



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

Maria Juliana Bezerra Costa

**Perfil de prostaglandina E₂
em pacientes com diferentes estágios clínicos da COVID-19**

Barreiras-BA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

Maria Juliana Bezerra Costa

**Perfil de prostaglandina E₂
em pacientes com diferentes estágios clínicos da COVID-19**

Monografia apresentada à Universidade Federal do Oeste da Bahia como requisito do componente curricular Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientador: Dr. Théo de Araújo Santos.

Barreiras-BA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

C837 Costa, Maria Juliana Bezerra.

Perfil de prostaglandina E2 em pacientes com diferentes estágios clínicos da COVID-19. / Maria Juliana Bezerra Costa. – 2022.

54f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Théo de Araújo Santos.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2022.

1. Virologia. 2. Prostaglandina E2. 3. COVID-19. I. Santos, Théo de Araújo. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia - Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 614.575

Biblioteca Universitária de Barreiras - UFOB




UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO


Aos 13 dias do mês de julho de 2022, às 10 horas e 16 minutos, em sessão pública realizada em sala virtual do google meet, na presença da Banca Examinadora presidida pelo(a) Professor(a) Théo de Araújo Santos e composta pelos examinadores: Luiz Gustavo Rodrigues de Oliveira, Yasmin Monara Ferreira de Sousa Andrade, a aluna Maria Juliana Bezerra Costa apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: Perfil de prostaglandina E₂ em pacientes com diferentes estágios clínicos da COVID-19, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Bacharelado em Medicina. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela Aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao aluno e demais presentes e eu, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais examinadores.

Documento assinado digitalmente
 THEO DE ARAUJO SANTOS
Data: 13/07/2022 11:47:04-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Presidente da Banca Examinadora

Yasmin Monara Ferreira de Sousa Andrade

Examinador 01

Documento assinado digitalmente
 LUIZ GUSTAVO RODRIGUES OLIVEIRA
Data: 13/07/2022 17:24:11-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Examinador 02

RESUMO

Introdução: A prostaglandina E₂ (PGE₂) é um dos principais produtos do metabolismo do ácido araquidônico e está relacionada com a modulação da resposta imune a infecções virais. Estudos recentes identificaram níveis aumentados de PGE₂, bem como de outros eicosanoides, no plasma e no lavado bronco-alveolar de pacientes com COVID-19. Esse mediador é capaz de modular as respostas imunes em vários tipos de células durante a infecção por SARS-CoV-2, influenciando a patogênese da COVID-19. Dessa forma, a PGE₂ parece ser importante para o desenvolvimento da infecção. **Metodologia:** Nesse contexto, foi realizado um estudo de corte transversal durante a primeira onda da pandemia, no qual foram avaliados os níveis plasmáticos de PGE₂ de pacientes em diferentes estágios clínicos da COVID-19, a saber: não infectados (NI, n=10), curados (C, n=13), moderados (M, n=29), graves (G, n=15) e óbitos (O, n=11). Para as dosagens de PGE₂ e de dímero-D, foram realizados testes por ELISA; para a quantificação da carga viral, foi feita a técnica de RT-qPCR. **Resultados:** Nesta análise, os níveis plasmáticos de PGE₂ estavam mais baixos em pacientes com COVID-19, quando comparados com controles saudáveis, porém, os níveis desse mediador não foram relacionados à carga viral nem estavam mais elevados no plasma de pacientes com doença mais grave. Ademais, não foram encontradas correlações estatisticamente significantes entre PGE₂ nem com níveis plasmáticos de dímero-D nem com a carga viral. **Conclusão:** Os níveis plasmáticos de PGE₂ não estão associados com a gravidade da COVID-19. Pacientes hospitalizados com COVID-19 são frequentemente tratados com corticosteroides e com anti-inflamatórios não-esteroidais, os quais podem ser responsáveis pela redução de PGE₂ observada nos resultados. Análises adicionais deverão ser realizadas para avaliar a participação dos receptores de PGE₂ em pacientes com diferentes formas clínicas da COVID-19.

Palavras-chave: COVID-19, Prostaglandina E₂, Carga viral, SARS-CoV-2.

ABSTRACT

Introduction: Prostaglandin E₂ (PGE₂) is one of the main products of arachidonic acid metabolism and is related to the immune response to viral infections. Recent studies have identified increased levels of PGE₂, as well as other eicosanoids, in the plasma and bronchoalveolar lavage of patients with COVID-19. This mediator is able to modulate immune responses in various cell types during SARS-CoV-2 infection, influencing the pathogenesis of COVID-19. Thus, PGE₂ seems to be important for development of SARS-CoV-2 infection.

Methodology: In this context, a cross-sectional study was made during the first wave of the pandemic, in which PGE₂ plasma levels of patients in different clinical stages were evaluated, namely: uninfected (U, n=10), cured (C, n=13), moderate (M, n=29), severe (S, n=15) and deaths (D, n=11). For PGE₂ and D-dimer assays, ELISA tests were performed; for viral load quantification, RT-qPCR technique was used.

Results: In this analysis, plasma levels of PGE₂ were lower in patients with COVID-19 when compared to healthy individuals, however, levels of this mediator were related neither to viral load nor to D-dimer plasma levels in patients with more severe disease. Furthermore, there were none statistically significant correlations between PGE₂ neither with plasma D-dimer levels nor with SARS-CoV-2 burden.

Conclusion: PGE₂ plasma levels are not associated with COVID-19 severity. Oftenly, hospitalized patients are treated with corticosteroids and non-steroidal anti-inflammatory drugs; thereby, any of these drug classes could be responsible for the PGE₂ reduction observed in the results of this study. Additional analyzes should be performed to assess PGE₂ receptors in patients with different clinical forms of COVID-19.

Keywords: COVID-19, Prostaglandin E₂, Viral burden, SARS-CoV-2.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FISIOPATOLOGIA DA COVID-19 _____	10
FIGURA 2 - ESQUEMATIZAÇÃO DE POSSÍVEIS SINTOMAS DA COVID-19 _____	12
FIGURA 3 – DÍMERO-D FAVORECE A PRODUÇÃO DE PGE ₂ E DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM MONÓCITOS HUMANOS. _____	18
FIGURA 4 - DESENHO DO ESTUDO _____	25
FIGURA 5 - NÍVEIS PLASMÁTICOS DE PGE ₂ EM PACIENTES COM COVID-19 _____	35
FIGURA 6 - CORRELAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE PGE ₂ E DE DÍMERO D _____	36
FIGURA 7 - CORRELAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE PGE ₂ E CARGA VIRAL _____	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES DE ACORDO COM A GRAVIDADE DOS SINTOMAS E DESFECHOS DA COVID-19 _____	29
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES ANALISADOS _____	33

LISTA DE ABREVIACOES

SARS-CoV	Coronavírus 1 da síndrome respiratória aguda grave
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave
Proteína Spike	Proteína S
Enzima conversora de angiotensina 2	ECA2
Doença Causada pelo Coronavírus 2019	COVID-19
Interleucina	IL
Fator de necrose tumoral alfa	TNF- α
doença pulmonar obstrutiva crônica	DPOC
doença renal crônica	DRC
Síndrome do desconforto respiratório agudo	SDRA
Lactato desidrogenase	LDH
Aspartato aminotransferase	AST
Alanina transaminase	ALT
Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real	RT-qPCR
Creatina quinase	CK
Velocidade de hemossedimentação	VHS
Tomografia computadorizada	TC
Ácido araquidônico	AA
Prostaglandina	PG
Cicloxigenase	COX
Tromboxano A ₂	TXA ₂
Prostaglandina E ₂	PGE ₂
Ácido 12-hidroxiheptadecatenóico	12-HHTrE
Prostaglandina sintase	PGES
Interferon	IFN
Células T natural killers	NK
Anti-inflamatórios não esteroides	AINEs
Ensaio de Imunoabsorção Enzimática	ELISA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	SARS-COV-2	8
1.2	IMUNOPATOGENESE DA COVID-19	8
1.2.1	Entrada do vírus na célula	8
1.2.2	Células afetadas	9
1.2.3	Desenvolvimento da COVID-19	9
1.3	COVID-19	10
1.3.1	Transmissão	10
1.3.2	Características demográficas e comorbidades	11
1.3.3	Manifestações clínicas	11
1.3.4	Manifestações laboratoriais	12
1.3.5	Manifestações radiológicas	13
1.4	COVID-19 GRAVE	13
1.4.1	Resposta imunológica e gravidade da COVID-19	14
1.5	EICOSANOIDES E A RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA COVID-19	15
1.5.1	PGE₂ na COVID-19	16
1.6	TRATAMENTO DA COVID-19 COM MEDICAMENTOS QUE ATUAM NA VIA DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO	19
2	JUSTIFICATIVA	21
3	PROBLEMA	22
4	HIPÓTESE	23
5	OBJETIVOS	24
5.1	OBJETIVO GERAL	24
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
6	METODOLOGIA	25
6.1	DESENHO DO ESTUDO	25
6.2	TIPO DE ESTUDO	26
6.3	LOCAL DE PESQUISA	26
6.4	POPULAÇÃO	26
6.5	CRITÉRIOS PARA INCLUSÃO DOS PARTICIPANTES	26

6.6	CRITÉRIOS PARA EXCLUSÃO DOS PARTICIPANTES	27
6.7	AMOSTRA	27
6.8	QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL	30
6.9	QUANTIFICAÇÃO DO D-DÍMERO E DE EICOSANOIDES	30
6.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	30
6.11	ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS (RESOLUÇÃO 466/12)	31
7	RESULTADOS	32
7.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES	32
7.2	NÍVEIS PLASMÁTICOS DE PGE ₂ NÃO ESTÃO ASSOCIADOS À GRAVIDADE DA COVID-19	34
7.3	NÍVEIS DE PGE ₂ NÃO ESTÃO ASSOCIADOS À GRAVIDADE DA DOENÇA.	35
7.4	NÍVEIS DE PGE ₂ NÃO ESTÃO ASSOCIADOS À CARGA VIRAL NA COVID-19.	36
8	DISCUSSÃO	38
	PERSPECTIVAS	41
	ANEXOS	42
	EQUIPE	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 SARS-COV-2

Detectado inicialmente no final de 2019, o Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2) foi identificado pela primeira vez após um grupo de pacientes com pneumonia de origem etiológica previamente desconhecida ter sido relacionado a um mercado popular na província de Wuhan, China (ZHU ., 2020)

O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado de RNA de fita simples positiva que pertence à família *Coronaviridae* e ao gênero *Betacoronavirus* (JACKSON *et al.*, 2022). Outros membros dessa família incluem as cepas altamente patogênicas denominadas Coronavírus 1 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-1) e o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) (GUSTINE; JONES, 2021).

O SARS-CoV-2 é composto por quatro proteínas estruturais: a do nucleocapsídeo (N), a de membrana (M), a de envelope (E) e a Spike (S) (JACKSON *et al.*, 2022). Durante o processo de infecção, a proteína S, uma proteína homotrimérica presente no envelope viral, é clivada em duas subunidades, S1 e S2, as quais são fundamentais para o estágio inicial de infecção (JACKSON *et al.*, 2022; LAN *et al.*, 2020).

1.2 IMUNOPATOGÊNESE DA COVID-19

1.2.1 Entrada do vírus na célula

A ligação da proteína S aos receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) desencadeia uma cascata de eventos que leva à fusão entre a célula do hospedeiro e o envelope viral, permitindo a entrada do vírus na célula (LAN *et al.*, 2020). Na nova célula-alvo, a subunidade S1 liga-se ao receptor ECA2, enquanto a subunidade S2 ancora a proteína S à membrana do virion, mediando a fusão da membrana viral (JACKSON *et al.*, 2022). As proteínas E e M contribuem para a montagem e para o brotamento do vírus através das interações com outras proteínas virais (JACKSON *et al.*, 2022). Por fim, os vírus montados

atingem a membrana plasmática por meio da via secretora da célula, onde são liberados no espaço extracelular após a fusão das vesículas contendo o vírus com a membrana plasmática (JACKSON *et al.*, 2022).

1.2.2 Células afetadas

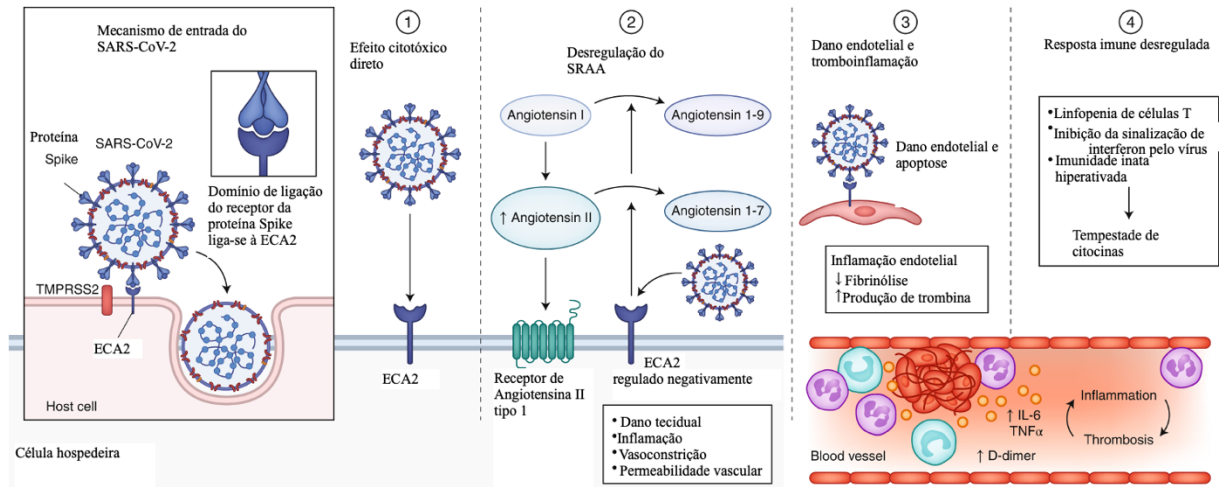
O SARS-CoV-2 afeta primária e principalmente as células do tecido epitelial do trato respiratório, mais especificamente os pneumócitos, onde apresenta a maior taxa de replicação, atingindo seu pico replicativo por volta do quarto dia de infecção (WÖLFEL *et al.*, 2020).

É importante ressaltar, todavia, que a expressão de ECA2 é feita em células de diferentes locais, como da mucosa oral, do epitélio alveolar, do intestino, dos rins, do fígado e do coração, por exemplo (BRODIN, 2021), evidenciando que o SARS-CoV-2 tem capacidade de infectar diversos tecidos. Assim, o SARS-CoV-2 possui uma invasão heterogênea e variada de diferentes células e tecidos, afetando muito mais órgãos do que somente o pulmão (SANTOS; TAVARES; MENGEL, 2020). Por conta disso, o vírus pode ser detectado em diferentes segmentos do trato gastrointestinal, tais como no esôfago, no estômago e até no reto, bem como em diversos outros tecidos, como o cardiovascular, o nervoso e o endócrino, por exemplo (LIN *et al.*, 2020).

1.2.3 Desenvolvimento da COVID-19

Após ter sucesso em sua replicação, o SARS-CoV-2 gera a doença do coronavírus 2019 (COVID-19) ([OMS, acessado em 01/07/2022](#)). Os mecanismos propostos para o desenvolvimento da COVID-19 incluem (i) dano citotóxico direto mediado pelo vírus; (ii) desregulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, como consequência da regulação negativa da ECA2 relacionada à entrada viral, que leva à diminuição da clivagem da angiotensina I e da angiotensina II; (iii) danos endoteliais e tromboinflamação; e (iv) desregulação da resposta imune com hiper inflamação, causada pela inibição da sinalização do interferon pelo vírus, depleção de células T e produção de citocinas pró-inflamatórias, particularmente a interleucina (IL) 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Figura 1) (GUPTA *et al.*, 2020).

Figura 1 - Fisiopatologia da COVID-19



Fonte: Adaptada de Gupta *et al.*, 2020.

1.3 COVID-19

1.3.1 Transmissão

É reconhecido atualmente que a principal forma de transmissão da COVID-19 de humano para humano ocorre através de gotículas respiratórias expelidas por um indivíduo infectado; portanto, tossir e espirrar propagam o SARS-CoV-2 no ar, aumentam o risco de indivíduos não infectados contraírem a doença. Além disso, a transmissão do SARS-CoV-2 também pode ocorrer como resultado do contato com objetos inanimados contaminados, conhecidos como fômites (SHARMA; AHMAD FAROUK; LAL, 2021). Também é sabido que há uma correlação positiva entre a carga viral de SARS-CoV-2 e maior transmissibilidade da COVID-19 (DADRAS *et al.*, 2022).

Quanto às infecções nosocomiais, é sabido que os hospitais são uma importante fonte de transmissão secundária do SARS-CoV-2, pois hospedam muitos indivíduos infectados. Quando coletadas amostras de superfície das enfermarias de COVID-19 para evidência de RNA viral, descobriu-se que instalações sanitárias e amostras de ar possuíam resultado positivo para SARS-CoV-2. Particularmente, as maiores concentrações de vírus no ar obtidas foram provenientes de pacientes que estavam recebendo oxigênio através de uma cânula nasal (SHARMA; AHMAD FAROUK; LAL, 2021).

1.3.2 Características demográficas e comorbidades

A idade média dos pacientes com COVID-19 foi de 51,97 anos, sendo 55,9% do sexo masculino. Os pacientes apresentavam comorbidades em 36,8% dos casos, sendo as mais significativas hipertensão, doenças cardiovasculares e diabetes (RODRIGUEZ-MORALES *et al.*, 2020).

Todos as seguintes comorbidades estavam associados à maior risco para COVID-19 grave: hipertensão, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doença renal crônica (DRC) e câncer. Além disso, o risco de mortalidade foi significativamente aumentado em indivíduos com doença cardiovascular, DPOC, DRC, doença cerebrovascular e câncer (SINGH *et al.*, 2020).

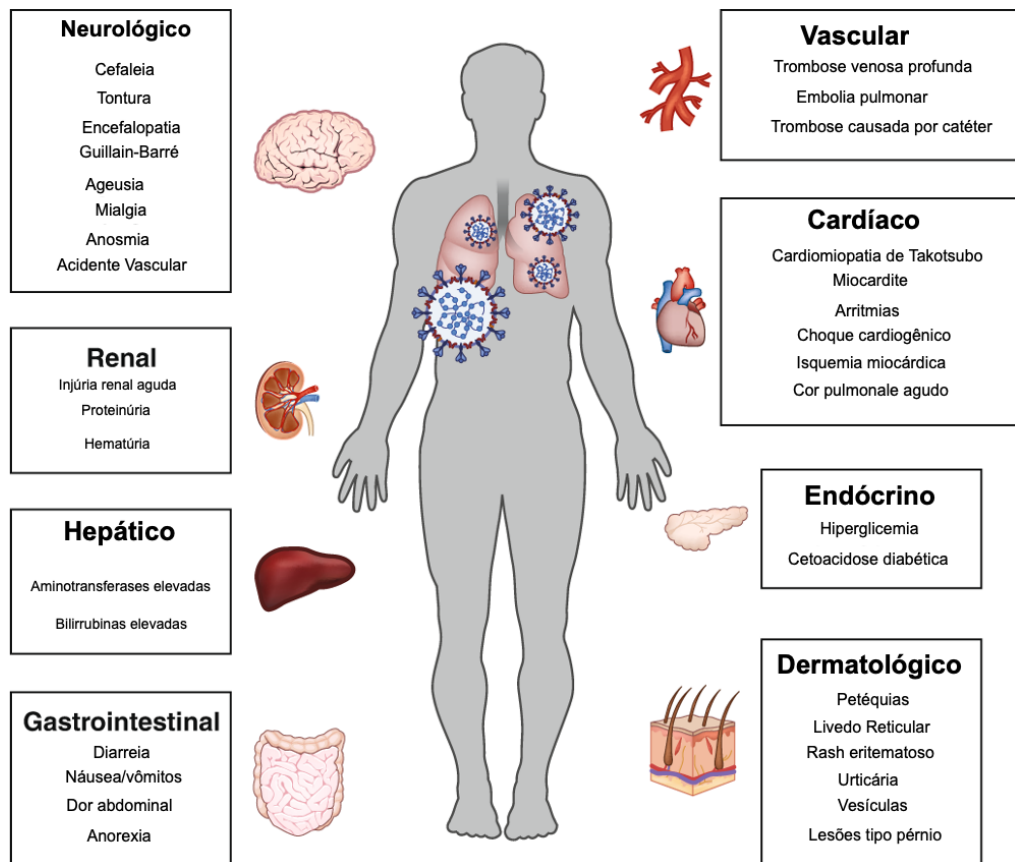
1.3.3 Manifestações clínicas

Clinicamente, a apresentação da doença de COVID-19 é heterogênea. Os pacientes podem ser assintomáticos, manifestar doença respiratória superior leve e até mesmo apresentarem pneumonia viral grave, necessitando de hospitalização e podendo progredir para síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e/ou para a morte (GUSTINE; JONES, 2021).

Febre, tosse seca, taquipneia e falta de ar são os sintomas mais característicos da COVID-19 (RODRIGUEZ-MORALES *et al.*, 2020). Todavia, dor de garganta, espirros, congestão nasal, produção de escarro, anosmia e dispepsia, confusão mental, dor no peito, diarreia, náuseas e vômitos, erupções cutâneas, descoloração dos dedos das mãos ou dos pés e conjuntivite viral também podem ser sintomas da doença (LOTFI; HAMBLIN; REZAEI, 2020).

Na figura 2, explicita-se uma esquematização da ampla variedade de disfunções que o vírus pode gerar em diferentes tecidos.

Figura 2 - Esquemática de possíveis sintomas da COVID-19



Fonte: Adaptada de GUPTA *et al.*, 2020.

1.3.4 Manifestações laboratoriais

Durante a COVID-19, há aumentos de lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST), alanina transaminase (ALT), proteína C reativa, creatina quinase (CK), velocidade de hemossedimentação (VHS), níveis de glóbulos brancos, níveis de dímero D, procalcitonina, ureia e creatinina (LOTFI; HAMBLIN; REZAEI, 2020). Também correm diminuições na hemoglobina, na contagem de linfócitos e de eosinófilos e na albumina sérica (LOTFI; HAMBLIN; REZAEI, 2020).

Todas as alterações laboratoriais são bastante inespecíficas, podendo estar aumentadas em diversas condições patológicas (clinicallabs.com, acessado em 01/07/2022). Porém, essa variedade de modificações bioquímicas demonstra a possibilidade da afecção de múltiplos sistemas pelo SARS-CoV-2.

1.3.5 Manifestações radiológicas

À tomografia computadorizada (TC) de tórax, é possível encontrar padrões diversos de achados radiológicos, tais quais padrões morfológicos arredondados, opacidades em vidro fosco e consolidações, com distribuição predominante bilateral, multilobar, subpleural, periférica e basilar (GHOSH *et al.*, 2021). Com esse exame, pode-se observar um padrão de progressão radiológica da doença: inicialmente, há um padrão típico de pneumonia; mas a TC pode ser normal em até 25% dos pacientes. Progressivamente, após alguns dias da doença, consolidações lobares e derrames pleurais podem se desenvolver, em pacientes com COVID-19 grave. Após duas a quatro semanas do início da doença, pode-se desenvolver fibrose precoce e bronquiectasia, sobretudo durante a síndrome do desconforto respiratório agudo grave. Também pode-se visualizar linfadenopatia mediastinal, derrames pleurais, cavitações e nódulos pulmonares, porém esses são achados incomuns (GHOSH *et al.*, 2021).

Apesar de ser considerada adequada como um teste diagnóstico inicial em pacientes com infecção do trato respiratório inferior, incluindo aqueles com suspeita de COVID-19, a radiografia torácica não deve ser indicada para descartar a infecção por COVID-19, devido à sua baixa sensibilidade (GHOSH *et al.*, 2021). Consolidações periféricas predominantes nos lobos pulmonares inferiores e opacidades em vidro fosco são os achados mais comuns desse exame, quando realizados em pacientes com COVID-19 (GHOSH *et al.*, 2021; RODRIGUEZ-MORALES *et al.*, 2020).

1.4 COVID-19 GRAVE

A COVID-19 pode tornar-se uma doença hiperinflamatória grave em casos raros (BRODIN, 2021). A presença de comorbidades é um importante fator de risco para COVID-19 mais severa, uma vez que 75% dos pacientes que foram à óbito devido a essa condição apresentavam alguma doença prévia (FANG *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2020). Hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares, DPOC e DRC foram associadas à maior risco de morte por COVID-19 (FANG *et al.*, 2020). Indivíduos do sexo masculino e com maior idade têm maior probabilidade de apresentar doença mais grave (FANG *et al.*, 2020).

Durante hospitalização, os pacientes podem apresentar linfopenia e trombocitopenia importantes, além de aumento de glóbulos brancos, elevação de proteína C reativa, CK, AST, ALT de LDH, sendo todos esses fatores independentemente associados a maior risco de um

pior desfecho da doença (MALIK *et al.*, 2021). Os níveis de ureia e creatinina apresentam-se progressivamente mais elevados à medida que o estado clínico piora, aumentando significativamente antes da morte do indivíduo (WANG *et al.*, 2020).

Ainda no contexto de gravidade da doença, uma metanálise realizada por Dadras *et al.* (2022) indicou que a relação entre a gravidade da COVID-19 e a carga viral de SARS-CoV-2 é inconclusiva quanto à predição da gravidade da doença, pois um número semelhante de estudos confirmou ou se opôs a essa hipótese.

Além dos marcadores supracitados, pacientes não sobreviventes apresentavam níveis mais elevados de dímero-D (BARBOSA *et al.*, 2022; MALIK *et al.*, 2021; PARK *et al.*, 2022; TANG *et al.*, 2020) e de produtos de degradação da fibrina, bem como maiores tempos de protrombina e de tromboplastina parcial ativada, quando em comparação com pacientes sobreviventes, indicando que a coagulopatia é uma característica da COVID-19 grave (COSTA-FILHO *et al.*, 2021; TANG *et al.*, 2020).

Níveis elevados de dímero-D são frequentemente utilizados como marcador de mau prognóstico em pacientes com COVID-19 grave (PARK *et al.*, 2022). O dímero-D é um fragmento de proteína que se acumula no sangue após a degradação do polímero de fibrina estabilizado (PARK *et al.*, 2022). Por isso, a elevação acentuada desse marcador confirma a ocorrência de ativação da via comum da coagulação, de hiperfibrinólise secundária (TANG *et al.*, 2020), de eventos trombóticos e da coagulação intravascular disseminada nos pacientes com COVID-19 (PARK *et al.*, 2022).

1.4.1 Resposta imunológica e gravidade da COVID-19

Paralelamente à infecção viral, os sintomas de maior gravidade da COVID-19 estão relacionados à desregulação da resposta imune, a qual, quando exagerada, leva a estados hiperinflamatórios e, conseqüentemente, à piora da inflamação gerada pela infecção viral (QIN *et al.*, 2020). Os pacientes que desenvolveram SDRA e/ou os pacientes não sobreviventes apresentaram marcadores inflamatórios elevados ao longo de todo o curso clínico, e a deterioração clínica que precedeu a morte foi acompanhada de níveis crescentes de inflamação (GUSTINE; JONES, 2021).

Parte dessa exacerbação imunológica é causada pela geração inadequadamente elevada de citocinas pró-inflamatórias, produzidas devido à desregulação da resposta imune (BARBOSA *et al.*, 2022; MULCHANDANI; LYNGDOH; KAKKAR, 2021; QIN *et al.*, 2020). Esse aumento indevido foi classificado como uma síndrome, a qual foi denominada como

“tempestade de citocinas” (MULCHANDANI; LYNGDOH; KAKKAR, 2021). Essa resposta exacerbada pode causar dano pulmonar, comprometimento de função de diversos sistemas, falência múltipla de órgãos e, em alguns casos, morte (MULCHANDANI; LYNGDOH; KAKKAR, 2021).

Pacientes hospitalizados devido à COVID-19 apresentaram maior produção de S100A9, uma molécula endógena cuja expressão é aumentada durante estados inflamatórios, bem como das citocinas IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12p70, quando comparados com pacientes não hospitalizados, não infectados ou curados (BARBOSA *et al.*, 2022). Níveis séricos elevados de IL-1 β , IL-2 e interferon (IFN)- γ também foram associados à infecção grave e ao dano pulmonar extenso durante a COVID-19 (HUANG *et al.*, 2020). Ademais, níveis séricos de citocinas são inversamente correlacionados com a relação PaO₂/FiO₂, uma relação que determina o índice de oxigenação de pacientes. Atesta-se, pois, uma relação entre o grau de inflamação e o acometimento pulmonar gerado pela SDRA (BONNET *et al.*, 2021).

Todos os dados supracitados reforçam, pois, que a tempestade de citocinas é crucial no desenvolvimento da COVID-19 grave (BARBOSA *et al.*, 2022).

Além da tempestade de citocinas, a expressão aumentada de quimiocinas, o aumento de células TCD4⁺ e TCD8⁺ e a diminuição de células T regulatórias também contribuem para a resposta imune acentuada (QIN *et al.*, 2020).

Outrossim, a gravidade da COVID-19 também é relacionada com a relação neutrófilos/linfócitos aumentada, a qual é um marcador de inflamação e um indicador de mau prognóstico da COVID-19 (BRODIN, 2021).

1.5 EICOSANOIDES E A RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA COVID-19

Os eicosanoides são moléculas derivadas do ácido araquidônico (AA) que exercem importante papel em respostas inflamatórias, inclusive naquelas desencadeadas por infecções virais (SORGI *et al.*, 2018, 2020). Produzido a partir dos fosfolipídios de membrana, pela conversão através da fosfolipase A2, o AA é convertido em diversos lipídios bioativos, como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (FUNK, 2001).

As prostaglandinas (PGs), especificamente, também são sintetizadas a partir do ácido araquidônico, sendo tal conversão realizada pelas enzimas cicloxigenase (COX)-1, expressada constitutivamente nas células, e COX-2, produzida na presença de estados inflamatórios

(FUNK, 2001). Elas são produzidas quando as células são acometidas por trauma mecânico, por citocinas específicas, por fatores de crescimento celular ou por outros estímulos, como o difosfato de adenosina em plaquetas, dentre outras circunstâncias (FUNK, 2001). Dentre as diversas funções das prostaglandinas, a ação delas na resposta inflamatória é notável. Tendo sua produção significativamente mais elevada nos tecidos inflamados, as prostaglandinas contribuem para o surgimento dos sinais cardinais da inflamação aguda: dor, calor, rubor, edema e perda de função (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

Durante a COVID-19, diversos eicosanoides participam da resposta inflamatória que surge durante a infecção viral (THEKEN; FITZGERALD, 2021). Nesse sentido, os lipídios bioativos são capazes de aumentar o recrutamento e a ativação leucocitária, promovendo a formação de trombos e estimulando a agregação de plaquetas (ARCHAMBAULT *et al.*, 2021). Pacientes com COVID-19 possuem níveis aumentados de AA, bem como de todos os metabólitos das COX, mais especificamente tromboxano (TX) B₂, prostaglandina E₂ (PGE₂) e o ácido 12-hidroxiheptadecatenóico (12-HHTrE), quando comparados a indivíduos saudáveis (ARCHAMBAULT *et al.*, 2021).

O TXA₂ promove broncoconstrição e ativa leucócitos e plaquetas, o que é consistente com o aumento da ativação plaquetária e trombose no COVID-19 e a forte ligação entre TXB₂ e a SDRA. A prostaglandina D₂, por sua vez, promove o recrutamento/ativação de eosinófilos, basófilos, mastócitos e células linfoides inatas (ARCHAMBAULT *et al.*, 2021). A esse respeito, um estudo observacional retrospectivo mostrou que a administração de prostaglandina I₂ (epoprostenol) foi eficaz na melhora da relação PaO₂/FiO₂ em 50% dos pacientes com COVID-19 (ARCHAMBAULT *et al.*, 2021).

Portanto, é crucial que existam estudos relacionando o papel dos eicosanoides durante a COVID-19, uma vez que essas moléculas estão diretamente relacionadas a estados inflamatórios e à resolução deles (BENNETT; GILROY, 2016).

1.5.1 PGE₂ na COVID-19

Após a conversão feita pelas COX, o ácido araquidônico é convertido em PGH₂, a qual, posteriormente, por meio da enzima prostaglandina E sintase (PGES), poderá ser convertida em PGE₂ (FUNK, 2001).

A PGE₂ é um conhecido modulador biológico de infecções virais, sendo capaz de suprimir repostas imunológicas inatas e adaptativas durante tais ocasiões (RICKE-HOCH *et al.*, 2021). As deleções da enzima PGES ou dos receptores de prostanoídes de PGE₂, EP2 ou

EP4, são capazes de suprimir a resposta imune a infecções virais (THEKEN; FITZGERALD, 2021).

Durante a infecção por SARS-CoV-2, especificamente, a PGE₂ pode interferir na entrada do vírus nas células, uma vez que ela é capaz de modular a expressão dos genes ECA2 e TMPRSS2, contribuindo diretamente para a endocitose e a replicação virais (ROBB *et al.*, 2020).

Em um estudo feito em fibroblastos humanos, a entrada de SARS-CoV-2 nas células, bem como o processamento e a expressão de seus genes, foram amplificados após o tratamento com PGE₂, o qual foi capaz de aumentar a expressão dos receptores ECA2, contribuindo diretamente para a entrada do vírus nas células (SENA *et al.*, 2021). Dessa forma, a produção de PGE₂ está relacionada com a ampliação da infecção causada pelo SARS-CoV-2 (FRAGA-SILVA *et al.*, 2021; RIPON *et al.*, 2021).

Esse mediador é capaz, também, de modular as respostas imunes em vários tipos de células durante a infecção por SARS-CoV-2 (ROBB *et al.*, 2020). Ele pode, por exemplo, não apenas diminuir a produção de IFN γ e a citotoxicidade de células T *natural killers* (NK) e TCD8+, que matam células infectadas com SARS-CoV-2, mas também promover a diferenciação de células Th17 e Th1 pró-inflamatórias, as principais fontes celulares da tempestade de citocinas nos estágios finais de COVID-19 (ROBB *et al.*, 2020).

Outrossim, a PGE₂ é capaz de promover uma resposta imune humoral menos substancial quando atua indireta, mas especificamente, nas células B, reduzindo a produção de PAX5, que é um fator-chave para a proliferação e diferenciação desses linfócitos (RICKE-HOCH *et al.*, 2021).

Curiosamente, sabe-se que o SARS-CoV-2 também é capaz de induzir, por si só, a geração e secreção de PGE₂ em células epiteliais pulmonares infectadas, por meio da regulação positiva da COX-2 e da redução da enzima 15-hidroxiprostaglandina-desidrogenase, degradadora de prostaglandinas (RICKE-HOCH *et al.*, 2021).

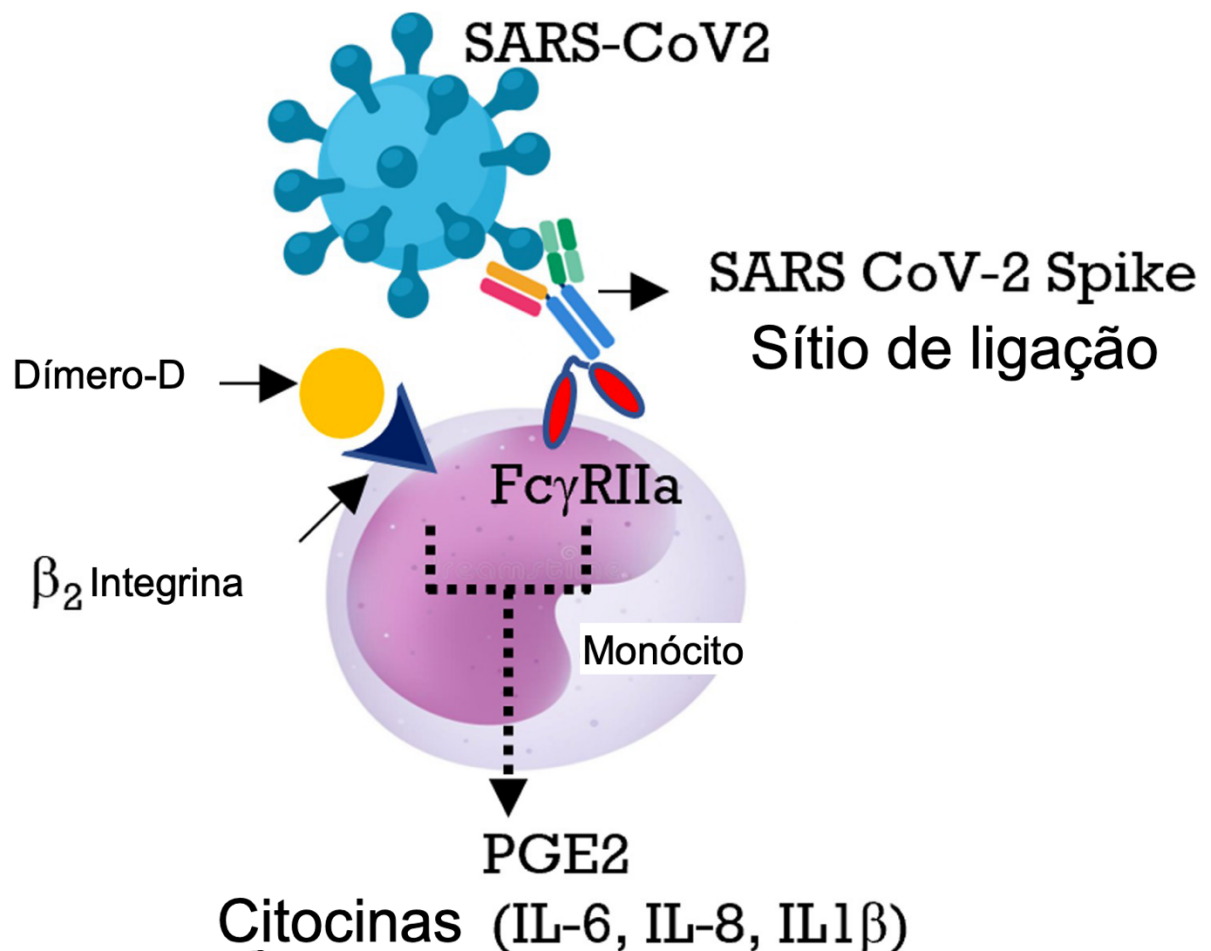
Já no que tange à carga viral, pacientes com COVID-19 grave e com alta carga viral de SARS-CoV-2 apresentaram concentrações plasmáticas mais altas de PGE₂, bem como níveis mais baixos de IFN- α , do que aqueles com baixa carga viral de SARS-CoV-2 (ROMÃO *et al.*, 2022).

Como previamente mencionado, o dímero-D é um importante marcador de gravidade da COVID-19. Nesse contexto, essa molécula é capaz de induzir a produção de PGE₂ e de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, IL1-B) em monócitos humanos, durante a infecção por

SARS-CoV-2 (PARK *et al.*, 2022), o que indicaria, portanto, uma possível relação entre PGE₂ e a gravidade da COVID-19. A figura 3 esquematiza essa relação entre o D-dímero e a produção de PGE₂ em monócitos humanos.

Percebe-se, pois, que a PGE₂ parece ser importante para o desenvolvimento da infecção por SARS-CoV-2, porém, o papel desse mediador na gravidade da COVID-19 ainda não foi demonstrado. Portanto, a PGE₂ é um importante assunto de estudo nesse contexto patológico.

Figura 3 – Dímero-D favorece a produção de PGE₂ e de citocinas pró-inflamatórias em monócitos humanos.



Fonte: Adaptada de PARK *et al.*, 2022.

1.6 TRATAMENTO DA COVID-19 COM MEDICAMENTOS QUE ATUAM NA VIA DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

Uma vez que a COVID-19 é uma doença primordialmente inflamatória, diversos fármacos que atuam nas vias do ácido araquidônico foram utilizados durante a pandemia de 2020 como possibilidades de tratamento e/ou redução de sintomas.

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), tais como a aspirina, o ibuprofeno, a indometacina e o celecoxib, inibem a atividade das cicloxigenases pela inativação de seu centro ativo e, assim, inibem a biossíntese de prostanoídes, resultando em efeitos antipiréticos, analgésicos e anti-inflamatórios (HOHJOH *et al.*, 2014). Por conta desses efeitos, são comumente utilizados na prática médica.

Durante o ano de 2020, os dados acerca do uso de AINEs eram controversos. Apesar da Organização Mundial de Saúde não contraindicar o uso dessa classe medicamentosa em pacientes com COVID-19 ([OMS, acessado em 01/07/2022](#)), outros estudos referiam que os AINEs não deveriam ser utilizados em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, uma vez que, além dos efeitos adversos comuns dos AINEs, esses medicamentos podem causar doenças mais prolongadas ou complicações importantes quando tomados durante infecções do trato respiratório (ROBB *et al.*, 2020). Por outro lado, estudos epidemiológicos sugeriam, no mesmo ano, que os benefícios do uso de AINEs eram prováveis, uma vez que estudos experimentais com celecoxibe, naproxeno e com ibuprofeno indicaram menor progressão da COVID-19 para estados graves (ROBB *et al.*, 2020).

Atualmente, em 2022, a literatura científica indica que o uso de AINEs não teve efeito sobre a mortalidade; assim como não teve efeito sobre o desenvolvimento da COVID-19 grave, com o uso de ventilação mecânica, a necessidade de unidade de terapia intensiva e de oxigênio suplementar (ZHOU *et al.*, 2022). Além disso, o uso desses medicamentos em pacientes saudáveis não parece estar associado ao aumento do risco de infecção por SARS-CoV-2 (ZHOU *et al.*, 2022).

Os corticosteroides, por sua vez, também são fármacos que atuam na via do ácido araquidônico. Porém, diferentemente dos AINEs, eles atuam bloqueando a enzima fosfolipase A2 (RAGBALLE, 1989). Dado que os corticosteroides inibem a produção de PGs em vários tecidos humanos, como intestino e pulmão, o uso desses medicamentos mostrava-se promissor como terapias contra a COVID-19 (ROBB *et al.*, 2020).

Nesse contexto, embora tenham ocorrido diversos ensaios clínicos com corticosteroides em pacientes com COVID-19 durante a pandemia ([clinicaltrials, acessado em 01/07/2022](#)), não existiam evidências suficientes para embasar o uso rotineiro desses medicamentos.

Todavia, posteriormente, um ensaio clínico mostrou que a dexametasona em baixa dose (6 mg, uma vez ao dia) reduziu o número de mortes em pacientes com COVID-19 que necessitaram de ventilação mecânica, bem como reduziu os óbitos dos pacientes que receberam apenas oxigênio suplementar, enquanto nenhum benefício foi observado em pacientes com COVID-19 que não necessitaram de suporte respiratório. Nesse aspecto, a dexametasona teve apenas efeitos moderados na redução da mortalidade de pacientes graves/críticos com COVID-19 (THE RECOVERY COLLABORATIVE GROUP, 2021).

Mais atualmente, um estudo de metanálise sugeriu que o uso de corticosteroides reduz a mortalidade em pacientes com SDRA, sendo que os indivíduos que usaram mais de 7 dias de corticosteroides tiveram maiores taxas de sobrevivência em comparação àqueles que fizeram períodos mais curtos de medicação (CHAUDHURI *et al.*, 2021).

Numa abordagem mais específica, inibidores específicos de prostaglandinas também foram testados como terapias para pacientes com COVID-19. A Taxifolina (um inibidor específico de PGE₂) e o Asapirant (inibidor específico de PGD₂) mostraram resultados satisfatórios no tratamento da COVID-19 grave. A Taxifolina foi capaz de reduzir a replicação viral *in vitro* e *in silico* (RICKE-HOCH *et al.*, 2021); enquanto o Asapirant, por sua vez, foi capaz de converter uma infecção letal por SARS-CoV-2 em uma infecção subletal, num estudo em camundongos (WONG *et al.*, 2022). A administração de Asapirant uma vez a dia por até 4 semanas foi considerada segura e bem tolerada. Esse medicamento está sendo usado atualmente em ensaios clínicos randomizados e controlados por placebo ([clinicaltrials, acessado em 01/07/2022](#)), com indivíduos hospitalizados por COVID-19 que correm risco de insuficiência respiratória (WONG *et al.*, 2022).

2 JUSTIFICATIVA

O cenário de pandemia gerado pelo SARS-CoV-2 impactou social e economicamente todo o mundo. A alta taxa de infectividade do vírus, associada à presença de elevadas taxas de morbimortalidade, promoveu, desde 2020 até a atualidade, grande impacto na saúde, na economia e no cotidiano de diversas pessoas.

Para além de um aspecto puramente social, a necessidade de uma terapia específica e eficaz contra a COVID-19 permanece atual. Nesse sentido, diversas terapias relacionadas à modulação de mediadores lipídicos, em especial os eicosanoides, foram, e continuam sendo, objetos de estudo. Há evidências, por exemplo, de que o tratamento com corticosteroides auxilia na recuperação dos pacientes em estado grave e previne a evolução para o óbito. Ademais, o uso de anti-inflamatórios não esteroidais também é feito rotineiramente para aliviar quadros de dor e de inflamação, sobretudo em casos leves de COVID-19. Outrossim, inibidores específicos de prostaglandinas, como a Taxifolina e o Asapripant têm mostrado capacidade de prevenir o desenvolvimento de COVID-19 grave.

Contudo, ainda há carência de dados quanto à utilização dessas medicações no contexto da COVID-19. Assim, pesquisas que avaliem o perfil de eicosanoides em pacientes com COVID-19 geram novos dados e, conseqüentemente, novas possibilidades terapêuticas contra a doença. Diante desse cenário, é imprescindível determinar os níveis plasmáticos de prostaglandina E₂ em pacientes com diferentes estágios clínicos da infecção por SARS-COV-2, relacionando ambos.

3 PROBLEMA

Níveis séricos de prostaglandina E₂ estão associados com a gravidade da COVID-19 em pacientes infectados com o SARS-CoV-2?

4 HIPÓTESE

O aumento dos níveis séricos de prostaglandina E₂ identificados em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 está relacionado à apresentação de formas graves da COVID-19.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Relacionar os níveis plasmáticos de Prostaglandina E₂ com os diferentes estágios clínicos de pacientes com COVID-19.

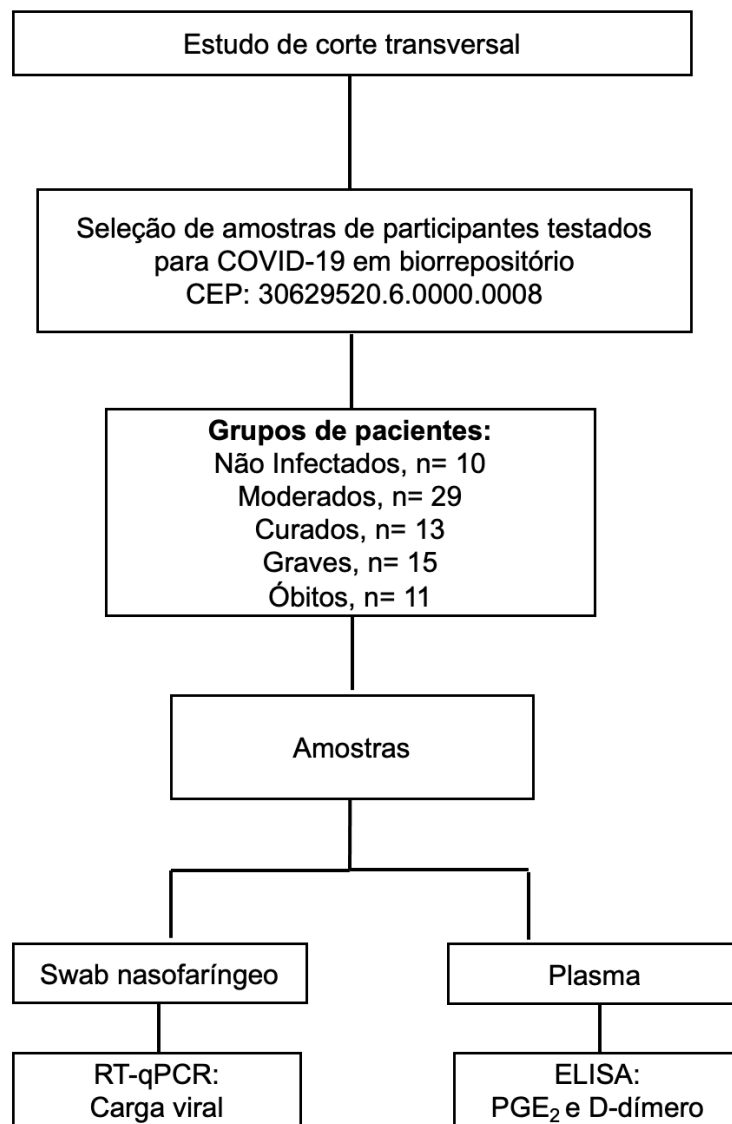
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Comparar os níveis de PGE₂ de pacientes em diferentes estágios clínicos da COVID-19.
- (ii) Relacionar os níveis de PGE₂ com os dados de carga viral dos pacientes;
- (iii) Relacionar os níveis de PGE₂ com os dados de dímero-D dos pacientes.

6 METODOLOGIA

6.1 DESENHO DO ESTUDO

Figura 4 - Desenho do estudo



Fonte: Elaborada pela autora

6.2 TIPO DE ESTUDO

Estudo de corte transversal de associação entre níveis plasmáticos de PGE₂, carga viral, dímero-D e sinais e sintomas de pacientes positivos ou não para COVID-19, registrados em cidades do Oeste da Bahia no período de 30 de maio até 30 de setembro de 2020 (Figura 4).

6.3 LOCAL DE PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Molecular da UFOB, o qual foi estruturado para acompanhamento dos casos de COVID-19 da região Oeste da Bahia.

6.4 POPULAÇÃO

A população deste estudo consistiu em pacientes suspeitos de serem portadores de COVID-19, além de pacientes não infectados que tenham sido testados para a doença, no período de 30 de maio a 30 de setembro de 2020.

6.5 CRITÉRIOS PARA INCLUSÃO DOS PARTICIPANTES

- (i) Diagnóstico confirmado para COVID-19;
- (ii) Idade superior a 18 anos
- (iii) Para doença ativa, ter carga viral quantificada
- (iv) Dados clínicos disponíveis

- (v) Amostras de plasma e de sangue disponíveis

6.6 CRITÉRIOS PARA EXCLUSÃO DOS PARTICIPANTES

- (i) Ter situação do exame laboratorial para COVID-19 indeterminada;
- (ii) Ausência de dados no biorrepositório
- (iii) Ausência de informações clinico-epidemiológicas nos formulários de pesquisa;
- (iv) Ser portador de HIV;
- (v) Possuir histórico de abuso de drogas, tabagismo ou álcool;
- (vi) Ter câncer;

6.7 AMOSTRA

A amostra do estudo foi composta por 78 pacientes, divididos em 5 grupos de acordo com a gravidade dos sintomas, tendo por base os testes de reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (RT-qPCR) para COVID-19, realizados a partir dos testes de swab nasal, e os desfechos clínicos de cada caso (Tabela 1). Os grupos foram denominados: não infectados (n=10), curados (n=13), moderados (n=29), graves (n=15) e óbitos (n=11).

O grupo dos não infectados foi composto por indivíduos com teste negativo para SARS-CoV-2. O grupo dos curados era composto por indivíduos com teste para SARS-CoV-2 positivo, realizado pelo menos 02 meses antes da coleta de informações feitas para esta pesquisa. O grupo de pacientes moderados foi aquele cujos indivíduos apresentaram teste positivo para COVID-19 e pelo menos um dos sintomas leves da doença (febre, diarreia, tosse, dor de cabeça, ageusia/ anosmia, mialgia, náusea e vômito, dor de garganta, tosse seca). O grupo dos pacientes graves foi formado por indivíduos com teste positivo para COVID-19 que apresentavam pelo menos um dos sintomas leves, que necessitaram de hospitalização e/ou do

uso de suporte ventilatório durante o curso da doença, de internação de unidades de terapia intensiva e/ou que sofreram angústia respiratória durante o curso da doença. O grupo de pacientes denominado óbitos foi constituído por aqueles com os mesmos critérios do grupo grave e que tiveram o óbito confirmado em um prazo de até 72 horas após a coleta das amostras para detecção de SARS-CoV-2. A Tabela 1 esquematiza as características dos pacientes baseadas nos sinais e sintomas por eles apresentados.

TABELA 1 - Caracterização dos participantes de acordo com a gravidade dos sintomas e desfechos da COVID-19

Classificação do grupo	Número de participantes	Caracterização dos pacientes
<i>Não Infectados</i>	10	<ul style="list-style-type: none"> • Teste negativo para SARS-CoV-2 • Sem sintomas
<i>Curados</i>	13	<ul style="list-style-type: none"> • Teste positivo para SARS-CoV-2, feito há pelo menos 02 meses • Ter apresentado pelo menos um sinal ou sintoma moderados de COVID-19 (febre, diarreia, tosse, dor de cabeça, perda do paladar (ageusia)/olfato (anosmia), mialgia, náusea e vômito, dor de garganta, tosse seca), durante o curso da doença
<i>Moderados</i>	29	<ul style="list-style-type: none"> • Teste positivo para SARS-CoV-2 • Pelo menos um dos seguintes sintomas: febre, diarreia, tosse, dor de cabeça, ageusia/anosmia, mialgia, náusea e vômito, dor de garganta, tosse seca. • Não necessitaram de hospitalização nem de suporte ventilatório durante o curso da doença
<i>Graves</i>	15	<ul style="list-style-type: none"> • Teste positivo para SARS-CoV-2 • Pelo menos um dos seguintes sintomas: diarreia, tosse, febre, dor de cabeça, ageusia/anosmia, mialgia, náusea e vômito, dor de garganta, tosse seca, dispneia. • Necessitaram de hospitalização e/ou do uso de suporte ventilatório durante o curso da doença • Necessidade de internação de unidades de terapia intensiva • Angústia respiratória
<i>Óbitos</i>	11	<ul style="list-style-type: none"> • Critérios do grupo “Graves” • Óbito confirmado em até 72h após a coleta das amostras para detecção de SARS-CoV-2.

6.8 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL

A carga viral foi quantificada por testes de RT-qPCR, utilizando-se primer e sonda específica para a sequência N1 do SARS-CoV-2, bem como uma curva padrão contendo diferentes números de cópias do plasmídeo purificado contendo a sequência N1 (KLEIN *et al.*, 2022).

6.9 QUANTIFICAÇÃO DO D-DÍMERO E DE PROSTAGLANDINA E₂

Utilizando as amostras de plasma coletadas dos participantes selecionados, foram utilizados kits de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) indireto, a fim de quantificar os níveis séricos de prostaglandina E₂, seguindo as instruções do fabricante (Cayman Chemical Company, MI, EUA). Similarmente, os níveis circulantes de D-dímero foram medidos no plasma de pacientes com COVID-19 pelo kit ELISA comercial, também de acordo com as instruções de fabricação (ThermoFischer Scientific).

6.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A comparação entre os pares de grupos foi feita utilizando o teste T não paramétrico, com pós teste Mann Whitney. Para realização da análise estatística de variáveis contínuas, como Dímero-D e com carga viral, realizou-se o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. As características clínicas categóricas foram analisadas usando o teste χ^2 com o método exato de Fisher. As variáveis contínuas foram testadas para correlações usando o teste de Spearman. Todas as estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

6.11 ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS (RESOLUÇÃO 466/12)

A pesquisa foi submetida ao comitê de ética em pesquisa humana para apreciação via plataforma Brasil, obtendo a sua aprovação com o número de registro CAAE: nº 30629520.6.0000.0008.

7 RESULTADOS

7.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES

Neste estudo, foram avaliados dados de 78 pacientes, os quais foram classificados por dados laboratoriais e clínicos, sendo divididos nos seguintes grupos: não infectados (n=10), curados (n=13), moderados (n=29), graves (n=15) e óbitos (n=11) (Tabela 2). De acordo com estudos anteriores, pacientes do sexo masculino e com maior idade possuíam maior risco de apresentar a forma grave da doença (FANG *et al.*, 2020; RICKE-HOCH *et al.*, 2021). Em nossas análises, também houve associação estatisticamente significativa entre sexo masculino e idade avançada com formas mais graves da doença (Tabela 2). Ademais, foram comparados dados clínicos dos pacientes com COVID-19 (moderados, graves e óbitos) e saudáveis (curados). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto aos sintomas de dor de cabeça, dor de garganta, tosse seca, mialgia e dispneia. Pacientes pertencentes ao grupo “Moderados” apresentavam mais dor de cabeça, dor de garganta e mialgia quando comparados aos grupos com doença grave. Indivíduos pertencentes aos grupos “Graves” e “Óbitos” apresentavam mais dispneia e mais tosse seca. Não houve diferença estatística entre os grupos quanto aos sintomas de febre, edema, ageusia/anosmia, diarreia e vômito. Indivíduos com diabetes e hipertensão tiveram doença mais grave quando comparados a pacientes saudáveis (Tabela 2).

Outrossim, os níveis de dímero-D também foram associados à maior gravidade da doença (Tabela 2), o que está em conformidade com outros trabalhos prévios, os quais indicavam a associação desse marcador bioquímico à maior severidade da COVID-19 (BARBOSA *et al.*, 2022; MALIK *et al.*, 2021; PARK *et al.*, 2022; TANG *et al.*, 2020).

TABELA 2 - Características clínicas dos pacientes analisados

Características	Grupos				
	Não infectados	Curados	Moderados	Graves	Óbitos
Dados demográficos					
Idade (anos)	32 (\pm 1,8)	41 (\pm 3,55)	35 (\pm 1,78)	69 (\pm 4,05) *	61 (\pm 5,84) *
Sexo feminino	8 (80%)	8 (61,64%)	6 (20,69%) *	5 (33,33%) *	6 (54,55%)
Marcadores de gravidade da COVID-19					
D-Dímero [mg/L]	-	0,4496 (\pm 0,01)	0,51 (\pm 0,03)	0,6143 (\pm 0,01) #	0,6135 (\pm 0,00) #
Carga viral [$\times 10^6$ GC/ μL]	-	-	120,81 (\pm 53,75)	662,72 (\pm 43,46)	48,62 (\pm 22,76)
Comorbidades					
Histórico de asma	0 (0%)	0 (0%)	2 (6,89%)	0 (0%)	0 (0%)
Diabetes	0 (0%)	1 (7,69%)	1 (3,45%)	7 (46,6%) *	2 (18,18%) *
Hipertensão	0 (0%)	1 (7,69%)	0 (0%)	10 (66,6%) *	2 (18,18%) *
Sintomas					
Febre	-	-	23 (79,31%)	11 (73,33%)	6 (54,54%)
Dor de cabeça	-	-	24 (82,76%) *	2 (13,33%)	1 (9,09%)
Dor de garganta	-	-	12 (41,38%) *	1 (6,67%)	1 (9,09%)
Tosse seca	-	-	1 (3,45%) *	12 (80%)	10 (90,90%)
Mialgia	-	-	19 (65,57%) *	2 (13,33%)	0 (0%)
Edema	-	-	1 (3,45%)	0 (0%)	0 (0%)
Dispneia	-	-	1 (3,45%) *	14 (93,33%)	11 (100%)
Ageusia/ anosmia	-	-	11 (37,93%)	2 (13,33%)	1 (9,09%)
Diarreia	-	-	7 (24,14%)	1 (6,67%)	2 (18,18%)
Vômito	-	-	3 (10,34%)	1 (6,67%)	0 (0%)

Os valores representam as frequências relativas para variáveis categóricas e a mediana \pm erro padrão estão à direita para variáveis contínuas. A frequência relativa das variáveis analisadas está entre parênteses. #, $p < 0,05$ para diferenças entre os diferentes grupos usando Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para variáveis contínuas. *, $p < 0,05$ para diferenças entre os diferentes grupos usando o teste exato de Fisher para variáveis categóricas.

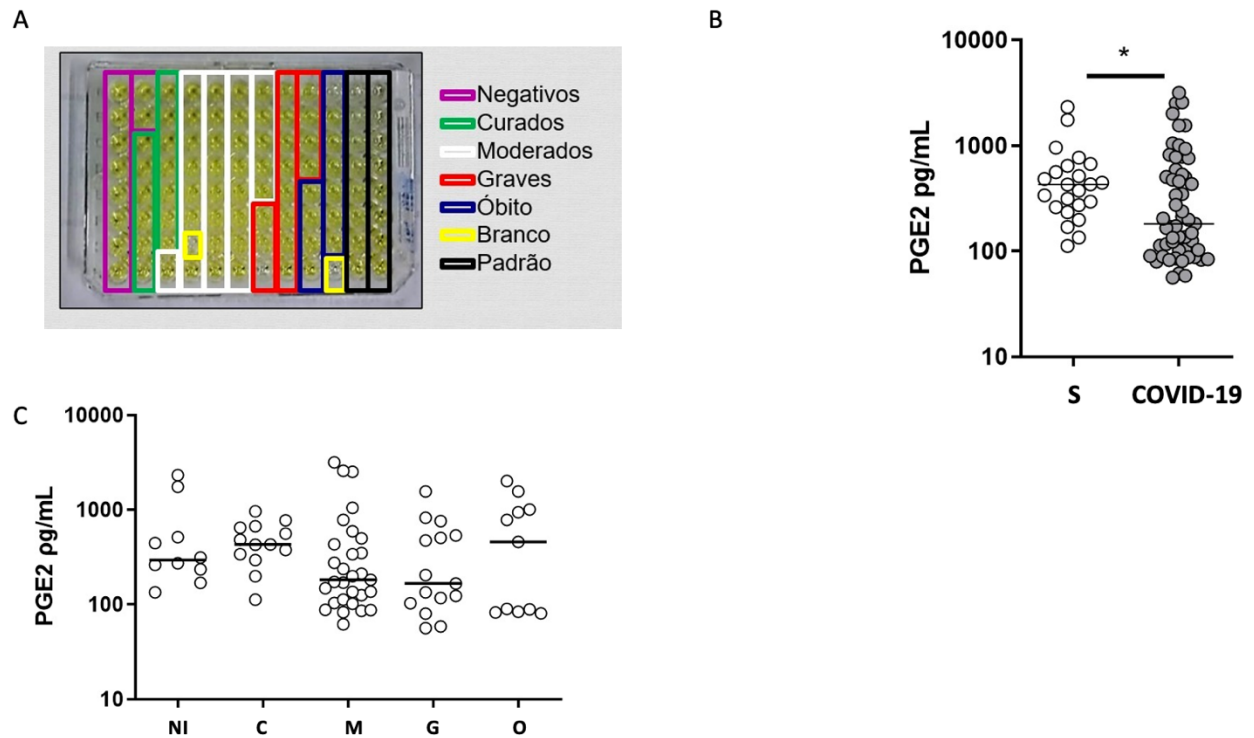
Fonte: Elaborada pela autora

7.2 NÍVEIS PLASMÁTICOS DE PROSTAGLANDINA E₂ NÃO ESTÃO ASSOCIADOS À GRAVIDADE DA COVID-19

Sabe-se que os eicosanoides têm grande significância na resposta inflamatória desencadeada por diversas infecções (SORGI *et al.*, 2018, 2020). Recentemente, tem sido investigado o perfil de mediadores lipídicos circulantes em pacientes com COVID-19 (ARCHAMBAULT *et al.*, 2021; PARK *et al.*, 2022; RICKE-HOCH *et al.*, 2021; RIPON *et al.*, 2021; ROBB *et al.*, 2020; WONG *et al.*, 2022). Alguns estudos, por exemplo, já foram capazes de demonstrar que a PGE₂ é capaz de modular as respostas imunes em vários tipos de células durante a infecção por SARS-CoV-2, influenciando na patogênese da doença (FRAGA-SILVA *et al.*, 2021; RIPON *et al.*, 2021; ROBB *et al.*, 2020, 2020; THEKEN; FITZGERALD, 2021).

Neste estudo, foram avaliados, por meio de teste ELISA (Figura 5A), os níveis plasmáticos de PGE₂ em diferentes estágios clínicos da COVID-19.

Como resultado das análises efetuadas, nota-se que os pacientes com COVID-19 apresentam níveis plasmáticos diminuídos de PGE₂ quando comparados aos controles saudáveis (Figura 5B). Porém, não houve diferença entre os níveis plasmáticos desse mediador em pacientes com estágios clínicos distintos de COVID-19 (Figura 5C).

Figura 5 - Níveis plasmáticos de PGE₂ em pacientes com COVID-19

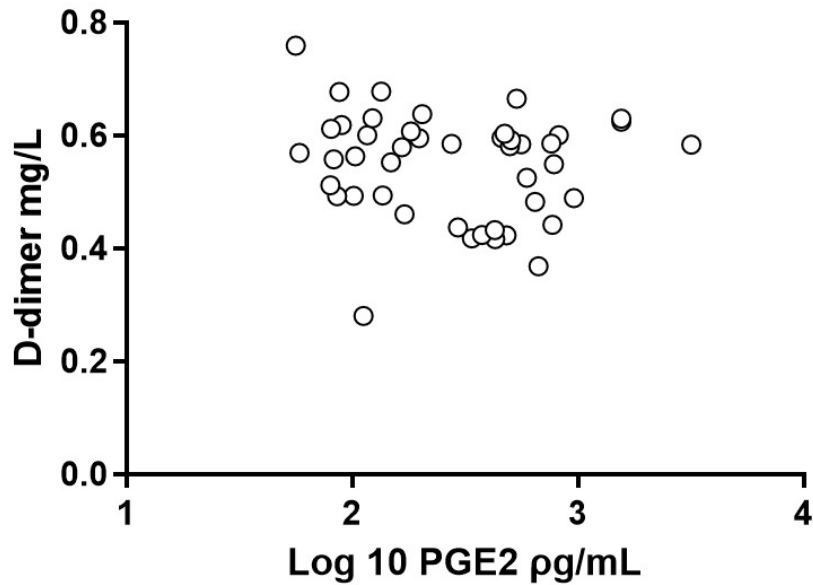
Legenda: Os níveis de PGE₂ foram medidos por (A) ELISA no plasma de pacientes com COVID-19 (n= 55) ou sem COVID-19 (N= 23), evidenciando-se que os indivíduos infectados apresentavam níveis menores de PGE₂ (B). Não houve diferença significativa entre os diferentes grupos de estágio clínico (C). A comparação entre os pares de grupos foi feita utilizando o teste T não paramétrico, com pós teste Mann Whitney. * indica valor de p <0.05. Fonte: Elaborada pela autora.

7.3 NÍVEIS DE PGE₂ NÃO ESTÃO ASSOCIADOS À GRAVIDADE DA DOENÇA.

Níveis aumentados de dímero-D são usados como marcador de gravidade da COVID-19 (ROSTAMI; MANSOURITORGHABEH, 2020). Após tratamento de monócitos humanos saudáveis com dímero-D, houve um aumento dose-dependente na produção PGE₂ e de citocinas inflamatórias, IL-6 e IL-8 (PARK *et al.*, 2022). A PGE₂ induzida por dímero-D e as citocinas inflamatórias aumentaram significativamente após co-tratamento com imunocomplexos da proteína S recombinante do SARS CoV-2 ou de pseudovírus contendo proteína S do SARS CoV-2 (PARK *et al.*, 2022). Por isso, um teste de correlação entre os níveis plasmáticos de D-dímero e de PGE₂ foi realizado, e, após feitas as análises estatísticas, observa-se que não há correlação estatisticamente significativa entre os níveis de dímero-D e os de PGE₂ (figura 6).

Esse dado sugere, pois, que esse eicosanoide não está relacionado com a gravidade da COVID-19.

Figura 6 - Correlação entre níveis de PGE₂ e de Dímero D

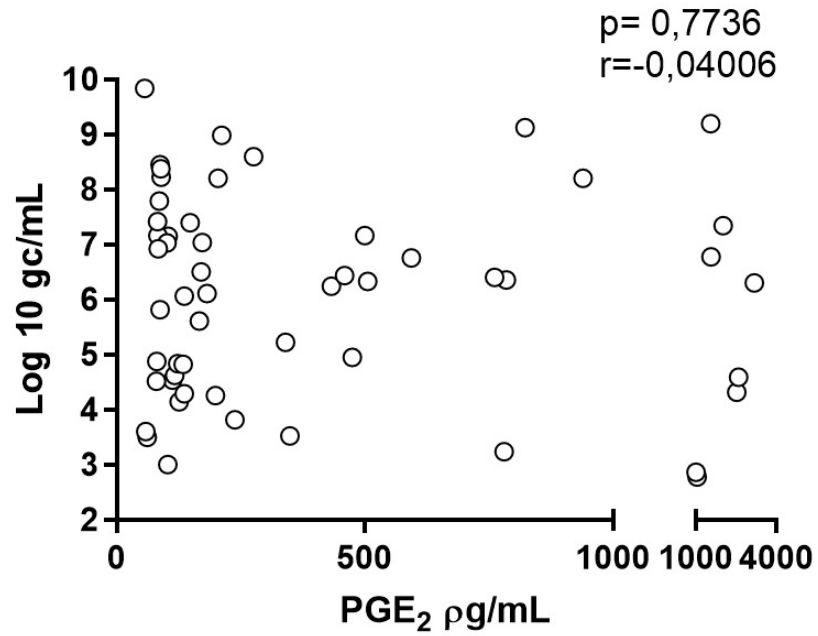


Legenda: Os dados foram mostrados como gráficos de pontos de dispersão após a transformação em log10. A correlação foi realizada por meio do teste r de Spearman.

Fonte: Elaborada pela autora.

7.4 NÍVEIS DE PGE₂ NÃO ESTÃO ASSOCIADOS À CARGA VIRAL DURANTE A COVID-19.

Os eicosanoides têm capacidade de modular a replicação viral em modelos experimentais (WIDEGREN *et al.*, 2011). Por conta disso, realizou-se uma associação entre cópias genômicas de SARS-CoV-2 e níveis plasmáticos de PGE₂. Não houve correlação estatisticamente significativa entre os níveis de PGE₂ e a carga viral no plasma de indivíduos em diferentes estágios clínicos da COVID-19 (Figura 7).

Figura 7 - Correlação entre níveis de PGE₂ e carga viral

Legenda: A carga viral foi medida a partir de amostras de swab nasal por RT-qPCR. O gráfico mostra a carga viral em cópias do genoma viral por mL (gc/mL). A correlação foi realizada por meio do teste r de Spearman.

Fonte: Elaborada pela autora.

8 DISCUSSÃO

Um estado hiperinflamatório é postulado como uma das principais causas do desenvolvimento de cursos graves da COVID-19 (MULCHANDANI; LYNGDOH; KAKKAR, 2021). No entanto, os mecanismos que geram respostas inflamatórias descontroladas e relacionadas a desfechos mais severos da doença permanecem incertos. Nesse sentido, já que a ativação das vias do ácido araquidônico é parte importante das respostas inflamatórias em humanos (FUNK, 2001), o estudo das moléculas derivadas dessa cascata de sinalização mostra-se como uma potencial ajuda para a compreensão da fisiopatologia da COVID-19. O papel da PGE₂ durante a infecção pelo SARS-CoV-2 tem sido objeto de estudo, uma vez que esse mediador é capaz de modular a expressão dos genes ECA2 e TMPRSS2 (FRAGA-SILVA *et al.*, 2021; ROBB *et al.*, 2020; SENA *et al.*, 2021), os quais são cruciais para a entrada do vírus na célula.

A partir das análises realizadas neste estudo com plasma sanguíneo, achados laboratoriais e informações clínicas de pacientes testados para COVID-19, demonstra-se que os níveis plasmáticos de PGE₂ medidos foram significativamente menores ao comparar pacientes positivos para COVID-19 com indivíduos saudáveis, o que não foi observado ao separar os grupos por estágios clínicos, demonstrando que a PGE₂ não está relacionada à gravidade da COVID-19. Outros estudos encontraram aumento nos níveis plasmáticos de PGE₂ durante a COVID-19 (RICKE-HOCH *et al.*, 2021), porém, a comparação só foi feita em indivíduos com alta carga viral de SARS-CoV-2 e não houve separação dos grupos de acordo com o estágio da doença, como realizado no presente estudo.

Além da comparação dos níveis de PGE₂ pelo estágio clínico dos pacientes, a relação entre esse lipídio bioativo e outros marcadores da doença também foi avaliada, conforme descrito a seguir.

O dímero-D foi descrito como um marcador de gravidade da COVID-19 (ROSTAMI; MANSOURITORGHABEH, 2020), uma vez que está correlacionado com estados de hipercoagulação e, portanto, relacionado com maiores gravidade e mortalidade da doença (SINGHANIA *et al.*, 2020). Assim, avaliou-se se os níveis de D-dímero dos pacientes positivos para COVID-19 estavam relacionados com os de PGE₂, porém não houve significância estatística entre as duas variáveis. Isso está de acordo com os dados sobre os níveis plasmáticos de eicosanoides separados pelos estágios clínicos da COVID-19 encontrados no presente estudo.

No que tange à carga viral de SARS-CoV-2 durante a COVID-19, ainda não há consenso na literatura quanto à relação entre o número de cópias genômicas do vírus e a gravidade da doença (DADRAS *et al.*, 2022). De todo modo, investigou-se se a carga viral estava relacionada aos níveis séricos de PGE₂. Nessas análises, não foi encontrada relação entre os níveis plasmáticos de PGE₂ e a carga viral, o que difere de Romão *et al.* (2022), que relatou aumento da PGE₂ em pacientes com carga viral de SARS-CoV-2 mais elevada. Essa discrepância entre os dados aqui relatados e o previamente demonstrado por Romão *et al.* (2022) ocorre pelo fato de os participantes do presente estudo apresentarem em sua maioria uma carga viral elevada, parâmetro que não está relacionado com a gravidade da doença na amostra avaliada.

Nesse sentido, percebe-se que PGE₂ está reduzida em pacientes com COVID-19, não estando relacionada, porém, com parâmetros clínicos nem laboratoriais de gravidade da doença.

É importante ressaltar, contudo, que a via do ácido araquidônico atuando durante a COVID-19 continua sendo um importante campo de estudo, uma vez que, por ter uma resposta inflamatória intensa, muitas vezes a COVID-19 é tratada com corticosteroides e anti-inflamatórios não esteroidais, os quais atuam na via de inibição da produção de eicosanoides.

Ainda nesse contexto, nota-se que a hipótese aqui apresentada é indiretamente corroborada com atual evidência quanto ao uso de anti-inflamatórios não esteroidais em pacientes com COVID-19. Isso ocorre porque o uso desses medicamentos não foi associado à maior mortalidade, maior admissão em UTIs nem à maior necessidade de suporte ventilatório em pacientes com COVID-19 (ZHOU *et al.*, 2022). Logo, se a PGE₂ fosse importante para o desenvolvimento de maior severidade da doença, o uso de AINEs, que inibem a produção desse mediador, deveria mostrar-se significativo na redução da gravidade da doença, o que não ocorre na prática.

Além dos AINEs, um estudo com um antagonista específico dos receptores da PGD₂, o Asapiprant, demonstrou capacidade de proteger camundongos envelhecidos da letalidade por infecção do SARS-CoV-2 (WONG *et al.*, 2022) e, atualmente, está em fase 2 de ensaios clínicos, tendo grande potencial terapêutico contra a COVID-19. Dessa forma, ainda é crucial que novos estudos sejam feitos, preferencialmente focados na atuação de moléculas que atuem em receptores de prostaglandinas, buscando potenciais relações entre eles e o tratamento para a COVID-19.

O presente estudo apresenta algumas limitações, visto que não houve acesso à informação quanto ao uso de AINEs ou de corticosteroides pelos pacientes durante o manejo clínico deles. Tendo em vista que indivíduos hospitalizados com infecções respiratórias virais,

incluindo COVID-19, normalmente são tratados com esses medicamentos, percebe-se que esses medicamentos podem ser responsáveis pela redução observada nos níveis plasmáticos de PGE₂, justificando os resultados aqui apresentados.

PERSPECTIVAS

Pretende-se, com este estudo, possibilitar base teórica para publicações futuras no contexto de eicosanoides e COVID-19. Além disso, é pretendido que esse artigo possa ser publicado em uma revista científica, sendo o tema de estudo ampliado para a análise adicional do perfil de leucotrieno B₄ durante a COVID-19. O anexo A contém o artigo, o qual já está sendo preparado para publicação.

ANEXOS

ANEXO A – Artigo a ser publicado

Title: Prostaglandin E2/Leukotriene B4 balance and viral load in distinct clinical stages of coronavirus disease from 2019

Larisse Ricardo Gadêlha¹, João Paulo Alecrim de Abreu¹, Maria Juliana Bezerra Costa¹, Larissa Paola Rodrigues Venâncio¹, Mary Hellen Fabres-Klein¹, Raphael Contelli Klein¹, Jonilson Berlink Lima^{1*} and Théo Araújo-Santos^{1#}

¹ Núcleo de Estudos de Agentes Infecciosos e Vetores (NAIVE), Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), Barreiras, Bahia, Brasil.

Corresponding authors: Théo Araújo-Santos, PhD, Laboratório de Agentes e Infecciosos e Vetores (LAIVE), Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia. Rua da Prainha, 1326, Morada Nobre. Barreiras, Bahia, Brasil. Zip code: 47810-047. E-mail: theo.santos@ufob.edu.br, Phone number: +55 77 3614-3237.

Running Head: **PGE2/LTB4 ratio and viral load in COVID-19.**

ABSTRACT

Background: Prostaglandin E2 (PGE2) and Leukotriene B4 (LTB4) are the main products of arachidonic acid metabolism and are related to the modulation of the immune response during viral infections. Recent studies have identified increased levels of several eicosanoids in the plasma and bronchoalveolar lavage of patients with coronavirus disease (COVID-19),

suggesting an importance of these mediators during the disease. **Objective:** This study investigated the correlation between plasma levels of PGE2 and LTB4 and clinical severity manifestations of COVID-19. **Methods:** This is a cross-sectional study involving COVID-19 patients classified as cured (n=13), oligosymptomatic (n=29), severe (n=15), death (n=11) and non-infected (n=10). D-dimer, PGE2 and LTB4 were measured in plasma samples by ELISA technique and data was correlated with viral load. **Results:** PGE2 plasma levels were decreased in COVID-19 patients compared to the non-infected group. PGE2 and LTB4 levels did not alter by distinct clinical presentation of COVID-19. However, LTB4 was related to the decrease in SARS-CoV-2 burden in patients, suggesting only LTB4 is associated with control of viral load. **Conclusion:** Our data indicates PGE2/LTB4 plasma levels are not associated with COVID-19 clinical severity. Hospitalized patients with COVID-19 are typically treated with corticosteroids, which may be responsible for the observed eicosanoid imbalance. Additional analyzes should be carried out to assess the participation of PGE2 receptors in the pathophysiology of COVID-19.

Key words: Leukotriene B4, Prostaglandin E2, SARS-CoV-2, Viral Load, COVID-19

1. INTRODUCTION

The coronavirus disease from 2019 (COVID-19) is caused by SARS-CoV-2, a virus mainly transmitted via respiratory droplets [1]. The range of clinical manifestations can vary from sore throat, anosmia, headache, fever to dyspnea, systemic coagulation and death in the severe patients [2].

Severe COVID-19 is related to systemic inflammatory response with high plasma levels of cytokines and lipid mediators including eicosanoids and specialized mediators [3]. Treatment with corticosteroids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) is commonly used to attenuate the symptoms, control inflammation and prevent the shock [4].

NSAIDs are inhibitors of cyclooxygenase 1 and 2 reducing prostaglandin synthesis and not affecting leukotrienes production. The production of prostaglandin E2 (PGE2) is related to the worsening of the infection caused by SARS-CoV-2 [5,6]. Usually, PGE2 suppresses the adaptive and innate immune system and promotes infection [7]. Therefore, it is already known that PGE2 can modulate the response of various cell types during SARS-CoV-2 infection, influencing the pathogenesis of COVID-19 [8]. However, the NSAIDs therapy seems to be ineffective to prevent severe COVID-19 [9]. On the other hand, Leukotriene B4 (LTB4) can control viral infections, especially in the lungs [10]. In addition, LTB4 inhibits the viral replication of the influenza virus *in vivo* and coronavirus *in vitro* [11]. LTB4 plasma levels are associated with severe disease in COVID-19 diabetic patients (BONYEK-SILVA *et al.*, 2021). In others viral respiratory infections, LTB4 is involved in the pathogenesis of viral pneumonia, acute lung injury and acute respiratory distress syndrome, and it contributes with the cellular recruitment and induction of the immune response influencing the immune system ability to fight pathogens [13].

The contribution of SARS-CoV-2 burden to severe covid-19 is still undetermined. Age and time of symptoms were associated with SARS-CoV-2 load, both being risk factors for COVID-19 mortality [14,15]. In this study, we investigated the association between PGE2 and LTB4 plasma levels and burden of SARS-CoV-2 in patients with distinct clinical stages of COVID-19. We identified that higher levels of LTB4 are related to lower viral load. In addition, PGE2 was not associated with viral load or COVID-19 poor outcomes.

2. METHODS

2.1. RESEARCH ETHIC

This study was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. The research was submitted to the ethics committee in human research for

consideration via Plataforma Brasil, obtaining its approval with registration number CAAE: n° 30629520.6.0000.0008.

2.2. STUDY DESIGN

Cross-sectional study during the first wave of COVID-19 between May and September of 2020, enrolling patients in distinct clinical stages of the disease in Barreiras, Bahia, Brazil. The sample was composed of 78 patients divided into 5 groups according to the SARS-CoV-2 RT-qPCR test, the severity of symptoms and hospitalization in non-infected (NI, n=10), cured (C, n=13), oligosymptomatic (O, n=29), severe (S, n=15) and deaths (D, n=11). Patients were classified as severe according to hospitalization in the moment of the collecting sample (Figure 1).

2.3 INCLUSION CRITERIA

We included in the study patients tested for COVID-19 by RT-PCR with completed clinical and epidemiological information and age between 18 and 75 years old.

2.4 SAMPLE COLLECTION

Nasopharyngeal, nasal and oropharyngeal swabs and plasma samples (n=78) collected during the first COVID-19 wave in Brazil between May and June of 2020 were obtained after SARS-CoV-2 detection in the Laboratory of Vectors and Infection Disease.

2.5 VIRAL LOAD

SARS-CoV-2 viral load of the nasopharyngeal swab samples was quantified using RT-qPCR. The assay was performed using primers and TaqMan probe for the N1 sequence of SARS-CoV-2, and a standard curve containing different copy numbers of the purified plasmid containing the N1 sequence (Klein *et al.* 2020).

2.6 D-DIMER AND EICOSANOIDS ELISA

Using the plasma samples collected from selected participants, the Prostaglandin E2, Leukotriene B4 were measured by ELISA according manufacturer instructions (Cayman Chemical Company, MI, USA). Circulating D-dimer levels were measured in plasma from COVID-19 patients by commercial Elisa kit according to instructions of manufacture (Thermofischer Scientific).

2.7 STATISTICAL ANALYSIS

Groups were compared by ANOVA, followed by multiple comparison of means with Tukey's post test . Categorical data were analyzed using the χ^2 test with Fisher's exact method. All statistics were performed using GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, CA, USA). Continuous variables were tested to associations using Spearman's test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

3. RESULTS

3.1 BASELINE CHARACTERISTICS OF PATIENTS IN DIFFERENT CLINICAL STAGES OF COVID-19

Participants of the study were adults and presented clinical and epidemiological characteristics as usually identified in COVID-19 patients [2]. Severe disease was identified in male 10/15 (66.67%, $P < 0.05$) and/or aged patients (69 ± 4.05 , $P < 0.05$). In addition, severe COVID-19 was related with comorbidities such as hypertension 7/15 (46.67%, $P < 0.05$), diabetes 10 (66.67%, $P < 0.05$) compared to other groups (Table 1). All deaths in the study occurred in hospitalized individuals and no differences of clinical data were observed between severe and death groups. Oligosymptomatic patients presented headache, sore throat, myalgia and rarely

dyspnea when compared to severe and death patients (Table 1). In addition, we investigated coagulopathy disturbance, since high d-dimer plasma levels are related with severe cases of COVID-19 (TANG *et al.* 2020). In this regard, severe patients presented increased d-dimer plasma levels when compared to oligosymptomatic and cured patients (Table 1). No differences were identified in SARS-CoV-2 viral load of COVID-19 patients.

3.2 PLASMA LEVELS OF EICOSANOIDS ARE NOT ASSOCIATED WITH SEVERITY IN COVID-19 PATIENTS

Eicosanoid levels increase during severe COVID-19 [16]. Herein, we observed PGE2 but not LTB4 levels were lower when comparing the COVID-19 patients with healthy donors including cured and non-infected patients (Figure 2A-B). However, the PGE2/LTB4 ratio was decreased in COVID-19 patients (Figure 2C). In addition, we did not observe differences between either PGE2 or LTB4 plasma levels in patients with distinct clinical stages of COVID-19 (Figure 2D-F). Once increased D-dimer levels is a severity marker of COVID-19 [17] we performed a correlation test between D-dimer and eicosanoid measured in patients' plasma (ROSTAMI; MANSOURITORGHABEH, 2020). The plasma amount of D-dimer was not associated with neither PGE2 nor LTB4 (Figure 3), suggesting that these eicosanoids are not related with severity during COVID-19.

3.3 LTB4 PLASMA LEVELS ARE ASSOCIATED WITH REDUCED SARS-CoV-2 BURDEN IN COVID-19 PATIENTS

Leukotriene B4 can inhibit the viral replication of human coronavirus, rhinovirus and syncytial respiratory virus in neutrophils, *in vitro* [11]. On the opposite way, PGE2 is produced by SARS-CoV-2-infected monocytes (ROMÃO *et al.*, 2022). To evaluate if the eicosanoids plasma levels

were associated with viral load we performed a Spearman correlation test between genomes of copies of SARS-CoV-2 and plasma levels of PGE2 or LTB4 (Figure 4). In this analysis, PGE2 plasma levels were not related to viral load, however the increase in plasma levels of LTB4 was related to the decrease in SARS-CoV-2 genome copies (Figure 4B). The PGE2/LTB4 ratio was not correlated to viral load levels (Figure 4C), suggesting only LTB4 is associated with SARS-CoV-2 replication control in patients.

4. DISCUSSION

COVID-19 is characterized by a hyper-inflammatory state with activation of arachidonic acid pathways including PGE2 and LTB4 production, both with important roles during disease [9]. The production of PGE2 induced by SARS-CoV-2 infection critically influences the severity of COVID-19, since PGE2 hampers PAX5 expression, inhibiting B cells differentiation, and reducing the humoral immune response [9]. In addition, PGE2 dampens the production of IFN- γ and affects the cytotoxicity of natural killer and CD8 cells that destroy cells infected by SARS-CoV-2 [8]. Since PGE2 can exert immunosuppressive effects during viral infection, its elevation can reduce the initial defense against SARS-CoV-2 and therefore lead to more severe disease courses [18]. On the other hand, LTB4 is considered a key mediator of the innate immune response for stimulating production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 by neutrophils and macrophages [19]. LTB4 also acts by altering the function of T lymphocytes by increasing the proliferation and production of interleukin-2 and IFN- γ , suggesting an increase in the function of Th1 cells. The LTB4 stimulates innate immune cells and increases cytotoxicity of natural killer lymphocytes (GELFAND, 2017), while promoting neutrophils degranulation to combat external agents (CHOI; SANTOSO; CHAVAKIS, 2009). During viral infections, LTB4 stimulates the neutrophil release of peptides with antimicrobial capacity, such as defensins and cathelicidin-related antimicrobial peptide (CRAMP), which have a demonstrated ability to act in certain infections, such as

influenza, cytomegalovirus disease, herpes simplex virus type 1 infection and coronavirus diseases [10,11]. In the context of COVID-19, SARS-CoV-2 induces neutrophil extracellular traps, a microbial defense mechanism based in neutrophil recruitment and death, and pulmonary lesions are replete with these cells during severe stages of the disease [20]

Herein, we compared plasma levels of PGE2 and LTB4 patients with distinct SARS-CoV-2 burden and clinical stages of COVID-19. PGE2 plasma levels measured in our study were significantly lower when comparing COVID-19 positive patients with healthy individuals, which was not observed when separating the groups by clinical stages. LTB4 is associated with chronic inflammation in diabetes experimental models. Thus, when comparing diabetic and non-diabetic individuals with COVID-19, LTB4 levels were higher in diabetic patients; however, when comparing individuals from the same group who went to ICU and those who did not, there was no difference between the LTB4 levels [12], corroborating the non-association of LTB4 with severity.

As eicosanoid levels do not appear to increase with disease severity according to clinical data, we tested the correlation with a marker of COVID-19 severity. Therefore, we analyzed D-dimer, which has been described as a marker of COVID-19 severity [17]. Thus, D-dimer data from positive patients were correlated with the PGE2 and LTB4 data and did not show statistical significance, which corroborates the apparent non-correlation between the levels of PGE2 and LTB4 with the severity of the disease.

SARS-CoV-2 burden was not associated with COVID-19 severity [22]. Romão *et al.* showed an increase in PGE2 in patients with higher viral load, but the study included a reduced number of participants [9]. LTB4 and PGE2 levels are increased in the bronchoalveolar lavage of patients with COVID-19 [23]. We did not observe a relationship between PGE2 plasma levels and viral load. Leukotriene B4 induces neutrophil recruitment and activity and increases the antiviral response against human coronavirus, human respiratory syncytial virus and influenza B

virus *in vitro* [11]. In our study, increased LTB4 plasma levels are negatively associated with viral load found in nasopharyngeal swabs. Together, our data indicates that LTB4 is important to control viral load during COVID-19 infection, but eicosanoids are not related with severity of the disease. This agrees with the results found in mice, which showed that the reduction of viral antigen in the lungs was not associated with improvement of the damage caused by inflammation [10].

It is important to emphasize that the arachidonic acid pathway acting during COVID-19 remains an important field of study, since due to its intense inflammatory response, COVID-19 is often treated, among others, with corticosteroids and non-steroidal anti-inflammatory- drug classes that act on the arachidonic acid pathway. However, corticosteroids were not able to reduce symptoms or the viral load in patients with COVID-19, however, they are able to improve the clinical outcome of patients who need ventilatory support, that are, those with severe disease [6].

In this context, non-steroidal anti-inflammatory drugs were able to reduce the inflammatory response and the production of antibodies against COVID-19, instead of modifying the susceptibility to infection or viral replication (CHEN *et al.*, 2021). Taxifolin demonstrated the ability of this drug to prevent severe disease courses (RICKE-HOCH *et al.*, 2021). Finally, a specific prostaglandin D2 receptor antagonist, Asapiprant, has been shown to prevent lethality of SARS-Cov-2 infection in aged mice (WONG *et al.*, 2022) and is currently in phase 2 clinical trials, having great therapeutic potential against COVID-19. Thus, it is crucial that novel studies are carried out, preferably focused on the action of molecules that act on prostaglandin receptors, with the aim of treating the disease.

This study presents some potential limitations since we did not have complete access to use of NSAIDS or corticosteroids by the patients during their clinical management. Hospitalized individuals with viral respiratory infections, including COVID-19, are typically treated with these drugs, which could be responsible for the observed reduction in PGE2, but not LTB4

plasma levels. Although not associated with severity, LTB4 can contribute to the cytokine storm, which is a characteristic of severe COVID-19. Future studies can be conducted to investigate the contribution of LTB4 in pathophysiology of the COVID-19.

5. Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JBL, TA-S. Data collection: LRG, JPAA, MJBC, LPRV, RCK, MHFK, JBL, TA-S; Analyzed the data, LRG, JPAA, MJBC, LPRV, RCK, MHFK, RFC, JBL, TA-S; Contributed materials/analysis tools: LPRV, RFC, JBL, TA-S; Wrote the paper: LRG, JPAA, MJBC, TA-S.

6. Financial Support

Associação Baiana de Produtores de Algodão (ABAPA); Associação Baiana de Agricultores Irrigantes da Bahia (AIBA); FAPESB (#1381/2020); FINEP – CT-INFRA 2014 (#0418000600); CNPq; CAPES, MEC, MCTIC. These institutions had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

7. Acknowledgments

We thank the Secretariat of Epidemiological Surveillance of the city of Barreiras and the West Hospital for providing data on patients treated in the municipality. We also thank Larissa Gomes Barbosa, Rosimery Santos de Jesus, Iole Neri de Oliveira and Marlan Magalhães Gualberto for technical support.

8. Conflict of Interest Statement

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

EQUIPE

- Théo de Araújo Santos: orientador do trabalho e docente da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB).
- Maria Juliana Bezerra Costa: autora do trabalho e discente do curso de Medicina da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB).
- João Paulo Alecrim de Abreu: discente do curso de Medicina da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB).
- Larisse Ricardo Gadêlha: Mestranda em Patologia Investigativa da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB).

REFERÊNCIAS

1. ARCHAMBAULT, A. *et al.* High levels of eicosanoids and docosanoids in the lungs of intubated COVID-19 patients. **The FASEB Journal**, v. 35, n. 6, jun. 2021.
2. BARBOSA, L. G. *et al.* **S100A9 as an inflammatory marker in hospitalized COVID-19 patients.** [s.l.] In Review, 18 maio 2022. Disponível em: <<https://www.researchsquare.com/article/rs-1661944/v1>>. Acesso em: 30 jun. 2022.
3. BONNET, B. *et al.* Severe COVID-19 is characterized by the co-occurrence of moderate cytokine inflammation and severe monocyte dysregulation. **EBioMedicine**, v. 73, p. 103622, nov. 2021.
4. BRODIN, P. Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. **Nature Medicine**, v. 27, n. 1, p. 28–33, 2021.
5. CHAUDHURI, D. *et al.* Corticosteroids in COVID-19 and non-COVID-19 ARDS: a systematic review and meta-analysis. **Intensive Care Medicine**, v. 47, n. 5, p. 521–537, maio 2021.
6. COSTA-FILHO, R. C. *et al.* Should COVID-19 be branded to viral thrombotic fever? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 116, p. e200552, 2021.
7. DADRAS, O. *et al.* The relationship between COVID-19 viral load and disease severity: A systematic review. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 10, n. 3, mar. 2022.
8. FANG, X. *et al.* Epidemiological, comorbidity factors with severity and prognosis of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Aging**, v. 12, n. 13, p. 12493–12503, 13 jul. 2020.
9. FRAGA-SILVA, T. F. DE C. *et al.* COVID-19: Integrating the Complexity of Systemic and Pulmonary Immunopathology to Identify Biomarkers for Different Outcomes. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 599736, 29 jan. 2021.
10. FUNK, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1871–1875, 30 nov. 2001.
11. GHOSH, S. *et al.* Imaging algorithm for COVID-19: A practical approach. **Clinical Imaging**, v. 72, p. 22–30, abr. 2021.
12. GUPTA, A. *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 7, p. 1017–1032, jul. 2020.
13. GUSTINE, J. N.; JONES, D. Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. **The American Journal of Pathology**, v. 191, n. 1, p. 4–17, jan. 2021.

14. HOHJOH, H. *et al.* Prostanoid receptors and acute inflammation in skin. **Biochimie**, v. 107, p. 78–81, dez. 2014.
15. HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, fev. 2020.
16. JACKSON, C. B. *et al.* Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 3–20, jan. 2022.
17. KLEIN, R. C. *et al.* Identifying Inconclusive Data in the SARS-CoV-2 Molecular Diagnostic Using Nucleocapsid Phosphoprotein Gene as a Target. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 146, n. 3, p. 272–277, 1 mar. 2022.
18. LAN, J. *et al.* Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature**, v. 581, n. 7807, p. 215–220, 14 maio 2020.
19. LIN, L. *et al.* Gastrointestinal symptoms of 95 cases with SARS-CoV-2 infection. **Gut**, v. 69, n. 6, p. 997–1001, jun. 2020.
20. LOTFI, M.; HAMBLIN, M. R.; REZAEI, N. COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. **Clinica Chimica Acta**, v. 508, p. 254–266, set. 2020.
21. MALIK, P. *et al.* Biomarkers and outcomes of COVID-19 hospitalisations: systematic review and meta-analysis. **BMJ Evidence-Based Medicine**, v. 26, n. 3, p. 107–108, jun. 2021.
22. MULCHANDANI, R.; LYNGDOH, T.; KAKKAR, A. K. Deciphering the COVID-19 cytokine storm: Systematic review and meta-analysis. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 51, n. 1, jan. 2021.
23. PARK, Y.-J. *et al.* D-dimer and CoV-2 spike-immune complexes contribute to the production of PGE2 and proinflammatory cytokines in monocytes. **PLOS Pathogens**, v. 18, n. 4, p. e1010468, 6 abr. 2022.
24. QIN, C. *et al.* Dysregulation of Immune Response in Patients with COVID-19 in Wuhan, China. **SSRN Electronic Journal**, 2020a.
25. QIN, C. *et al.* Dysregulation of Immune Response in Patients with COVID-19 in Wuhan, China. **SSRN Electronic Journal**, 2020b.
26. RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, maio 2011.
27. RICKE-HOCH, M. *et al.* Impaired immune response mediated by prostaglandin E2 promotes severe COVID-19 disease. **PLOS ONE**, v. 16, n. 8, p. e0255335, 4 ago. 2021.

28. RIPON, MD. A. R. *et al.* Role of arachidonic cascade in COVID-19 infection: A review. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 154, p. 106539, jun. 2021.
29. ROBB, C. T. *et al.* Non-steroidal anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and COVID-19. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 21, p. 4899–4920, nov. 2020.
30. RODRIGUEZ-MORALES, A. J. *et al.* Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 34, p. 101623, mar. 2020.
31. ROMÃO, P. R. *et al.* Viral load is associated with mitochondrial dysfunction and altered monocyte phenotype in acute severe SARS-CoV-2 infection. **International Immunopharmacology**, v. 108, p. 108697, jul. 2022.
32. ROSTAMI, M.; MANSOURITORGHABEH, H. D-dimer level in COVID-19 infection: a systematic review. **Expert Review of Hematology**, v. 13, n. 11, p. 1265–1275, 1 nov. 2020.
33. SENA, K. *et al.* Altered expression of SARS-CoV-2 entry and processing genes by Porphyromonas gingivalis-derived lipopolysaccharide, inflammatory cytokines and prostaglandin E2 in human gingival fibroblasts. **Archives of Oral Biology**, v. 129, p. 105201, set. 2021.
34. SHARMA, A.; AHMAD FAROUK, I.; LAL, S. K. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 202, 29 jan. 2021.
35. SINGH, A. K. *et al.* Prevalence of co-morbidities and their association with mortality in patients with COVID -19: A systematic review and meta-analysis. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 22, n. 10, p. 1915–1924, out. 2020.
36. SINGHANIA, N. *et al.* Current Overview on Hypercoagulability in COVID-19. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v. 20, n. 5, p. 393–403, out. 2020.
37. SORGI, C. A. *et al.* Comprehensive high-resolution multiple-reaction monitoring mass spectrometry for targeted eicosanoid assays. **Scientific Data**, v. 5, n. 1, p. 180167, dez. 2018.
38. SORGI, C. A. *et al.* Eicosanoid pathway on host resistance and inflammation during Mycobacterium tuberculosis infection is comprised by LTB4 reduction but not PGE2 increment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 3, p. 165574, mar. 2020.

39. TANG, N. *et al.* Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 4, p. 844–847, abr. 2020.
40. THE RECOVERY COLLABORATIVE GROUP. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 8, p. 693–704, 25 fev. 2021.
41. THEKEN, K. N.; FITZGERALD, G. A. Bioactive lipids in antiviral immunity. **Science**, v. 371, n. 6526, p. 237–238, 15 jan. 2021.
42. 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, 17 mar. 2020.
43. WIDEGREN, H. *et al.* LTB₄ increases nasal neutrophil activity and conditions neutrophils to exert antiviral effects. **Respiratory Medicine**, v. 105, n. 7, p. 997–1006, jul. 2011.
44. WÖLFEL, R. *et al.* Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. **Nature**, v. 581, n. 7809, p. 465–469, 28 maio 2020.
45. WONG, L.-Y. R. *et al.* Eicosanoid signalling blockade protects middle-aged mice from severe COVID-19. **Nature**, v. 605, n. 7908, p. 146–151, 5 maio 2022.
46. ZHOU, Q. *et al.* Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and adverse outcomes during the COVID-19 pandemic: A systematic review and meta-analysis. **eClinicalMedicine**, v. 46, p. 101373, abr. 2022.
47. ZHU, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020.