**). Concordando com esse último resultado, também não observamos associação entre os níveis séricos de sCD163 e a forma clivada de caspase-1, Casp1p20, um indicador da sua ativação (**fig. 6A**) (RODRIGUES et al., 2021).

Uma vez que há diferenças entre os pacientes com COVID-19 quanto ao grau de inflamação, buscamos aprofundar a caracterização das associações entre sCD163, IL-6, LDH e IL-18. Para isso, avaliamos a correlação com sCD163 nos pacientes hiperinflamados ou nos pacientes não hiperinflamados. Pudemos observar que não houve correlação entre os níveis de sCD163 e LDH específica em nenhum dos dois subgrupos analisados (**fig. 6F**). Por outro lado, observamos que a relação significativa entre sCD163 e IL-6 se manteve apenas entre os pacientes hiperinflamados, mas não entre os pacientes não hiperinflamados (**fig. 6G**). Em relação a IL-18, apesar da ausência de associação com sCD163, observamos que existe uma correlação significativa entre os níveis de sCD163 e IL-18 analisando-se apenas os pacientes hiperinflamados (**fig. 6H**). Assim, os dados sugerem uma associação entre sCD163 e citocinas inflamatórias entre os pacientes hiperinflamados de COVID-19.

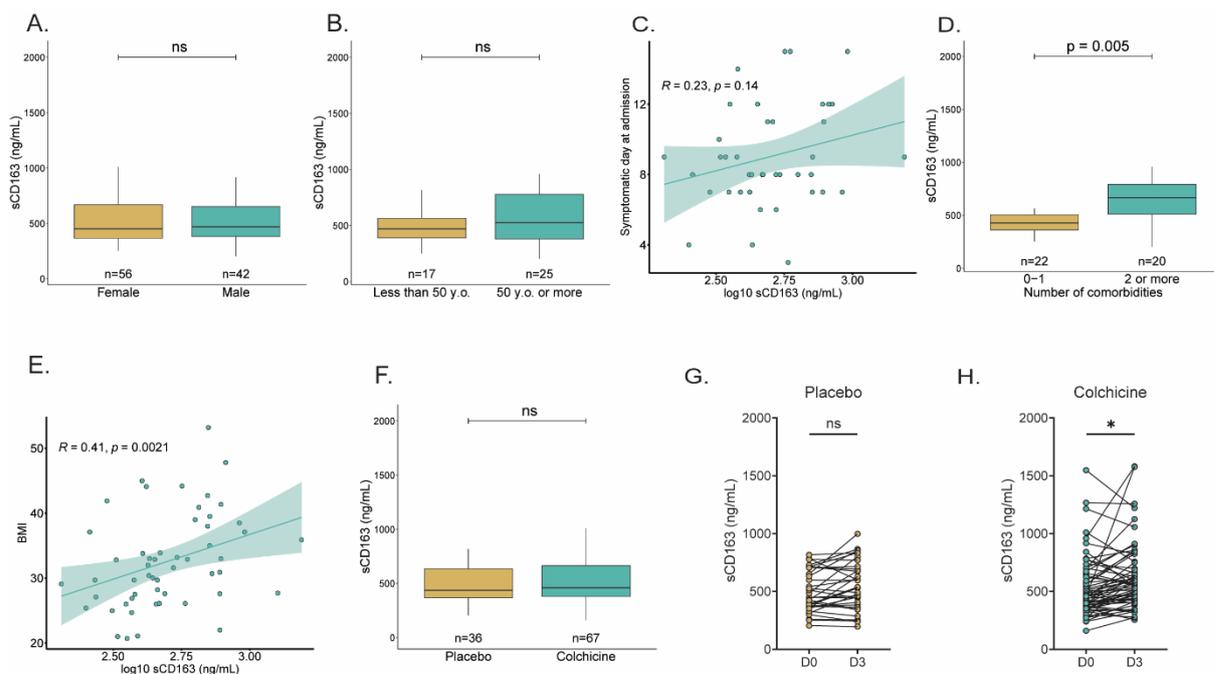


**Figura 6. Os níveis séricos de sCD163 se correlacionam com marcadores laboratoriais e citocinas associadas a quadros inflamatórios.** Matrizes de correlação entre os níveis séricos de sCD163 em pacientes de COVID-19 da coorte 1, citocinas (IL-1B, TNFa, IL-8, IL-10, IL-12, IL-6 e IL-18) e produto da ativação do inflamassoma (Casp1p20) (A) e IL-12) e marcadores laboratoriais associados à inflamação (Proteína C reativa [CRP], Dímero D [D-Dimer], Lactato Desidrogenase [LDH], Ferritina, Razão Neutrófilo-Linfócito [NLR], Plaquetas e Hemoglobina [Hb]) (B). Correlação dos níveis séricos de sCD163 com os níveis sérios de LDH (C,F), IL-6 (D,G) e IL-18 (E-H) nos pacientes COVID-19 como um todo (C-E) e estratificados por grau de hiperinflamação (F-H). A,B: Dados referentes aos valores de R (coeficiente de regressão linear de Spearman) representados pela variação de cores como indicado na legenda, relações significativas assinaladas com asterisco (p < 0.05). C-H: Dados referentes à dosagem por ELISA dos níveis séricos de sCD163 em log10 no eixo x e níveis séricos de LDH, IL-6 ou IL-18 em log10 no eixo y apresentados como pontos individuais no plano cartesiano da correlação, reta da regressão linear e área do intervalo de confiança de 95%. São indicados os valores de R e de p da relação analisada.

## **12.2 Pacientes com altos níveis de sCD163 podem não ser responsivos à modulação do inflamassoma pelo tratamento com colchicina**

A infecção de SARS-CoV-2 é capaz de induzir uma marcada resposta inflamatória que induz, entre outros fenômenos, a ativação do inflamassoma de NLRP3. O inflamassoma de NLRP3 ativo induz a clivagem de caspase-1 e morte celular piroptótica, processo responsável pela maturação e secreção, respectivamente, das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18. De forma importante, a ativação excessiva de inflamassoma está associada à piora clínica do paciente e à hiperinflamação (PAN et al., 2021; RODRIGUES et al., 2021; SEFIK et al., 2022). Diante da relevância do inflamassoma no contexto de COVID-19, foram propostos tratamentos capazes de modular o inflamassoma com intuito de gerar melhora clínica no quadro do paciente, sendo um deles o tratamento com colchicina (POTERE et al., 2022). Um recente ensaio clínico randomizado, duplo cego, controlado com placebo avaliou o efeito da administração de colchicina nas manifestações clínicas em pacientes com COVID-19. A administração de colchicina foi capaz de reduzir o tempo de hospitalização e o tempo de necessidade de suplementação de oxigênio nos pacientes com COVID-19 (LOPES et al., 2021).

Diante dos efeitos positivos observados no tratamento com colchicina nos pacientes com COVID-19 e da associação do sCD163 com quadros hiperinflamatórios de COVID-19, buscamos avaliar se os níveis séricos de sCD163 poderiam prever quais pacientes de COVID-19 iriam se beneficiar do tratamento com colchicina. Para isso, dosamos os níveis séricos de sCD163 na admissão e ao longo do tempo de hospitalização de uma segunda coorte composta por 103 pacientes de COVID-19 que participaram do ensaio clínico RBR-8jyhxh. Esses participantes do ensaio clínico receberam, além do tratamento padrão vigente para COVID-19, colchicina ou do placebo.



**Figura 7. Os níveis séricos de sCD163 na coorte 2 são afetados pelo tratamento com colchicina.** Estratificação dos níveis séricos de sCD163 em pacientes de COVID-19 da coorte 2 de acordo com o sexo (A) e com a idade (B). Correlação dos níveis séricos de sCD163 com dia sintomático na admissão hospitalar (C). Estratificação dos níveis séricos de sCD163 em pacientes de COVID-19 da coorte 2 de acordo com o acúmulo de comorbidades (D). Correlação dos níveis séricos de sCD163 com índice de massa corporal (BMI) (E). Estratificação dos níveis séricos de sCD163 em pacientes de COVID-19 da coorte 2 de acordo com tratamento com colchicina (F). Avaliação longitudinal dos níveis séricos de sCD163 no dia de admissão hospitalar (D0) e no terceiro dia de tratamento (D3) em pacientes de COVID-19 tratados com placebo (G) ou colchicina (H). (A, B, D e F) Dados referentes a dosagem de sCD163 por ELISA e estão expressos em boxplot com valores de mediana e intervalos interquartis. (D e F) Dados referentes ao dia sintomático na admissão hospitalar e ao BMI no eixo y, respectivamente, e à dosagem por ELISA dos níveis séricos de sCD163 em log<sub>10</sub> no eixo x apresentados como pontos individuais no plano cartesiano da correlação, reta da regressão linear e área do intervalo de confiança de 95%, sendo indicados os valores de R (coeficiente de regressão linear) e de p. (G-H) Dados referentes à quantificação por ELISA dos níveis de sCD163 em D0 e D3; cada par de pontos representa um paciente. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

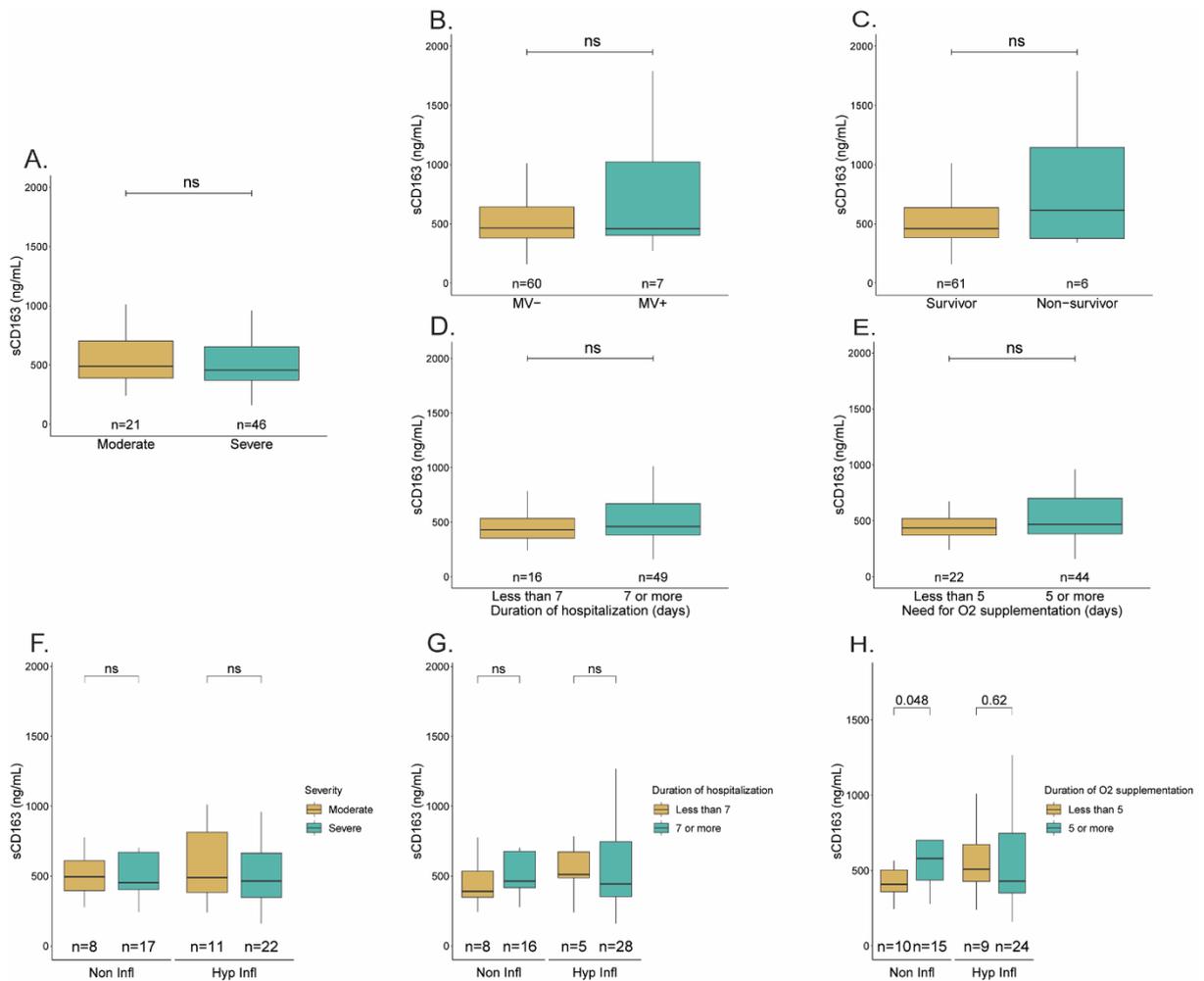
Inicialmente, realizamos uma caracterização geral da coorte 2 para avaliar se haveria algum efeito dos fatores epidemiológicos associados ao maior risco de gravidade em COVID-19 nos níveis de sCD163. Observamos que não havia diferença

nos níveis de sCD163 no dia da admissão hospitalar dependentes do sexo (**fig. 7A**), da idade avançada dos pacientes (**fig. 7B**) ou do dia sintomático da doença (**fig. 7C**). No entanto, observamos que os níveis de sCD163 estavam aumentados nos pacientes que apresentam 2 ou mais comorbidades, em relação aos que apresentam até uma comorbidade (**fig. 7D**). Visto que a obesidade está associada ao maior risco de gravidade em COVID-19, avaliamos então a associação entre o índice de massa corporal (BMI) dos pacientes e os níveis séricos de sCD163. A partir dessa análise, observamos que existe uma correlação positiva significativa entre BMI e sCD163 (**fig. 7E**), sugerindo que os pacientes obesos apresentam maiores níveis de sCD163.

Seguindo na caracterização da coorte, avaliamos se o tratamento de colchicina influencia os níveis de sCD163. Para isso, checamos os níveis séricos de sCD163 no dia da admissão hospitalar, ou seja, antes de iniciar os tratamentos dos grupos que seriam tratados com colchicina em relação aos que seriam tratados com placebo. Observamos que não houve diferença significativa entre esses dois grupos (**fig. 7F**). A partir dessa análise, avaliamos então os níveis de sCD163 após 3 dias de administração dos respectivos tratamentos. Observamos, nesse caso, que os pacientes tratados com colchicina apresentaram aumento nos níveis séricos de sCD163 no terceiro dia de tratamento, o que não aconteceu nos que foram tratados com placebo (**fig. 7G**). Os dados apresentados sugerem que os níveis de sCD163 na coorte 2 são influenciados pelas comorbidades dos pacientes e indicam que o tratamento com colchicina afeta os níveis de sCD163.

Uma vez que nossos achados indicaram que sCD163 pode atuar como indicador de gravidade associada à hiperinflamação em COVID-19, avaliamos se os níveis séricos de sCD163 predizem quais pacientes tratados com colchicina evoluiriam para melhor prognóstico. Para isso, checamos os níveis de sCD163 no dia de admissão hospitalar dos pacientes tratados com colchicina e os estratificamos a partir dos seguintes parâmetros: gravidade, necessidade de ventilação mecânica, sobrevida, duração total da hospitalização e duração total da suplementação de oxigênio. Observamos que os níveis séricos de sCD163 não foram capazes de prever os pacientes tratados com colchicina que evoluiriam para graves (**fig. 8A**), que precisariam de ventilação mecânica (**fig. 8B**), que iriam à óbito (**fig. 8C**), que ficaram hospitalizados por 7 dias ou mais (**fig. 8D**) e que necessitariam de suplementação de oxigênio por 5 dias ou mais (**fig. 8E**).

Visto a heterogeneidade dos pacientes quanto ao grau de inflamação, avaliamos se os níveis de sCD163 seriam capazes de realizar predições de responsividade nos pacientes hiperinflamados. No entanto, de forma similar, observamos que os níveis de sCD163 não foram capazes de predizer os pacientes hiperinflamados que iriam evoluir para grave (**fig. 8F**), que ficaram hospitalizados por 7 dias ou mais (**fig. 8G**) e que necessitariam de suplementação de oxigênio por 5 dias ou mais (**fig. 8H**). Curiosamente, observamos um aumento nos níveis de sCD163 nos pacientes não hiperinflamados que necessitariam de mais de 5 dias de suplementação de oxigênio (**fig. 8H**). Os resultados apresentados sugerem que sCD163 não atua como biomarcador preditivo de evolução para melhor prognóstico de pacientes tratados com colchicina.

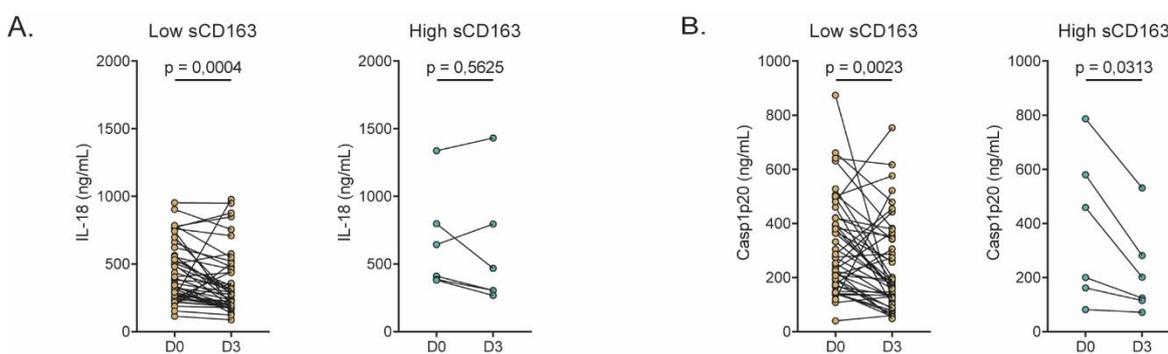


**Figura 8. Os níveis séricos de sCD163 na admissão hospitalar não predizem a resposta ao tratamento com colchicina.** Estratificação dos níveis séricos de sCD163 no dia da admissão hospitalar em pacientes de COVID-19 da coorte 2 que foram tratados com colchicina de acordo com gravidade (A), necessidade de ventilação mecânica (B), sobrevivência (C), duração total da hospitalização (D), duração total da suplementação de oxigênio (E), e grau de hiperinflamação por gravidade (F), duração total da hospitalização (G) e duração total da suplementação de oxigênio (H). Dados referentes à dosagem de sCD163 por ELISA e estão expressos em boxplot com valores de mediana e intervalos interquartis. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

De forma importante, o tratamento com colchicina por 3 dias foi capaz de reduzir os níveis séricos de IL-18 e Casp1p20 em pacientes de COVID-19 dessa mesma coorte (AMARAL et al., 2023 [dados não publicados]). Visto a relevância desses substratos da ativação do inflamassoma de NLRP3 na gravidade de COVID-19 e a correlação de sCD163 e IL-18 em pacientes hiperinflamados (fig. 6H), avaliamos se

os níveis de sCD163 no momento da admissão hospitalar seriam capazes de indicar em quais pacientes o tratamento de colchicina reduziria os níveis séricos de IL-18.

Realizamos uma estratificação prévia dos pacientes em dois grupos com base nos níveis de sCD163 a partir do valor de *cutoff* gerado na análise da curva ROC de gravidade (**fig. 5A**). Dessa forma, os pacientes que apresentavam níveis de sCD163 inferiores a 762,0 ng/mL foram designados como “*Low sCD163*”, enquanto os que apresentam níveis acima desse valor foram designados como “*High sCD163*”. Nessa análise, os pacientes com baixos níveis de sCD163 apresentaram redução dos níveis de IL-18 após 3 dias de tratamento com colchicina (**fig. 9A**). No entanto, nos pacientes com altos níveis de sCD163 não houve redução dos níveis séricos de IL-18 em resposta ao tratamento com colchicina (**fig. 9A**). Também avaliamos se sCD163 seria capaz de prever a redução dos níveis de Casp1p20 em resposta ao tratamento com colchicina. Concordando com os resultados demonstrados na **fig. 6A**, a redução dos níveis de Casp1p20 ocorre tanto nos pacientes com altos níveis de sCD163 como nos de baixos níveis (**fig. 9B**). Portanto, os dados sugerem que os níveis de sCD163 podem indicar quais pacientes apresentarão redução de IL-18 mediante tratamento com colchicina.



**Figura 9. A redução dos níveis de IL-18 após tratamento com colchicina pode ser predito pelos níveis sCD163.** Avaliação longitudinal dos níveis séricos de IL-18 (A) e Casp1p20 (B) no D0 e no D3 em pacientes de COVID-19 tratados com colchicina estratificados por baixos níveis de sCD163 (*Low sCD163*) ou altos níveis de sCD163 (*High sCD163*). Dados referentes à quantificação por ELISA dos níveis de IL-18 e Casp1p20 em D0 e D3; cada par de pontos representa um paciente. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

# ***Discussão***

### 13 DISCUSSÃO

O caráter inflamatório das manifestações graves da COVID-19 tem sido extensivamente descrito. Nesse contexto, se destaca a disfunção imune associada a desregulações no complexo mieloide que contribui para o quadro hiperinflamatório observado (GUSTINE; JONES, 2021; LAMERS; HAAGMANS, 2022; MERAD; MARTIN, 2020; SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020; SILVIN et al., 2020). Em síndromes hiperinflamatórias associadas à ativação exacerbada de macrófagos e monócitos, são observados altos níveis de sCD163 que se associam com a gravidade da patologia. Dessa forma, sCD163 tem sido proposto como um biomarcador associado a gravidade em que há hiperativação de macrófagos e monócitos, inclusive em contextos de infecções virais (AB-RAHMAN et al., 2016; COLAFRANCESCO et al., 2014; KNUDSEN et al., 2016; MCELROY et al., 2019).

Nosso estudo demonstrou que o sCD163 pode atuar como biomarcador prognóstico da gravidade em COVID-19. De forma importante, nossos resultados apontam que sCD163 é capaz de discriminar dentre os pacientes hiperinflamatórios aqueles com pior prognóstico clínico.. Especificamente, nossos dados sugerem que os níveis de sCD163 são capazes de diferenciar os pacientes não-sobreviventes dos sobreviventes, apontando que sCD163 é potencialmente um biomarcador prognóstico para discriminar pacientes em que a gravidade está associada à desregulação da resposta imune inata.

Alguns estudos recentes também descreveram um aumento nos níveis de sCD163 em pacientes de COVID-19 (CHOREÑO-PARRA et al., 2021; GÓMEZ-RIAL et al., 2020; MOSTAFA et al., 2022). Além disso, já há evidência corroborando que os níveis séricos de sCD163 são diretamente associados à gravidade da doença ((ABERS et al., 2021; CARDELLI et al., 2022; HARA et al., 2022a, 2022b; MAROCCO et al., 2022; NALBANT et al., 2022; RAJAMANICKAM et al., 2021; ZINGAROPOLI et al., 2021). No entanto, o nosso estudo foi o primeiro a apresentar em uma grande coorte de pacientes a capacidade do sCD163 de distinguir os pacientes hiperinflamados, e ainda diferenciar - dentre esse subgrupo - aqueles que evoluíram à óbito.

Além disso, corroborando com sua associação à inflamação exacerbada, nós encontramos uma correlação significativa entre sCD163 com os níveis séricos de IL-6 e LDH, marcadores inflamatórios também associadas à gravidade de COVID-19 (CHEN et al., 2020; MCGONAGLE et al., 2020; RODRIGUES et al., 2021). Adicionalmente, observamos associação de sCD163 com IL-6 e IL-18 especificamente nos pacientes hiperinflamados. A correlação de sCD163 com marcadores laboratoriais associados à inflamação já foi observada em outras síndromes hiperinflamatórias (COLAFRANCESCO et al., 2014). De forma similar, outros estudos já apontavam a correlação de sCD163 com IL-6 (ZINGAROPOLI et al., 2021) e com LDH (HARA et al., 2022). Um estudo prévio apontou a ausência de correlação dos níveis séricos de sCD163 com IL-18 para os pacientes de COVID-19 (VOLFOVITCH et al., 2022). Porém esses estudos não se aprofundaram na caracterização da hiperinflamação nos pacientes de COVID-19, reforçando o caráter inédito do nosso estudo. Esses dados reforçam a relevância do contexto imune na caracterização dos pacientes de COVID-19 e que a hiperinflamação e biomarcadores a ela associados devem ser levados em conta na definição das estratégias terapêuticas.

Uma maior proporção de monócitos CD163+ é encontrada em síndromes hiperinflamatórias (CUI et al., 2019). Nós e outros observamos que os pacientes de COVID-19 apresentam esse aumento da expressão de CD163 em monócitos (TROMBETTA et al., 2021). Análises de single-cell RNA-seq sugerem um perfil disfuncional nos monócitos CD163+ circulantes de pacientes com COVID-19 (SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020). De forma importante, estudos mais recentes têm proposto que o acúmulo de macrófagos derivados de monócitos com alta expressão de CD163 adquirem um fenótipo profibrótico em quadros de SDRA em COVID-19 (WENDISCH et al., 2021). Essas evidências são corroboradas *in vitro* em modelo de infecção de monócitos com SARS-CoV-2 e indução de um programa genético profibrótico nessas células (WENDISCH et al., 2021).

Outro achado associado à disfunção da imunidade inata em síndromes hiperinflamatórias é a presença de hemofagocitose na medula óssea (GUSTINE; JONES, 2021). Estudos recentes identificaram a ocorrência desse evento histológico na medula óssea de pacientes de COVID-19 (BRYCE et al., 2021). Em estudo prévio do nosso grupo, observamos que os pacientes de COVID-19 com altos níveis de CD163 na superfície dos monócitos também apresentavam esse achado clínico

(FORTES-ROCHA, 2020), o que corrobora com a proposição de disfunção do compartimento mieloide em pacientes graves de COVID-19 apresentada na literatura.

No nosso estudo, além de avaliar o potencial prognóstico de gravidade de sCD163 para pacientes com COVID-19, também caracterizamos se sCD163 é um potencial marcador preditivo da resposta a tratamentos voltados para a modulação da resposta imune. Especificamente, avaliamos a associação dos níveis de sCD163 à resposta ao tratamento com colchicina, um modulador da ativação de inflamassoma, como parte de um ensaio clínico randomizado conduzido pelo HC-FMRP (LOPES et al., 2021). Nossos dados sugerem que sCD163 não é capaz de prever a resposta dos pacientes tratados com colchicina, independente do seu grau de hiperinflamação.

No entanto, observamos que os níveis séricos de sCD163 puderam discriminar os pacientes em que a administração de colchicina afetou os níveis séricos de IL-18, citocina secretada dependente de inflamassoma. Os pacientes com altos níveis de sCD163 não apresentaram redução nos níveis de IL-18 após tratamento com colchicina, sugerindo que sCD163 possa indicar os pacientes em que potencialmente o tratamento com colchicina conseguirá reduzir a ativação exacerbada do inflamassoma. Diversos trabalhos já apontavam a relevância do inflamassoma no contexto de COVID-19 (PAN et al., 2021; RODRIGUES et al., 2021; SEFIK et al., 2022) e o caráter promissor dos tratamentos que modulam o inflamassoma nesses pacientes (LOPES et al., 2021; POTERE et al., 2022).

Por fim, nosso trabalho vai ao encontro de estudos prévios que apontam o potencial de sCD163 como biomarcador preditivo em outras infecções virais (LI et al., 2023). Nesse contexto, os níveis séricos de sCD163 já foram associados à gravidade de outras doenças em que há ativação do inflamassoma (SILVA et al., 2017; ZAMBONI; SACKS, 2019). No caso da COVID-19, o potencial preditivo de sCD163 foi previamente testado no contexto da resposta de pacientes ao tocilizumab, um anticorpo monoclonal que inibe o receptor de IL-6. Similar ao apresentado em nosso estudo, também já foi observado que tratamento de pacientes de COVID-19 com outro imunomodular, o tocilizumab, afetou os níveis de sCD163 mas não foi capaz de diferenciar os pacientes responsivos dos não-responsivos ao tratamento, utilizando-se critérios clínicos como desfecho (MAROCCO et al., 2022). Algumas questões permanecem em aberto: como os níveis de sCD163 se comportam com relação a

outras variantes de SARS-CoV-2? Existe diferença em indivíduos imunizados que ainda apresentaram sintomas graves? Será que os níveis de sCD163 são capazes de identificar os pacientes que irão apresentar “COVID longa”?

Algumas limitações do nosso estudo estão associadas ao baixo número de pacientes hiperinflamados em algumas associações, o que limita às nossas conclusões. Apesar de termos avaliado a associação entre o dia sintomático da doença e os níveis de sCD163, não conseguimos avaliar o sCD163 longitudinalmente. Essa observação é importante, uma vez que podem existir variações a depender da gravidade desses pacientes. ao longo ao caráter associativo das relações observadas entre o sCD163 e os demais marcadores. Além disso, as análises estatísticas foram relação foram feitas por pareamentos 2 a 2 em sua maioria. Dessa maneira, não foi possível levar em consideração variáveis de confusão envolvidas na caracterização dos pacientes e isso limita parcialmente a evidência das análises propostas.

# ***Conclusão***

## **14 CONCLUSÃO**

Coletivamente, os dados apresentados demonstram que o sCD163 pode funcionar como um biomarcador prognóstico associado a gravidade de COVID-19 e sugere que seja capaz de discriminar os pacientes hiperinflamados de COVID-19 com maior risco de mortalidade. No entanto, os níveis séricos de sCD163 não foram capazes de prever os pacientes de COVID-19 tratados com colchicina. Por outro lado, nossos dados sugerem que o sCD163 pode prever a redução dos níveis de IL-18 após tratamento com colchicina.

# ***Referências***

## 15 REFERÊNCIAS

ABERS, Michael S. et al. An immune-based biomarker signature is associated with mortality in COVID-19 patients. **JCI Insight**, [S. l.], v. 6, n. 1, 2021. DOI: 10.1172/jci.insight.144455.

AB-RAHMAN, Hasliana Azrah; RAHIM, Hafiz; ABUBAKAR, Sazaly; WONG, Pooi-Fong. Macrophage Activation Syndrome-Associated Markers in Severe Dengue. **International Journal of Medical Sciences**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 179–186, 2016. DOI: 10.7150/ijms.13680.

BALLMAN, Karla V. Biomarker: Predictive or Prognostic? **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 33, n. 33, p. 3968–3971, 2015. DOI: 10.1200/JCO.2015.63.3651.

BLEESING, Jack et al. The diagnostic significance of soluble CD163 and soluble interleukin-2 receptor  $\alpha$ -chain in macrophage activation syndrome and untreated new-onset systemic juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, [S. l.], v. 56, n. 3, p. 965–971, 2007. DOI: 10.1002/art.22416.

BROZ, Petr; DIXIT, Vishva M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 16, n. 7, p. 407–420, 2016. DOI: 10.1038/nri.2016.58.

BRYCE, Clare et al. Pathophysiology of SARS-CoV-2: the Mount Sinai COVID-19 autopsy experience. **Modern Pathology**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 1456–1467, 2021. DOI: 10.1038/s41379-021-00793-y.

BUECHLER, C.; RITTER, M.; ORSÓ, E.; LANGMANN, T.; KLUCKEN, J.; SCHMITZ, G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. **Journal of leukocyte biology**, [S. l.], v. 67, n. 1, p. 97–103, 2000.

CALIFF, Robert M. Biomarker definitions and their applications. **Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 243, n. 3, p. 213–221, 2018. DOI: 10.1177/1535370217750088.

CARDELLI, M. et al. Biomarkers of cell damage, neutrophil and macrophage activation associated with in-hospital mortality in geriatric COVID-19 patients. **Immunity & Ageing**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 65, 2022. DOI: 10.1186/s12979-022-00315-7.

CHAUVIN, Pierre; MORZADEC, Claudie; DE LATOUR, Bertrand; LLAMAS-GUTIERREZ, Francisco; LUQUE-PAZ, David; JOUNEAU, Stéphane; VERNHET, Laurent. Soluble CD163 is produced by monocyte-derived and alveolar macrophages, and is not associated with the severity of idiopathic pulmonary fibrosis. **Innate Immunity**, [S. l.], v. 28, n. 3–4, p. 138–151, 2022. DOI: 10.1177/17534259221097835.

CHEN, Guang et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 130, n. 5, p. 2620–2629, 2020. DOI: 10.1172/JCI137244.

CHEN, Steven T. et al. A shift in lung macrophage composition is associated with COVID-19 severity and recovery. **Science Translational Medicine**, [S. l.], v. 14, n. 662, 2022. DOI: 10.1126/scitranslmed.abn5168.

CHOREÑO-PARRA, José Alberto et al. Clinical and Immunological Factors That Distinguish COVID-19 From Pandemic Influenza A(H1N1). **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.593595.

COLAFRANCESCO, S.; PRIORI, R.; ALESSANDRI, C.; ASTORRI, E.; PERRICONE, C.; BLANK, M.; AGMON-LEVIN, N.; SHOENFELD, Y.; VALESINI, G. sCD163 in AOSD: a biomarker for macrophage activation related to hyperferritinemia. **Immunologic Research**, [S. l.], v. 60, n. 2–3, p. 177–183, 2014. DOI: 10.1007/s12026-014-8563-7.

CORMAN, Victor M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, [S. l.], v. 25, n. 3, 2020. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.

CRAYNE, Courtney B.; ALBEITUNI, Sabrin; NICHOLS, Kim E.; CRON, Randy Q. The Immunology of Macrophage Activation Syndrome. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 10, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00119.

CUI, Yun; XIONG, Xi; REN, Yuqian; WANG, Fei; WANG, Chunxia; ZHANG, Yucai. CD163 as a valuable diagnostic and prognostic biomarker of sepsis-associated

hemophagocytic lymphohistiocytosis in critically ill children. **Pediatric Blood & Cancer**, [S. l.], v. 66, n. 10, p. e27909, 2019. DOI: 10.1002/pbc.27909.

DE SOUZA, William Marciel et al. Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. **Nature Human Behaviour**, [S. l.], v. 4, n. 8, p. 856–865, 2020. DOI: 10.1038/s41562-020-0928-4.

DEL VALLE, Diane Marie et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 26, n. 10, p. 1636–1643, 2020. DOI: 10.1038/s41591-020-1051-9.

ETZERODT, Anders; MANIECKI, Maciej Bogdan; MØLLER, Kirsten; MØLLER, Holger Jon; MOESTRUP, Søren Kragh. Tumor necrosis factor  $\alpha$ -converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 88, n. 6, p. 1201–1205, 2010. DOI: 10.1189/jlb.0410235.

ETZERODT, Anders; MOESTRUP, Søren K. CD163 and Inflammation: Biological, Diagnostic, and Therapeutic Aspects. **Antioxidants & Redox Signaling**, [S. l.], v. 18, n. 17, p. 2352–2363, 2013. DOI: 10.1089/ars.2012.4834.

ETZERODT, Anders; RASMUSSEN, Mie Rostved; SVENDSEN, Pia; CHALARIS, Athena; SCHWARZ, Jeanette; GALEA, Ian; MØLLER, Holger Jon; MOESTRUP, Søren Kragh. Structural Basis for Inflammation-driven Shedding of CD163 Ectodomain and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 289, n. 2, p. 778–788, 2014. DOI: 10.1074/jbc.M113.520213.

FORTES-ROCHA, Marlon. **Caracterização e avaliação do potencial de sCD163 como biomarcador de gravidade na infecção por SARS-CoV-2**. 2020. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

FRINGS, Werner; DREIER, Jens; SORG, Clemens. Only the soluble form of the scavenger receptor CD163 acts inhibitory on phorbol ester-activated T-lymphocytes, whereas membrane-bound protein has no effect. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 526, n. 1–3, p. 93–96, 2002. DOI: 10.1016/S0014-5793(02)03142-3.

GÓMEZ-RIAL, Jose et al. Increased Serum Levels of sCD14 and sCD163 Indicate a Preponderant Role for Monocytes in COVID-19 Immunopathology. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 11, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.560381.

GROM, Alexei A.; HORNE, AnnaCarin; DE BENEDETTI, Fabrizio. Macrophage activation syndrome in the era of biologic therapy. **Nature Reviews Rheumatology**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 259–268, 2016. DOI: 10.1038/nrrheum.2015.179.

GUO, Chuang et al. Single-cell analysis of two severe COVID-19 patients reveals a monocyte-associated and tocilizumab-responding cytokine storm. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 3924, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-17834-w.

GUSTINE, Joshua N.; JONES, Dennis. Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. **The American Journal of Pathology**, [S. l.], v. 191, n. 1, p. 4–17, 2021. DOI: 10.1016/j.ajpath.2020.08.009.

HARA, Yu; TSUKIJI, Jun; YABE, Aya; ONISHI, Yoshika; HIROSE, Haruka; YAMAMOTO, Masaki; KUDO, Makoto; KANEKO, Takeshi; EBINA, Toshiaki. Heme oxygenase-1 as an important predictor of the severity of COVID-19. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 17, n. 8, p. e0273500, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0273500.

HASAN, Djo; SHONO, Atsuko; VAN KALKEN, Coenraad K.; VAN DER SPEK, Peter J.; KRENNING, Eric P.; KOTANI, Toru. A novel definition and treatment of hyperinflammation in COVID-19 based on purinergic signalling. **Purinergic Signalling**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 13–59, 2022. DOI: 10.1007/s11302-021-09814-6.

HINTZ, Katharine A. et al. Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 72, n. 4, p. 711–717, 2002. DOI: 10.1189/jlb.72.4.711.

HÖGGER, Petra; ERPENSTEIN, Uta; ROHDEWALD, Peter; SORG, Clemens. Biochemical characterization of a glucocorticoid-induced membrane protein (RM3/1) in human monocytes and its application as model system for ranking glucocorticoid potency. **Pharmaceutical Research**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 296–302, 1998. DOI: 10.1023/A:1011931021743.

HÖGGER, Petra; SORG, Clemens. Soluble CD163 Inhibits Phorbol Ester-Induced Lymphocyte Proliferation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 288, n. 4, p. 841–843, 2001. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5845.

KAZANKOV, Konstantin et al. The macrophage activation marker sCD163 is associated with morphological disease stages in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Liver International**, [S. l.], v. 36, n. 10, p. 1549–1557, 2016. DOI: 10.1111/liv.13150.

KAZANKOV, Konstantin; BARRERA, Francisco; MØLLER, Holger Jon; BIBBY, Bo Martin; VILSTRUP, Hendrik; GEORGE, Jacob; GRØNBAEK, Henning. Soluble CD163, a macrophage activation marker, is independently associated with fibrosis in patients with chronic viral hepatitis B and C. **Hepatology**, [S. l.], v. 60, n. 2, p. 521–530, 2014. DOI: 10.1002/hep.27129.

KELLER, Marla J.; KITSIS, Elizabeth A.; ARORA, Shitij; CHEN, Jen-Ting; AGARWAL, Shivani; ROSS, Michael J.; TOMER, Yaron; SOUTHERN, William. Effect of Systemic Glucocorticoids on Mortality or Mechanical Ventilation in Patients With COVID-19. **Journal of Hospital Medicine**, [S. l.], v. 15, n. 8, p. 489–493, 2020. DOI: 10.12788/jhm.3497.

KESSEL, Christoph et al. Definition and validation of serum biomarkers for optimal differentiation of hyperferritinaemic cytokine storm conditions in children: a retrospective cohort study. **The Lancet Rheumatology**, [S. l.], v. 3, n. 8, p. e563–e573, 2021. DOI: 10.1016/S2665-9913(21)00115-6.

KJÆRGAARD, Anders G.; RØDGAARD-HANSEN, Sidsel; DIGE, Anders; KROG, Jan; MØLLER, Holger J.; TØNNESEN, Else. Monocyte Expression and Soluble Levels of the Haemoglobin Receptor (CD163/sCD163) and the Mannose Receptor (MR/sMR) in Septic and Critically Ill Non-Septic ICU Patients. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. e92331, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0092331.

KNEIDL, Jessica; LÖFFLER, Bettina; ERAT, Michele C.; KALINKA, Julia; PETERS, Georg; ROTH, Johannes; BARCZYK, Katarzyna. Soluble CD163 promotes recognition, phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* via binding of specific

fibronectin peptides. **Cellular Microbiology**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 914–936, 2012. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2012.01766.x.

KNOLL, Rainer; SCHULTZE, Joachim L.; SCHULTE-SCHREPPING, Jonas. Monocytes and Macrophages in COVID-19. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.720109.

KNUDSEN, Troels Bygum; ERTNER, Gideon; PETERSEN, Janne; MØLLER, Holger Jon; MOESTRUP, Søren K.; EUGEN-OLSEN, Jesper; KRONBORG, Gitte; BENFIELD, Thomas. Plasma Soluble CD163 Level Independently Predicts All-Cause Mortality in HIV-1–Infected Individuals. **Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 214, n. 8, p. 1198–1204, 2016. DOI: 10.1093/infdis/jiw263.

KOWAL, Krzysztof; SILVER, Richard; SŁAWIŃSKA, Emila; BIELECKI, Marek; CHYCZEWSKI, Lech; KOWAL-BIELECKA, Otylia. CD163 and its role in inflammation. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 365–374, 2011. DOI: 10.5603/FHC.2011.0052.

KRISTIANSEN, Mette; GRAVERSEN, Jonas H.; JACOBSEN, Christian; SONNE, Ole; HOFFMAN, Hans-Jürgen; LAW, S. K. Alex; MOESTRUP, Søren K. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. **Nature**, [S. l.], v. 409, n. 6817, p. 198–201, 2001. DOI: 10.1038/35051594.

KYRIAZOPOULOU, Evdoxia et al. An open label trial of anakinra to prevent respiratory failure in COVID-19. **eLife**, [S. l.], v. 10, 2021. DOI: 10.7554/eLife.66125.

LAMERS, Mart M.; HAAGMANS, Bart L. SARS-CoV-2 pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 270–284, 2022. DOI: 10.1038/s41579-022-00713-0.

LERKVALEEKUL, Butsabong; VILAIYUK, Soamarat. Macrophage activation syndrome: early diagnosis is key. **Open Access Rheumatology: Research and Reviews**, [S. l.], v. Volume 10, p. 117–128, 2018. DOI: 10.2147/OARRR.S151013.

LI, Liya et al. Characteristics and clinical significance of plasma IL-18, sCD14, and sCD163 levels in patients with HIV-1 infection. **Journal of Medical Virology**, [S. l.], v. 95, n. 1, 2023. DOI: 10.1002/jmv.28223.

LI, Qing et al. Immune response in COVID-19: what is next? **Cell Death & Differentiation**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 1107–1122, 2022. DOI: 10.1038/s41418-022-01015-x.

LOPES, Maria Isabel et al. Beneficial effects of colchicine for moderate to severe COVID-19: a randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. **RMD Open**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. e001455, 2021. DOI: 10.1136/rmdopen-2020-001455.

LUCAS, Carolina et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**, [S. l.], v. 584, n. 7821, p. 463–469, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2588-y.

MANSON, Jessica J. et al. COVID-19-associated hyperinflammation and escalation of patient care: a retrospective longitudinal cohort study. **The Lancet Rheumatology**, [S. l.], v. 2, n. 10, p. e594–e602, 2020. DOI: 10.1016/S2665-9913(20)30275-7.

MAROCCO, Raffaella et al. Role of Tocilizumab in Down Regulating sCD163 Plasmatic Levels in a Cohort of COVID-19 Patients. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 13, 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.871592.

MARSH, Rebecca A. Epstein–Barr Virus and Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 8, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01902.

MARTINEZ, Fernando O.; COMBES, Theo W.; ORSENIGO, Federica; GORDON, Siamon. Monocyte activation in systemic Covid-19 infection: Assay and rationale. **eBioMedicine**, [S. l.], v. 59, p. 102964, 2020. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.102964.

MCELROY, Anita K. et al. Macrophage Activation Marker Soluble CD163 Associated with Fatal and Severe Ebola Virus Disease in Humans<sup>1</sup>. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 290–298, 2019. DOI: 10.3201/eid2502.181326.

MCGONAGLE, Dennis; SHARIF, Kassem; O'REGAN, Anthony; BRIDGEWOOD, Charlie. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. **Autoimmunity Reviews**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 102537, 2020. DOI: 10.1016/j.autrev.2020.102537.

MEHTA, Om Prakash; BHANDARI, Parshal; RAUT, Akshay; KACIMI, Salah Eddine Oussama; HUY, Nguyen Tien. Coronavirus Disease (COVID-19): Comprehensive

Review of Clinical Presentation. **Frontiers in Public Health**, [S. l.], v. 8, 2021. DOI: 10.3389/fpubh.2020.582932.

MEIDANINIKJEH, Sepideh; SABOUNI, Nasim; MARZOUNI, Hadi Zare; BENGAR, Sajad; KHALILI, Ahmad; JAFARI, Reza. Monocytes and macrophages in COVID-19: Friends and foes. **Life Sciences**, [S. l.], v. 269, p. 119010, 2021. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.119010.

MERAD, Miriam; MARTIN, Jerome C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 355–362, 2020. DOI: 10.1038/s41577-020-0331-4.

MØLLER, Holger Jon; MOESTRUP, Søren K.; WEIS, Nina; WEJSE, Christian; NIELSEN, Henrik; PEDERSEN, Svend Stenvang; ATTERMANN, Jørn; NEXØ, Ebba; KRONBORG, Gitte. Macrophage serum markers in pneumococcal bacteremia: Prediction of survival by soluble CD163\*. **Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 34, n. 10, p. 2561–2566, 2006. DOI: 10.1097/01.CCM.0000239120.32490.AB.

MØLLER, Holger Jon; NIELSEN, Marianne Jensby; MANIECKI, Maciej Bogdan; MADSEN, Mette; MOESTRUP, Søren Kragh. Soluble macrophage-derived CD163: A homogenous ectodomain protein with a dissociable haptoglobin–hemoglobin binding. **Immunobiology**, [S. l.], v. 215, n. 5, p. 406–412, 2010. DOI: 10.1016/j.imbio.2009.05.003.

MORRIS, Gerwyn et al. The cytokine storms of COVID-19, H1N1 influenza, CRS and MAS compared. Can one sized treatment fit all? **Cytokine**, [S. l.], v. 144, p. 155593, 2021. DOI: 10.1016/j.cyto.2021.155593.

MOSTAFA, Gehan Ahmed; IBRAHIM, Hanan Mohamed; AL SAYED SHEHAB, Abeer; GENDY, Yasmin Gamal El; ALY, Dina Medhat Mohamed; SHOUSHA, Ghada Abdel Haleem. Up-regulated serum levels of soluble CD25 and soluble CD163 in pediatric patients with SARS-CoV-2. **European Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 181, n. 6, p. 2299–2309, 2022. DOI: 10.1007/s00431-022-04398-8.

NALBANT, Ahmet; KAYA, Tezcan; YAYLACI, Selçuk; ÇEKİÇ, Deniz; SÜNER, Kezban; KARACAER, Cengiz; ÇOKLUK, Erdem; BILGIN, Cahit. Prognostic Significance of Soluble CD163 in Hospitalized Patients with COVID-19. **Bakirkoy Tip Dergisi /**

**Medical Journal of Bakirkoy**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 297–302, 2022. DOI: 10.4274/BMJ.galenos.2022.2022.2-5.

NIELSEN, Marlene Christina; HVIDBJERG GANTZEL, Rasmus; CLÀRIA, Joan; TREBICKA, Jonel; MØLLER, Holger Jon; GRØNBÆK, Henning. Macrophage Activation Markers, CD163 and CD206, in Acute-on-Chronic Liver Failure. **Cells**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 1175, 2020. DOI: 10.3390/cells9051175.

O'DRISCOLL, Megan; RIBEIRO DOS SANTOS, Gabriel; WANG, Lin; CUMMINGS, Derek A. T.; AZMAN, Andrew S.; PAIREAU, Juliette; FONTANET, Arnaud; CAUCHEMEZ, Simon; SALJE, Henrik. Age-specific mortality and immunity patterns of SARS-CoV-2. **Nature**, [S. l.], v. 590, n. 7844, p. 140–145, 2021. DOI: 10.1038/s41586-020-2918-0.

PAN, Pan et al. SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. **Nature Communications**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 4664, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-25015-6.

PORCHERAY, Fabrice; SAMAH, Boubekeur; LÉONE, Cathie; DEREUDDRE-BOSQUET, Nathalie; GRAS, Gabriel. Macrophage activation and human immunodeficiency virus infection: HIV replication directs macrophages towards a pro-inflammatory phenotype while previous activation modulates macrophage susceptibility to infection and viral production. **Virology**, [S. l.], v. 349, n. 1, p. 112–120, 2006. DOI: 10.1016/j.virol.2006.02.031.

POTERE, Nicola et al. Interleukin-1 and the NLRP3 inflammasome in COVID-19: Pathogenetic and therapeutic implications. **eBioMedicine**, [S. l.], v. 85, p. 104299, 2022. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.104299.

RAJAMANICKAM, Anuradha et al. Dynamic alterations in monocyte numbers, subset frequencies and activation markers in acute and convalescent COVID-19 individuals. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 20254, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-99705-y.

RAMOS-CASALS, Manuel; BRITO-ZERÓN, Pilar; LÓPEZ-GUILLERMO, Armando; KHAMASHTA, Munther A.; BOSCH, Xavier. Adult haemophagocytic syndrome. **The Lancet**, [S. l.], v. 383, n. 9927, p. 1503–1516, 2014. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61048-X.

RECOVERY, Colaborative Group. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 384, n. 8, p. 693–704, 2021. DOI: 10.1056/NEJMoa2021436.

REMAP-CAP, Investigators. Interleukin-6 Receptor Antagonists in Critically Ill Patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 384, n. 16, p. 1491–1502, 2021. DOI: 10.1056/NEJMoa2100433.

RODRIGUES, Tamara S. et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 218, n. 3, 2021. DOI: 10.1084/jem.20201707.

SALINA, Ana CG et al. Efferocytosis of SARS-CoV-2-infected dying cells impairs macrophage anti-inflammatory functions and clearance of apoptotic cells. **eLife**, [S. l.], v. 11, 2022. DOI: 10.7554/eLife.74443.

SCHAER, Dominik J.; BORETTI, Felicitas S.; SCHOEDON, Gabriele; SCHAFFNER, Andreas. Induction of the CD163-dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids. **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 119, n. 1, p. 239–243, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2002.03790.x.

SCHAER, Dominik J.; BORETTI, Felicitas S.; SCHOEDON, Gabriele; SCHAFFNER, Andreas. Induction of the CD163-dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids. **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 119, n. 1, p. 239–243, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2002.03790.x.

SCHAER, Dominik J.; SCHLEIFFENBAUM, Boris; KURRER, Michael; IMHOF, Alexander; BACHLI, Esther; FEHR, Jorg; MOLLER, Holger J.; MOESTRUP, Soren K.; SCHAFFNER, Andreas. Soluble hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163 as a lineage-specific marker in the reactive hemophagocytic syndrome. **European Journal of Haematology**, [S. l.], v. 74, n. 1, p. 6–10, 2005. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2004.00318.x.

SCHULTE-SCHREPPING, Jonas et al. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. **Cell**, [S. l.], v. 182, n. 6, p. 1419- 1440.e23, 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.001.

SEFIK, Esen et al. Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. **Nature**, [S. l.], v. 606, n. 7914, p. 585–593, 2022. DOI: 10.1038/s41586-022-04802-1.

SIDDIQI, Hasan K.; MEHRA, Mandeep R. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical–therapeutic staging proposal. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, [S. l.], v. 39, n. 5, p. 405–407, 2020. DOI: 10.1016/j.healun.2020.03.012.

SILVA, Ricardo Luís Louzada et al. sCD163 levels as a biomarker of disease severity in leprosy and visceral leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. e0005486, 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005486.

SILVIN, Aymeric et al. Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. **Cell**, [S. l.], v. 182, n. 6, p. 1401- 1418.e18, 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.002.

TIMMERMANN, Meike; BUCK, Friedrich; SORG, Clemens; HÖGGER, Petra. Interaction of soluble CD163 with activated T lymphocytes involves its association with non-muscle myosin heavy chain type A. **Immunology & Cell Biology**, [S. l.], v. 82, n. 5, p. 479–487, 2004. DOI: 10.1111/j.0818-9641.2004.01277.x.

TRAN, Viet-Thi et al. Corticosteroids in patients hospitalized for COVID-19 pneumonia who require oxygen: observational comparative study using routine care data. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 603–610, 2021. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.11.035.

TROMBETTA, Amelia C. et al. Severe COVID-19 Recovery Is Associated with Timely Acquisition of a Myeloid Cell Immune-Regulatory Phenotype. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.691725.

VANHOLLEBEKE, Benoit; DE MUYLDER, Géraldine; NIELSEN, Marianne J.; PAYS, Annette; TEBABI, Patricia; DIEU, Marc; RAES, Martine; MOESTRUP, Soren K.; PAYS, Etienne. A Haptoglobin-Hemoglobin Receptor Conveys Innate Immunity to *Trypanosoma brucei* in Humans. **Science**, [S. l.], v. 320, n. 5876, p. 677–681, 2008. DOI: 10.1126/science.1156296.

VERAS, Flavio Protasio et al. SARS-CoV-2–triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 217, n. 12, 2020. DOI: 10.1084/jem.20201129.

VOLFOVITCH, Yuval et al. The intercorrelations between blood levels of ferritin, sCD163, and IL-18 in COVID-19 patients and their association to prognosis. **Immunologic Research**, [S. l.], v. 70, n. 6, p. 817–828, 2022. DOI: 10.1007/s12026-022-09312-w.

WANG, Dawei et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, [S. l.], v. 323, n. 11, p. 1061, 2020. DOI: 10.1001/jama.2020.1585.

WEAVER, L. K.; HINTZ-GOLDSTEIN, K. A.; PIOLI, P. A.; WARDWELL, K.; QURESHI, N.; VOGEL, S. N.; GUYRE, P. M. Pivotal Advance: Activation of cell surface Toll-like receptors causes shedding of the hemoglobin scavenger receptor CD163. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 80, n. 1, p. 26–35, 2006. DOI: 10.1189/jlb.1205756.

WEAVER, Lehn K.; PIOLI, Patricia A.; WARDWELL, Kathleen; VOGEL, Stefanie N.; GUYRE, Paul M. Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 81, n. 3, p. 663–671, 2007. DOI: 10.1189/jlb.0706428.

WEBB, Brandon J. et al. Clinical criteria for COVID-19-associated hyperinflammatory syndrome: a cohort study. **The Lancet Rheumatology**, [S. l.], v. 2, n. 12, p. e754–e763, 2020. DOI: 10.1016/S2665-9913(20)30343-X.

WENDISCH, Daniel et al. SARS-CoV-2 infection triggers profibrotic macrophage responses and lung fibrosis. **Cell**, [S. l.], v. 184, n. 26, p. 6243–6261.e27, 2021. DOI: 10.1016/j.cell.2021.11.033.

WU, Mei-ying; YAO, Lin; WANG, Yi; ZHU, Xin-yun; WANG, Xia-fang; TANG, Pei-jun; CHEN, Cheng. Clinical evaluation of potential usefulness of serum lactate dehydrogenase (LDH) in 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia. **Respiratory Research**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 171, 2020. DOI: 10.1186/s12931-020-01427-8.

ZAMBONI, Dario S.; SACKS, David L. Inflammasomes and Leishmania: in good times or bad, in sickness or in health. **Current Opinion in Microbiology**, [S. l.], v. 52, p. 70–76, 2019. DOI: 10.1016/j.mib.2019.05.005.

ZINGAROPOLI, Maria Antonella et al. Increased sCD163 and sCD14 Plasmatic Levels and Depletion of Peripheral Blood Pro-Inflammatory Monocytes, Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells in Patients With Severe COVID-19 Pneumonia. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.627548.

ZUO, Yu et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. **JCI Insight**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1172/jci.insight.138999.

ZWADLO-KLARWASSER, Gabriele; BENT, Stefan; HAUBECK, Hans-Dieter; SORG, Clemens; SCHMUTZLER, Wolfgang. Glucocorticoid-Induced Appearance of the Macrophage Subtype RM 3/1 in Peripheral Blood of Man. **International Archives of Allergy and Immunology**, [S. l.], v. 91, n. 2, p. 175–180, 1990. DOI: 10.1159/000235111.