



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MAYARA TIEMI ENOKIDA MORI

**AVALIAÇÃO DAS VARIANTES DO GENE *IL 18* (rs360717 E  
rs187238) E DE BIOMARCADORES CLÍNICOS E  
LABORATORIAIS COMO PREDITORES DE GRAVIDADE E  
MORTALIDADE DA COVID-19**

---

Londrina  
2021

MAYARA TIEMI ENOKIDA MORI

**AVALIAÇÃO DAS VARIANTES DO GENE *IL18* (rs360717 E  
rs187238) E DE BIOMARCADORES CLÍNICOS E  
LABORATORIAIS COMO PREDITORES DE GRAVIDADE E  
MORTALIDADE DA COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Orientador: Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy

Londrina  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Mori, Mayara Tiemi Enokida .

Avaliação das variantes do gene IL18 (rs360717 e rs187238) e de biomarcadores clínicos e laboratoriais como preditores de gravidade e mortalidade da COVID-19 / Mayara Tiemi Enokida Mori. - Londrina, 2021.  
91 f. : il.

Orientador: Marcell Alysson Batisti Lozovoy.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2021.

Inclui bibliografia.

1. COVID-19 - Tese. 2. IL18 - Tese. 3. Biomarcadores - Tese. 4. Inflamação - Tese. I. Lozovoy, Marcell Alysson Batisti . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

CDU 577.27

MAYARA TIEMI ENOKIDA MORI

**AVALIAÇÃO DAS VARIANTES DO GENE *IL18* (rs360717 E  
rs187238) E DE BIOMARCADORES CLÍNICOS E  
LABORATORIAIS COMO PREDITORES DE GRAVIDADE E  
MORTALIDADE DA COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti  
Lozovoy  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Sayonara Rangel de Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 01 de setembro de 2021.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família, em especial meu marido Paulo, por todo o incentivo, companheirismo, e apoio ao longo dos meus estudos. Aos meus pais e irmãos que sempre me deram segurança para nunca desistir dos meus sonhos.

Um agradecimento especial ao meu orientador Professor Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy e Professora Dra. Andréa Name Colado Simão pela disponibilidade, apoio, paciência, dedicação, pelos conhecimentos transmitidos ao longo desse período e pela oportunidade oferecida a mim para a confecção desse trabalho, aos dois toda a minha gratidão.

Agradeço aos membros da banca e professores avaliadores por aceitarem o convite e colaborarem para o enriquecimento do trabalho.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Imunologia Aplicada e do programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, pelos ensinamentos, apoio, ajuda e conselhos dados ao longo da confecção do trabalho.

Agradeço aos técnicos do laboratório de Análises Clínicas do Hospital Uniersitário de Londrina que sempre estão dispostos a ajudar.

Ao Programa de Fisiopatologia Clínica e Laboratorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina e aos professores por todo o conhecimento transmitido e suporte.

Por último, e mais importante, à Deus pelo dom da vida, e por me permitir realizar tantos sonhos, por me permitir errar, aprender e crescer, por seu imenso amor que faz a minha vida renovada a cada dia.

MORI, Mayara Tiemi Enokida. **Avaliação das variantes do gene *IL18* (rs360717 e rs187238) e de biomarcadores clínicos e laboratoriais como preditores de gravidade e mortalidade da COVID-19.** 2021. 92 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A *Coronavirus disease 2019* (COVID-19) é uma infecção aguda causada pelo novo coronavírus denominado *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2), com mais de mais de 180 milhões de casos confirmados e aproximadamente quatro milhões de casos fatais registrados pelo mundo. A COVID-19 grave está ligada a uma resposta inflamatória excessiva, incluindo o nível elevado de citocinas pró-inflamatórias e biomarcadores inflamatórios sistêmicos como proteína C reativa, dímero-D, ferritina e relação neutrófilo/linfócito. A tempestade de citocinas é um dos principais agravantes observados na COVID-19 grave, levando à falência de múltiplos órgãos ou choque séptico. Níveis séricos elevados da interleucina (IL)-18 são associados a gravidade da COVID-19 e pior prognóstico. Variantes genéticas no *IL18* podem influenciar os níveis da citocina e podem estar relacionadas a fisiopatologia da COVID-19.

**OBJETIVO:** Avaliar as variantes genéticas *IL18-105G>A* (rs360717) e *IL18-137C>G* (rs187238) e sua associação com a gravidade e o desfecho da COVID-19, bem como sugerir modelos preditores para prognóstico e mortalidade em pacientes com COVID-19. **SUJEITOS E MÉTODOS:** O estudo transversal incluiu 528 pacientes com COVID-19 atendidos no Hospital Universitário de Londrina e Unidade de Pronto Atendimento de Londrina. A gravidade clínica da COVID-19 foi avaliada usando a classificação da Organização Mundial da Saúde e os pacientes foram categorizados de acordo com a gravidade leve (157 pacientes), moderado (63 pacientes) e grave (308 pacientes). A genotipagem das variantes de nucleotídeo único de *IL18* foram realizadas pela reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR). **RESULTADOS:** A *IL18-105G>A* está associado a um efeito protetor sobre a gravidade da COVID-19, com o genótipo GA no modelo co-dominante [Odds ratio (OR): 0,55, intervalo de confiança (IC) 95%: 0,34-0,89, p= 0,015], modelo overdominante (OR: 0,56, IC 95%: 0,35-0,89, p= 0,014) e os genótipos AA + GA em um modelo dominante (OR: 0,61; IC 95%: 0,38-0,96, p= 0,031). Assim, a presença do alelo A em homozigose ou heterozigose foi associado a proteção ao desenvolvimento de casos moderados e graves. Similarmente, o genótipo *IL18-137CG* foi associado a um efeito protetor à gravidade da COVID-19 (OR: 0,55, IC 95%: 0,34-0,89, p= 0,015). Para o modelo overdominante, o genótipo CG foi associado a um efeito protetor à gravidade da COVID-19 (OR: 0,57, IC 95%: 0,36-0,91, p= 0,018). No modelo dominante, os genótipos GG + CG também foram associados a um efeito protetor à gravidade da COVID-19 (OR: 0,59, IC 95%: 0,37-0,93, p= 0,025) e a presença do alelo G em homozigose ou a heterozigose foi associado a proteção ao desenvolvimento de casos moderados e graves. Nós propomos um modelo de biomarcador capaz de prever a gravidade da COVID-19 com *IL18-105 GA* (negativamente associado), e idade, alterações na tomografia computadorizada de tórax (CCTA - do inglês *chest computed tomography scan alteration*), índice de massa corpórea, doenças cardíacas, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão e índice de inflamação (positivamente associados), podem ser usados

para prever o desenvolvimento de doença moderada ou grave com uma precisão de 84,3% (sensibilidade: 83,3% e especificidade: 86,5%). A não sobreviventes (versus sobreviventes) foi mais bem prevista por idade elevada, demência, inflamação, redução de SpO<sub>2</sub>, admissão na unidade de terapia intensiva, intubação, índice de massa corpórea e doença grave; 85,7% dos casos foram classificados corretamente com uma sensibilidade de 83,3% e especificidade de 86,7%. **CONCLUSÕES:** Os resultados sugerem que as variantes genéticas *IL18-105G>A* e *IL18-137C>G* possam exercer um efeito protetor significativo em relação à gravidade da COVID-19, mas não sobre a mortalidade. Propomos modelos preditivos para prognóstico e mortalidade que podem auxiliar na identificação precoce de pacientes com maior chance de evoluir para um pior prognóstico, necessitando de tratamento individualizado.

**Palavras-chave:** COVID-19; variantes genéticas; *IL18*; gravidade COVID-19; modelos preditores.

MORI, Mayara Tiemi Enokida. **Evaluation of *IL18* genetic variants (rs360717 and rs187238) and clinical and laboratory biomarkers predict the severity and mortality of COVID-19.** 2021. 92 p. Dissertation (Master Degree in Clinical and Laboratory Pathophysiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is an acute infection caused by the new coronavirus named *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2), has more than 180 million confirmed cases and by almost four million fatal cases worldwide. Severe COVID-19 is linked to an excessive inflammatory response, including elevated levels of pro-inflammatory cytokines and systemic inflammatory biomarkers such as C-reactive protein, D-dimer, ferritin and neutrophil/lymphocyte ratio. Cytokine storm is one of the main aggravations observed in severe COVID-19, leading to multiple organ failure or septic shock. High serum levels of interleukin (IL)-18 are associated with severity of COVID-19 and with worse prognosis. Genetic variants *IL18* can influence the cytokine levels and may be related to pathophysiology of COVID-19. **OBJECTIVE:** To evaluate the genetic variants of *IL18*-105G>A (rs360717) and *IL18*-137C>G (rs187238) and their association with the severity and outcome of COVID-19, as well as to suggest models to predict the prognosis and mortality in patients with COVID-19. **SUBJECTS AND METHODS:** The cross-sectional study consisted of 528 COVID-19 patients treated at the University Hospital of Londrina and Emergency Rooms in Londrina. The COVID-19 clinical severity was assessed using the World Health Organization classification and the patients were categorized according to severity into mild (157 patients), moderate (63 patients) and critical (308 patients). Genotyping of single nucleotide *IL18* variants were determined using quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). **RESULTS:** The *IL18*-105G>A was associated with a protective effect on the severity of COVID-19, with the GA genotype in the co-dominant model [Odds ratio (OR): 0.55, 95% confidence interval (CI): 0.34-0.89, p= 0.015], overdominant model (OR: 0.56, 95% CI: 0.35-0.89, p= 0.014) and the AA+GA genotypes in a dominant model (OR: 0.61; 95% CI: 0.38-0.96, p= 0.031). Thus, the presence of the A allele in homozygosis or heterozygosis was associated with protection for development of moderate and severe cases. Similarly, *IL18*-137CG genotype was associated with a protective effect on COVID-19 severity (OR: 0.55, 95% CI: 0.34-0.89, p= 0.015). With the overdominant model, the CG genotype was associated with a protective effect on severity of COVID-19 (OR: 0.57, 95% CI: 0.36-0.91, p= 0.018). In the dominant model, the GG+CG genotypes were also associated with a protective effect on the severity of COVID-19 (OR: 0.59, 95% CI: 0.37-0.93, p= 0.025) and the presence of the G allele in homozygosis or heterozygosis was associated protection in the development of moderate and severe cases. We propose biomarker models capable of predicting of the severity COVID-19 with *IL18*-105G>A genotype GA (negatively associated), and age, chest computed tomography scan alteration (CCTA), body mass index, heart diseases, type 2 diabetes melitus, hypertension, and inflammation (positively associated) may be used to predict who will develop moderate or critical disease with an accuracy of 84.3% (sensitivity: 83.3% and specificity: 86.5%). Death was best predicted (versus no-death) by higher age, dementia, inflammation, lowered peripheral capillary oxygen saturation (SpO<sub>2</sub>),

intensive unit care admission, intubation, body mass index and severe illness; 85.7% of the subjects were correctly classified with a sensitivity of 83.3% and specificity 86.7%. **CONCLUSION:** The results suggest that the genetic variants *IL18*-105G>A and *IL18*-137C>G may exert a protective effect in regard to the severity of COVID-19, but not to the mortality. We propose prediction models of prognosis and mortality that may help in the early identification of patients who are more likely to progress to a worse prognosis, requiring individualized treatment.

**Key words:** COVID-19; genetic variants; *IL18*, severity COVID-19; predict models.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Distribuição da mortalidade por COVID-19 entre os 20 países com maior número de casos .....	17
<b>Figura 2</b> – Estrutura genômica e domínio funcional da proteína S do SARS- CoV-2 .....	21
<b>Figura 3</b> – Ciclo de vida de SARS-CoV-2.....	22
<b>Figura 4</b> – Via de sinalização da interleucina (IL)-18 na COVID-19 .....	26
<b>Figura 5</b> – Representação esquemática das atividades funcionais da IL-18...	27
<b>Figura 6</b> – Diagrama do gene IL18 e a localização das variantes genéticas IL18-105G>A e IL18-137G>C .....	30

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Critérios de classificação segundo a gravidade da Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) .....	19
<b>Tabela 2</b> – Variante IL18-137C>G em pacientes com doenças autoimunes e inflamatórias.....	33
<b>Tabela 3</b> – Variante IL18-105G>A em pacientes com aborto idiopático recorrente e aborto espontâneo recorrente.....	35

## LISTA DE TABELAS ARTIGO

<b>Table 1</b> –	Sociodemographic data, symptoms and laboratory parameters on the severity of SARS-CoV-2 infection, named Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) .....	62
<b>Table 2</b> –	Association between IL18-105G>A and IL18-137C>G variants in patients with COVID-19 according to their severity (moderate + critical versus mild severity) .....	64
<b>Table 3</b> –	Sociodemographic data, symptoms, and biomarkers among the non survivors and survivors patients with SARS-CoV-2 infection ..	65
<b>Table 4</b> –	Results of binary logistic regression analysis with different dichotomies as dependent variables and demogrtaphic, clinical, genetic variant and laboratory data as explanatory variables in patients with COVID-19 infection .....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5'UTR	Região 5' não traduzida
AIM2	Absent in Melanoma-2
ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Analysis of Variance (Análise de Variância)
APACHE II	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II
BMI	Body Mass Index (Índice de Massa Corpórea)
CCTA	Chest Computed Tomography Scan Alteration (Alterações na Tomografia Computadorizada De Tórax)
CI	Confidence Interval (Intervalo de Confiança)
CKD	Chronic Kidney Disease (Doença Renal Crônica)
COPD	Chronic Obstructive Pulmonar Diserase (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica)
COVID-19	Coronavirus Disease 2019 (Doença do Coronavírus 2019)
CRP	C-Reactive Protein (Proteína C Reativa)
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns (Padrões Moleculares Associados ao Dano)
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
T2DM	Type 2 diabetes mellitus (Diabetes mellitus tipo 2)
DP	Desvio Padrão (Standard Deviation)
ECA2	Receptor de Enzima Conversora de Angiotensina 2
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ERGIC	ER-Golgi Intermediate Compartment (Compartimento Intermediário RE-Golgi)
FasL	Fas-ligante
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor (Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos)
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos-Macrófagos)
H4TF-1	Fator 1 de Transcrição Específico do Gene Da Histona H4
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IFN	Interferon

IL	Interleucina
IL-18BP	IL-18 Binding Protein (Proteína de Ligação da IL-18)
IL-18R $\alpha$	IL-18 Receptor Alpha (IL-18 Receptor Alfa)
IL-18R $\beta$	IL-18 Receptor Beta
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1 (Molécula de Adesão Intercelular 1)
Kb	Kilobase
kbA	Kilobar
LES	Lupús Eritomatoso Sistêmico
LDH	Lactato Desidrogenase
Ln	Logaritmo Natural (Natural Logarithm)
MBL2	Mannose Binding Lectin 2 (Lecitina Ligante de Manose 2)
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1 (Proteína Quimiotática de Monócito-1)
MCP-3	Monocyte Chemoattractant Protein-3 (Proteína Quimiotática de Monócito-3)
MIP-1 $\beta$	Monocyte Inflammatory Protein 1 (Proteína Inflamatória De Monócito-1 $\beta$ )
NETs	Neutrophil Extracellular Traps (Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos)
NF- $\kappa$ B	Fator Nuclear Kappa B
NK	Natural killer
NLR	Neutrophil/Lymphocyte Ratio (Razão Neutrófilo/Linfócito)
NLRs	Nod-like receptors (Receptores do Tipo NOD)
NLRP3	Receptor do tipo NOD, domínio pirina contendo a proteína 3
NOD	Nucleotide binding and oligomerization domain (domínio de oligomerização de nuceotídeo)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds Ratio
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)
qPCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantativa)

PRR	Pattern Recognition Receptor (Receptor de Reconhecimento de Padrão)
+ssRNA	Single-Stranded Positive-Sense Viral RNA (RNA de Fita Simples de Sentido Positivo)
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)
RTC	Replicase-Transcriptase Complex (Complexo de Replicação-Transcrição)
RT-qPCR	Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Via Transcriptase Reversa)
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus-2)
SDRA	Acute Respiratory Distress Syndrome (Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo)
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica)
SNV	Single Nucleotide Variant (Variante de Nucleotídeo Único)
SpO2	Peripheral Capillary Oxygen Saturation (Saturação Periférica de Oxigênio)
Th	T Helper Cell (Células T Auxiliares)
TMPRSS2	Transmembrane Serine Protease 2 (Serina Protease Transmembranar 2)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Fator de Necrose Tumoral)
UPA	Unidade de Pronto Atendimento
UTI	Unidade de Terapia Intensiva (Intensive Care Unit)
WBC	White Blood Cells (Contagem Leucocitária)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1	ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA COVID-19 .....	16
1.2	FISIOPATOLOGIA DA COVID-19 .....	20
1.3	O PAPEL DA IL-18 NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA .....	25
1.4	IL-18 E COVID-19 .....	28
1.5	VARIANTES GENÉTICAS IL18 -105G>A E IL18 -137G>C.....	30
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	37
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	38
3.1	OBJETIVO GERAL .....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
<b>4</b>	<b>SUJEITOS E MÉTODOS</b> .....	39
4.1	ASPECTOS ÉTICOS .....	39
4.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM .....	39
4.3	COLETA DE SANGUE E EXAMES BIOQUÍMICOS.....	39
4.4	EXTRAÇÃO DE DNA .....	40
4.5	GENOTIPAGEM DE IL18 -105G>A E IL18 -137C>G .....	40
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>6</b>	<b>ARTIGO</b> .....	44
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO</b> .....	67
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	68
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69
	<b>APÊNDICES</b> .....	80

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO.....	80
APÊNDICE B – FICHA CONSULTA PACIENTE .....	82
<b>ANEXOS</b> .....	84
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA .....	85

# 1 1 INTRODUÇÃO

## 2 1.1 ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA COVID-19

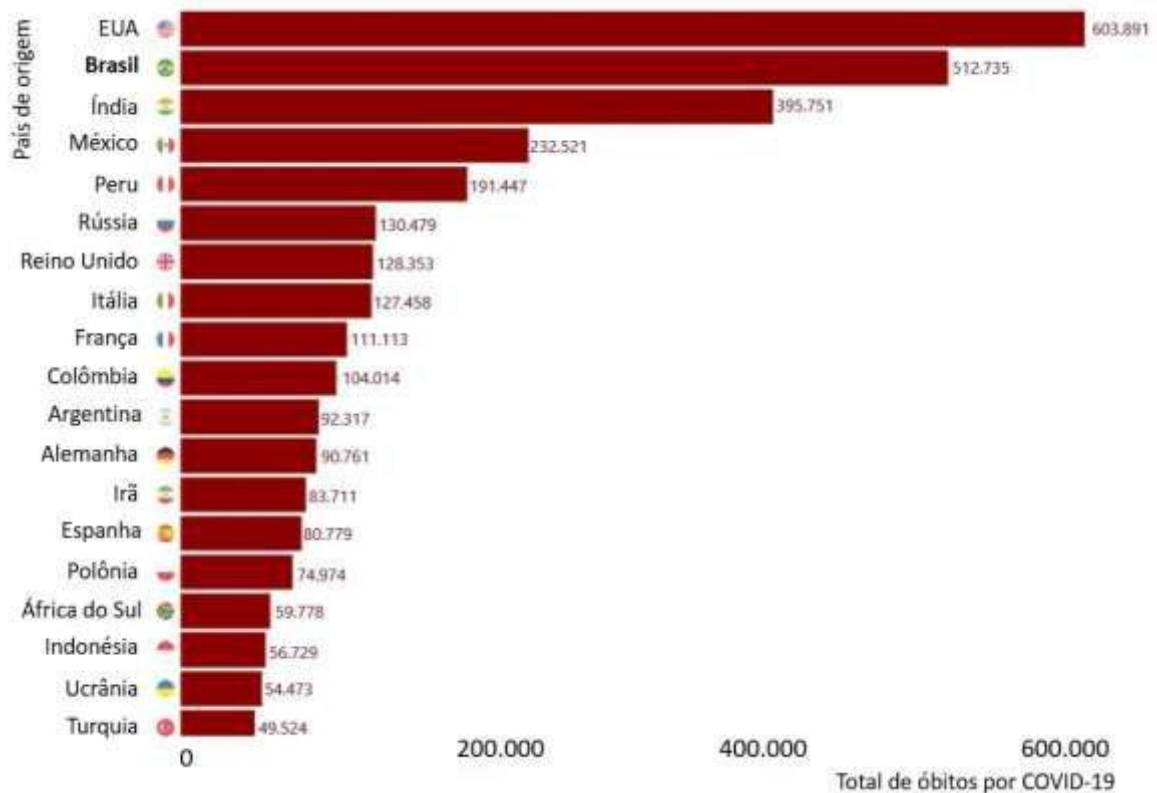
3

4 A doença do coronavírus 2019 (COVID-19 - do inglês *Coronavirus Disease*  
5 *2019*) é uma doença infecciosa, altamente contagiosa e mortal, causada por um  
6 patógeno viral denominado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus como  
7 Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus-2 (SARS-CoV-2 - do inglês  
8 *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) (GORBALENYA et al., 2020).  
9 Originalmente encontrado na cidade de Wuhan, na China, em dezembro de 2019, o  
10 SARS-CoV-2 espalhou-se pelo mundo e foi declarado como uma pandemia pela  
11 Organização Mundial de Saúde (OMS) em 11 de março de 2020 (ROTHAN;  
12 BYRAREDDY, 2020; ZHOU et al., 2020b; ZHU et al., 2020).

13 De acordo com a OMS (2021) até o momento, mais de 180 milhões de casos  
14 confirmados de COVID-19 foram registrados globalmente. As Américas possuem o  
15 maior número de casos acumulados, com aproximadamente 71 milhões relatados  
16 até 27 de junho de 2021 (OMS, 2021).

17 No Brasil, o primeiro caso foi notificado no estado de São Paulo, em 26 de  
18 fevereiro de 2020. Pelo Boletim Epidemiológico com dados de 20 a 26 de junho de  
19 2021, o país possui um total de 18.386.894 casos confirmados de COVID-19, com  
20 uma taxa incidência de 86.830,7 casos por um milhão de habitantes e,  
21 aproximadamente 512.375 óbitos registrados em todo o país (BRASIL, 2021). A  
22 Figura 1 demonstra a distribuição dos óbitos por COVID-19 entre os 20 países com  
23 maior número de casos.

24 O estado do Paraná é o sexto maior estado brasileiro em termos de  
25 população com aproximadamente 11 milhões de pessoas e, devido ao grande  
26 número de habitantes e à proximidade com grandes estados como São Paulo, está  
27 sendo grandemente afetado pela pandemia e está entre as 10 unidades federativas  
28 com maiores números de casos novos registrados, possuindo mais de 1.278.051  
29 casos e 30.539 mortes até o presente momento (BRASIL, 2020; BRASIL, 2021). Em  
30 Londrina, a segunda maior cidade mais populosa do Paraná, no Boletim  
31 Epidemiológico com dados até dia 30 de junho de 2021, o número total de casos foi  
32 de 66.484, com 1.725 mortes em decorrência da COVID-19 (LONDRINA, 2021).



1  
2 **Figura 1 – Distribuição da mortalidade por COVID-19 entre os 20 países com maior número de**  
3 **casos.** Dados até 26 de junho de 2021. **Fonte:** BRASIL (2021).

4  
5 O quadro clínico do paciente com COVID-19 é caracterizado pela síndrome  
6 gripal e, caso o paciente apresente sintomas, o diagnóstico clínico pode ser  
7 realizado por investigação clínico-epidemiológica, anamnese e exame físico  
8 adequando ao paciente (BRASIL, 2020). A apresentação clínica do paciente é  
9 variável, sendo composta por sintomas mais frequentes, como febre (83 – 99%),  
10 tosse (59 – 82%), fadiga (44 – 70%), sintomas menos frequentes, como anorexia,  
11 falta de ar, mialgia, dor de garganta, cefaléia, congestão nasal, diarreia, náuseas e  
12 vômito, perda de olfato ou paladar (CHEN et al., 2020b; HUANG et al., 2020; WANG  
13 et al., 2020; ZAIM et al., 2020).

14 A gravidade da infecção por SARS-CoV-2 também é variável apresentando  
15 desde assintomático à infecção grave, com pneumonia ou insuficiência pulmonar,  
16 síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), síndrome da resposta  
17 inflamatória sistêmica (SIRS) e pode evoluir para disfunção de múltiplos órgãos com  
18 consequências fatais (SALZBERGER et al., 2020). No entanto, geralmente 90% de  
19 todas as infecções, são assintomáticas, oligossintomáticas ou com sintomas leves a  
20 moderados (SALZBERGER et al., 2020).

1           Dentre os fatores de risco para a COVID-19, a idade avançada está  
2 relacionada a maior gravidade da infecção, enquanto indivíduos do sexo masculino  
3 são mais propensos a infecção e piores desfechos (DOCHERTY et al., 2020; YANG  
4 et al., 2020a). Pacientes mais velhos e com doenças pre-existentes possuem taxas  
5 mais altas de admissão em unidade de terapia intensiva (UTI) e maiores taxas de  
6 letalidade (SHARIF et al., 2021).

7           Entre os pacientes com COVID-19, uma maior mortalidade está relacionada a  
8 comorbidades pré-existentes incluindo doença renal crônica, doença  
9 cerebrovascular, doença cardiovascular, diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), doença  
10 respiratória crônica, hipertensão e obesidade (RAEISI et al., 2021; SHI et al., 2021).  
11 Dentre essas, as que possuem pior prognóstico são T2DM e doença cardiovascular  
12 que podem estar relacionadas ao receptor de enzima conversora de angiotensina 2  
13 (ECA2), principal local de ligação para o SARS-CoV-2 (APICELLA et al., 2020;  
14 SHARIF et al., 2021). A expressão desse receptor no pâncreas e no coração  
15 aumenta o risco de infecção por SARS-CoV-2 em pacientes com estas doenças  
16 graves (LIU et al., 2020; PATEL; VERMA, 2020). Em um estudo realizado no Reino  
17 Unido, com cerca de 16.749 pacientes hospitalizados com COVID-19, o maior risco  
18 de morte estava associado a pacientes com doença cardíaca, renal, pulmonar,  
19 demência e obesidade (DOCHERTY et al., 2020).

20           A rápida disseminação do SARS-CoV-2 pelo mundo e o elevado número de  
21 pacientes assintomáticos tornam um difícil desafio de contenção da disseminação  
22 viral (MONTICELLI et al., 2021). Variações genéticas do hospedeiro são de extrema  
23 importância na suscetibilidade a infecção por SARS-CoV-2 (MONTICELLI et al.,  
24 2021). Mesmo que não se tenha total clareza do fenômeno, a busca por fatores  
25 genéticos para explicar as diferenças entre a gravidade dos casos se mostra de  
26 grande importância (MONTICELLI et al., 2021).

27           Ellinghaus e colaboradores (2020) avaliaram 1.980 pacientes com COVID-19  
28 grave e 2.381 indivíduos saudáveis realizaram a análise genética em diferentes  
29 locus dentre eles, locus 6p21 do antígeno leucocitário humano (HLA), locus 9q34.2  
30 do *ABO* e locus 3p21.31 como principais genes candidatos nessa região  
31 *SLC6A20*, *LZTFL1*, *FYCO1*, *CXCR6*, *XCR1* e *CCR9*. As variantes genéticas  
32 rs11385942 em 3p21.31 e rs657152 em 9q34.2 foram associadas a insuficiência  
33 respiratória induzida pela COVID-19. Segundo o mesmo autor, em uma análise  
34 específica do grupo sanguíneo, o locus 9q34.2 *ABO*, foi observado um efeito

1 protetor para tipo O e um risco maior entre pessoas com grupo sanguíneo A em  
2 comparação com os outros grupos.

3 Outros grupos de genes foram analisados e obtiveram uma correlação  
4 significativa para infecção por SARS-CoV-2, dentre eles gene da lecitina ligante de  
5 manose 2” (*MBL2* - do inglês *Mannose Binding Lectin 2*), da Serina Protease  
6 Transmembranar 2 (*TMPRSS2* - do inglês *Transmembrane Serine Protease 2*) e  
7 *CD27* (MONTICELLI et al., 2021). Além dessas, a variante rs3819025 (G>A) no  
8 gene que codifica a citocina pró-inflamatória interleucina (IL)-17A, o alelo G foi  
9 associado a risco de COVID-19 e maior expressão tecidual de IL-17A (AZEVEDO et  
10 al., 2021). Deste modo, o histórico genético é de extrema importância na avaliação  
11 da suscetibilidade a COVID-19 e a descoberta de genes alvo podem ser úteis no  
12 tratamento e na prevenção da infecção (MONTICELLI et al., 2021).

13 Para o manejo clínico do paciente com COVID-19, é de suma importância a  
14 estratificação dos casos de acordo com a gravidade, para que se possa definir a  
15 conduta correta para cada caso (BRASIL, 2020). Deste modo, a OMS propôs uma  
16 classificação da gravidade da COVID-19 descrita na Tabela 1 (OMS, 2021).

17 **Tabela 1** – Critérios de classificação segundo a gravidade da *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19)

<b>Doença Leve</b>	Adulto ou adolescente com sintomáticos com febre, tosse, fadiga, anorexia, dispneia e mialgia, ou outros sintomas inespecíficos dor de garganta, congestão nasal, cefaleia, diarreia, náuseas e vômito, mas sem evidência de hipóxia ou pneumonia viral.
<b>Doença moderada</b>	Adulto ou adolescente com sinais clínicos de pneumonia (febre, tosse, dispneia, taquipneia), mas sem nenhum sinal de pneumonia grave, incluído os níveis de saturação periférica oxigênio (SpO <sub>2</sub> ) ≥90% em ar ambiente.
<b>Doença grave</b>	Adulto ou adolescente com sinais clínicos de pneumonia (isto é, febre, tosse, dispneia, taquipneia) associados a um dos seguintes: frequência respiratória >30 respirações/minuto; dificuldade respiratória grave; ou SpO <sub>2</sub> <90% em ar ambiente.
<b>Doença crítica</b>	Presença de síndrome do desconforto respiratório agudo, sepse ou choque séptico.

19 **Fonte:** adaptado de OMS (2021).

20

21 O principal modo de transmissão do SARS-CoV-2, é por meio de gotículas  
22 que são produzidas durante a fala, tosse, ou espirros transmissíveis entre infectado  
23 e não infectado a uma distância de até 1,5 m (WIERSINGA et al., 2020). O maior  
24 risco de transmissão está associado a contatos breves ou prolongados com  
25 indivíduos sintomáticos, enquanto a exposição breve a pacientes assintomáticos é  
26 menos provável de resultar em transmissão (WIERSINGA et al., 2020). A rápida  
27 replicação no trato respiratório superior, é um fator importante na rápida

1 disseminação do vírus; a replicação ocorre também no trato respiratório inferior e no  
2 trato gastrointestinal (WÖLFEL et al., 2020).

3 Gotículas contendo o vírus SARS-CoV-2 também podem contaminar  
4 superfícies e, conseqüentemente, contaminar mãos que podem ser levadas as  
5 mucosas da boca, nariz e olhos consistindo em outro modo possível de transmissão  
6 (MEI-YUE et al., 2020). O SARS-CoV-2 pode, também, se espalhar por meio de  
7 aerossóis (gotículas menores que permanecem suspensas no ar), mas não está  
8 claro se esta é uma fonte significativa de infecção em humanos fora de ambiente  
9 laboratorial (CHU et al., 2020). Apesar da detecção de aerossóis em estado  
10 fisiológico (tosse) ou ácidos nucleicos no ar, não significa que essas pequenas  
11 partículas sejam infectantes (BOUROUBA, 2020). O papel da transmissão por  
12 aerossol ainda permanece incerto (SOMSEN et al., 2020).

13

## 14 1.2 FISIOPATOLOGIA DA COVID-19

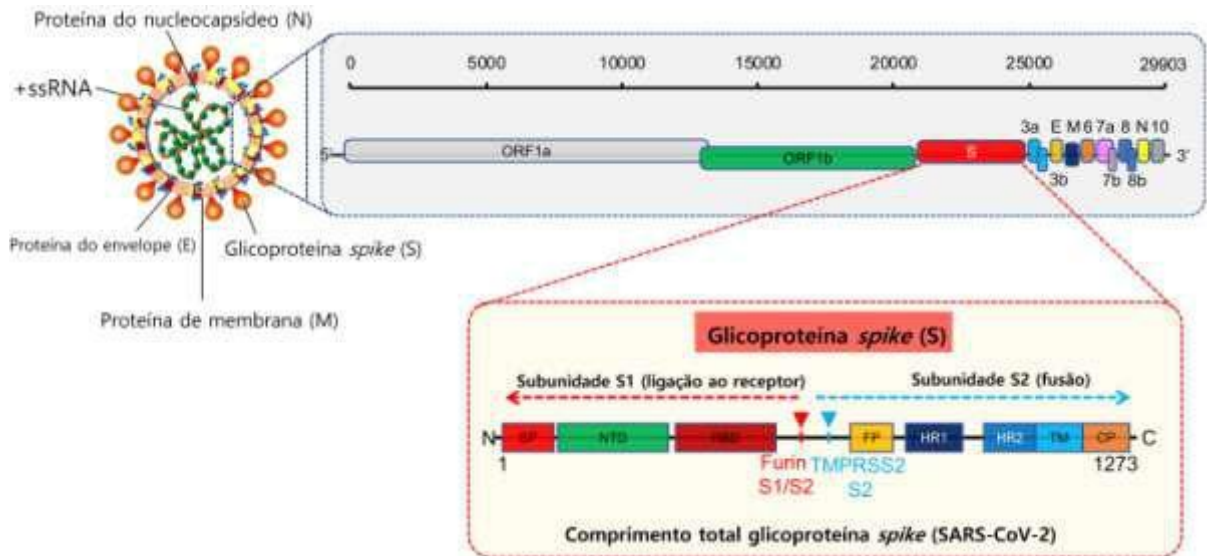
15

16 Os coronavírus pertencem à família dos *Coronaviridae* da ordem *Nidovirales*,  
17 vírus grande envelopado de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples de sentido  
18 positivo variando de 26 a 32 kilobases (kb) de comprimento, encontrados em  
19 humanos e outros mamíferos (KAUR et al., 2021). O SARS-CoV-2 pertence aos  $\beta$ -  
20 coronavírus, com genoma de tamanho aproximado de 29,9 kb e possui quatro  
21 proteínas estruturais, são elas proteína *Spike* (S), proteína do envelope (E), proteína  
22 de membrana (M), proteína do nucleocapsídeo (N) e as proteínas não estruturais  
23 (LU et al., 2020; WU et al., 2020a).

24 O SARS-CoV-2 é um vírus altamente patogênico; em humanos, infecta  
25 células epiteliais brônquicas, pneumócitos e células do trato respiratório superior,  
26 com lesões pulmonares, podendo evoluir para doenças respiratórias graves com  
27 risco de morte (V'KOVSKI et al., 2021). Ao entrar no corpo humano pela inalação, a  
28 proteína S do SARS-CoV-2 reconhece o receptor celular proteico ECA2,  
29 abundantemente expresso no epitélio pulmonar (WALLS et al., 2020). Essa proteína  
30 precisa ser clivada por proteases celulares em duas subunidades funcionais S1 e S2  
31 (HOFFMANN et al., 2020; WALLS et al., 2020). A primeira subunidade tem como  
32 função se ligar a célula hospedeira e a segunda quando ancorada a membrana  
33 plasmática, contém o mecanismo de fusão (HOFFMANN et al., 2020; WALLS et al.,

1 2020). Após a introdução do material genético viral na célula, uma vesícula celular  
 2 chamada endossomo é formada (HOFFMANN et al., 2020; WALLS et al., 2020). A  
 3 Figura 2 apresenta a estrutura genômica do SARS-CoV-2, assim como o domínio  
 4 funcional da proteína S e suas subunidades S1 e S2.

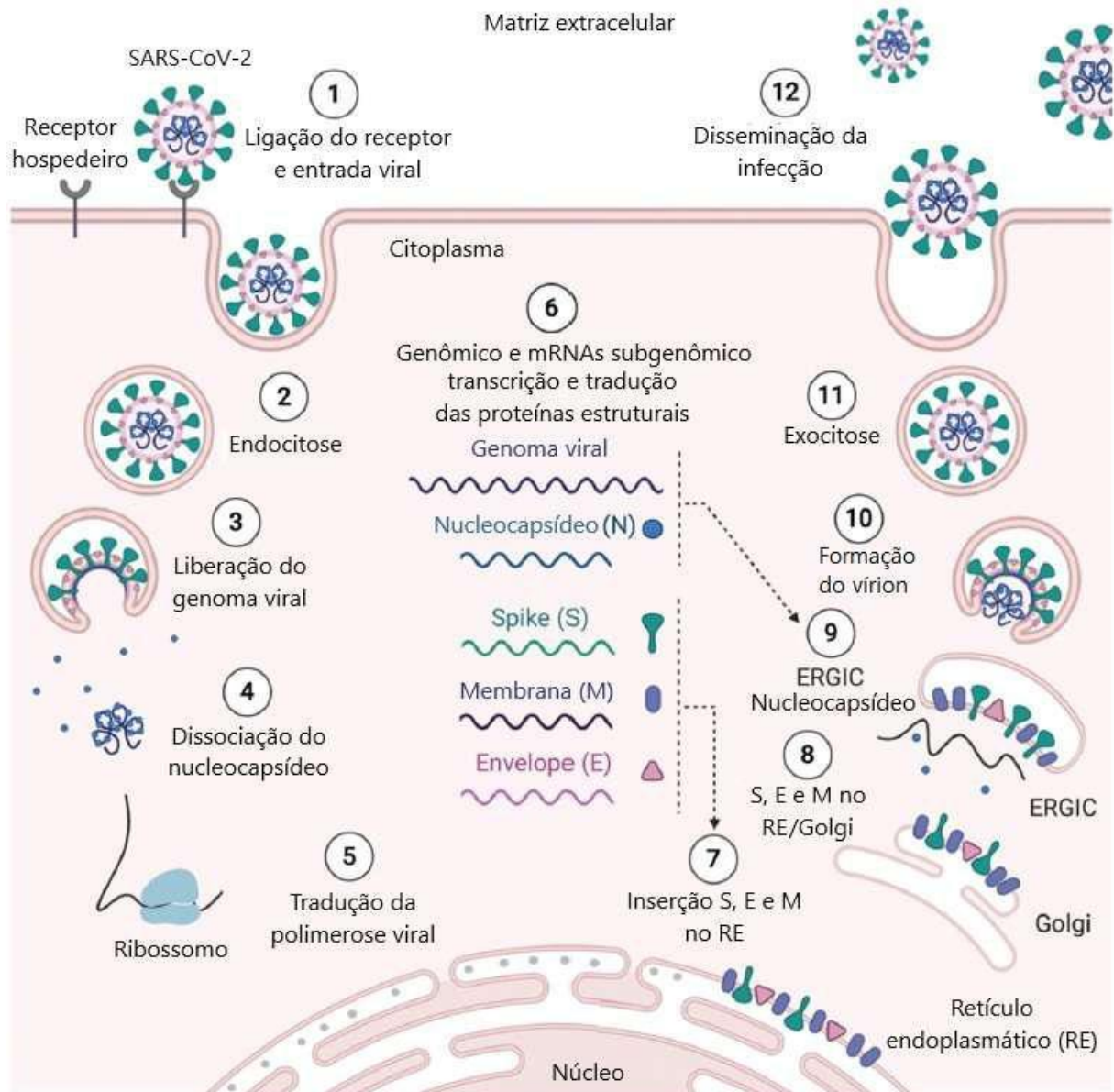
5



6

7 **Figura 2 – Estrutura genômica e domínio funcional da proteína S do SARS-CoV-2.** As proteínas  
 8 da superfície viral *Spike* (S), do envelope (E) e de membrana (M) estão incorporadas na bicamada  
 9 lipídica, e o RNA de fita simples de sentido positivo (+ssRNA) está associado a proteína do  
 10 nucleocapsídeo (N). Genoma é formado pelo complexo de replicação (ORF1a / ORF1b), as proteínas  
 11 estruturais do vírus glicoproteína S, envelope E, membrana M, nucleocapsídeo N e outras proteínas  
 12 acessórias. Proteínas S medeia a ligação viral às células hospedeiras após a ativação pela enzima  
 13 TMPRSS2. **Legenda:** proteínas Spike (S), proteína do envelope (E), proteína de membrana (M),  
 14 proteína do nucleocapsídeo (N), RNA de fita simples de sentido positivo (+ssRNA), peptídeo sinal (SP  
 15 - do inglês *signal peptide*), serina protease transmembranar 2 (TMPRSS2 - do inglês *transmembrane*  
 16 *serine protease 2*), domínio N terminal (NTD - do inglês *N-terminal domain*), domínio de ligação ao  
 17 receptor (RBD - do inglês *receptor-binding domain*), peptídeo de fusão (FP - do inglês *fusion peptide*),  
 18 *heptad repeat 1 e 2* (HR), domínio transmembrana (TM - do inglês *transmembrane domains*), domínio  
 19 citoplasmático (CP - do inglês *cytoplasm domain*). **Fonte:** adaptado de Kumar; Khodor (2020).

20 Após fusão, o material genético é liberado no citoplasma e o RNA viral utiliza  
 21 a maquinaria da célula hospedeira para iniciar a replicação do genoma viral e  
 22 síntese da cadeia de polipeptídeos e formar o complexo de replicação-transcrição  
 23 (RCT) necessário para sintetizar os RNAs subgenômico e proteínas acessórias e  
 24 estruturais (envelope e nucleocapsídeo) (KUMAR; KHODOR, 2020). Após a  
 25 montagem dos componentes do RNA e das proteínas, os novos vírus são  
 26 transportados para a superfície celular em vesículas e liberados por exocitose  
 27 (ANDERSEN et al., 2020; DE WIT et al., 2016). A Figura 3 representa o ciclo de vida  
 28 do SARS-CoV-2.



1  
2 **Figura 3 – Ciclo de vida de SARS-CoV-2.** [1] O SARS-CoV-2 liga-se a receptor ECA2 das células  
3 hospedeiras, pela proteína *spike* (S), que medeia a fusão vírus-membrana plasmática e entrada viral.  
4 [2] A entrada é iniciada por endocitose, uma vez que a partícula do vírus é envolvida com seu  
5 envelope intacto. [3] Dentro da vesícula endossômica, as proteases lisossomais induzidas começam  
6 a clivar as glicoproteínas S virais, mediando a fusão do envelope viral com a membrana endossômica  
7 do hospedeiro. [4] O vírion nu é liberado no citoplasma, onde as proteínas do nucleocapsídeo  
8 começam a se dissociar, liberando o RNA de fita simples de sentido positivo (+ssRNA) viral.  
9 [5] Liberado +ssRNA no citoplasma se move para os ribossomos hospedeiros, onde o genoma é  
10 decodificado. A configuração do genoma policistrônico permite a tradução primeiro de ORF, que  
11 codifica a poliproteína replicase (polimerase). [6] A replicase então gera o genoma viral e mRNAs  
12 subgenômicos aninhados, que codificam as quatro proteínas estruturais principais: pico (S), envelope  
13 (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N). [7] Após a tradução, as proteínas estruturais virais, S, E e  
14 M, são inseridas no RE [8] e, eventualmente, transportadas para a via secretória do RE e do  
15 complexo de golgi (ERGIC), formando partículas semelhantes a vírus. [9] As proteínas N traduzidas  
16 subsequentemente polimerizam em torno do genoma viral recém-sintetizado para formar o  
17 nucleocapsídeo, que se transforma no complexo ERGIC contendo o envelope associado e as  
18 proteínas estruturais para formar um vírion maduro. [10] O genoma viral de comprimento total  
19 encapsidado pela proteína N forma novos vírions. [11] Os vírions montados saem por exocitose, [12]  
20 e as partículas de vírus recém-formadas se espalham para infectar os tecidos adjacentes. **Legenda:**  
21 compartimento intermediário RE-Golgi (ERGIC - do inglês *ER-Golgi Intermediate Compartment*),

1 retículo endoplasmático (RE), RNA mensageiro (mRNAs), RNA de fita simples de sentido positivo  
2 (+ssRNA), enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2). **Fonte:** Adaptado de ALSHAMMARY; AL-  
3 SULAIMAN (2021).

4 O SARS-CoV-2 se espalha pelo trato respiratório superior chegando aos  
5 alvéolos responsáveis pela troca gasosa e a infecção leva a edema pulmonar,  
6 ativação da coagulação intravascular disseminada, isquemia pulmonar, insuficiência  
7 respiratória e dano pulmonar progressivo (ZAIM et al., 2020). O vírus pode  
8 disseminar-se por diferentes partes do corpo, incluindo o cérebro, trato  
9 gastrointestinal, coração, rins e fígado, pode levar a insuficiência cardíaca,  
10 insuficiência renal, lesão hepática, choque, falência múltipla de órgãos e morte  
11 (ZAIM et al., 2020).

12 ECA2 está presente em células epiteliais nasais e brônquicas e está  
13 amplamente expressa na superfície de pneumócitos alveolares do tipo II, que  
14 também coexpressam várias outras proteínas que estão envolvidas na regulação da  
15 reprodução e transmissão viral, incluindo TMPRSS2 (MENG et al., 2020). Os  
16 pneumócitos tipo II produzem surfactantes e exercem funções imunoregulatórias.  
17 Essas células compartilham a mesma membrana basal com células endoteliais  
18 capilares, ambas expressam ECA2 e podem ser o local primário de entrada do  
19 SARS-CoV-2, resultando em danos nas células do endotélio capilar e da membrana  
20 alvéolo-capilar, além de hiperplasia reativa dos pneumócitos tipo II (BOURGONJE et  
21 al., 2020). Com a intensa entrada e replicação viral nos pneumócitos, pode levar a  
22 um círculo vicioso de contínua destruição e reparo da parede alveolar, culminando  
23 em um progressivo dano alveolar difuso (BOURGONJE et al., 2020). As células  
24 lesionadas liberam, citocinas e componentes intracelulares e podem ser  
25 reconhecidos por células epiteliais vizinhas, células endoteliais e macrófagos  
26 alveolares; esses por sua vez, desencadeiam a geração de citocinas pró-  
27 inflamatórias e quimiocinas, que atraem monócitos, macrófagos e células T CD8<sup>+</sup> e T  
28 CD4<sup>+</sup> promovendo mais inflamação, com a adição de interferon (IFN)- $\gamma$  produzido  
29 pelas células T, estabelecendo um ciclo de feedback pró-inflamatório (RAHMAN et  
30 al., 2021; TAY et al., 2020).

31 A COVID-19 grave, é caracterizada por uma desregulação imunológica e,  
32 varias alterações na rede de citocinas, ocorrem durante a infecção por SARS-CoV-2,  
33 incluindo os níveis plasmáticos aumentados de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, IL-8, fator de  
34 necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), fator estimulador de colônia de granulócito (G-CSF),

1 proteína 10 induzida por IFN- $\gamma$ , proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e 3  
2 (MCP-3) (HUANG et al., 2020; QIN et al., 2020; YANG et al., 2020b). Deste modo,  
3 foi sugerido que a “tempestade de citocinas”, é a principal causa da lesão tecidual  
4 que leva a SDRA, falência de múltiplos órgãos e morte na COVID-19 (YANG et al.,  
5 2020b)

6 Em resposta as citocinas liberadas, pode haver a inflamação das células  
7 endoteliais pulmonares (endotelite), que altera a integridade e a função da barreira  
8 vascular (YE et al., 2020). Os mecanismos subjacentes a essas alterações,  
9 associadas as citocinas pró-inflamatórias, levam ao aumento da permeabilidade  
10 vascular, aumento na expressão de moléculas de adesão e induz o recrutamento de  
11 mais células imunológicas, como neutrófilos ativados e monócitos (RAHMAN et al.,  
12 2021; YE et al., 2020).

13 A infecção por SARS-CoV-2 causa dano alveolar difuso no pulmão e dano na

14 membrana hialina nos alvéolos, leva ao alargamento intersticial e edema, resultando  
15 em dificuldade respiratória e deficiência de oxigenação (MATTHAY et al., 2019).  
16 Além disso, pelo dano ocasionado às células alveolares, menos surfactante é  
17 produzido, prejudicando ainda mais a oxigenação (GONZALES; LUCAS; VERIN,  
18 2015). Culmina no aparecimento de SDRA, considerada a principal causa de óbito  
19 nos pacientes com COVID-19 (YE et al., 2020).

20 A liberação de mediadores inflamatórios, leucócitos e células endoteliais  
21 danificadas levam a broncoconstrição, com a ventilação prejudicada devido ao  
22 leucotrieno. As prostaglandinas, juntamente com IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , são  
23 responsáveis pela febre presente em mais de 80% dos casos de COVID-19  
24 (ABDULKHALEQ et al., 2018; COSTELA-RUIZ et al., 2020; ROBB et al., 2020).

25 Em biópsia realizada nos pulmões de pacientes com COVID-19, foram  
26 encontrados dano alveolar difuso com edema bilateral, exsudatos proteicos ou  
27 fibrina alveolar e hiperplasia reativa difusa de pneumócitos tipo II (TIAN et al., 2020).  
28 Além disto, há presença variável de infiltração irregular, principalmente intersticial de  
29 células mononucleares e, em alguns casos, células gigantes multinucleadas em  
30 alvéolos com alterações virais associadas, e a formação da camada hialina com  
31 septos alveolares espessados devido a proliferação de fibroblastos intersticiais  
32 consistente com fibrose (TIAN et al., 2020).

33

34

### 1.3 O PAPEL DA IL-18 NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

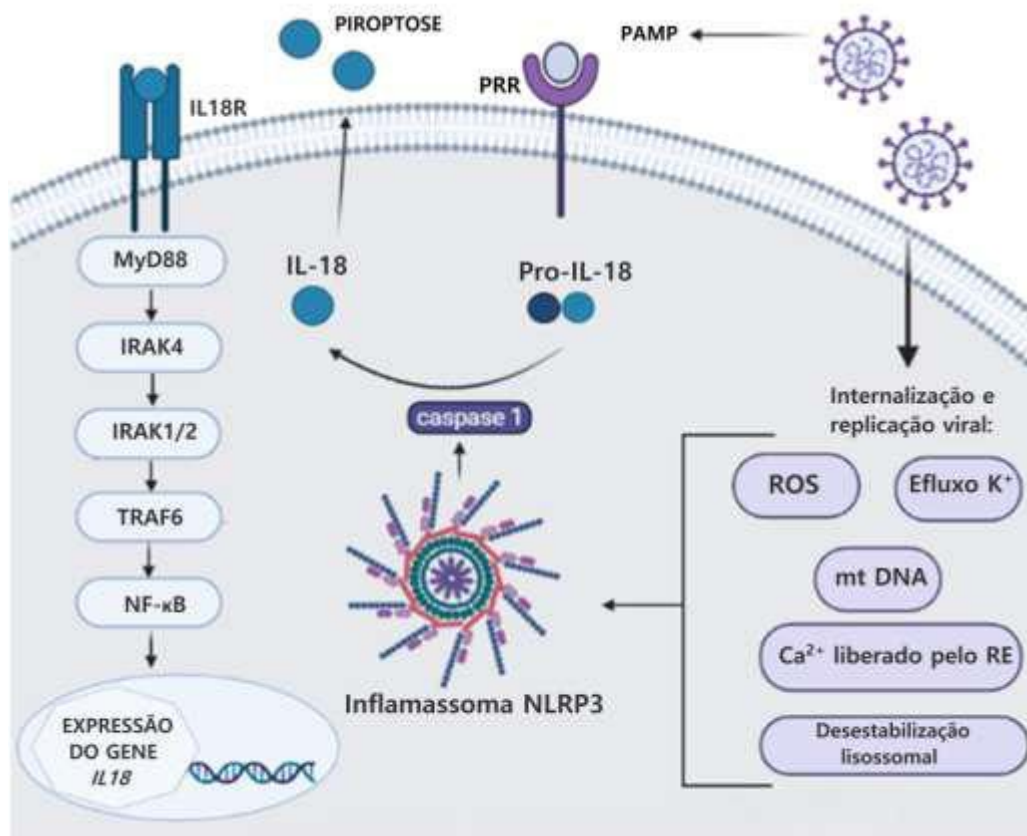
A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória membro da família da IL-1 e foi descrita originalmente como fator indutor de IFN- $\gamma$  (OKAMURA et al., 1995). Sintetizada como precursor inativo, necessita ser clivada intracelularmente pela caspase-1 para se tornar biologicamente ativa (DINARELLO et al., 2013). O precursor de IL-18 está expresso constitutivamente em macrófagos, monócitos, células dendríticas, queratinócitos, células de Kupffer, células endoteliais, células epiteliais intestinais e células epiteliais alveolares tipo II (DINARELLO et al., 2013; PECHKOVSKY et al., 2006).

A pró-caspase-1 precisa ser clivada em sua forma madura caspase-1 ativa por inflamassomas canônicos como pertencentes a família dos receptores do tipo NOD (NLRs - do inglês *Nod-like receptors*) ou receptores tipo AIM2 (do inglês, *absent in melanoma-2*). A caspase-1 ativa IL-18 é secretada por monócitos e macrófagos (DINARELLO et al., 2013). A ativação de caspase-1 pelo inflamassoma também pode causar a morte celular denominada de piroptose, por meio da ativação da proteína gasdermina D, que induz poros na membrana e a liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 madura (DINARELLO et al., 2013; JORGENSEN; MIAO, 2015).

Há, também, mecanismos independentes de caspase-1 para a clivagem de IL-18, como a ativação de IL-18 por caspase-8, granzima B de células citotóxicas, quimase de mastócitos ou meprina  $\beta$  de células epiteliais intestinais e renais que clivam IL-18 para a forma ativa, e o precursor de IL-18 pode ser processado extracelularmente quando liberado por células mortas, pelas proteases de neutrófilos como proteinase-3 (BOSSALLER et al., 2012; OMOTO et al., 2006, 2010; SUGAWARA et al., 2001).

No processo de sinalização, IL-18 se liga ao complexo heterodimérico que consiste na cadeia de ligação do ligante denominada de IL-18 receptor alfa (IL-18R $\alpha$ ), e na cadeia transdutora de sinal IL-18 receptor beta (IL-18R $\beta$ ) para formar um receptor de alta afinidade (DINARELLO, 1998; HOSHINO et al., 1999; KIM et al., 2001). A maioria das células expressa IL-18R $\alpha$ , mas IL-18R $\beta$  é expresso em linfócitos T e células dendríticas, mas não comumente expressos em células mesenquimais (KAPLANSKI, 2018).

1 Ao se ligar ao complexo do receptor, IL-18 ativa vias de sinalização e recruta  
 2 MyD88, mediado por IRAK4, e IRAK1 e 2 formando um complexo denominado  
 3 *Myddosome*. Este complexo recruta TRAF6 e ativa as vias de fator nuclear kappa B  
 4 (NF- $\kappa$ B) (ADACHI et al., 1998; SUZUKI et al., 2003; TSUTSUMI et al., 2014). E a  
 5 regulação de IL-18 é mediada pela proteína de ligação da IL-18 (IL-18BP - do inglês  
 6 *IL-18 binding protein*), se liga com maior afinidade que IL-18R $\alpha$  a IL-18 (DINARELLO  
 7 et al., 2013). A Figura 4 apresenta a via de sinalização da IL-18 na COVID-19.



8  
 9 **Figura 4 – Via de sinalização interleucina (IL)-18 na COVID-19.** Após a infecção viral, há a  
 10 montagem do inflamssoma pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos  
 11 (PAMPs) e padrões moleculares associados a dano (DAMPs) ativando a caspase-1, essencial para a  
 12 clivagem de pró-IL-18 em sua forma ativa. Após a externalização, essa citocina pode induzir piroptose  
 13 e ativar seus receptores para promover a expressão de moléculas pró-inflamatórias. **Legenda:**  
 14 espécies reativas de oxigênio (ROS), DNA mitocondrial (mt DNA), retículo endoplasmático (RE),  
 15 receptor de reconhecimento de padrão (PRR - do inglês *Pattern Recognition Receptor*), fator nuclear  
 16 kappa B (NF- $\kappa$ B), receptor do tipo NOD, domínio pirina contendo a proteína 3 (NLRP3), padrões  
 17 moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a dano (DAMPs).  
 18 **Fonte:** adaptado de Calado; Santana; Crovella (2021).  
 19

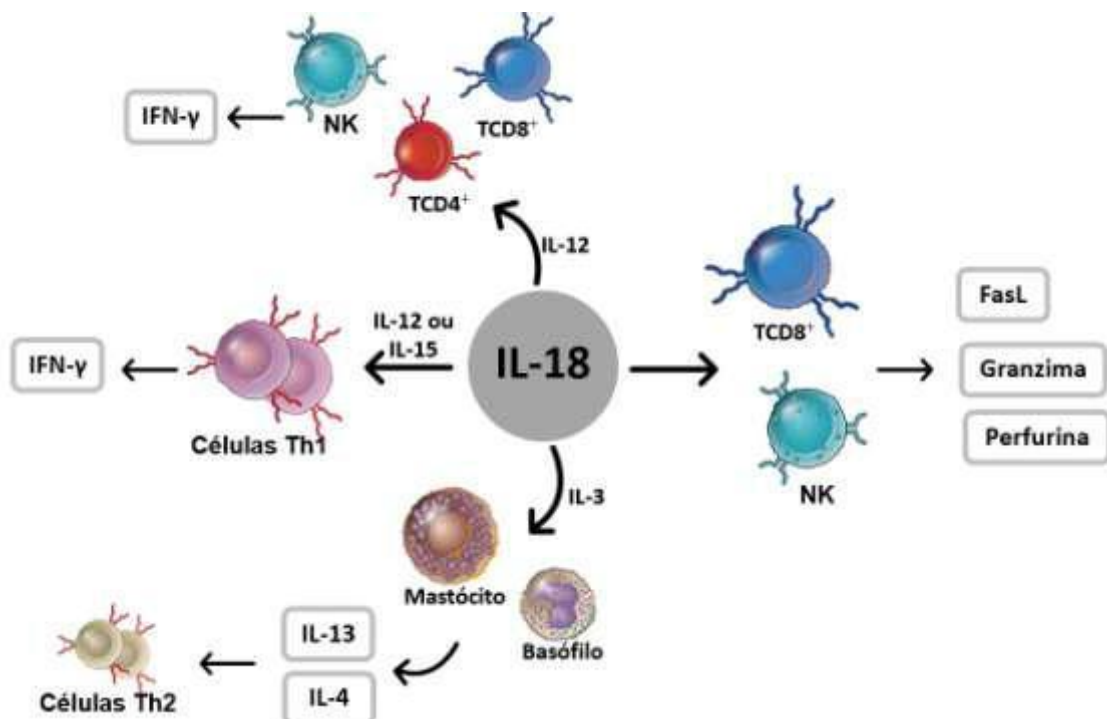
20 A sinalização mediada por IL-18 é responsável pela indução de vários fatores  
 21 inflamatórios envolvidos nas respostas imunes inatas e adaptativas. IL-18 é uma  
 22 citocina envolvida na ativação e diferenciação de populações de células T, com  
 23 importante defesa contra patógenos intracelulares pela indução da produção de IFN-

1  $\gamma$  e da resposta imune mediada por células T auxiliares 1 (Th1 - do inglês *T helper*  
2 *cell*) (CHAIX et al., 2008; KAPLANSKI, 2018).

3 IL-12 ou IL-15 regula positivamente a expressão de IL-18R $\alpha$ , em células Th1,  
4 essencial para a transdução de sinal de IL-18. Deste modo, IL-18 na presença de IL-  
5 12 ou IL-15, induz uma resposta antiviral por meio da indução de IFN- $\gamma$  (NAKANISHI  
6 et al., 2001a). IL-18 e IL-12, em combinação, atuam em células T CD4 $^{+}$ , células T  
7 CD8 $^{+}$  e células *Natural Killer* (NK) para induzir a produção de IFN- $\gamma$ , pela indução da  
8 ativação simultânea de NF- $\kappa$ B por IL-18 e STAT-4 por IL-12 (DINARELLO et al.,  
9 2013; NAKANISHI et al., 2001a).

10 Sem a presença de IL-12 ou IL-15, IL-18 em combinação com IL-3, estimula  
11 basófilos e mastócitos a produzir em IL-4 e IL-13 que desencadeiam uma resposta  
12 tipo Th2 (NAKANISHI et al., 2001a)

13 IL-18 também regula positivamente a citotoxicidade em células NK e células T  
14 CD8 $^{+}$  com Fas-ligante (FasL) que pode induzir a apoptose em células alvo que  
15 expressam Fas, ou por meio de perforina formadora de poros na célula alvo e  
16 granzimas participam diretamente da morte de células-alvo (KÄGI et al., 1996;  
17 TSUTSUI et al., 1996). A Figura 5 apresenta a representação esquemática das  
18 principais atividades funcionais da IL-18.



19

20 **Figura 5 – Representação esquemática das atividades funcionais da IL-18.** IL-18 com IL-12 ou  
21 IL-15 induz a produção de IFN- $\gamma$  por células Th1, e IL-18 com IL-12 induz a liberação IFN- $\gamma$  por  
22 células T CD8 $^{+}$ , T CD4 $^{+}$  e NK. IL-18 regula positivamente a citotoxicidade em células T CD8 $^{+}$  e NK. Em  
23 basófilo e mastócitos, IL-18 induz a produção de IL-4 e IL-13 e desencadeia resposta tipo Th2.

1 **Legenda:** *T helper cell* (Th)-1 e (Th)-2, interferon (IFN)- $\gamma$ , *Natural Killer* (NK) e interleucina (IL)-18.  
2 **Fonte:** o próprio autor.

3  
4  
5 Outros mediadores induzidos por IL-18 incluem óxido nítrico  
6 induzível, ciclooxigenase-2, citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, quimiocinas IL-8,  
7 MCP-1 e proteína inflamatória de monócito-1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ), molécula de adesão  
8 intercelular 1 (ICAM-1) e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos  
9 (GM-CSF) (DINARELLO, 1998; KOHKA et al., 1998; NAKANISHI et al., 2001a;  
10 OLEE et al., 1999). Segundo Valero e colaboradores (2019), o aumento dos níveis  
11 ferritina e IL-18 foram associados com a gravidade da dengue em crianças  
12 infectadas com diferentes sorotipos do vírus da dengue e, sugere que IL-18 /  
13 ferritina poderia ser um biomarcador para infecção viral.

#### 14 15 1.4 IL-18 E COVID-19

16  
17 O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do organismo frente a  
18 estímulos estranhos como lesões, inflamações, danos celulares ou microrganismos  
19 invasores (CRUVINEL et al., 2010). Para que essa resposta seja eficaz, o sistema  
20 imune possui uma série de barreiras, células fagocíticas e proteínas sanguíneas,  
21 que farão o reconhecimento, liberação de citocinas, quimiocinas, assim como  
22 fiscalização ou início de uma resposta imunológica mais especializada, denominada  
23 resposta imune adaptativa (CRUVINEL et al., 2010).

24 A SDRA, a forma mais grave de lesão pulmonar aguda, é uma síndrome que  
25 carece de tratamentos específicos e ausência de biomarcadores, sendo o  
26 diagnóstico baseado em uma combinação de manifestações clínicas. Acomete cerca  
27 de 15% dos pacientes sintomáticos, com alta taxa de internação em UTI e  
28 mortalidade (CALADO; SANTANA; CROVELLA, 2021; FAN; BRODIE; SLUTSKY,  
29 2018).

30 A doença grave na COVID-19 está ligada a uma resposta inflamatória  
31 excessiva exuberante, incluindo o nível elevado de citocinas pró-inflamatórias,  
32 proteína C reativa (PCR), dímero-D, ferritina, lactato desidrogenase (LDH), razão  
33 neutrófilo/linfócito (NLR), procalcitonina, alanina aminotransferase (ALT), enquanto  
34 que linfopenia, hipoalbuminemia e trombocitopenia também são achados  
35 importantes na gravidade da COVID-19 (CHEN et al., 2020a; JIANG et al., 2020;

1 MOORE; JUNE, 2020; QIN et al., 2020; RUAN et al., 2020; XU et al., 2020). Um  
2 aumento repentino da inflamação é característico da transição de doença leve para  
3 doença grave ou crítica da COVID-19, provocada por uma tempestade de citocinas  
4 (CARICCHIO et al., 2021).

5 Nas infecções virais, a atividade excessiva do inflamassoma desempenha um  
6 papel fundamental nessa patogênese, resultando em inflamação destrutiva e  
7 sistêmica nos pacientes com COVID-19 (SAEEDI-BOROJENI et al., 2021b).  
8 Células como monócitos, macrófagos e células dendríticas são sentinelas e acionam  
9 o sistema imune inato ao detectar infecção invasiva e ativam o inflamassoma, esse  
10 por sua vez constitui um mediador importante da inflamação liberando citocinas  
11 como IL-18 (DINARELLO, 2009; LIU et al., 2021).

12 Em um estudo realizado por Junqueira e colaboradores (2021), marcadores  
13 específicos da piroptose, dentre eles LDH, IL-1RA, IL-18 e gasdermina D foram  
14 associados com a gravidade da infecção por SARS-CoV-2, uma vez que se  
15 apresentam elevados no plasma de pacientes graves quando comparados com  
16 aqueles com doença leve ou moderada.

17 Segundo Rodrigues e colaboradores (2020), em um estudo que analisou  
18 níveis séricos de IL-18 de pacientes COVID-19 e indivíduos saudáveis, encontraram  
19 níveis séricos elevados de caspase-1 ativa e IL-18, sugerindo assim que o  
20 inflamassoma é ativado em pacientes com infecção por SARS-CoV-2. Uma  
21 associação entre os níveis séricos de IL-18 e de IL-6 foi encontrada, e níveis séricos  
22 de IL-18 estão associados a biomarcadores inflamatórios como PCR, LDH e ferritina  
23 na COVID-19 (RODRIGUES et al., 2021).

24 As concentrações de IL-18 também se associam com marcadores de lesão  
25 orgânica dentre eles creatinina, enzimas hepáticas e troponina, sugerindo a sua  
26 contribuição para falência de múltiplos órgãos na infecção por SARS-CoV-2, o que  
27 indica que produção exacerbada de IL-18, se relaciona a gravidade da COVID-19 e  
28 pior prognóstico, o inflamassoma do receptor do tipo NOD, domínio pirina contendo  
29 a proteína 3 (NLRP3) não só é ativado, mas também desempenha um papel  
30 importante na progressão da COVID-19 (LUCAS et al., 2020; RODRIGUES et al.,  
31 2020; SATIŞ et al., 2021).

32

33

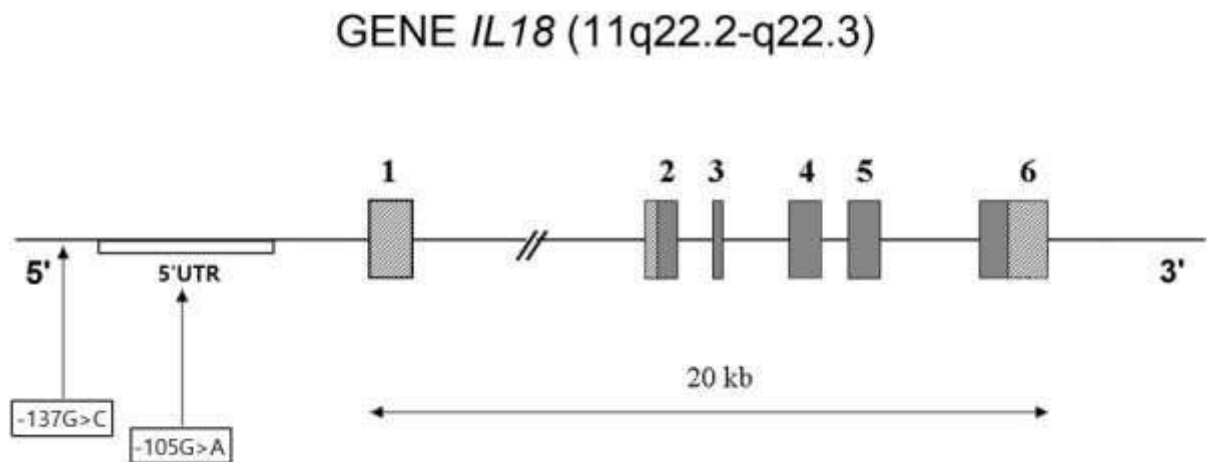
34

## 1 1.5 VARIANTES GENÉTICAS *IL18*-105G>A E *IL18*-137G>C

2

3 O gene *IL18* humano compreende seis exons e cinco íntrons e está localizado  
4 no cromossomo 11 em 11q22.2-q22.3, com um comprimento total de,  
5 aproximadamente, 19,5 kilobase (kb) e codifica a citocina pró-inflamatória IL-18  
6 (LEBEL-BINAY et al., 2000; NOLAN; GREAVES; WALDMANN, 1998). A IL-18  
7 desempenha um papel crítico na inflamação crônica, doenças autoimunes e em  
8 doenças infecciosas (MOTAVAF; SAFARI; ALAVIAN, 2014; PIZARRO et al., 1999;  
9 SAHOO et al., 2011; TANAKA et al., 2001).

10 A variante genética *IL18*-105G>A está localizada na região 5' não traduzida  
11 (5'UTR) do gene *IL18*, enquanto a variante *IL18*-137G>C está localizada na região  
12 promotora do gene *IL18* e parece influenciar o nível de produção da IL-18  
13 (BARBAUX et al., 2007; KHRIPKO et al., 2008). A Figura 6 apresenta o diagrama do  
14 gene *IL18* e a localização das variantes genéticas *IL18*-105G>A e *IL18*-137G>C no  
15 gene.



16

17 **Figura 6 – Diagrama do gene *IL18* e a localização das variantes genéticas *IL18*-105G>A e *IL18*-**  
18 **137G>C.** O gene *IL18* está localizado no cromossomo 11 em 11q22.2-q22.3, com um comprimento  
19 total de, aproximadamente 20 kilobase (Kb). A variante genética *IL18*-105G>A está localizada na  
20 5'UTR, enquanto a variante *IL18*-137G>C está localizada na região promotora do gene *IL18*.  
21 **Legenda:** região 5' não traduzida (5'UTR), kilobase (Kb). **Fonte:** adaptado de Tired e colaboradores  
22 (2005).

23

24 Em 2001, Giedraitis e colaboradores, observaram que a mudança de G para  
25 C na posição -137 alterou o local de ligação do fator 1 de transcrição específico do  
26 gene da histona H4 (H4TF-1), para um local de ligação desconhecido em GM-CSF,  
o que pode influenciar a expressão de *IL18* e alterar a produção da citocina.

27

Em um estudo relacionando a variante *IL18*-137G>C e o nível de produção

1 de IL-18 estimulada por lipopolissacarídeos, foi relatado que alelo G está associado  
2 ao aumento da produção espontânea e estimulada de IL-18 por células  
3 mononucleares periféricas isoladas de indivíduos saudáveis (KHRIPKO et al., 2008).  
4 Em concordância com esse estudo, Arimitsu e colaboradores (2006), mostraram que  
5 essa variante influencia a produção de IL-18 por monócitos, e a produção  
6 espontânea e estimulada por lipopolissacarídeos de IL-18 foi maior no genótipo  
7 *IL18-137GG* do que naqueles com o genótipo *IL18-137CG* em indivíduos  
8 saudáveis.

9 A infecção por SARS-CoV-2 leva a danos de pneumócitos tipo II que  
10 resultam na produção de citocinas pró-inflamatórias (RAHMAN et al., 2021).  
11 Portanto, variantes genéticas das citocinas pró-inflamatórias e outros genes  
12 relacionados são importantes nas respostas inflamatórias e imunes (RAHMAN et al.,  
13 2021).

14 Não encontramos na literatura, até o presente momento, estudos que  
15 abordem as variantes *IL18-105G>A* e *IL18-137G>C* na infecção por SARS-CoV-2.  
16 Entretanto, *IL18-137G>C* do *IL18* foi associada a outras doenças como colite  
17 ulcerativa (BEN ALEYA et al., 2011), diabetes mellitus tipo 1 (DM1) (KRETOWSKI et  
18 al., 2002; TAVARES et al., 2013) e tuberculose (ZHOU et al., 2015). E escassos  
19 estudos avaliaram *IL18-105G>A* e a suscetibilidade a doenças; dentre os estudos  
20 estão a relação entre o esta variante e carcinoma papilífero de tireoide, aborto  
21 idiopático recorrente e aborto espontâneo recorrente (AL-KHATEEB et al., 2011;  
22 CHUNG et al., 2015; MESSAOUDI et al., 2012).

23 Chung e colaboradores (2015) analisaram a correlação entre a variante do  
24 *IL18-105G>A* com carcinoma papilífero de tireoide em 94 pacientes e 260 indivíduos  
25 livres de neoplasia, na população sul coreana, e constataram que essa variante  
26 estava associado a diminuição do risco de metastáse.

27 Em 2005, Takagawa e colaboradores avaliaram *IL18-137G>C* e sua  
28 associação com colite ulcerativa e doença de Crohn em uma amostra da população  
29 japonesa, que incluiu 205 pacientes com doença de Crohn, 210 com colite ulcerativa  
30 e 212 indivíduos saudáveis. Para colite ulcerativa, a presença do alelo C foi  
31 significativamente maior nos pacientes com proctite do que nos controles, da mesma  
32 forma, a frequência do genótipo GC. Entretanto, a variante em questão não está  
33 associada à doença, mas parece estar relacionada à extensão da colite ulcerativa.

1           Tavares e colaboradores (2013) avaliaram, na população brasileira, a  
2   associação de três variantes genéticas (-656 C>A rs1946519, -607 G>T rs1946518, -  
3   137G>C rs187238) do *IL18* em 181 pacientes com DM1 e 122 indivíduos saudáveis.  
4   Em relação a variante *IL18-137G>C*, alelo G foi associado a suscetibilidade de  
5   desenvolver DM1, com 1,8 vezes mais suscetíveis ao início de DM1.

6           Em uma metanálise que correlacionou estudos com a variante *IL18-137G>C*  
7   e a predisposição a doença inflamatória intestinal (DII), foram incluídos seis estudos  
8   e as análises quantitativas combinadas demonstraram que a variante *IL18-137G>C*,  
9   foi significativamente associada à predisposição a doença de Crohn no modelo  
10  dominante, mas isso não foi observado para a colite ulcerativa (SU; ZHAO, 2020).

11          Diante deste cenário, variantes na região promotora do *IL18* são fortes  
12  candidatas devido a seu impacto na produção de IL-18, e consequentemente, pode  
13  estar relacionada a fisiopatologia da COVID-19. A tabela 2 e 3 sintetizam os dados  
14  de diversos estudos que avaliaram a variante *IL18-137G>C* e *IL18-105G>A*,  
15  respectivamente, e a suscetibilidade a doenças inflamatórias, autoimunes, assim  
16  como aborto idiopático recorrente e aborto espontâneo recorrente. Os resultados  
17  conflitantes podem ser explicados pelo tamanho das amostras, pelo método de  
18  genotipagem e pelas diversas etnias.

**Tabela 2** – Variante *IL18-137G>C* avaliada em pacientes com doenças autoimunes e inflamatórias.

<b>Estudo (país)</b>	<b>População</b>	<b>Amostra</b>	<b>Frequência Alélica</b>	<b>Efeito</b>
Ben Aleya e colaboradores (2011) (Tunisia)	Africana	Casos: 105 Controles: 100	Caso: C=0,40 / G=0,60 Controle: C=0,40 / G=0,60	Não houve associação da variante com doença de Crohn.
Ben Aleya e colaboradores (2011) (Tunisia)	Africana	Casos: 59 Controles: 100	Caso: C=0,34 / G=0,66 Controle: C=0,40 / G=0,60	Genótipo <i>IL18-137GG</i> foi mais frequente em pacientes com colite ulcerativa do que em controles (OR:1,99, IC 95%: 0,98-4,05, p=0,038).
Takagawa e colaboradores (2005) (Japão)	Asiática	Casos: 210 Controles: 212	Caso: C=0,11 / G=0,89 Controle: C=0,11 / G=0,89	Não houve associação da variante com colite ulcerativa. Porém, o alelo C <i>IL18-137G&gt;C</i> relacionado a extensão da doença (OR: 2,39, IC 95%: 1,32-4,33, p =0,0068).
Aizawa e colaboradores (2005) (Japão)	Asiática	Casos: 99 Controles: 102	Caso: C=0,10 / G=0,90 Controle: C=0,12 / G=0,88	Não houve associação com colite ulcerativa.
Aizawa e colaboradores (2005) (Japão)	Asiática	Casos: 79 Controles: 102	Caso: C=0,17 / G=0,83 Controle: C=0,12 / G=0,88	Não houve associação com doença de Crohn.
Huang e colaboradores (2016) (China)	Asiática	Casos: 58 Controles: 113	Caso: C=0,21 / G=0,79 Controle: C=0,13 / G=0,87	Não houve associação com esclerose sistêmica.
Hadžija e colaboradores (2013) (Croácia)	Europeia	Casos:187 Controles: 236	Caso: C=0,30 / G=0,71 Controle: C=0,33 / G=0,67	Não houve associação com DM1.
Kretowski e colaboradores (2002) (Polônia)	Europeia	Casos: 201 Controles: 194	Caso: C=0,38 / G=0,62 Controle: C=0,27 / G=0,73	O genótipo -137GC está associado a suscetibilidade genética a DM1 (p=0,0015). O alelo C papel na predisposição ao DM1 (p=0,002).

**Continuação tabela 3** – Variante *IL18-137G>C* avaliada em pacientes com doenças autoimunes e inflamatórias.

Estudo (país)	População	Amostra	Frequência Alélica	Efeito
Tavares e colaboradores (2013) (Brasil)	América latina	Casos: 181 Controles: 122	Caso: C=0,29 / G=0,71 Controle: C=0,44 / G=0,56	O alelo G foi associado com suscetibilidade a DM1 (OR: 1,96, IC 95%: 1,37-2,80, p=0.0001), esse alelo aumenta em 1,8 vezes a suscetibilidade surgimento de DM1 (OR: 1,82, IC 95%: 1,24-2,69, p=0,0015).
Htoon e colaboradores (2011) (Turquia)	Europeia	Casos: 189 Controles: 253	Caso: C=0,19 / G=0,81 Controle: C=0,20 / G=0,80	Não houve associação com LES.
Hirankarn e colaboradores (2009) (Tailândia)	Asiática	Casos: 116 Controles: 142	Caso: C=0,15 / G=0,85 Controle: C=0,15 / G=0,85	Não houve associação com LES. O alelo C foi associado com artrite no LES (OR: 6,88, IC 95%: 1,54-42,93, p=0,003).
Rueda e colaboradores (2005) (Espanha)	Europeia	Casos: 362 Controles: 339	Caso: C=0,28 / G=0,72 Controle: C=0,27 / G=0,73	Não houve associação com AR.

LES: lúpus eritematoso sistêmico, AR: artrite reumatoide, DM1: diabetes mellitus tipo 1, VHS: velocidade de hemossedimentação. **Fonte:** o próprio autor.

**Tabela 4** – Variante *IL18-105G>A* em pacientes com aborto idiopático recorrente e aborto espontâneo recorrente.

<b>Estudo (país)</b>	<b>População</b>	<b>Amostra</b>	<b>Frequência Alélica</b>	<b>Efeito</b>
Messaoudi e colaboradores (2012) (Tunisia)	Africana	Casos: 235 Controles: 235	Caso: A=0,49/G=0,51 Controle: A=0,30/G=0,70	O alelo A foi significativamente associado com aborto idiopático recorrente (OR: 2,18, IC 95%: 1,70-2,78, $p<0,001$ ).
Al-Khateeb e colaboradores (2011) (Barém)	Asiática	Casos: 282 Controles: 283	Caso: A=0,48/G=0,52 Controle: A=0,30/G=0,70	Foi significativamente associado ao aborto espontâneo recorrente, independentemente do modelo genético usado, dominante ( $p<0,001$ ) ou recessivo ( $p=0,007$ ).

**Fonte:** o próprio autor.

A participação dessas variantes genéticas na patogenese da COVID-19 ainda permanecem desconhecidas; porém, a associação destas com outras doenças podem sugerir uma possibilidade dessas variantes estarem associadas também a infecção por SARS-CoV-2. Com isso, poderíamos extrapolar esse conhecimento para o desfecho no paciente com COVID-19.

## 2 JUSTIFICATIVA

Diante da fisiopatologia complexa da COVID-19, o estudo das variantes genéticas do *IL18* permite avaliar sua associação com diferentes evoluções clínicas dos pacientes com infecção por SARS-COV-2. Até a presente data, não conhecemos estudos que tenham avaliado as variantes *IL18-105G>A* (rs360717) e *IL18-137C>G* (rs187238) na COVID-19. Essas variantes são localizadas em regiões importantes do gene, podendo estar relacionadas a modificação da expressão de *IL18* e, conseqüentemente, influenciar o nível de produção da citocina IL-18. Pacientes com COVID-19 possuem níveis plasmáticos elevados dessa citocina, que está associado a gravidade da COVID-19. Além disso, fatores prognósticos são importantes para identificação precoce de pacientes que podem evoluir pior, necessitando de tratamento individualizado. Deste modo, estudos de modelos preditivos para prognóstico e desfecho da COVID-19, são de suma importância. Pela falta de estudos dessas variantes genéticas e a importância desses genes na regulação do IL-18, nossos resultados podem contribuir para a compreensão da heterogeneidade clínica e correlação na gravidade e desfecho em uma amostra da população brasileira de pacientes com COVID-19.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as variantes genéticas *IL18-105G>A* e *IL18-137C>G* e suas associações com a gravidade e mortalidade da COVID-19, bem como sugerir modelos preditores para prognóstico e mortalidade em pacientes com COVID-19.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a frequência dos genótipos das variantes *IL18-105G>A* e *IL18-137C>G* em pacientes com COVID-19 com diferentes graus de gravidade.
- Avaliar modelos dominante, overdominante e recessivo das variantes do gene *IL18* com a gravidade da infecção por SARS-CoV-2.
- Propor modelos de biomarcadores que possam prever prognóstico e mortalidade em pacientes com COVID-19.

## 4 SUJEITOS E MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) sob o parecer de aprovação número CAAE: 31656420.0.0000.5231 (ANEXO A). Os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa, informados sobre o estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A).

### 4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM

Trata-se de um estudo do tipo transversal com 528 pacientes com diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2, de ambos os sexos, com idade entre 19 a 100 anos, atendidos no Hospital Universitário de Londrina e Unidade de Pronto Atendimento (UPA), da cidade de Londrina, Paraná. O diagnóstico de COVID-19 foi realizado por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Via Transcriptase Reversa (RT-qPCR). Os pacientes foram classificados em três grupos de acordo com a gravidade da doença dos quais 157 classificados como leve, 63 moderado e 308 grave, seguindo os critérios de classificação da OMS (2021). Os dados demográficos, epidemiológicos e antropométricos dos pacientes, bem como a história clínica foram obtidos por meio de um questionário padrão na admissão dos indivíduos (APÊNDICE B). O índice de massa corporal (IMC) foi calculado como peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado. Os critérios de inclusão foram pacientes de ambos os sexos e maiores de 18 anos. Os critérios de exclusão foram a presença de infecções agudas e crônicas, câncer e doenças autoimunes.

### 4.3 COLETA DE SANGUE E EXAMES BIOQUÍMICOS

Os pacientes foram submetidos a uma coleta sangue periférico utilizando tubos estéreis à vácuo sem coagulante ou contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 10 mL e 10 mL, respectivamente. As amostras foram encaminhadas ao laboratório para a realização do cadastro, processamento,

separação e armazenamento. O material foi centrifugado a 3.000 r.p.m. por 15 minutos e alíquotas do soro, plasma e *buffy-coat* foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises, quando as amostras não eram analisadas no mesmo dia.

O biomarcador inflamatório PCR foi determinado com ensaio de alta sensibilidade usando turbidimeria (*Architect C8000*, Abbott Laboratory, Illinois, EUA); os níveis de ferritina foram determinados por imunoensaio quimioluminescente (*Alinity i*, Abbott, Illinois, EUA) e as análises hematológicas (plaquetas, neutrófilos, linfócitos e leucócitos totais) foram determinadas por dispersão de luz e análise de fluorescência (*BC-6800 Mindray*, Nanshan, China).

#### 4.4 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico foi extraído do *buffy-coat* de células do sangue periférico com o Kit Biopur Mini Spin Plus (Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria em aparelho NanoDrop 2000c® *Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*, Wilmington, EUA) a 260 nm; a pureza do DNA foi avaliada pela razão 260/280 nm e o material armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.5 GENOTIPAGEM DE *IL18-105G>A* E *IL18-137C>G*

As variantes do gene *IL18* localizados no cromossomo 11 foram genotipadas, uma na região 5'UTR *IL18-105G>A* (rs360717) na posição 112164002 e outra na região promotora *IL18-137C>G* (rs187238) na posição 112164265, de acordo com o listado no banco de dados internacional.

As variantes *IL18-105G>A* (rs360717) e *IL18-137C>G* (rs187238) foram avaliadas por reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR) pelo método de TaqMan®. Foram utilizados ensaios validados (C\_\_2898462\_10, C\_\_2408543\_10, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA, respectivamente) com *primers* específicos e sondas fluorescentes para determinação dos possíveis genótipos [VIC/FAM] *IL18-137C>G* [VIC/FAM] (TGT AAT ATC ACT ATT TTC ATG AAA T[C/G]T TTT CTT CCG TAA AAG TTG GGG CTC) and *IL18-105G>A* [VIC/FAM] (GTG TAG ACT GCA GCA GGT GGC AGC C[A/G]C TTT AGC AGC CAG AGT TGG CAG CCA). O ensaio foi realizado

utilizando 0,25  $\mu$ L de *Taqman SNP Genotyping Assay 40X* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) contendo dois *primers* e duas sondas TaqMan® MGB alelo-específicas com um corante repórter na extremidade 5' (VIC® ou FAM®), 5  $\mu$ L de *TaqMan Universal Genotyping Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e 5 ng de DNA genômico. Os níveis de fluorescência foram avaliados pelo termociclador QuantStudio™ 6 Flex (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis categóricas foram expressas como número (n) e porcentagem (%) e as variáveis contínuas foram expressas como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Transformações logarítmias (Ln) ou de raiz quadrada de dados contínuos foram usadas para normalizar a distribuição de dados ou para ajustar a heterogeneidade de variância entre os grupos de estudo (conforme avaliado com o teste de Levene). A análise das tabelas de contingência foi feita por meio do teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) (ou teste exato de Fisher, quando apropriado) ou análise de variância (F) para verificar as associações entre as variáveis categóricas. A análise de regressão logística binária automática *stepwise* entre as variáveis dependentes e exploratórias, permitindo os possíveis efeitos das variáveis explicativas, controlando possíveis efeitos de variáveis como idade, sexo e etnia. Os resultados foram expressos como *Odds ratio* (OR) ajustado com o intervalo de confiança (IC) de 95% correspondente. Os valores de Nagelkerke foram usados como tamanhos de efeito pseudo  $R^2$  e a precisão com sensibilidade e especificidade foram calculadas em todas as análises de regressão. A análise de regressão múltipla automática foi usada para prever variáveis de escala dependentes com base em biomarcadores e dados demográficos (SpO<sub>2</sub>, CCTA, índice de inflamação, variantes genéticas, idade, sexo, IMC e assim por diante) ao avaliar as alterações de  $R^2$ , homocedasticidade (usando teste de White e Breusch-Pagan modificado para homocedasticidade), multicolinearidade (usando tolerância e VIF) e normalidade multivariada (distância de Cook). Usamos um método automático *stepwise (step-up)* com 0,05 p-para-entrar e 0,06 p-para-remover. Os resultados dessas análises de regressão foram sempre bootstrapped com 5.000 amostras *bootstrap*, e os últimos resultados são exibidos se

os resultados não forem concordantes. Todos os testes foram bicaudais e um nível alfa de 0,05 indicou resultados estatisticamente significativos. Construímos um índice z de inflamação de hsCRP (zCRP) + z ferritina + z NLR.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta dissertação foram apresentados e discutidos em um artigo científico intitulado: “**Protective effects of *IL18-105G>A* and *IL18-137C>G* genetic variants on severity of COVID-19**”.

## 6 ARTIGO

### **Protective effects of *IL18-105G>A* and *IL18-137C>G* genetic variants on severity of COVID-19**

Mayara Tiemi Enokida Mori<sup>1</sup>, Andréa Name Colado Simão<sup>1,2</sup>, Tiago Danelli<sup>1</sup>, Sayonara Rangel Oliveira<sup>2</sup>, Pedro Luis Candido de Souza Cassela<sup>1</sup>, Guilherme Lerner Trigo<sup>1</sup>, Kauê Cardoso<sup>1</sup>, Alexandre Mestre Tejo<sup>3</sup>, Zuleica Naomi Tano<sup>3</sup>, Elaine Regina Delicato de Almeida<sup>1,2</sup>, Edna Maria Vissoci Reiche<sup>1</sup>, Michael Maes<sup>4,5</sup>, Marcell Alysson Batisti Lozovoy<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Research in Applied Immunology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

<sup>2</sup>Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Laboratory of Research in Applied Immunology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

<sup>3</sup>Department of Medical Clinic, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

<sup>4</sup>Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

<sup>5</sup>IMPACT Strategic Research Centre, School of Medicine, Deakin University, Geelong, VIC, Australia.

\* Corresponding author: [deianame@uel.br](mailto:deianame@uel.br)

Postal address: Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – Rua Robert Koch, n 60. University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86038-440. Tel.: +55- 43-3371-2321; Fax: +55-43-3371-2619.

## ABSTRACT

**Introduction:** Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is characterized by a strong inflammatory process including increased interleukin-18 (IL-18).

**Objective:** To delineate the effects of *IL18-105G>A* (rs360717) and *IL18-137C>G* (rs187238) variants on COVID-19.

**Subjects and Methods:** This cross-sectional study recruited 528 COVID-19 patients, 157 with mild, 63 moderate and 308 critical COVID-19 (assessed using the World Health Organization classification). The *IL18-105G>A* and *IL18-137C>G* variants were determined using real time polymerase chain reaction.

**Results:** *IL18-105G>A* was significantly associated with the severe subtypes (moderate + critical) versus mild COVID-19, with significant effects of the GA genotype in the co-dominant model [Odds ratio (OR): 0.55, 95% confidence interval (CI): 0.34-0.89,  $p=0.015$ ], overdominant model (OR: 0.56, 95% CI: 0.35-0.89,  $p=0.014$ ) and the AA+GA genotypes in a dominant model (OR: 0.60; 95% CI: 0.38-0.96,  $p=0.031$ ). *IL18-137GC* was also significantly associated with both severe subtypes, with significant effects in the co-dominant model (OR: 0.55, 95% CI: 0.34-0.89,  $p=0.015$ ), overdominant model (OR: 0.57, 95% CI: 0.36-0.91,  $p=0.018$ ) and in the GG+CG genotypes in a dominant model (OR: 0.59, 95% CI: 0.37-0.93,  $p=0.025$ ). *IL18-105 GA* coupled with age, chest CT scan alteration, body mass index, heart diseases, type 2 diabetes mellitus, hypertension, and inflammation may be used to predict who will develop moderate or critical disease with an accuracy of 84.3% (sensitivity: 83.3% and specificity: 86.5%).

**Conclusion:** The *IL18-105G>A* and *IL18-137C>G* variants contribute significantly to COVID-19 severity. The latter association may be explained by the effects of *IL18-137C>G* modulating IL-18 production and Th1-mediated immune responses.

**Keywords:** COVID-19, *IL18*, inflammation, inflammasome, CRP, biomarkers, oxygen saturation, chest CT scan abnormalities

## Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is an infectious viral disease caused by a new and highly pathogenic virus called severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (GORBALENYA et al., 2020). It emerged in Wuhan, Hubei Province, China, in December 2019, causing a clinical syndrome with pneumonia-like symptoms (ZHU et al., 2020). SARS-CoV-2 has rapidly spread across the globe, with more than 180 million confirmed cases worldwide resulting in almost 4 million fatal cases, in late June, 2021 (WHO, 2021). The highest mortality risk was observed in patients with advanced age, male sex, current smoking status, obesity, preexisting comorbidities (chronic kidney, respiratory, diabetes mellitus and cardio cerebrovascular diseases) (RAEISI et al., 2021; SHI et al., 2021).

SARS-CoV-2 infection is accompanied by activation of immune-inflammatory pathways including increased plasma levels of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, IL-18, IL-10, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (HUANG et al., 2020; QIN et al., 2020; YANG et al., 2020). Exuberant cytokine production, named “cytokine storm”, is thought to be the main cause of tissue injury leading to acute respiratory distress syndrome (ARDS), multi-organ failure and death in COVID-19 (YANG et al., 2020). High serum levels of IL-18 are associated with disease severity and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome are highly active in patients with severe infection (BERG; VELDE, 2020; JUNQUEIRA et al., 2021; RODRIGUES et al., 2021). In the early stages of viral infections, IL-18 induces the production of interferon (IFN)- $\gamma$ , which is important in the host defense against infections (LAGUNAS-RANGEL; CHÁVEZ-VALENCIA, 2020; PROMPETCHARA; KETLOY; PALAGA, 2020). Markedly elevated serum IL-18 levels are associated with severe disease and mortality in some viral infections characterized by cytokine storm (VALERO et al., 2019).

In addition, one study reported that serum IL-18 levels were significantly higher in COVID-19 patients compared to healthy subjects, with the highest levels in patients with severe pneumonia (SATIŞ et al., 2021). These authors showed that IL-18 serum concentrations were almost four-fold higher in patients with worse outcome compared to those with good outcome. Genetic variants may be associated with altered host responsivity because single nucleotide variants (SNVs) can impact gene

expression and change serum protein levels (AZEVEDO et al., 2021; LANDER, 2011; SHEN et al., 2019). SNVs in the promoter region of the *IL18* gene can influence protein expression and could play a role in the physiopathology of COVID-19 (BARBAUX et al., 2007; GIEDRAITIS et al., 2001; ZHOU et al., 2015). There is an increasing number of association with the genetic variants located on promoter regions of the *IL18* gene in other diseases, such as ulcerative colitis (BEN ALEYA et al., 2011), type 1 diabetes mellitus (KRETOWSKI et al., 2002; TAVARES et al., 2013) and tuberculosis (ZHOU et al., 2020). However, to date, there are no studies which have evaluated *IL18* genetic variants in patients with COVID-19 and their association with disease severity.

The clinical manifestations of COVID-19 are very heterogeneous, although most of the patients have mild clinical course, some have severe pneumonia with high mortality rate requiring intensive care unit (ICU) treatment (BASTUG et al., 2020). Therefore, predictive models that combine several variables or features to estimate the severity of the COVID-19 and the increased risk of dying from the infection could assist medical staff in screening patients when allocating limited healthcare resources (WYNANTS et al., 2020). In addition, models that predict the disease course may be of great utility for personalized treatments, monitoring clinical progress, and allocating proper resources at all levels of care to mitigate morbidity and mortality (MARIN et al., 2021).

Hence, the main aim in the present study was to delineate the associations between the *IL18*-105G>A (rs360717) and *IL18*-137C>G (rs187238) genetic variants and severity of COVID-19 including the increased mortality due to COVID-19.

## **Subjects and Methods**

This cross-sectional study consisted of 528 COVID-19 patients treated at the University Hospital of Londrina (HU) and Emergency Rooms (ER) in Londrina, Paraná, Brazil. COVID-19 clinical severity was assessed using the WHO classification, 157 were classified as mild, 63 as moderate and 308 as critical (WHO, 2021). Patients were followed up until the end of the infection: cure or death. Inclusion criteria were patients of both sexes and over 18 years of age. Exclusion criteria were the presence of acute and chronic infections, cancer and autoimmune diseases.

The protocol was approved by the Institutional Research Ethics Committee of the State University of Londrina, Paraná, Brazil (CAAE:31656420.0.0000.5231) and all of the individuals invited were informed in detail about the research and gave written informed consent.

#### *Demographic, clinical and laboratory data*

Demographic, epidemiological and anthropometric data for patients, as well as clinical history, comorbidities, and drug treatments were obtained using a standard questionnaire at the admission. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared and the ethnicity was self-reported as Caucasian and non-Caucasian.

The measurement of SpO<sub>2</sub> were obtained by pulse oxymetry at admission and after that, a arterial blood gas to obtain a O<sub>2</sub> saturation.

Venous blood collection (20 mL) was performed at infection onset with EDTA anticoagulant and clot activator or serum Vacutainer System tubes (Becton-Dickinson, New Jersey, U.S). Plasma, serum and buffy coat were stored at -80°C until the analyzed. The inflammatory biomarker C-reactive protein (CRP) was determined with high sensitivity assay (hsCRP) using turbidimetry (Architect C8000, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA) and ferritin levels were determined by chemiluminescent immunoassay (Alinity i, Abbott, Illinois, EUA) e hematology analysis, included white blood cell counts (WBC) and leukocyte differentiation were determined by light scattering and fluorescence analysis (BC-6800 Mindray, Nanshan, China). We also evaluated an inflammation index, computed as a z unit weighted composite score of  $z \text{ hsCRP} + z \text{ ferritin} + z \text{ neutrophil/lymphocyte ratio (NLR)}$ .

#### *Assessment of chest computed tomography (CT) scan abnormalities (CCTA)*

The CCTA were obtained from all subjects at Hospital admission. For all patients noncontrast chest CT were performed on BRIGHTSPEED/ GE 16 channels (GE- Healthcare- America: Milwaukee, USA). The CT features were findings: ground-glass opacities, consolidations with halo sign, presence of nodules, pleural effusion

and lymphadenopathy, and pulmonary involvement divided in 0-25%, 25-50%, 50-75% and more than 75%.

#### *Genomic DNA extraction and IL18 genotyping*

Genomic DNA was extracted from the buffy coat of peripheral blood cells using a resin column procedure (Biopur, Biometrix Diagnostika, Curitiba, Brazil), following the manufacturer's instructions. DNA concentration was measured using a NanoDrop 2000c™ spectrophotometer (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) at 260 nm, and the DNA purity was assessed by 260/280 nm ratio.

*IL18-137C>G* (rs187238) and *IL18-105G>A* (rs360717) variants were determined using real time polymerase chain reaction (qPCR) with the TaqMan® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) method. Validated assays (C\_2408543\_10, C\_2898462\_10, respectively, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) with specific primers and fluorescent probes for the genotype determination *IL18-137C>G* [VIC/FAM] (TGT AAT ATC ACT ATT TTC ATG AAA T[C/G]T TTT CTT CCG TAA AAG TTG GGG CTC) and *IL18-105G>A* [VIC/FAM] (GTG TAG ACT GCA GCA GGT GGC AGC C[A/G]C TTT AGC AGC CAG AGT TGG CAG CCA) were utilized. The level of fluorescence of the qPCR products were evaluated using the Quantum Studio VI (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

#### *Statistical analysis*

Logarithmic (Ln) or square root transformations of continuous data were used to normalize the data distribution or to adjust for heterogeneity of variance between study groups (as assessed with the Levene test). Analysis of contingency tables was performed using Chi-square test ( $\chi^2$ ) (or Fisher exact test, when appropriate) to check the associations between categorical variables, and analysis of variance (F) to assess differences in scale variables between groups. Automatic stepwise binary logistic regression analysis was performed to assess the association between dependent binary and explanatory variables while allowing for the possible effects of background variables including age, sex, and ethnicity. The results were expressed as adjusted odds ratio (OR) with the corresponding 95% confidence interval (CI). Nagelkerke values were used as pseudo  $R^2$  effect sizes and accuracy with sensitivity and specificity were computed in all regression analyses. Automatic multiple

regression analysis was used to predict dependent scale variables based on biomarkers and demographic data (SpO<sub>2</sub>, CCTA, inflammation index, genetic variants, age, sex, BMI, and so on) while assessing R<sup>2</sup> changes, homoscedasticity (using White and modified Breusch-Pagan tests for homoscedasticity), multicollinearity (using tolerance and VIF), and multivariate normality (Cook's distance and leverage). We used an automatic stepwise (step-up) method with 0.05 p-to-enter and 0.06 p-to-remove. The results of these regression analyses were always bootstrapped with 5.000 bootstrap samples, and the latter results are displayed if the results were not concordant. All tests were two-tailed and an alpha level of 0.05 indicated statistically significant results. We constructed an inflammatory index z score of hsCRP (zCRP) +z ferritin + z NLR.

## RESULTS

### *Mild, moderate, and critical COVID-19 infection*

Table 1 shows the differences in socio-demographic and clinical data among COVID-19 patients with mild, moderate, and critical infection. Male sex was significantly higher in those with moderate/critical infection as compared to those with mild infection. Patients with mild COVID-19 infection were significantly younger than patients with moderate/critical infection. BMI was significantly higher in those with moderate/critical infection as compared to those with mild infection, although there was no significant difference in obesity frequency between those groups. The prevalence of hypercholesterolemia, stroke, heart disease, dementia, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and chronic kidney disease (CKD) was significantly higher in patients with critical infection compared with those with mild and moderate infection. The prevalence of hypertension and type 2 diabetes mellitus (T2DM) were higher in patients with moderate and critical symptoms than in those with mild symptoms.

The CCTA and NLR were significantly increased and peripheral capillary oxygen saturation (SpO<sub>2</sub>) was significantly lower in patients with critical infection as compared with those with mild and moderate infection. The inflammation index, hsCRP, and frequency of ICU admission were significantly different between the three study groups and increased according to the severity of infection. The

frequencies of orotracheal intubation and death were significantly higher in COVID-19 patients with critical infection than in those with mild/ moderate infection.

#### *Genotypic distribution and severity of illness*

Table 2 shows the *IL18* genotype distribution in patients with moderate and critical versus mild infection. The two genotype distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium, namely *IL18-105G>A*:  $\chi^2=0.23$ ,  $df=1$ ,  $p=0.135$ ; and *IL18-137C>G*:  $\chi^2=1.48$ ,  $df=1$ ,  $p=0.224$ . Logistic regression analyses showed significant associations between severe+critical COVID-19 (reference group is mild COVID-19) and the *IL18-105G>A* ( $p=0.008$ ) and *IL18-137C>G* ( $p=0.01$ ) variants, and these differences remained significant after false discovery rate p-correction at  $p=0.01$ , and after adjusting for sex, ethnicity and age. Consequently, we have examined the associations between moderate+critical COVID-19 and the genotypes of both variants using different genetic models (Table 2). We observed significant differences in the *IL18-105G>A* overdominant model with a lowered frequency of moderate + critical patients in GA carriers as compared with AA and GG carriers. The GG genotype also showed an increased frequency in moderate and critical patients as compared to AA and GA carriers. *IL18-137C>G* patients showed a lowered frequency of more severe disease when compared with GG+CC genotypes. The CC genotype showed an increased incidence of more severe disease than GG and GC patients. The recessive models did not differ in both *IL18* SNVs ( $p>0.05$ ).

#### *Predictive models of severe illness and death*

Table 3 shows the characteristics of non-survivors and survivors with COVID-19. Non-survivors were significantly older than survivors and showed lower SpO<sub>2</sub> values. Non-survivors showed a significantly higher number of WBCs, NLR, hsCRP, ferritin and inflammation index. They also showed a higher frequency of ICU admission and orotracheal intubation, T2DM, stroke, and CKD.

Table 4, model 1 shows the results of a binary logistic regression analysis with moderate and critical disease as dependent variables and age, sex, ethnicity, genotypes, the inflammation index, CCTA, SpO<sub>2</sub>, BMI, and comorbid disorders as

explanatory variables. We found that moderate and critical disease was best predicted by higher age, more CCTAs, BMI, inflammation, heart disease, hypertension, and T2DM, while the *IL18-105G>A* variant GA genotype was protective; 84.3% of the subjects were correctly classified with a sensitivity of 83.3% and specificity of 86.5%. In Table 4, model 2, death was best predicted (versus no-death) by higher age, dementia, inflammation, lowered SpO<sub>2</sub>, ICU admission, intubation, BMI and severe illness; 85.7% of the subjects were correctly classified with a sensitivity of 83.3% and specificity 86.7%.

## DISCUSSION

The main results of the present study are that the genetic variants of *IL18-105G>A* and *IL18-137C>G* have significant protective effects on severity of COVID-19 (in the overdominant and dominant models). Moreover, we found that *IL18-105GA* (inversely associated) and age, CCTA, BMI, heart diseases, T2DM, hypertension and inflammation index (all positively) may be used to predict who will develop moderate or critical disease. Furthermore, we showed that a combination of increasing age, dementia, inflammation, ICU admission and intubation, BMI and severity of infection, and lowered SpO<sub>2</sub> may be used to predict who will die following COVID-19 infection.

In agreement with previous studies, we found that classic risk factors were associated with moderate and critical infection in the COVID-19 (GAO et al., 2021). Many risk factors have been identified in the progression of COVID-19 into a severe and critical stage, including old age, male sex, underlying comorbidities, such as hypertension, T2DM, chronic lung diseases, heart, liver and kidney diseases (GAO et al., 2021). Older age is associated with more comorbidities, weaker immune defense, and higher levels of proinflammatory cytokines than younger age. The discrepancy of COVID-19 severity between male and female patients can be attributed to the differences in sex hormones involved in inflammatory processes, expressed levels of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), and transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2), a cell surface protein primarily expressed by endothelial cells across the respiratory and digestive tract, and lifestyle (GAO et al., 2021).

COVID-19 severity is linked to higher levels of proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, IL-18, G-CSF, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  (FREEMAN; SWARTZ, 2020). IL-18 is a cytokine that belongs to the IL-1 family and is involved in both innate and adaptive immune responses. The activation of inflammasomes particularly the NOD-, LRR-, and NLRP3 inflammasomes, is required for their stimulation (DAVIS; WEN; TING, 2011). Previous research found that patients with COVID-19 had higher IL-18 levels, which was associated with disease severity (LUCAS et al., 2020; SATI et al., 2021). As a result, the pathophysiology of severe COVID-19 may be influenced by genetic NLRP3 variations that impact cytokine release.

Our results demonstrated that the *IL18-137C>G* and *IL18-105G>A* genetic variants were associated with COVID-19 severity and exert a significant protective effect. Our findings revealed that in the overdominant model, the frequency of the *IL18-137* CG genotype was lower in patients with moderate and severe disease, whereas in the dominant model, the *IL18-137* CC genotype had a higher incidence in patients with moderate and severe disease than those with mild severity. Thus, our results suggested that G allele presence could have a protective effect to COVID-19 severity.

According to Giedraitis et al. (2001), the rs187238 SNV changes G to C and affects the expression of the *IL18* gene and its activity, by changing the binding site of the nuclear factor H4TF-1 to a binding site for a factor unknown found in the GM-CSF promoter, affecting the promoter activity. Arimitsu et al. (2006) showed that a polymorphic variant of the *IL18* gene influenced IL-18 production by monocytes *in vitro*. In particular, they showed that spontaneous and lipopolysaccharide-stimulated production of IL-18 in volunteers with the GG genotype was higher than in those with the GC genotype, thus a genetic tendency *IL18-137G>C* allele G, to produce greater quantities of IL-18. Khripko et al. (2008) investigated the association of SNV in the *IL18-137G>C* promoter with the level of IL-18 protein production by peripheral blood mononuclear cells *in vitro* from healthy donors, showed that peripheral blood mononuclear cells from donors carrying allele C had lower levels of both spontaneous and lipopolysaccharide-stimulated IL-18 production. Together, those results suggested that allele G is involved to higher IL-18 production.

In the presence of IL-12, IL-18 can stimulate Th1 cells, nonpolarized T cells, NK cells, B cells, dendritic cells, and macrophages to release IFN- $\gamma$  (NAKANISHI et

al., 2001a, 2001b). Furthermore, IL-18 directly activates CD8+ T cells and upregulates cytotoxic activities of NK cells and cytotoxic T cells, and exerts their cytotoxic action through the use of perforin and FasL, FasL induces apoptosis in Fas-expressing target cells, and Perforin is a potent pore-forming molecule against target cell membrane, playing a central role in viral clearance (KÄGI et al., 1996; NAKANISHI et al., 2001b; TIZAOUI et al., 2020; TSUTSUI et al., 1996; YOSHIMOTO et al., 1998). In addition to the above mentioned functions, IL-18 may stimulate the synthesis of granulocyte-monocyte colony estimator factor (GM-CSF) (UDAGAWA et al., 1997). The C allele alters GM-CSF promoter binding site, which can stimulate neutrophil production. The increased neutrophils in the alveoli can lead to increased production of neutrophil extracellular traps (NETs), causing increased clot formation, endothelial damage and alveolar damage associated with COVID-19 (ZHAO; DI; XU, 2021).

Similarly, the frequency of the *IL18*-105GA genotype in the overdominant model was reduced in moderate and severe patients, and in the dominant model the *IL18*-105GG genotype demonstrated an increased frequency in moderate and severe patients. Thus, the presence of the A allele in homozygosis or heterozygosis conferred about 44% protection in the development of moderate and severe cases. The *IL18*-105G>A variant is located in the potentially regulatory 5' untranslated region (5'UTR) of *IL18* which can then affect the level of gene expression and is consequently linked to altered levels of IL-18 (BARBAUX et al., 2007). Few studies have evaluated the association between this genetic variant and diseases. Among them, Messaoudi et al. (2012) found an association between the A allele and recurrent idiopathic abortion, and Al-Khateeb et al. (2011) found an association with increased risk of developing recurrent miscarriage, regardless of the genetic model used. In fact, there are no studies correlating this genetic variant with altered expression of IL-18. We hypothesize that this variant may behave similarly to *IL18*-137C>G since it is also located in a regulatory region of the *IL18* gene. As far as we know, this is the first study in the Brazilian population that investigated the association between *IL18* genetic variants and the severity of COVID-19.

We showed in this work that both *IL18* variants were connected to enhanced IL-18 production and had a protective effect against COVID-19 severity, which is contrary to what we predicted. As a possible explanation for these findings, we

hypothesized that high levels of IL-18 play a vital role in the host defense against intracellular pathogen infection (NAKANISHI et al., 2001b), and that the shift to a neutrophilic response lowered antiviral defense.

The clinical profile and laboratory characteristics of COVID-19 patients who died were examined in the current investigation. When compared to surviving patients, those with this outcome were older, had less symptoms, and had lower oxygen saturation at the time of infection. The death group had a greater rate of ICU admission, intubation, T2DM, stroke, and non-dialysis chronic kidney disease. Our findings are consistent with prior research, which found that older patients and those with comorbidities are more likely to die from COVID-19. Younger patients with no major underlying conditions, on the other hand, may develop potentially fatal consequences such as fulminant myocarditis and disseminated intravascular coagulopathy (TERPOS et al., 2020). Regarding the laboratory changes, death-outcome patients showed higher levels of WBCs, NLR, hsCRP, ferritin and inflammation index. It has also been reported that patients with severe disease and fatal outcomes present a decreased lymphocyte/WBCs ratio both in admission and during hospitalization compared with those who survived (DENG et al., 2020). High levels of hsCRP have been linked to unfavorable prognosis of COVID-19 disease, such as death (DENG et al., 2020). Our data agree with most of those obtained by Lino et al (2021) identified high levels of ferritin, C-reactive protein and serum creatinine were significantly associated with mortality. A similar result was obtained in another study for ferritin, where the high levels of ferritin were found in non-survivor patients (AHMED et al., 2021).

Some studies developed prediction models which combine a variety of clinical and laboratory indicators in order to better understand COVID-19's clinical course. It is critical to identify characteristics that predict COVID-19 problems in order to guide clinical care, improve patient outcomes, and allocate limited resources (ASSAF et al., 2020; BASTUG et al., 2020; MARIN et al., 2021). Our findings demonstrated that a panel of biomarkers, including the *IL18-105GA* genetic variant (negatively), as well as old age, CCTA, cardiac disorders, T2DM, hypertension, and inflammatory index, can predict the severity of COVID-19 by about 60% (all positively). Assaf et al. (2020) examined clinical, hematological, and biochemical markers at admission and used machine-learning algorithms to predict the risk of

critical COVID-19. Three distinct machine-learning models were employed to predict patient deterioration, and their results were compared to current predictors as well as the APACHE II risk prediction score. Machine-learning models beat all other criteria, including the APACHE II score, in this investigation, predicting crucial COVID-19 with 88 percent sensitivity, 92.7 percent specificity, and 92 percent accuracy. The APACHE II score, WBCs, time from onset of symptoms to admission, oxygen saturation, and blood lymphocyte counts were the most important factors in the models (ASSAF et al., 2020).

Other studies showed that laboratory parameters, including percentage of large unstained cell (% LUC), NLR, D-dimer, and CRP made the highest contribution to the prediction of the disease severity besides age, comorbidity presence, and symptoms on the admission. The binary logistic regression model included ferritin, % LUC, NLR, and D-dimer, which correctly classified 91.7% of the cases (BASTUG et al., 2020). Although other studies have suggested predictive models for COVID-19 severity with high sensitivity and specificity, our study was the first to include a genetic variant combined with clinical and laboratory parameters associated with prognosis.

Another interesting finding of our study was the identification of positively associated host factors, such as age, dementia, inflammation index, ICU admission, intubation, BMI and severe illness, as well as negatively associated host factor, such as SpO<sub>2</sub>, which could predict death by 64%. A systematic study found 107 prognostic models for COVID-19 patients' diagnosis and prognosis. The majority of the studies employed alternative outcomes, with 39 estimating mortality risk and 28 attempting to predict progression to a severe or critical disease (WYNANTS et al., 2020). Vital signs, age, comorbidities, imaging characteristics, sex, lymphocyte count, and CRP are the most common predictors in COVID-19 prediction models (WYNANTS et al., 2020). These researchers found two interesting models (one diagnostic and the other prognostic) that should be validated in many cohorts as soon as possible. Knight and colleagues (2020) and Jehi and colleagues (2020) developed models that are strong candidates for validation investigations in other data. All of the studied prediction models were found to have an unclear or high risk of bias, according to this systematic review, and data from independent external validations of the newly constructed models is still lacking. The urgency of prognostic

models to aid in early and efficient patient screening in the COVID-19 pandemic, on the other hand, may inspire physicians and researchers (WYNANTS et al., 2020).

There are limitations in the current study that should be considered, such as the cross-sectional design, which does not allow to make causal inferences and the unavailable data of the IL-18 plasma measurements of the patients with COVID-19 enrolled in this study. However, the present study also has some strengths. To the best of our knowledge, this is the first study which investigated the relationship between *IL18-105G>A* and *IL18-137C>G* genetic variants in COVID-19 patients. Another strength is that this study controlled for possible confounding variables including sex, age and ethnicity by the robust statistical analysis.

In conclusion, the *IL18-105G>A* and *IL18-137C>G* variants contribute significantly to COVID-19 severity. The latter association may be explained by the effects of *IL18-137C>G* increasing IL-18 production thereby activating Th1-mediated immune responses. This result suggests that the quantitative alteration of IL-18 could be one of the factors involved in the susceptibility and severity of COVID-19. The findings that involve the presence of protective-associated alleles may identify individuals with different susceptibility to the worst outcome when infected with SARS-CoV-2. In addition, we propose with a panel of biomarkers as predictive models of prognosis and outcome of COVID-19 that could help in the early identification of patients who may progress to a worse prognosis, requiring personalized treatment.

## REFERENCES

- AHMED, S. et al. Evaluation of serum ferritin for prediction of severity and mortality in COVID-19- A cross sectional study. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 63, p. 102163, 12 fev. 2021.
- AL-KHATEEB, G. M. et al. Analysis of interleukin-18 promoter polymorphisms and changes in interleukin-18 serum levels underscores the involvement of interleukin-18 in recurrent spontaneous miscarriage. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 4, p. 921–926, oct. 2011.
- ARIMITSU, J. et al. IL-18 gene polymorphisms affect IL-18 production capability by monocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, n. 4, p. 1413–1416, apr. 2006.

- ASSAF, D. et al. Utilization of machine-learning models to accurately predict the risk for critical COVID-19. **Internal and Emergency Medicine**, v. 15, n. 8, p. 1435– 1443, nov. 2020.
- AZEVEDO, M. L. V. et al. Lung Neutrophilic Recruitment and IL-8/IL-17A Tissue Expression in COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 12, mar. 2021.
- BARBAUX, S. et al. Differential haplotypic expression of the interleukin-18 gene. **European Journal of Human Genetics**, v. 15, n. 8, p. 856–863, aug. 2007.
- BASTUG, A. et al. Clinical and laboratory features of COVID-19: Predictors of severe prognosis. **International Immunopharmacology**, v. 88, p. 106950, nov. 2020.
- BEN ALEYA, W. et al. Interleukin-18 Gene Polymorphisms in Tunisian Patients with Inflammatory Bowel Disease. **Digestion**, v. 83, n. 4, p. 269–274, jan. 2011.
- BERG, D. F. VAN DEN; VELDE, A. A. TE. Severe COVID-19: NLRP3 Inflammasome Dysregulated. **Frontiers in Immunology**, v. 11, jun. 2020.
- DAVIS, B. K.; WEN, H.; TING, J. P.-Y. The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 707, jun. 2011.
- DENG, Y. et al. Clinical characteristics of fatal and recovered cases of coronavirus disease 2019 in Wuhan, China: a retrospective study. **Chinese Medical Journal**, v. 133, n. 11, p. 1261, 5 jun. 2020.
- FREEMAN, T. L.; SWARTZ, T. H. Targeting the NLRP3 Inflammasome in Severe COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 11, jun. 2020.
- GAO, Y. et al. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. **Allergy**, v. 76, n. 2, p. 428–455, feb. 2021.
- GIEDRAITIS, V. et al. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 112, n. 1–2, p. 146–152, jan. 2001.
- GORBALENYA, A. E. et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536, mar. 2020.
- HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10223, p. 497, feb. 2020.
- JEHI, L. et al. Individualizing Risk Prediction for Positive Coronavirus Disease 2019 Testing: Results From 11,672 Patients. **Chest**, v. 158, n. 4, p. 1364, oct. 2020.

- JUNQUEIRA, C. et al. SARS-CoV-2 infects blood monocytes to activate NLRP3 and AIM2 inflammasomes, pyroptosis and cytokine release. *Res Sq* [Preprint] 021 Aug 11:rs.3.rs-153628. doi: 10.21203/rs.3.rs-153628/v1.
- KÄGI, D. et al. Molecular Mechanisms of Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity and Their Role in Immunological Protection and Pathogenesis In Vivo. **Annual Review of Immunology**, v. 14, n. 1, p. 207–232, apr. 1996.
- KHRIPKO, O. P. et al. Association of Single Nucleotide Polymorphisms in the IL-18 Gene with Production of IL-18 Protein by Mononuclear Cells from Healthy Donors. **Mediators of Inflammation**, v. 2008, jun. 2008.
- KNIGHT, S. R. et al. Risk stratification of patients admitted to hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterization Protocol: development and validation of the 4C Mortality Score. **The BMJ**, v. 370, sep. 2020.
- KRETOWSKI, A. et al. Interleukin-18 Promoter Polymorphisms in Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 11, p. 3347–3349, nov. 2002. LAGUNAS-RANGEL, F. A.; CHÁVEZ-VALENCIA, V. High IL-6/IFN- $\gamma$  ratio could be associated with severe disease in COVID-19 patients. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 10, p. 1789–1790, oct. 2020.
- LANDER, E. S. Initial impact of the sequencing of the human genome. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 187–197, feb. 2011.
- LINO, K. et al. Serum ferritin at admission in hospitalized COVID-19 patients as a predictor of mortality. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 25, n. 2, p. 101569, abr. 2021.
- LUCAS, C. et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 463–469, aug. 2020.
- MARIN, B. G. et al. Predictors of COVID-19 severity: A literature review. **Reviews in Medical Virology**, v. 31, n. 1, p. 1, jan. 2021.
- MESSAOUDI, S. et al. Interleukin-18 promoter polymorphisms and risk of idiopathic recurrent pregnancy loss in a Tunisian population. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 93, n. 2, p. 109–113, mar. 2012.
- NAKANISHI, K. et al. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 12, n. 1, p. 53–72, 1 mar. 2001a.

- NAKANISHI, K. et al. Interleukin-18 Regulates Both Th1 and Th2 Responses. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 423–474, apr. 2001b.
- PROMPETCHARA, E.; KETLOY, C.; PALAGA, T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 38, n. 1, mar. 2020.
- QIN, C. et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 762–768, jul. 2020.
- RAEISI, T. et al. The negative impact of obesity on the occurrence and prognosis of the 2019 novel coronavirus (COVID-19) disease: a systematic review and meta-analysis. **Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity**, jul. 2021.
- RODRIGUES, T. 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**, v. 218, n. e20201707, nov. 2021.
- SATIŞ, H. et al. Prognostic value of interleukin-18 and its association with other inflammatory markers and disease severity in COVID-19. **Cytokine**, v. 137, p. 155302, jan. 2021.
- SHEN, C. et al. Genetic association between the NLRP3 gene and acne vulgaris in a Chinese population. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 44, n. 2, p. 184–189, mar. 2019.
- SHI, C. et al. Predictors of mortality in patients with coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, jul. 2021.
- TAVARES, N. A. C. et al. Interleukin 18 (*IL 18*) gene promoter polymorphisms are associated with type 1 diabetes mellitus in Brazilian patients. **Cytokine**, v. 62, n. 2, p. 286–289, may. 2013.
- TERPOS, E. et al. Hematological findings and complications of COVID-19. **American Journal of Hematology**, v. 95, n. 7, p. 834–847, apr. 2020.
- TIZAOUI, K. et al. Update of the current knowledge on genetics, evolution, immunopathogenesis, and transmission for coronavirus disease 19 (COVID-19). **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 15, p. 2906, sep. 2020.

- TSUTSUI, H. et al. IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 9, p. 3967–3973, nov. 1996.
- UDAGAWA, N. et al. Interleukin-18 (Interferon- $\gamma$ -inducing Factor) Is Produced by Osteoblasts and Acts Via Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor and Not Via Interferon- $\gamma$  to Inhibit Osteoclast Formation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 6, p. 1005–1012, mar. 1997.
- VALERO, N. et al. Increased serum ferritin and interleukin-18 levels in children with dengue. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 649, jul. 2019. WHO, World Health Organization. **COVID-19 Clinical management: living guidance**. 2021. Available in: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-1>. Access in: 20 jul 2021
- WHO, World Health Organization. **COVID-19 Weekly epidemiological update on COVID-19 - 29 June 2021**. Available in: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---29-june-2021>. Access in: 15 jul 2021.
- WYNANTS, L. et al. Prediction models for diagnosis and prognosis of covid-19: systematic review and critical appraisal. **BMJ**, v. 369, p. m1328, apr. 2020.
- YANG, Y. et al. Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 146, n. 1, p. 119- 127.e4, jul. 2020.
- YOSHIMOTO, T. et al. IL-12 Up-Regulates IL-18 Receptor Expression on T Cells, Th1 Cells, and B Cells: Synergism with IL-18 for IFN- $\gamma$  Production. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 7, p. 3400–3407, oct. 1998.
- ZHAO, N.; DI, B.; XU, L. The NLRP3 inflammasome and COVID-19: Activation, pathogenesis and therapeutic strategies. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, jun. 2021.
- ZHOU, C. et al. The -137G/C single nucleotide polymorphism in IL-18 gene promoter contributes to tuberculosis susceptibility in Chinese Han population. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 36, p. 376–380, dec. 2015.
- ZHU, N. et al. Brief Report: A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727, feb. 2020.

1 **Table 1** – Sociodemographic data, symptoms and laboratory parameters on the severity of SARS-CoV-2 infection, named  
 2 Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)

Variables	Mild disease <sup>A</sup> n=157	Moderate disease <sup>B</sup> n=63	Critical disease <sup>C</sup> n=308	F/X <sup>2</sup>	df	p value
Sex (Female / Male)	93(59.2) / 64(40.8) <sup>B,C</sup>	25(39.7) / 38(60.3) <sup>A</sup>	127(41.2) / 181(58.8) <sup>B</sup>	14.85	2	<b>0.001</b>
Age (years)	43.2 (16.3) <sup>B,C</sup>	60.2 (16.5) <sup>A,C</sup>	66.0 (15.7) <sup>A,B</sup>	105.94	2/525	<b>&lt;0.001</b>
Ethnicity (C/NC)	124(79.0) / 33(21.0)	49(77.8) / 14(22.2)	248(80.5) / 59(19.5)	0.41	2	0.816
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	26.56 (4.40) <sup>B,C</sup>	28.96 (6.08) <sup>A</sup>	28.38 (6.04) <sup>A</sup>	5.31	2/379	<b>0.005</b>
Obesity (Yes/No)	29(18.5) / 128(81.5)	14(22.2) / 49(77.8)	73(23.7) / 235(76.3)	1.66	2	0.436
Hypercholesterolemia (Yes/No)	2(1.3) / 155(98.7)	4(6.3) / 59(93.7)	30(9.7) / 278(9.3) <sup>#</sup>	FEPT	-	<b>0.001</b>
Hypertension (Yes/No)	24(15.3) / 133(84.7) <sup>B,C</sup>	31(49.2) / 32(50.8) <sup>A</sup>	178(57.8) / 130(42.2) <sup>A</sup>	76.95	2	<b>&lt;0.001</b>
T2DM (Yes/No)	8(5.1) / 148(94.9) <sup>B,C</sup>	14(22.2) / 49(77.8) <sup>A</sup>	100(34.5) / 208(67.5) <sup>A</sup>	43.54	2	<b>&lt;0.001</b>
Stroke (Yes/No)	1(0.6) / 156(99.4)	2(3.2) / 61(96.8)	24(7.8) / 284(92.2) <sup>#</sup>	FEPT	-	<b>0.001</b>
Heart diseases (Yes/No)	3(1.9) / 154(98.1)	5(7.9) / 58(92.1)	61(19.8) / 247(80.2) <sup>#</sup>	FEPT	-	<b>&lt;0.001</b>
Dementia (Yes/No)	1(0.6) / 156(99.4)	5(7.9) / 58(92.1)	24(7.8) / 284(92.2) <sup>#</sup>	FEPT	-	<b>0.001</b>
COPD (Yes/No)	0(0) / 157(100)	4(6.3) / 59(93.7)	16(5.2) / 292(94.8) <sup>#</sup>	FEPT	-	<b>0.002</b>
Dialysis chronic kidney disease (Yes/No)	1(0.6) / 156(99.4)	7(11.1) / 56(88.9)	14(4.5) / 294(95.5)	FEPT	-	<b>0.002</b>
Non-dialysis chronic kidney disease (Yes/No)	2(1.3) / 155(98.7)	4(6.3) / 59(93.7)	30(9.7) / 278(9.3) <sup>#</sup>	FEPT	-	<b>0.001</b>
CCTA	2.65 (1.41) <sup>C</sup>	2.83 (1.16) <sup>C</sup>	3.38 (1.25) <sup>A,B</sup>	7.74	2/349	<b>0.001</b>

**Continued table 1** – Sociodemographic data, symptoms and laboratory parameters on the severity of SARS-CoV-2 infection, named Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)

Variables	Mild disease <sup>A</sup> n=157	Moderate disease <sup>B</sup> n=63	Critical disease <sup>C</sup> n=308	F/X <sup>2</sup>	df	p value
SpO2 (%)	93.6 (5.1) <sup>C</sup>	90.8 (4.1) <sup>C</sup>	86.3(7.5) <sup>A,B</sup>	21.97	2/381	<b>&lt;0.001</b>
ICU (Yes/No)	1(0.6%) / 156(99.4%) <sup>B,C</sup>	7(11.1) / 56(88.9) <sup>A,C</sup>	136(44.2) / 172(55.8) <sup>A,B</sup>	108.71	2	<b>&lt;0.001</b>
Orotracheal intubation (Yes/No)	0(0%) / 157(100%)	3(4.8) / 60(95.2)	119(38.6) / 189(61.4) <sup>#</sup>	100.92	2	<b>&lt;0.001</b>
Death (Yes/No)	0(0%) / 35(100%)	2(3.2) / 61(96.8)	134(43.5) / 174(56.5) <sup>#</sup>	57.48	2/406	<b>&lt;0.001</b>
WBC (cells /mm <sup>3</sup> )	7272.1 (2739.4)	7264.6 (4675.4)	8398.60 (7077.73)	1.12	2/402	0.328
NLR *	7.53 (6.29) <sup>C</sup>	6.96 (7.29) <sup>C</sup>	11.54 (11.27) <sup>A,B</sup>	7.73	2/401	<b>0.001</b>
Platelets (mil/mm <sup>3</sup> )	229.7 (78.6)	202.3 (77.4)	206.7 (88.3)	1.26	2/402	0.286
hsCRP (mg/L) *	70.3 (60.7) <sup>B,C</sup>	95.7 (73.7) <sup>A,C</sup>	139.8(94.3) <sup>A,B</sup>	21.32	2/398	<b>&lt;0.001</b>
Ferritin (ng/mL) *	724.7 (767.5) <sup>C</sup>	1348.4 (1689.4)	1557.2(2688.3) <sup>A</sup>	6.27	2/391	<b>0.002</b>
Inflammation index	-1.326 (1.096) <sup>B,C</sup>	-0.462 (2.281) <sup>A,C</sup>	0.771 (2.279) <sup>A,B</sup>	58.93	2/525	<b>&lt;0.001</b>

- 1 All results of Chi-square tests ( $\chi^2$ ) or analysis of variance (F). FEPT: results of Fisher's exact probability test. Categorical variables are expressed as number  
2 (n) and percentage (%). Continuous variables are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). C: Caucasian, NC: Non Caucasian, CCTA: Chest computed  
3 tomography alteration, SpO2: peripheral capillary oxygen saturation (infection onset), ICU: Intensive care unit; T2DM : type 2 diabetes mellitus (on oral  
4 hypoglycemics), COPD: Chronic obstructive pulmonary disease, WBC: white blood cells, NLR: Neutrophil / lymphocyte ratio, hsCRP: High sensitivity C-  
5 reactive protein. Bold values represent statistically significant values ( $p < 0.05$ )  
6 Inflammation index: computed as a z unit weighted composite score of z high sensitivity CRP + z ferritin + z neutrophil/lymphocyte ratio  
7 \* Processed in Ln transformation; <sup>A,B,C</sup>: multiple comparisons among treatment means: #: significant different from mild + moderate (chi-square test).

1 **Table 2** – Association between *IL18-105G>A* and *IL18-137C>G* variants in patients with COVID-19 according to their severity  
 2 (moderate + critical versus mild severity)

	Genotype	Mild	Moderate + critical	p value	OR (95% CI)
<i>IL18-105G&gt;A</i> <sup>A</sup>	GG	68 (43.3)	211 (56.9)		Reference
	GA	75 (47.8)	125 (33.7)	<b>0.015</b>	0.552 (0.341-0.893)
	AA	14 (8.9)	35 (9.4)	0.784	0.895 (0.404-1.984)
<i>IL18-105G&gt;A</i> <sup>B</sup>	GG	68 (43.3)	211 (56.9)		Reference
	AA+GA	89 (56.7)	160 (43.1)	<b>0.031</b>	0.606 (0.384-0.957)
<i>IL18-105G&gt;A</i> <sup>C</sup>	AA+GG	82 (52.2)	246 (66.3)		Reference
	GA	75 (47.8)	125 (33.7)	<b>0.014</b>	0.563 (0.355-0.891)
<i>IL18-105G&gt;A</i> <sup>D</sup>	GG+GA	143 (91.1)	336 (90.6)		Reference
	AA	14 (8.9)	35 (9.4)	0.669	1.181 (0.551-2,529)
<i>IL18-137C&gt;G</i> <sup>A</sup>	CC	67 (42.7)	210 (56.6)		Reference
	CG	75 (47.8)	128 (34.5)	<b>0.015</b>	0.551 (0.340-0.892)
	GG	15 (9.6)	33 (8.9)	0.564	0.794 (0.363-1.737)
<i>IL18-137C&gt;G</i> <sup>B</sup>	CC	67 (42.7)	210 (56.6)		Reference
	GG+CG	90 (57.3)	161 (43.3)	<b>0.025</b>	0.592 (0.375-0.935)
<i>IL18-137C&gt;G</i> <sup>C</sup>	GG+CC	82 (52.2)	243 (65.5)		Reference
	CG	75 (47.8)	128 (34.5)	<b>0.018</b>	0.574 (0.363-0.909)
<i>IL18-137C&gt;G</i> <sup>D</sup>	CC+CG	142 (90.4)	338 (91.1)		Reference
	GG	15 (9.6)	33 (8.9)	0.892	1.053 (0.499-2.220)

3 <sup>A</sup> Co-dominant models; <sup>B</sup> dominant models; <sup>C</sup> overdominant models; <sup>D</sup> recessive models.  $\chi^2$ : results of analyses of contingency tables. Data were expressed as  
 4 absolute number (n) and percentage (%). OR: odds ratio; CI: confidence interval; Bold values represent statistically significant values ( $p < 0.05$ ). Adjusted by  
 5 age, sex, and ethnicity.  
 6

1 **Table 3 – Sociodemographic data, symptoms, and biomarkers among the non survivors and survivors patients with SARS-CoV-2**  
 2 infection

Variables	Survivors n=270	Non survivors n=136	F/X <sub>2</sub>	df	p value
Sex (Female / Male)	115 (42.6) / 155 (57.4)	52(38.2) / 84(61.8)	0.71	1	0.400
Age (years)	60.4 (15.9)	71.8 (13.7)	50.99	1/404	<b>&lt;0.001</b>
Ethnicity (C/NC)	216 (80.0) / 53(20.0)	110(80.9) / 26(19.1)	0.02	1	0.888
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	28.37 (5.65)	28.24 (6.51)	0.03	1/258	0.871
CCTA	3.14 (1.23)	3.43 (1.34)	3.81	1/350	0.052
SpO2 (infection onset)	89.4 (5.8)	84.0 (8.5)	53.67	1/382	<b>&lt;0.001</b>
Platelets (mil/mm <sup>3</sup> )	208.8 (81.2)	206.2 (95.0)	0.09	1/403	0.768
WBC (cell/mm <sup>3</sup> )	7240.6 (3684.6)	9882.1 (9740.2)	15.44	1/403	<b>&lt;0.001</b>
NLR *	9.15 (10.31)	13.15 (10.57)	19.83	1/402	<b>&lt;0.001</b>
hsCRP (mg/L) *	111.6 (83.7)	158.0 (99.7)	22.41	1/400	<b>&lt;0.001</b>
Ferritin (ng/mL) *	1347.9 (2163.2)	1680.6 (2967.4)	5.67	1/392	<b>0.018</b>
Inflammation index	-0.018 (2.436)	1.203 (2.070)	25.03	1/404	<b>&lt;0.001</b>
ICU (Yes/No)	54(20.0) / 216(80.0)	90(66.2) / 46(33.8)	84.26	1	<b>&lt;0.001</b>
Need for orotracheal intubation (Yes/No)	30(11.1) / 240(88.9)	92(67.6) / 44(32.4)	137.53	1	<b>&lt;0.001</b>
Hypertension (Yes/No)	142(52.6) / 128(47.4)	80(58.8) / 56(41.2)	1.42	1	0.234
T2DM (on oral hypoglycemiant) (Yes/No)	66(24.4) / 204(75.6)	54(39.7) / 82(60.3)	10.12	1	<b>0.002</b>
Stroke (Yes/No)	11(4.1) / 259(95.9)	16(11.8) / 120(88.2)	8.62	1	<b>0.003</b>
Non-dialysis chronic kidney disease (Yes/No)	16(5.9) / 254(94.1)	20(14.7) / 116(85.3)	8.63	1	<b>0.003</b>

3 All results of Chi-square tests (X<sup>2</sup>) or analysis of variance (F). Categorical variables are expressed as number (n) and percentage (%). Continuous variables  
 4 are expressed as mean ± standard deviation (SD). \* Processed in Ln transformation. Bold values represent statistically significant values (p<0.05).  
 5 C: Caucasian, NC: Not Caucasian, CCTA: Chest computed tomography scan alteration; SpO2: peripheral capillary oxygen saturation (infection onset), WBC:  
 6 white blood cells, NLR: Neutrophil / lymphocyte ratio, hsCRP: High sensitivity C-reactive protein, ICU: Intensive care unit, T2DM: type 2 diabetes mellitus (on  
 7 oral hypoglycemiant).

8 Inflammation index: computed as a z unit weighted composite score of z CRP + z ferritin + z neutrophil/lymphocyte ratio  
 9  
 10  
 11  
 12

1 **Table 4** – Results of binary logistic regression analysis with different dichotomies as dependent variables and demographic,  
 2 clinical, genetic variant and laboratory data as explanatory variables in patients with COVID-19 infection

Dependent Variables	Explanatory variables	$\beta$	SE	W	p value	OR	95% CI	X <sup>2</sup>	df	p value	Nagelkerke pseudo-R <sup>2</sup>
<b>Moderate+critical versus Mild</b>	<b>Model 1</b>							286.37	8	<0.001	0.596
	Age	1.112	0.163	46.43	<0.001	3.04	2.21–4.18				
	CCTA	0.440	0.157	8.51	0.004	1.55	1.16–2.09				
	BMI	0.373	0.148	6.32	0.012	1.45	1.09–1.94				
	Heart diseases	1.950	0.709	7.57	0.006	7.03	1.75–28.20				
	T2DM	0.968	0.444	4.76	0.029	2.63	1.10–6.28				
	Hypertension	0.917	0.326	7.91	0.005	2.50	1.32–4.74				
	nflammation index	0.953	0.183	27.18	<0.001	2.59	1.81–3.71				
<i>IL 18-105GA</i>	-0.631	0.275	5.25	0.022	0.53	0.31–0.91					
<b>Death versus Survival</b>	<b>Model 2</b>							252.36	8	<0.001	0.642
	Age	0.085	0.014	31.08	<0.001	1.09	1.06–1.12				
	Dementia	1.278	0.540	5.60	0.018	3.59	1.25–10.34				
	Inflammation	0.428	0.161	7.04	0.008	1.53	1.12–2.10				
	SpO <sub>2</sub>	-0.056	0.023	5.88	0.015	0.95	0.90–0.99				
	ICU	0.973	0.411	5.59	0.018	2.65	1.19–5.92				
	Intubation	2.280	0.410	30.94	<0.001	9.78	4.38–21.84				
	BMI	0.317	0.156	4.11	0.043	1.37	1.01–1.87				
Severe illness	2.717	0.841	10.44	0.001	15.14	2.91–78.71					

3 Results of binary logistic regression analysis with different dichotomies as dependent variables and demographic, clinical, genetic variant and  
 4 laboratory data as explanatory variables in patients with COVID-19 infection

5 X<sup>2</sup>: Chi-square tests; CI: confidence intervals; OR: odds ratio; df: degree of freedom; CCTA: Chest computed tomography scan alteration; BMI:  
 6 body mass index, T2DM: type 2 diabetes mellitus, SpO<sub>2</sub>: peripheral capillary oxygen saturation; ICU: intensive care unit admission.

7 Model 1: 84.3% of the subjects were correctly classified with a sensitivity of 83.3% and specificity of 86.5%.

8 Model 2: 85.7% of the subjects were correctly classified with a sensitivity of 83.3% and specificity 86.7%.

## 1 7 CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

2 Levando em consideração os objetivos propostos por esse estudo, podemos concluir  
3 que:

- 4 • Em relação a variante *IL18-105G>A*, a frequência dos genótipos GG, GA e  
5 AA diferiu entre pacientes com doença leve e pacientes com doença  
6 moderada e grave, e o genótipo GA foi diretamente associado a proteção da  
7 gravidade na COVID-19. O SNV *IL18-137C>G*, demonstrou frequência  
8 diferente entre os genótipos CC, CG e GG e o genótipo CG foi mais frequente  
9 nos pacientes com doença leve, conferindo um efeito protetor sobre a  
10 gravidade da COVID-19.
- 11 • A variante *IL18-105G>A* foi associada a proteção da gravidade da COVID-19,  
12 com os genótipos GA e AA + GA no modelo overdominante e no modelo  
13 dominante, respectivamente; portanto a presença alelo A em homozigose ou  
14 heterozigose confere proteção à gravidade da COVID-19. Do mesmo modo,  
15 os genótipos CG e GG + CG (modelo overdominante e modelo dominante,  
16 respectivamente) da variante genética *IL18-137C>G* e o alelo G foram  
17 associados a um efeito protetor sobre a gravidade da COVID-19.
- 18 • O painel de biomarcadores incluindo *IL18-105 GA* (negativamente associado)  
19 e idade, CCTA, IMC, doenças cardíacas, T2DM, hipertensão e índice de  
20 inflamação (todos positivamente associados) foram capaz de prever em  
21 quase 60% o prognóstico de COVID-19, 84,3% dos casos foram corretamente  
22 classificados com sensibilidade de 83,3% e especificidade de 86,5%.  
23 Mostramos que os perfis de biomarcadores incluindo idade, demência, índice  
24 de inflamação, admissão na UTI, intubação, IMC e doença grave foram  
25 associados positivamente, enquanto SpO2 foi associado negativamente,  
26 podendo prever 64% a morte nesta coorte de pacientes brasileiros com  
27 COVID- 19, com acurácia de 85,7% (sensibilidade: 83,3% and especificidade:  
28 86,7%).

## 1 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

2           Esse estudo pretende contribuir com o melhor entendimento das variantes  
3 genéticas e a sua influência na gravidade da COVID-19. O presente estudo  
4 demonstrou que o alelo A da SNV *IL18-105G>A* e o alelo G da SNV *IL18-137C>G*  
5 tanto em heterozigose como em homozigose exercem um efeito protetor significativo  
6 no que se refere à gravidade de COVID-19, mas não à mortalidade desses  
7 pacientes. A principal limitação foi o delineamento transversal do estudo, que não  
8 permite fazer inferência de causalidade. No entanto, até onde sabemos este foi o  
9 primeiro estudo a investigar a relação entre as variantes genéticas *IL18-105G>A* e  
10 *IL18-137C>G* em pacientes com COVID-19, e demonstrou a associação de  
11 variantes genéticas da *IL18* com a gravidade da COVID-19, exercendo efeito  
12 protetor.

13           Modelos prognósticos são de grande importância na prática clínica uma vez  
14 que a triagem rápida e eficiente dos pacientes é essencial na pandemia de COVID-  
15 19 para a descarga do sistema de saúde e auxílio para os profissionais de saúde no  
16 cuidado clínico adequado do paciente. Deste modo, este estudo propôs modelos  
17 preditivos de prognóstico e desfecho clínico que podem auxiliar na identificação  
18 precoce de pacientes que podem evoluir para pior prognóstico, necessitando de  
19 tratamento individualizado.

20

## REFERÊNCIAS

- ABDULKHALEQ, L. A. et al. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Veterinary World**, v. 11, n. 5, p. 627, maio 2018.
- ADACHI, O. et al. Targeted Disruption of the MyD88 Gene Results in Loss of IL-1-and IL-18-Mediated Function. **Immunity**, v. 9, n. 1, p. 143–150, jul. 1998.
- AIZAWA, Y. et al. Association of interleukin-18 gene single-nucleotide polymorphisms with susceptibility to inflammatory bowel disease. **Tissue Antigens**, v. 65, n. 1, p. 88–92, jan. 2005.
- AL-KHATEEB, G. M. et al. Analysis of interleukin-18 promoter polymorphisms and changes in interleukin-18 serum levels underscores the involvement of interleukin-18 in recurrent spontaneous miscarriage. **Fertility and Sterility**, v. 96, n. 4, p. 921–926, out. 2011.
- ALSHAMMARY, A. F.; AL-SULAIMAN, A. M. The journey of SARS-CoV-2 in human hosts: a review of immune responses, immunosuppression, and their consequences. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 1771, 2021.
- ANDERSEN, K. G. et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nature Medicine**, v. 26, n. 4, p. 450–452, abr. 2020.
- APICELLA, M. et al. COVID-19 in people with diabetes: understanding the reasons for worse outcomes. **The Lancet. Diabetes & Endocrinology**, v. 8, n. 9, p. 782, set. 2020.
- ARIMITSU, J. et al. IL-18 gene polymorphisms affect IL-18 production capability by monocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, n. 4, p. 1413–1416, abr. 2006.
- ASSAF, D. et al. Utilization of machine-learning models to accurately predict the risk for critical COVID-19. **Internal and Emergency Medicine**, v. 15, n. 8, p. 1435–1443, nov. 2020.
- AZEVEDO, M. L. V. et al. Lung Neutrophilic Recruitment and IL-8/IL-17A Tissue Expression in COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 12, mar. 2021.
- BARBAUX, S. et al. Differential haplotypic expression of the interleukin-18 gene. **European Journal of Human Genetics**, v. 15, n. 8, p. 856–863, ago. 2007.
- BASTUG, A. et al. Clinical and laboratory features of COVID-19: Predictors of severe prognosis. **International Immunopharmacology**, v. 88, p. 106950, nov. 2020.
- BEN ALEYA, W. et al. Interleukin-18 Gene Polymorphisms in Tunisian Patients with Inflammatory Bowel Disease. **Digestion**, v. 83, n. 4, p. 269–274, jan. 2011.
- BERG, D. F. VAN DEN; VELDE, A. A. TE. Severe COVID-19: NLRP3 Inflammasome Dysregulated. **Frontiers in Immunology**, v. 11, jun. 2020.

BOSSALLER, L. et al. Cutting Edge: FAS (CD95) Mediates Noncanonical IL-1 $\beta$  and IL-18 Maturation via Caspase-8 in an RIP3-Independent Manner. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 12, p. 5508–5512, dez. 2012.

BOURGONJE, A. R. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **The Journal of Pathology**, v. 251, n. 3, p. 228–248, jul. 2020.

BOUROUIBA, L. Turbulent Gas Clouds and Respiratory Pathogen Emissions: Potential Implications for Reducing Transmission of COVID-19. **JAMA**, v. 323, n. 18, dez. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico especial Semana Epidemiológica 25 (20 a 26/6) de 2021**. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/julho/02/69\\_boletim\\_epidemiologico\\_covid\\_2junho.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/julho/02/69_boletim_epidemiologico_covid_2junho.pdf). Acesso em: 15 jul 2021.

BRASIL, Instituto de Geografia e Estatística. **Estimativas da população residente no Brasil e unidades da federação com data de referência em 1º de julho de 2020**. Disponível em: [https://ftp.ibge.gov.br/Estimativas\\_de\\_Populacao/Estimativas\\_2020/estimativa\\_dou\\_2020.pdf](https://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2020/estimativa_dou_2020.pdf). Acesso em: 5 abr 2021.

CALADO, M. B.; SANTANA, C. E. DA S.; CROVELLA, S. Do inflammasome impact COVID-19 severity? **VirusDisease**, p. 1, jul. 2021.

CARICCHIO, R. et al. Preliminary predictive criteria for COVID-19 cytokine storm. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 80, n. 1, p. 88–95, jan. 2021.

CHAIX, J. et al. Priming of Natural Killer cells by Interleukin-18. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 3, p. 1627, ago. 2008.

CHEN, G. et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 5, p. 2620, abr. 2020a.

CHEN, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507, fev. 2020b.

CHU, D. K. et al. Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 395, n. 10242, p. 1973–1987, jun. 2020.

CHUNG, J. et al. Single Nucleotide Polymorphism of Interleukin-18 and Interleukin-18 Receptor and the Risk of Papillary Thyroid Cancer. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 123, n. 10, p. 598–603, nov. 2015.

COSTELA-RUIZ, V. J. et al. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 54, p. 62, ago. 2020.

DAVIS, B. K.; WEN, H.; TING, J. P.-Y. The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 707, jun. 2011.

DE WIT, E. et al. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 523–534, ago. 2016.

DENG, Y. et al. Clinical characteristics of fatal and recovered cases of coronavirus disease 2019 in Wuhan, China: a retrospective study. **Chinese Medical Journal**, v. 133, n. 11, p. 1261, 5 jun. 2020.

DINARELLO, C. et al. Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. **Frontiers in Immunology**, v. 0, ago. 2013.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1, Interleukin-1 Receptors and Interleukin-1 Receptor Antagonist. **International Reviews of Immunology**, v. 16, n. 5–6, p. 457–499, jan. 1998.

DOCHERTY, A. B. et al. Features of 16,749 hospitalised UK patients with COVID-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol. **medRxiv**, p. 2020.04.23.20076042, abr. 2020.

ELLINGHAUS, D. et al. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. **The New England Journal of Medicine**, jun. 2020.

FAN, E.; BRODIE, D.; SLUTSKY, A. S. Acute Respiratory Distress Syndrome: Advances in Diagnosis and Treatment. **JAMA**, v. 319, n. 7, p. 698–710, fev. 2018.

FREEMAN, T. L.; SWARTZ, T. H. Targeting the NLRP3 Inflammasome in Severe COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 11, jun. 2020.

GAO, Y. et al. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. **Allergy**, v. 76, n. 2, p. 428–455, fev. 2021.

GIEDRAITIS, V. et al. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 112, n. 1–2, p. 146–152, jan. 2001.

GONZALES, J. N.; LUCAS, R.; VERIN, A. D. The Acute Respiratory Distress Syndrome: Mechanisms and Perspective Therapeutic Approaches. **Austin journal of vascular medicine**, v. 2, n. 1, jun. 2015.

GORBALENYA, A. E. et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536, mar. 2020.

HADŽIJA, M. P. et al. Polymorphisms in the IL-18 and IL-12B genes and their association with the clinical outcome in Croatian patients with Type 1 diabetes. **Gene**, v. 512, n. 2, p. 477–481, jan. 2013.

HIRANKARN, N. et al. Association of IL-18 gene polymorphism (–137C) with arthritis manifestations in SLE: combined effect with IFN gamma gene polymorphism (+874A). **Clinical Rheumatology**, v. 28, n. 2, p. 219–223, fev. 2009.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271, abr. 2020.

HOSHINO, K. et al. Cutting Edge: Generation of IL-18 Receptor-Deficient Mice: Evidence for IL-1 Receptor-Related Protein as an Essential IL-18 Binding Receptor. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 9, p. 5041–5044, maio 1999.

HTOON, J. et al. *IL18* Polymorphism Is Associated with Behçet's Disease But Not Lupus in Patients from Turkey. **The Journal of rheumatology**, v. 38, n. 5, p. 962, maio 2011.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10223, p. 497, fev. 2020.

HUANG, X.-L. et al. Association of interleukin-1 family cytokines single nucleotide polymorphisms with susceptibility to systemic sclerosis: an independent case–control study and a meta-analysis. **Immunologic Research**, v. 64, n. 4, p. 1041–1052, ago. 2016.

JEHI, L. et al. Individualizing Risk Prediction for Positive Coronavirus Disease 2019 Testing: Results From 11,672 Patients. **Chest**, v. 158, n. 4, p. 1364, out. 2020.

JIANG, S.-Q. et al. The association between severe COVID-19 and low platelet count: evidence from 31 observational studies involving 7613 participants. **British Journal of Haematology**, v. 190, n. 1, p. e29–e33, 1 jul. 2020.

JORGENSEN, I.; MIAO, E. A. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. **Immunological reviews**, v. 265, n. 1, p. 130, maio 2015.

JUNQUEIRA, C. et al. SARS-CoV-2 infects blood monocytes to activate NLRP3 and AIM2 inflammasomes, pyroptosis and cytokine release. *Res Sq [Preprint]* 021 Aug 11:rs.3.rs-153628. doi: 10.21203/rs.3.rs153628/v1.

KÄGI, D. et al. Molecular Mechanisms of Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity and Their Role in Immunological Protection and Pathogenesis In Vivo. **Annual Review of Immunology**, v. 14, n. 1, p. 207–232, abr. 1996.

KAPLANSKI, G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 138–153, jan. 2018.

KAUR, N. et al. Genetic comparison among various coronavirus strains for the identification of potential vaccine targets of SARS-CoV2. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 89, p. 104490, abr. 2021.

KHRIPKO, O. P. et al. Association of Single Nucleotide Polymorphisms in the IL-18 Gene with Production of IL-18 Protein by Mononuclear Cells from Healthy Donors. **Mediators of Inflammation**, v. 2008, jun. 2008.

- KIM, S. H. et al. Functional Reconstitution and Regulation of IL-18 Activity by the IL-18R $\beta$  Chain. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 1, p. 148–154, jan. 2001.
- KNIGHT, S. R. et al. Risk stratification of patients admitted to hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: development and validation of the 4C Mortality Score. **The BMJ**, v. 370, set. 2020.
- KOHKA, H. et al. Interleukin-18/interferon- $\gamma$ -inducing factor, a novel cytokine, up-regulates ICAM-1 (CD54) expression in KG-1 cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 64, n. 4, p. 519–527, out. 1998.
- KRETOWSKI, A. et al. Interleukin-18 Promoter Polymorphisms in Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 11, p. 3347–3349, nov. 2002.
- KUMAR, M.; KHODOR, S. A. Pathophysiology and treatment strategies for COVID-19. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, set. 2020.
- LAGUNAS-RANGEL, F. A.; CHÁVEZ-VALENCIA, V. High IL-6/IFN- $\gamma$  ratio could be associated with severe disease in COVID-19 patients. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 10, p. 1789–1790, out. 2020.
- LANDER, E. S. Initial impact of the sequencing of the human genome. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 187–197, fev. 2011.
- LEBEL-BINAY, S. et al. Interleukin-18: biological properties and clinical implications. **European Cytokine Network**, v. 11, n. 1, mar. 2000.
- LIU, F. et al. ACE2 Expression in Pancreas May Cause Pancreatic Damage After SARS-CoV-2 Infection. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 18, n. 9, p. 2128, ago. 2020.
- LONDRINA, Prefeitura Municipal. **Boletim coronavírus COVID-19 30 de junho de 2021**. Disponível em: <https://saude.londrina.pr.gov.br/index.php/dados-epidemiologicos/96-boletim-informativo-coronavirus/696-junho.html>. Acesso em: 20 ago 2021.
- LU, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565, fev. 2020.
- LUCAS, C. et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 463–469, ago. 2020.
- MARIN, B. G. et al. Predictors of COVID-19 severity: A literature review. **Reviews in Medical Virology**, v. 31, n. 1, p. 1, jan. 2021.
- MATTHAY, M. A. et al. Acute respiratory distress syndrome. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 5, n. 1, mar. 2019.

MEI-YUE, WANG et al. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, nov. 2020.

MENG, T. et al. The insert sequence in SARS-CoV-2 enhances spike protein cleavage by TMPRSS. **bioRxiv** preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.08.926006>, p. 2020.02.08.926006, fev. 2020.

MESSAOUDI, S. et al. Interleukin-18 promoter polymorphisms and risk of idiopathic recurrent pregnancy loss in a Tunisian population. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 93, n. 2, p. 109–113, mar. 2012.

MONTICELLI, M. et al. Why does SARS-CoV-2 hit in different ways? Host genetic factors can influence the acquisition or the course of COVID-19. **European Journal of Medical Genetics**, v. 64, n. 6, p. 104227, jun. 2021.

MOORE, J. B.; JUNE, C. H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. **Science**, v. 368, n. 6490, p. 473–474, maio 2020.

MOTAVAF, M.; SAFARI, S.; ALAVIAN, S. M. Interleukin 18 Gene Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Chronic Hepatitis B Infection: A Review Study. **Hepatitis Monthly**, v. 14, n. 7, jul. 2014.

NAKANISHI, K. et al. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 12, n. 1, p. 53–72, 1 mar. 2001a.

NAKANISHI, K. et al. Interleukin-18 Regulates Both Th1 and Th2 Responses. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 423–474, abr. 2001b.

NOLAN, K. F.; GREAVES, D. R.; WALDMANN, H. The Human Interleukin 18 Gene *IL18* Maps to 11q22.2–q22.3, Closely Linked to the DRD2 Gene Locus and Distinct from Mapped IDDM Loci. **Genomics**, v. 51, n. 1, p. 161–163, jul. 1998.

OKAMURA, H. et al. A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 10, p. 3966–3972, out. 1995.

OLEE, T. et al. IL-18 Is Produced by Articular Chondrocytes and Induces Proinflammatory and Catabolic Responses. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 2, p. 1096–1100, jan. 1999.

OMOTO, Y. et al. Human Mast Cell Chymase Cleaves Pro-IL-18 and Generates a Novel and Biologically Active IL-18 Fragment. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 12, p. 8315–8319, dez. 2006.

OMOTO, Y. et al. Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme. **Journal of Dermatological Science**, v. 59, n. 2, p. 129–135, ago. 2010.

PATEL, A. B.; VERMA, A. COVID-19 and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin Receptor Blockers: What Is the Evidence? **JAMA**, mar. 2020.

PECHKOVSKY, D. V. et al. Interleukin-18 expression by alveolar epithelial cells type II in tuberculosis and sarcoidosis. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 30–38, fev. 2006.

PIZARRO, T. T. et al. IL-18, a Novel Immunoregulatory Cytokine, Is Up-Regulated in Crohn's Disease: Expression and Localization in Intestinal Mucosal Cells. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 11, p. 6829–6835, jun. 1999.

PROMPETCHARA, E.; KETLOY, C.; PALAGA, T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 38, n. 1, mar. 2020.

QIN, C. et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 762–768, jul. 2020.

RAEISI, T. et al. The negative impact of obesity on the occurrence and prognosis of the 2019 novel coronavirus (COVID-19) disease: a systematic review and meta-analysis. **Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity**, jul. 2021.

RAHMAN, S. et al. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, p. 1, maio 2021.

ROBB, C. T. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and COVID-19. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 21, p. 4899, nov. 2020.

RODRIGUES, T. 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**, v. 218, n. e20201707, nov. 2021.

ROTHAN, H. A.; BYRAREDDY, S. N. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. **Journal of Autoimmunity**, v. 109, p. 102433, maio 2020.

RUAN, Q. et al. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. **Intensive Care Medicine**, p. 1, mar. 2020.

RUEDA, B. et al. Interleukin-18-promoter polymorphisms are not relevant in rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, v. 65, n. 6, p. 544–548, jun. 2005.

SAHOO, M. et al. Role of the Inflammasome, IL-1 $\beta$ , and IL-18 in Bacterial Infections. **The Scientific World Journal**, v. 11, p. 2037, set. 2011.

SALZBERGER, B. et al. Epidemiologie von SARS-CoV-2-Infektion und COVID-19. **Der Internist**, p. 1, jun. 2020.

SATIŞ, H. et al. Prognostic value of interleukin-18 and its association with other inflammatory markers and disease severity in COVID-19. **Cytokine**, v. 137, p. 155302, jan. 2021.

- SHARIF, N. et al. Prevalence and impact of diabetes and cardiovascular disease on clinical outcome among patients with COVID-19 in Bangladesh. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, maio 2021.
- SHEN, C. et al. Genetic association between the NLRP3 gene and acne vulgaris in a Chinese population. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 44, n. 2, p. 184–189, mar. 2019.
- SHI, C. et al. Predictors of mortality in patients with coronavirus disease 2019: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, jul. 2021.
- SOMSEN, G. A. et al. Small droplet aerosols in poorly ventilated spaces and SARS-CoV-2 transmission. **The Lancet. Respiratory Medicine**, v. 8, n. 7, p. 658, jul. 2020.
- SU, Y.; ZHAO, H. Predisposition of Inflammatory Bowel Disease Is Influenced by IL-8, IL-10, and IL-18 Polymorphisms: A Meta-Analysis. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 181, n. 10, p. 799–806, ago. 2020.
- SUGAWARA, S. et al. Neutrophil Proteinase 3-Mediated Induction of Bioactive IL-18 Secretion by Human Oral Epithelial Cells. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 11, p. 6568–6575, dez. 2001.
- SUZUKI, N. et al. IL-1 Receptor-Associated Kinase 4 Is Essential for IL-18-Mediated NK and Th1 Cell Responses. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 8, p. 4031–4035, abr. 2003.
- TAKAGAWA, T. et al. Association Between IL-18 Gene Promoter Polymorphisms and Inflammatory Bowel Disease in a Japanese Population: **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1038–1043, dez. 2005.
- TANAKA, M. et al. Mature Form of Interleukin 18 Is Expressed in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue and Contributes to Interferon- $\gamma$  Production by Synovial T Cells. **The Journal of Rheumatology**, p. 9, ago. 2001.
- TAVARES, N. A. C. et al. Interleukin 18 (*IL18*) gene promoter polymorphisms are associated with type 1 diabetes mellitus in Brazilian patients. **Cytokine**, v. 62, n. 2, p. 286–289, maio 2013.
- TAY, M. Z. et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363–374, jun. 2020.
- TIAN, S. et al. Pulmonary Pathology of Early-Phase 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Pneumonia in Two Patients With Lung Cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 15, n. 5, p. 700, maio 2020.
- TIRET, L. et al. Genetic Analysis of the Interleukin-18 System Highlights the Role of the Interleukin-18 Gene in Cardiovascular Disease. **Circulation**, v. 112, n. 5, p. 643–650, ago. 2005.
- TIZAOUI, K. et al. Update of the current knowledge on genetics, evolution, immunopathogenesis, and transmission for coronavirus disease 19 (COVID-19). **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 15, p. 2906, set. 2020.

TSUTSUI, H. et al. IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 9, p. 3967–3973, nov. 1996.

TSUTSUMI, N. et al. The structural basis for receptor recognition of human interleukin-18. **Nature Communications**, v. 5, dez. 2014.

UDAGAWA, N. et al. Interleukin-18 (Interferon- $\gamma$ -inducing Factor) Is Produced by Osteoblasts and Acts Via Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor and Not Via Interferon- $\gamma$  to Inhibit Osteoclast Formation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 6, p. 1005–1012, mar. 1997.

VALERO, N. et al. Increased serum ferritin and interleukin-18 levels in children with dengue. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 649, jul. 2019.

V'KOVSKI, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews. Microbiology**, p. 1, out. 2021.

WALLS, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281, abr. 2020.

WANG, D. et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, v. 323, n. 11, p. 1061, mar. 2020.

WHO, World Health Organization. **COVID-19 Clinical management: living guidance**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-1>. Acesso em: 20 jul 2021

WHO, World Health Organization. **COVID-19 Weekly epidemiological update on COVID-19 - 29 June 2021**. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---29-june-2021>. Acesso em: 15 jul 2021.

WIERSINGA, W. J. et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA**, v. 324, n. 8, ago. 2020.

WÖLFEL, R. et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. **Nature**, v. 581, n. 7809, maio 2020.

WU, C. et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. **Acta Pharmaceutica Sinica. B**, v. 10, n. 5, p. 766, maio 2020a.

WU, C. et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA Internal Medicine**, v. 180, n. 7, p. 1, jul. 2020b.

WYNANTS, L. et al. Prediction models for diagnosis and prognosis of covid-19: systematic review and critical appraisal. **BMJ**, v. 369, p. m1328, abr. 2020.

- XU, J. et al. Associations of procalcitonin, C-reaction protein and neutrophil-to-lymphocyte ratio with mortality in hospitalized COVID-19 patients in China. **Scientific Reports**, v. 10, 2020.
- YANG, J. et al. Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 94, p. 91, maio 2020a.
- YANG, Y. et al. Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 146, n. 1, p. 119- 127.e4, jul. 2020b.
- YE, Z. et al. Chest CT manifestations of new coronavirus disease 2019 (COVID-19): a pictorial review. **European Radiology**, p. 1, mar. 2020.
- YOSHIMOTO, T. et al. IL-12 Up-Regulates IL-18 Receptor Expression on T Cells, Th1 Cells, and B Cells: Synergism with IL-18 for IFN- $\gamma$  Production. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 7, p. 3400–3407, out. 1998.
- ZAIM, S. et al. COVID-19 and Multiorgan Response. **Current Problems in Cardiology**, v. 45, n. 8, p. 100618, ago. 2020.
- ZHAO, N.; DI, B.; XU, L. The NLRP3 inflammasome and COVID-19: Activation, pathogenesis and therapeutic strategies. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, jun. 2021.
- ZHOU, C. et al. The -137G/C single nucleotide polymorphism in IL-18 gene promoter contributes to tuberculosis susceptibility in Chinese Han population. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 36, p. 376–380, dez. 2015.
- ZHOU, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054, abr. 2020a.
- ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, mar. 2020b.
- ZHU, N. et al. Brief Report: A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727, fev. 2020.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**“INVESTIGAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS NA INFECÇÃO POR SARS-CoV-2: ASSOCIAÇÃO COM O PROGNÓSTICO, MORBIDADE E MORTALIDADE”**

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa **“INVESTIGAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS NA INFECÇÃO POR SARS-CoV-2: ASSOCIAÇÃO COM O PROGNÓSTICO, MORBIDADE E MORTALIDADE”**, a ser realizada no Hospital Universitário de Londrina (HU). O objetivo deste estudo é avaliar biomarcadores genéticos e imunológicos associados ao prognóstico, morbidade e mortalidade da doença causada por SARS-CoV-2.

Este estudo está selecionando pacientes atendidos no HU com diagnóstico de Síndrome Gripal, que pode ter como causa o SARS-CoV2 ou outros vírus respiratórios. Ao aceitar participar, após o diagnóstico laboratorial, você poderá ser alocado em um dos dois grupos a seguir: Grupo Outros Vírus Respiratórios (OVR) e Grupo COVID-19. Os pacientes alocados em qualquer dos dois grupos necessitarão fornecer informações clínicas e realizar uma coleta de sangue, no momento da internação (tempo zero do estudo). Serão realizados exames laboratoriais que para determinar quantitativamente as subpopulações de linfócitos, os níveis circulantes de citocinas, biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo e os genes relacionados [*IFNG* (rs2069718, rs1861493, rs1861494), *TGFBR2* (rs308465, rs9831477, rs6790424), *TGFBRI* (rs1800468, rs1800469, rs1800470, rs1800471, rs1800472), *IL10* (rs1800896, rs1800871, rs1800872), *FOXP3* (rs2232365, rs3761548), *APOBEC* (APOBEC3A/B deletion), *TNFA*, *IL6* (rs1800795, rs1800796), *IL17R* (rs2241043, rs2241049 e rs6518661), *IL17* (rs3819024, rs2275913 e rs3819025), *IL18* (rs360717, rs187238), *IL22R* (rs3795300, rs4233051 e rs4292900), *IL22* (rs2227484, rs2227485 e rs2227513), *IL23R* (rs12401432 e rs6656929), *IL23* (rs2066808 e rs2371494), HLA de classe I e II, genes associados ao inflamassoma]. Será realizado o sequenciamento viral para determinação da linhagem do vírus SARS-CoV2, *responsável pela infecção*. No entanto, caso você seja diagnosticado com COVID-19 você será acompanhado pela equipe de pesquisadores por 28 dias, e os dados laboratoriais e clínicos associados a morbidade e mortalidade da doença serão obtidos de seu prontuário no 7º, 14º e 28º dia após o início do estudo.

Esclarecemos, que suas informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Todos os dados coletados, clínicos e laboratoriais, serão descartados após a publicação do estudo. Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos que você não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação. Garantimos, porém, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação

A sua participação neste estudo não resultará em benefícios diretos à você. No entanto, ressaltamos que sua participação contribuirá para o melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento e progressão da doença, resultando em benefícios para a sociedade como um todo. Além disso, o sequenciamento viral possibilitará dados epidemiológicos importantes para o Estado do Paraná, possibilitando determinar qual a linhagem circulante e seu envolvimento com a evolução clínica da doença.

Quanto aos riscos, informamos que sua participação não acarretará qualquer risco à sua saúde nem alteração de qualquer um dos seus tratamentos. A coleta de sangue pode ocasionar sinais decorrentes da punção venosa e consiste: dor no local da punção venosa ou pequeno hematoma e, muito raramente, vermelhidão ou infecção local. Mesmo sendo mínimos, caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pelos farmacêuticos responsáveis pela coleta de sangue e um dos pesquisadores deste estudo.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar (**Walton Luiz Del Tedesco Júnior, Avenida Robert Koch 60, telefone: 99650-0552, [drwaltontedesco@gmail.com](mailto:drwaltontedesco@gmail.com)** ou **Andréa Name Colado Simão, Avenida Robert Koch 60, telefone 99627-8181**), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao prédio do LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue a você.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue a você.

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

**Pesquisador Responsável**  
**Walton Luiz Del Tedesco Júnior**  
 RG: 7.511.648-9  
 Tel: 99650-0552

**Andréa Name Colado Simão**  
 RG: 6.226.736-4  
 Tel: 99627-8181

Eu, \_\_\_\_\_ (**colocar nome por extenso do participante da pesquisa**), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar voluntariamente da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B

## FICHA CONSULTA PACIENTE

**PROJETO DE PESQUISA COVID-19 – SWAB E SANGUE**

Nome: \_\_\_\_\_

Etnia: CAUCASIANO ( ) NÃO CAUCASIANO ( )

Prontuário: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Classificação COVID-19 (OMS): LEVE ( ) MODERADO ( ) GRAVE ( )

Endereço: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_ Data de isolamento: \_\_\_\_\_

CPF: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

<b>Sexo</b>	Masculino ( )	Feminino ( )
<b>Medidas</b>	Peso:	Altura:
<b>Comorbidades</b>	Não ( )	Sim ( )
Doença cardíaca ( ) Qual?	Doença cardíaca ( ) Qual?	
Diabetes ( ) Qual?	Gestante ( ) Quantas semanas?	
Doença hepática ( ) Qual?	Doença neurológica ( ) Qual?	
Hipertensão (HAS) ( )	Hipercolesterolemia ( )	
Obesidade ( )	Tabagismo ( )	
Acidente vascular cerebral ( )	Doença renal crônica dialítica ( )	
DPOC ( )	Doença renal crônica não dialítica ( )	
Outras doenças:		
<b>Tempo de início dos sintomas:</b>		
<b>Sintomas</b>	Febre ( )	Tosse ( )
Odinofagia ( )	Mialgia ( )	Diarreia ( )
Náusea/vômito ( )	Cefaleia ( )	Coriza ( )
Tontura ( )	Fadiga ( )	Disgeusia ( )
Calafrios ( )	Congestão nasal ( )	Congestão conjuntiva ( )
Dificuldade de deglutir ( )	Rash cutâneo ( )	Asas nasais ( )
Cianose ( )	Dispneia ( )	Anosmia ( )
Perda de apetite ( )	Outros sintmas:	
<b>Tratamento para infecção pré-internação H.U. SIM ( ) NÃO ( )</b> Antitérmico ( ) Antibiótico ( ) Outros ( )		
<b>Medicamentos de uso contínuo</b>	Anti-hipertensivos ( )	Nome dos Medicamentos

	Hipolipemiantes ( ) Hipoglicemiantes Orais ( ) Insulina ( ) Ansiolíticos ( ) Antidepressivo ( ) Corticoide ( ) Outros imunossupressores ( ) Kit COVID ( )	
SpO2 na admissão:		
Tomografia de tórax:		

Coleta das amostras:

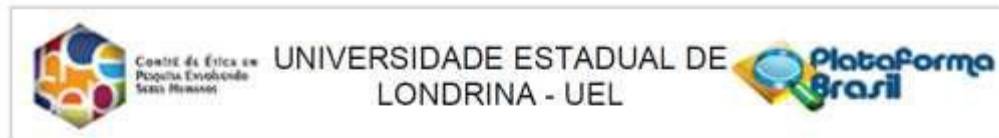
COLETA	DATA	Nº DO MOVIMENTO
PCR SARS-CoV-2 Orofaringe		
Sangue		

Desfecho até a alta do paciente:

	NÃO	SIM
Alta		
Óbito		
IOT		
UTI		
Tempo de internação na UTI		
Tempo de internação hospitalar		
Infecções secundárias		

**ANEXOS**

## ANEXO A

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Investigação de fatores genéticos e imunológicos na infecção por SARS-CoV-2: associação com o prognóstico, morbidade e mortalidade

**Pesquisador:** Andréa Name Colado Simão

**Área Temática:**

**Versão:** 5

**CAAE:** 31656420.0.0000.5231

**Instituição Proponente:** CCS - Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicologias

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.629.527

## Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda de projeto já aprovado:

1. Inclusão de pesquisadores: serão inseridos novos pesquisadores ao grupo de pesquisa pois possuem experiência na realização específica das avaliações laboratoriais propostas:

- Profa Dra. Jeane Eliete Laguila Visentainer e Prof. Dr. Quirino Alves de Lima Neto docentes da Universidade Estadual de Maringá (UEM) serão responsáveis pela genotipagem do sistema HLA em seus respectivos laboratórios na UEM - Prof. Dr. David Livingstone A. Figueiredo: será responsável pelo sequenciamento viral e do exoma humano.

2. Inclusão de novos objetivos:

- Associar a análise microbiológica de amostras biológicas de pacientes com COVID-19 à sua evolução clínico-laboratorial e ao desfecho do período de internação.

- Comparar os marcadores de estresse oxidativo em pacientes de acordo com a gravidade da doença;

- Determinar polimorfismos de genes HLA classe I (A, B e C) e de classe II (DR e DQ)

- Investigar se as alterações genéticas do SARS-CoV-2 e de seus receptores estão correlacionadas com a evolução clínica dos paciente com COVID-19.

- Classificar, por meio de abordagem genômica, os subtipos de SARS-CoV-2 em uma amostragem de pacientes dos estados do Paraná e de São Paulo. - Caracterizar o perfil de expressão global de miRNAs e mRNAs de linfócitos de pacientes da coorte.

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

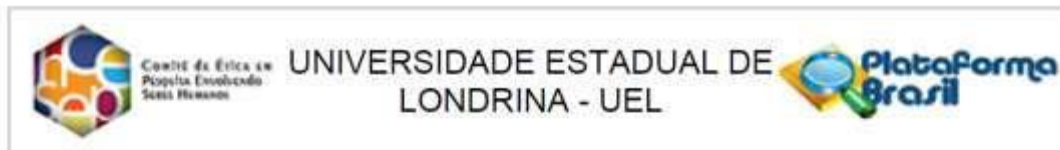
**CEP:** 86.057-970

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br



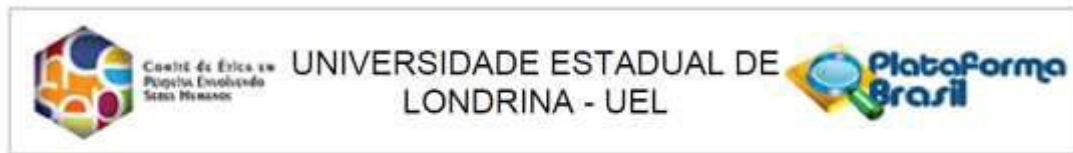
Continuação do Parecer: 4.629.527

### 3. Novas Metodologias

Foram incluídas novas metodologias na seção de Sujeitos e Métodos para contemplar os novos objetivos propostos. Pacientes com COVID-19 com e sem diagnóstico de infecção hospitalar durante a internação serão submetidos à coleta e análise de dados clínicos, laboratoriais e de terapia antimicrobiana prévia, assim como seu desfecho clínico. Os resultados das análises microbiológicas de sangue, aspirado traqueal, lavado bronco- alveolar, líquido pleural, líquor e urina dos pacientes com diagnóstico de COVID-19 serão avaliados quanto ao agente isolado, sua contagem em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL), bem como a presença de perfil inflamatório nos resultados das análises laboratoriais sanguíneas de rotina. Serão avaliados os prontuários eletrônicos e notificações de pneumonia hospitalar, infecção urinária e infecção da corrente sanguínea da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital Universitário segundo os Critérios Diagnósticos das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (Nota Técnica GVIMS/GGTES 03/2019) para determinar quais pacientes tiveram diagnóstico clínico de infecção hospitalar durante a internação. Serão avaliados os perfis de susceptibilidade, a terapia antimicrobiana utilizada previamente, aquela estabelecida após o diagnóstico da etiologia infecciosa bacteriana ou fúngica associada e o desfecho clínico em 7 dias, 14 dias e 28 dias.

- Análise de polimorfismos de genes HLA clássicos de classe I e II
- Sequenciamento de genoma do vírus SARS-CoV-2
- Exoma: Para o sequenciamento do exoma, será preparado uma biblioteca de DNA com o kit Nextera
- RNA-seq: Para o sequenciamento do RNA total será utilizado o sequenciamento em larga escala denominado RNA-seq.
- Avaliação do Estresse Oxidativo: Determinação de metabólitos de óxido nítrico (NOx): A quantificação de subprodutos de óxido nítrico (NOx) será medida através da determinação da concentração de nitritos no plasma.
- Capacidade Antioxidante Total Plasmática (TRAP): A capacidade antioxidante total plasmática (TRAP) será avaliada por quimiluminescência (QL) em uma adaptação do método da técnica descrita por Repetto et al.
- Quimiluminescência Induzida por t-Butil Hidroperóxidos (QL): A avaliação da formação de lipoperóxidos por QL será efetuada em uma adaptação da técnica descrita por Flecha e colaboradores
- Determinação de hidroperóxidos lipídicos: As concentrações de hidroperóxidos lipídicos serão

Endereço: LABESC - Sala 14  
 Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-970  
 UF: PR Município: LONDRINA  
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.629.527

determinados pela técnica de Ferrous Oxidation-xylene Orange Assay

- Determinação dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP): Concentrações plasmáticas de AOPP serão determinados utilizando método semiautomatizado descrito por Witko-Sarsat et al
- Determinação da superóxido dismutase (SOD): A atividade da SOD nos eritrócitos será determinada usando o método do pirogalol descrita por Marklund e Marklund
- Determinação da catalase (CAT): A análise da CAT será através da medida do decaimento na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da geração do oxigênio, utilizando a técnica descrita por Aebi et al
- Determinação da glutatona peroxidase (Gpx): A atividade da GPx será determinada segundo o método descrito por Sies
- Determinação da atividade da paraoxonase1 (PON 1): A atividade total PON1 e dos seus genótipos (PON1Q/Q192, PON1R/R192e PON1Q/R192) será realizado pela metodologia descrita por Richter, JarvinkeFurlong

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

. Avaliar biomarcadores genéticos e imunológicos associados ao prognóstico, morbidade e mortalidade da doença causada por SARS-CoV-2.

Objetivo Secundário:

- . Estabelecer o perfil diferencial, quantitativo e qualitativo, da resposta imunológica inflamatória, Th1, Th2, Th17 e T regulatória (Treg) em pacientes com SARS-CoV-2;
- . Associar os biomarcadores da resposta imunológica (populações celulares e perfis de citocinas) com a presença de comorbidades, sintomas clínicos, prognóstico, morbidades e mortalidade;
- . Comparar a frequência alélica, genotípica e haplotípica dos diversos SNPs avaliados entre as populações estudadas;
- . Associar os genótipos/haplótipos com as subpopulações de linfócitos e os níveis plasmáticos de citocinas assim como com sintomas clínicos, prognóstico, sucesso terapêutico com o tratamento convencional e com os indicadores de morbidade e mortalidade.

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

Segundo a pesquisadora, quanto aos riscos: "A coleta de sangue pode ocasionar sinais decorrentes da punção venosa e consiste: dor no local da punção venosa ou pequeno hematoma e, muito raramente, vermelhidão ou infecção local. Mesmo sendo mínimos, caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pelos farmacêuticos responsáveis pela coleta de sangue e um dos pesquisadores deste estudo.

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

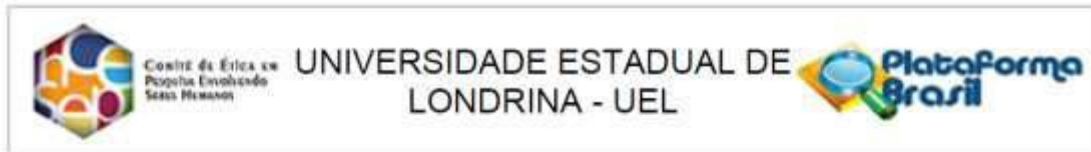
**CEP:** 86.057-970

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.629.527

**Benefícios:** "Este estudo contribuirá para o conhecimento das frequências de vários polimorfismos genéticos em pacientes com COVID-19. Espera-se com este estudo contribuir para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento e evolução da doença, assim como propor preditores de que auxiliem na progressão da doença. Por fim, a avaliação do envolvimento de genes relacionados à citocinas pró e anti- inflamatórias, a identificação do perfil de citocinas plasmáticas poderá contribuir para o melhor entendimento da fisiopatologia da doença, possibilitando a identificação de novos biomarcadores e alvos terapêuticos."

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

"Justificativa da Emenda: Vimos por meio deste, solicitar a autorização deste Comitê para a realização de novos testes laboratoriais no Projeto "INVESTIGAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS NA INFECÇÃO POR SARS-CoV-2: ASSOCIAÇÃO COM O PROGNÓSTICO, MORBIDADE E MORTALIDADE". Abaixo listamos as principais alterações realizadas e que todas elas foram destacadas em grifo amarelo no projeto de pesquisa anexado à Plataforma Brasil. Informamos também que foram anexados Autorizações dos Pesquisadores que participarão do projeto. 1. Inclusão de pesquisadores: serão inseridos novos pesquisadores ao grupo de pesquisa pois possuem experiência na realização específica das avaliações laboratoriais propostas: - Profa Dra. Jeane Eliete Laguilha Visentainer e Prof. Dr. Quirino Alves de Lima Neto docentes da Universidade Estadual de Maringá (UEM) serão responsáveis pela genotipagem do sistema HLA em seus respectivos laboratórios na UEM - Prof. Dr. David Livingstone A. Figueiredo: será responsável pelo sequenciamento viral e do exoma humano 2. Inclusão de novos objetivos: Foram acrescentados novos objetivos ao projeto:

- Associar a análise microbiológica de amostras biológicas de pacientes com COVID-19 à sua evolução clínico-laboratorial e ao desfecho do período de internação.
- Comparar os marcadores de estresse oxidativo em pacientes de acordo com a gravidade da doença
- Determinar polimorfismos de genes HLA classe I (A, B e C) e de classe II (DR e DQ)
- Investigar se as alterações genéticas do SARS-CoV-2 e de seus receptores estão correlacionadas com a evolução clínica dos paciente com COVID-19.
- Classificar, por meio de abordagem genômica, os subtipos de SARS-CoV-2 em uma amostragem de pacientes dos estados do Paraná e de São Paulo.
- Caracterizar o perfil de expressão global de miRNAs e mRNAs de linfócitos de pacientes da coorte.

**Endereço:** LABESC - Sala 14  
**Bairro:** Campus Universitário  
**UF:** PR **Município:** LONDRINA  
**Telefone:** (43)3371-5455 **CEP:** 86.057-970  
**E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.629.527

3. **Novas Metodologias:** Foram incluídas novas metodologias na seção de Sujeitos e Métodos para contemplar os novos objetivos propostos. A inclusão de novos pesquisadores, novos objetivos e metodologias irá proporcionar a obtenção de dados de suma importância para o entendimento da fisiopatologia da COVID 19, proporcionando o desenvolvimento de uma pesquisa mais robusta e em concordância com as necessidades/dúvidas emergentes na comunidade científica."

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

Documentos inseridos para a emenda:

1. Informações Básicas do Projeto
2. Projeto detalhado com as alterações grifadas
3. Carta de justificativa ao CEP
4. Termo de Responsabilidade dos pesquisadores da UEM incluídos no grupo de pesquisa: Jeane Eliete Laguilá Visentainer e Quirino Alves de Lima Neto.
5. Declaração de Concordância dos Serviços Envolvidos e/ou de Instituição Co-Participante do Instituto para a Pesquisa do Câncer (IPEC) de Guarapuava assinada por David Livingstone A. Figueiredo, que foi incluído como membro do grupo de pesquisa.

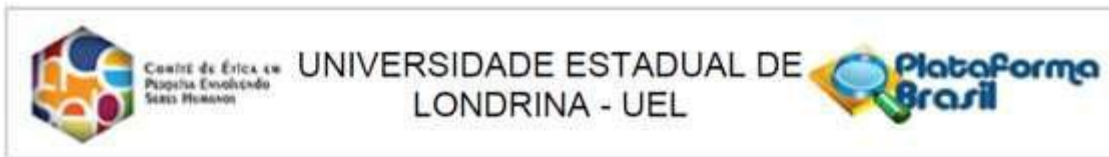
Não foram inseridos:

1. Novo TCLE com as alterações propostas;
2. Nova autorização da Instituição Coparticipante, uma vez que houve modificações na coleta de dados referentes resultados das análises microbiológicas de sangue, aspirado traqueal, lavado bronco-alveolar, líquido pleural, líquor e urina dos pacientes com diagnóstico de COVID-19 referentes ao agente isolado, presença de perfil inflamatório nos resultados das análises laboratoriais sanguíneas de rotina. Coleta de dados em prontuários eletrônicos e notificações de pneumonia hospitalar, infecção urinária e infecção da corrente sanguínea da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital Universitário;
3. Declaração de Concordância dos Serviços Envolvidos da Universidade Estadual de Maringá (UEM);
4. Esclarecimentos referente à origem dos dados de pacientes de São Paulo citados em um novo objetivo secundário.

**Recomendações:**

Esclarecemos que segundo o Manual do Pesquisador: "As modificações propostas pelo pesquisador responsável não podem descaracterizar o estudo originalmente proposto e aprovado pelo Sistema CEP-CONEP. Em geral, modificações substanciais no desenho do estudo, nas

<b>Endereço:</b> LABESC - Sala 14	<b>CEP:</b> 86.057-970
<b>Bairro:</b> Campus Universitário	
<b>UF:</b> PR	<b>Município:</b> LONDRINA
<b>Telefone:</b> (43)3371-5455	<b>E-mail:</b> csp268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.629.527

hipóteses, na metodologia e nos objetivos primários não podem ser consideradas emendas, devendo o pesquisador responsável submeter novo protocolo de pesquisa para ser analisado pelo Sistema CEP-CONEP."

<http://plataformabrasil.saude.gov.br/visao/publico/indexPublico.jsf>

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

Para a aprovação da emenda a pesquisadora deverá:

1. Apresentar novo TCLE com as alterações propostas;

ANÁLISE: A pesquisadora anexou novo TCLE com as alterações propostas.

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

2. Apresentar nova autorização da Instituição Coparticipante (HU) ou emenda da aprovação, uma vez que houve modificações na coleta de dados referentes resultados das "análises microbiológicas de sangue, aspirado traqueal, lavado bronco-alveolar, líquido pleural, líquido e urina dos pacientes com diagnóstico de COVID-19 referentes ao agente isolado, presença de perfil inflamatório nos resultados das análises laboratoriais sanguíneas de rotina, Coleta de dados em prontuários eletrônicos e notificações de pneumonia hospitalar, infecção urinária e infecção da corrente sanguínea da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital Universitário";

ANÁLISE: A pesquisadora informa que: "Essa parte foi retirada da Emenda. Os pesquisadores decidiram submeter um novo projeto específico para coleta destas informações."

PENDÊNCIA RESOLVIDA

3. Declaração de Concordância dos Serviços Envolvidos da Universidade Estadual de Maringá (UEM) uma vez que haverá atividades da pesquisa nessa Instituição ("serão responsáveis pela genotipagem do sistema HLA em seus respectivos laboratórios na UEM");

ANÁLISE: A pesquisadora anexou a autorização solicitada (declaração de concordância do Laboratório de Imunogenética da UEM).

PENDÊNCIA RESOLVIDA

4. Esclarecimentos referente à origem dos dados de pacientes de São Paulo citados em um novo objetivo secundário ("Classificar, por meio de abordagem genômica, os subtipos de SARS-CoV-2 em uma amostragem de pacientes dos estados do Paraná e de São Paulo"). Apresentar também os documentos referentes aos mesmos (TCLE, Autorização da Instituição ou autorização de uso de

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

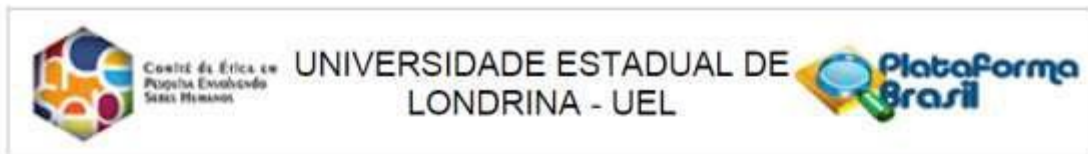
**CEP:** 86.057-970

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.629.527

banco de dados);

ANÁLISE: A pesquisadora informou que: " Não teremos amostra de São Paulo, esta informação foi colocada erroneamente no projeto. Desta forma, retiramos essa informação do objetivo secundário."

PENDÊNCIA RESOLVIDA.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_161978_6_E1.pdf	05/04/2021 12:36:14		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetoadendofinal.pdf	05/04/2021 12:24:17	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Outros	RespostaCEPfinal.pdf	05/04/2021 12:23:38	Andréa Name Colado Simão	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEfinal.pdf	05/04/2021 12:21:57	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Outros	AnueciaDavid.pdf	22/03/2021 10:34:26	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Declaração de concordância	concordanciaJeane.pdf	22/03/2021 10:20:23	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	materialbiologico.pdf	26/05/2020 18:26:24	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	09/05/2020 18:50:42	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Outros	AutorizacaoHU.pdf	07/05/2020 17:28:49	Andréa Name Colado Simão	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep288@uel.br



Conselho de Ética em  
Pesquisa Envolvendo  
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 4.629.527

LONDRINA, 05 de Abril de 2021

---

**Assinado por:**  
**Adriana Lourenço Soares Russo**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.057-970

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br