



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



FABIANE DA SILVA REIS GOES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *SELPLG*, *ITGA4*, *ARG1*, *NOS2* EM
LEUCÓCITOS TOTAIS E NÍVEIS PLASMÁTICOS DAS PROTEÍNAS P-
SELECTINA E PSGL-1 EM PACIENTES COM COVID-19 E SUA CORRELAÇÃO
COM GRAVIDADE**

Salvador

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FABIANE DA SILVA REIS GOES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *SELPLG*, *ITGA4*, *ARG1*, *NOS2* EM
LEUCÓCITOS TOTAIS E NÍVEIS PLASMÁTICOS DAS PROTEÍNAS P-
SELECTINA E PSGL-1 EM PACIENTES COM COVID-19 E SUA CORRELAÇÃO
COM GRAVIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Fortuna
Coorientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer

Salvador

2023

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde (BUS),
SIBI-UFBA.

Goes, Fabiane da Silva Reis

G598a Avaliação da expressão dos genes SELPLG, ITGA4, ARG1, NOS2 em leucócitos totais e níveis plasmáticos das proteínas p-selectina e PSGL-1 em pacientes com COVID-19 e sua correlação com gravidade/ Fabiane da Silva Reis Goes.- Salvador, 2023.

124 f.: il., fig., graf.

Inclui anexos e apêndices.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Fortuna.

Coorientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2023.

1. Infecções por coronavírus; 2. COVID-19 (Doença). I. Fortuna, Vitor. II. Meyer, Roberto José. III. Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2023. IV. Título.

CDU: 614

“Campeão, vencedor
Deus dá asas, faz teu voo
Campeão, vencedor
Essa fé que te faz imbatível
Te mostra o teu valor”

Jamily

Dedico este trabalho a todos os meus familiares com muito amor!

In memoriam (todas as vítimas da doença COVID-19)

AGRADECIMENTOS

Neste momento, olho para trás e vejo um longo e árduo caminho trilhado para a construção desta dissertação. Esta pesquisa é um fruto do trabalho coletivo de todo o meu grupo de pesquisa Terapia Celular e do grupo COVID-19 da UFBA.

Em primeiro lugar agradeço ao Altíssimo. Deus, a quem recorri em vários momentos pedindo força para não fraquejar diante dos obstáculos. Agradeço aos Orixás que em sua infinita bondade e misericórdia, me concederam trilhar este caminho com êxito, superando as dificuldades, moldando-me para que eu me tornasse uma pessoa e profissional melhor.

Agradeço aos meus pais: Felipe Neri Pinheiro Reis e Francisca da Silva Reis por todo incentivo, amor e cuidado comigo, vocês são minhas raízes! Agradeço ao meu querido e amado esposo: Bruno Mendes Góes, pois você é minha inspiração neste caminho árduo dos estudos, obrigada pela compreensão, apoio e por me consolar quando eu estava angustiada! Agradeço ao meu amado e querido filho Guilherme da Silva Reis Góes por sempre me motivar a continuar neste processo de crescimento profissional! Agradeço a minha querida sogra Dulcilene de Souza Mendes por todo apoio e amparo, palavras de conforto e cuidado com meu esposo e filho na minha ausência, devido aos estudos! Dulce, sem você seria impossível concluir meus estudos! Agradeço aos meus irmãos: Normeide da Silva Reis, Alba da Silva Reis e Antônio Claudio da Silva Reis que me incentivaram durante toda minha vida e cuidaram!

Especial agradecimento ao meu querido orientador, prof. Dr. Vitor Fortuna, pela dedicação, paciência, conhecimento compartilhado. Obrigada por ser um exemplo no âmbito acadêmico, científico e inspiração para mim!

Agradeço ao meu coorientador Dr. José Roberto Meyer por todo apoio técnico e conhecimento passado em aulas e palestras!

Agradeço, especialmente a minha parceria de bancada: Nívia Nonato Silva com quem dividi vitórias, aprendizado, cumplicidade, derrotas e superações! E, principalmente, pela sua parceria, amizade e irmandade Nil! Obrigada por tudo!

Agradeço, especialmente ao grupo Terapia Celular: aos doutorandos Brysa Mariana Dias Silveira e Tiago Ribeiro por toda orientação e colaboração ao meu trabalho, especialmente a Brysa, pois nos tornamos amigas! Agradeço a Beatriz dos Santos Costa, Caroline Lima Dias, Giselle Brito de Jesus por todo apoio técnico e colaboração científica! Vocês foram muito importantes neste processo!

Agradeço ao grupo COVID-19 da UFBA por toda colaboração técnica e científica, aos

mestres que contribuíram para a construção do meu conhecimento, especialmente ao professor Dr. Alex José Leite Torres, professor Dr. Ryan dos Santos Costa, professor Dr. José Tadeu Raynal, professor Dra. Soraya Castro Trindade, professor Dra. Songeli Menezes Freire e professor Dra. Silvana Beutinger Marchioro! Aos colegas Gabriel Barroso de Almeida, Taiane Macêdo Gondim por todo conhecimento dividido e apoio!

Agradeço especialmente a Rogério Reis Conceição e Patrícia Mares de Miranda por todo apoio nos experimentos e companheiro! Agradeço ao Sr. Mário por todo apoio neste processo!

Agradeço as minhas amigas: Marlúcia Carneiro da Silva, Poliana Oliveira Cruz E Karine Souza Nere pelo apoio incondicional e amizade verdadeira!

E, finalmente agradeço a coordenação do Programa de Pós-Graduação Dra. Silvia Lima Costa e ao programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIM) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

À FAPESB e ao CNPQ pelo auxílio financeiro e pelo investimento nas atividades científicas desenvolvidas neste projeto. A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. MUITO OBRIGADA!

RESUMO

INTRODUÇÃO: A COVID-19, doença causada pelo vírus SARS-COV-2 pode progredir para casos graves e promover a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA). A fisiopatologia da COVID grave não está bem esclarecida, mas parece estar relacionada à disfunção endotelial combinada a uma resposta imune desregulada e tempestade de citocinas. A COVID-19 evolui rapidamente para casos graves, portanto é de grande importância avaliar exames laboratoriais e biomarcadores indicadores da resposta imune do hospedeiro que sejam eficazes para prever a evolução de casos graves, com objetivo de otimizar o manejo clínico e a terapêutica para evitar desfecho desfavorável, como óbito. **OBJETIVO:** Avaliar a expressão dos genes *ARG1*, *NOS2*, *ITGA4* e *SELPLG* em leucócitos totais e mensurar os níveis das proteínas P-selectina e PSGL-1 no plasma de pacientes com COVID-19 associando com a gravidade do quadro clínico e ao prognóstico da doença. **METODOLOGIA:** No presente estudo observacional submetido e aprovado pelo CONEP (Nº Parecer: 4.014.165) Foram recrutados 117 pacientes com diagnóstico confirmado da doença COVID-19 (grave = 58 e leve = 59). Parâmetros demográficos, clínicos e laboratoriais foram coletados na admissão ao estudo. Usamos o ensaio de RT-qPCR para mensurar a expressão relativa dos genes. Avaliamos níveis plasmáticos da P-selectina e PSGL-1 com ensaio de ELISA. **RESULTADOS:** Encontramos que homens, negros, idosos com presença de comorbidades pré-existentes ($p < 0,0001$) tiveram maiores chances para desfecho grave. A razão neutrófilo-linfócito (RNL) e razão plaquetas-linfócitos (RPL) ($p < 0,0001$), estavam alteradas no grupo grave. Os pacientes com sintomas grave exibiram expressão aumentada dos genes *ARG1* ($p = 0,032$) e *SELPLG* ($p < 0,0001$), assim como maiores concentrações plasmáticas das proteínas P-selectina ($p = 0,031$) e PSGL-1 ($p < 0,002$). A análise multivariada demonstrou que os parâmetros hematológicos NLR, PLR, bem como a expressão do gene *SELPLG* e proteínas sPSGL-1 foram preditores independentes da gravidade do COVID-19. **CONCLUSÃO:** O presente estudo sugere que os biomarcadores de disfunção endotelial (P-selectina) e respostas leucocitárias desreguladas (*ARG1*; *SELPLG* e sPSGL-1) estão associados à gravidade da COVID-19, servindo como ferramentas preditivas promissoras para otimizar o manejo clínico e o monitoramento do paciente.

Palavras-chaves: COVID-19; Leucócitos totais; *SELPLG*; *ARG1*; sPSGL-1 and P-selectina

ABSTRACT

INTRODUCTION: COVID-19, a disease caused by the SARS-COV-2 virus, can progress to severe cases and promote Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). The pathophysiology of severe COVID is not well understood, but it appears to be related to endothelial dysfunction combined with a dysregulated immune response and cytokine storm. COVID-19 evolves quickly into severe cases, so it is of great importance to evaluate laboratory tests and biomarkers that are indicators of the host's immune response that are effective in predicting the evolution of severe cases, with the aim of optimizing clinical and therapeutic management to avoid adverse outcomes. unfavorable events, such as death. **OBJECTIVE:** To evaluate the expression of the *ARG1*, *NOS2*, *ITGA4* and *SELPLG* genes in total leukocytes and measure the levels of P-selectin and PSGL-1 proteins in the plasma of patients with COVID-19, associating it with the severity of the clinical picture and the prognosis of the disease. **METHODOLOGY:** In this controlled observational study approved by CONEP (Opinion No.: 4,014,165) 117 patients with confirmed diagnosis of COVID-19 disease (severe = 58 and mild = 59) were recruited. Demographic, clinical, and laboratory parameters were collected at study admission. We used the RT-qPCR assay to measure the relative expression of genes. We evaluated plasmatic levels of P-selectin and PSGL-1 with ELISA assay. **RESULTS:** we found that men, blacks, elderly people with pre-existing comorbidities ($p < 0.0001$) were more likely to have severe outcomes. The neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-lymphocyte ratio (PLR) ($p < 0.0001$) were altered in the severe group. Patients with severe symptoms exhibit increased expression of the *ARG1* ($p = 0.032$) and *SELPLG* ($p < 0.0001$) genes, as well as higher plasma concentrations of P-selectin ($p = 0.031$) and PSGL-1 ($p < 0.002$) proteins. Multivariate analysis demonstrated that hematological parameters NLR, PLR, as well as *SELPLG* gene expression and sPSGL-1 proteins were independent predictors of COVID-19 severity. **CONCLUSION:** The present study suggests that the biomarker of endothelial dysfunction (P-selectin) and dysregulated leukocyte responses (*ARG1*; *SELPLG* and sPSGL-1) are associated with the severity of COVID-19, serving as promising predictive tools for clinical management and outcome. patient monitoring.

Keywords: COVID-19; total leukocytes; *SELPLG*; *ARG1*; sPSGL-1 and P-selectin

LISTA DE SIGLAS

RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcriptase reversa
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
HGCA	Hospital Geral Cleríston Andrade
OMS	Organização Mundial de Saúde
ICM	Instituto Couto Maia
S	Proteína Spink
N	Proteína do nucleocapsídeo
E	Proteína de envelope
PSGL-1	Ligante de glicoproteína P-selectina 1
ARG1	Arginase 1
PT	Protrombina
PTT	Tempo de tromboplastina parcial
FIB	Fibrinogênio
LAC	Anticoagulante lúpico
ATIII	Antitrombina
FDPs	Produtos de degradação da fibrina
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
FT	Fator tecidual
vWF	Fator von Willebrand
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
SESAB	Secretaria de Saúde do Estado da Bahia
CDC	Disease Control and Prevention
ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
TMPRSS2	Protease transmembrana serina 2
NIH	National Institutes of Health
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo grave
ISARIC	International Severe Acute Respiratory and Emerging Infections Consortium
ITGA-4	Subunidade Alfa 4 do Receptor VLA-

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Espectro da gravidade e sintomas manifestados em pacientes com COVID-19... 24	24
Tabela 02. Definição dos grupos estudados. 52	52
Tabela 03. Critérios de inclusão e exclusão para os participantes..... 52	52
Tabela 04. Sequência de genes utilizados no estudo. 59	59
Tabela 05. Valores para as curvas de eficiência dos primers utilizados no estudo. 61	61
Tabela 06. Comparação das características clínicas entre os grupos estudados..... 67	67
Tabela 07. Comparação dos parâmetros hematológicos entre pacientes investigados..... 69	69
Tabela 08. Razão Neutrófilos-Linfócitos (RNL)..... 70	70
Tabela 09. Razão de Plaqueta-Linfócito (RPL)..... 71	71
Tabela 10. Valor diagnóstico para os genes <i>ARG1</i> e <i>PSGL-1</i> associadas à gravidade da COVID-19. 76	76
Tabela 11. Valor prognóstico para as proteínas associadas à gravidade da COVID-19. 78	78
Tabela 12. Razão sP-selectina-sPSGL-1 80	80
Tabela 13. Análise multivariada de marcadores moleculares associados a dados clínicos e sociodemográficos 81	81
Tabela 14. Análise de dados sociodemográficos para coorte avaliada na expressão gênica 82	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Migração das células imunes imaturas GMDSC's para o sítio de infecção na COVID-19 grave.	36
Figura 02. Possíveis mudança no metabolismo das células imunes inatas na infecção grave do SARS-CoV-2.....	39
Figura 03. Fluxo sugerido para síntese da proteína PSGL-1 em leucócitos totais mediante a estímulos.....	42
Figura 04. Imunotrombose sugerida na infecção por SARS-CoV-2 mediada por células imunes expressando o PSGL-1 e P-selectina.	44
Figura 05. Esquema de coleta das amostras.	54
Figura 06. Separação do plasma.....	55
Figura 07. Lise dos eritrócitos e separação dos leucócitos totais.....	56
Figura 08. Extração do RNA dos leucócitos totais.....	57
Figura 09. Corrida de eletroforese com controle negativo da corrida e amostras.....	58
Figura 10. Fluxo de diluição do banco master e solução de uso dos primers.	59
Figura 11. Curva de eficiência obtida para o gene referência HPRT-1 e genes alvos ITGA4, SELPLG, ARG1, NOS2.	61
Figura 12. Regressão linear das três diluições analisadas no experimento de padronização. .	62
Figura 13. Fluxo do experimento de RT-qPCR.	63
Figura 14. Curva de amplificação para o gene alvo ARG1 e gene referência HPRT-1.....	63
Figura 15. Curva de dissociação, em duplicata para gene alvo SELPLG e gene referência HPRT-1 (A). Curva de dissociação, em duplicata para gene alvo AGR1 e gene referência HPRT-1(B).	64
Figura 16. Análise de curva ROC para os parâmetros hematológicos RNL, RPL dos grupos com desfecho grave comparado ao grupo com desfecho leve.....	72
Figura 17. Comparação da expressão reativados para os genes (A) SELPLG (B) ARG1 em pacientes com desfechos leve e grave em relação ao gene referência HPRT-1. A linha tracejada representa a expressão do gene referência HPRT-1.	73
Figura 18. Comparação da expressão relativa dos genes (A) NOS2 e (B) ITGA4 em pacientes com desfechos leve e grave em relação ao gene referência HPRT-1. A linha tracejada representa a expressão do gene referência HPRT-1.....	74
Figura 19. Correlação de Spearman entre os genes ARG1 e SELPLG no mesmo paciente com	

desfecho leve do COVID-19.	75
Figura 20. Correlação de Spearman entre os genes ARG1 e SELPLG no mesmo paciente com desfecho grave do COVID-19.	75
Figura 21. Análise de curva ROC para os genes SELPLG e ARG1 entre os grupos investigados.	76
Figura 22. Níveis plasmáticos das proteínas (A) sPSGL-1 (B) sP-selectina nos grupos estudos. Teste U de Mann-Whitney.	77
Figura 23. Análise de curva ROC para as proteínas sPSGL-1 e sP-selectina nos grupos investigados.	78
Figura 24. Correlação de Spearman entre a proteína sPSGL-1 e sP-selectina em pacientes com COVID-19 leve.	79
Figura 25. Correlação de Spearman entre a proteína sPSGL-1 e sP-selectina em pacientes com COVID-19 leve.	80

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO	18
2	CAPÍTULO 2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	Agente patogênico	22
2.2.1	Transmissão do SARS-CoV-2.....	22
2.3	Espectro de gravidade da infecção por SARS-CoV-2	23
2.3.1	Manifestações clínicas das infecções pelo SARS-CoV-2	24
2.3.2	Fatores de riscos	25
2.4	Imunopatologia e tempestade de citocinas na COVID-19.....	26
2.5	Biomarcadores do COVID-19	28
2.5.1	Biomarcadores hematológicos no COVID-19.....	28
2.5.2	Biomarcadores de desregulação imunológica, Razão Neutrófilos-linfócitos (RNL) e Razão Plaquetas-linfócitos (RPL).....	30
2.5.3	Biomarcadores da tomboinflamação	31
2.6	Disfunção endotelial no COVID-19	31
2.6.1	Biomarcadores da disfunção endotelial no COVID-19.....	32
2.6.2	O possível papel da proteína Arginase -1 e gene <i>ARG1</i> na fisiopatologia do COVID-19	34
2.6.3	Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS/NOS2) na fisiopatologia do COVID-19	37
2.6.4	Subunidade Alfa 4 do Receptor VLA-4 (<i>ITGA-4</i>)	40
2.6.5	Ligante de glicoproteína P-selectina 1 (PSGL-1) e P-selectina	41
2.6.6	Características do Ligante de glicoproteína P-selectina 1 (PSGL-1) solúvel.....	45
3	CAPÍTULO 3 - JUSTIFICATIVA.....	47
3.1	Hipótese	49
3.2	Objetivo geral	50
3.2.1	Objetivos Específicos	50
4	CAPÍTULO 4 - MATERIAL E MÉTODO	51

4.1	Critérios Éticos	51
4.1.1	Local do estudo e pacientes.....	51
4.1.2	Cálculo amostral.....	51
4.1.3	Desenho do Estudo.....	52
4.1.4	Critérios de Inclusão e Exclusão	52
4.2	Diagnóstico da COVID-19	53
4.3	Coleta do material biológico.....	53
4.3.2	Hemograma	54
4.3.3	Separação do plasma	54
4.3.4	Lise dos eritrócitos e separação dos leucócitos totais	55
4.4	Extração do RNA com o reagente TRIzol ®.....	56
4.4.1	Quantificação do RNA por espectrometria	57
4.4.2	Eletroforese do RNA isolado.....	57
4.5	Preparo da biblioteca de cDNA	58
4.5.1	Desenho de primers para o Real-Time qPCR.....	58
4.7	Análise da expressão gênica por Real-Time qPCR.....	62
4.7.1	Análise da temperatura de Melting (TM).....	63
4.8	Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay (ELISA)	64
4.8.1	Padronização e diluição das amostras de plasma	64
4.8.2	Princípio do ensaio de ELISA.....	64
4.8.3	Ensaio de ELISA.....	65
4.9	Cálculo para a determinação do RNL e RPL.....	65
4.10	Tabulação dos dados e análise estatística.....	65
5	CAPÍTULO 5 - RESULTADOS	67
5.1	Análise de prevalência das características clínicas da população estudada.....	67
5.2	Comparação dos parâmetros hematológicos na população estudada	68

5.2.1	Razão dos neutrófilos-linfócitos (RNL) e razão plaquetas-linfócitos (RPL) nos grupos investigados	70
5.2.2	A RNL e RPL apresentaram potencial valor prognóstico no COVID-19.....	71
7.2	Análise da expressão relativa por RT-qPCR	72
5.3	Correlação entre o Cq dos genes <i>ARG1</i> e <i>SELPLG</i> entre os grupos com desfecho leve e grave do COVID-19.....	74
5.4	Os genes <i>SELPLG</i> e <i>ARG1</i> são potenciais biomarcadores com valor prognóstico na COVID-19 grave	76
5.5	Níveis plasmáticos das proteínas P-selectina e PSGL-1 estão alterados em pacientes com desfecho grave do COVID-19	77
5.5.1	As proteínas sP-selectina e sPSGL-1 são potenciais biomarcadores da gravidade no COVID-19	78
5.6	Correlação entre sPSGL-1 e sP-selectina por paciente	79
5.7	Razão sPSGL-1-sP-selectina	80
5.8	Análise Multivariada.....	81
5.9	Ensaio de expressão genica e dados sociodemográficos	81
6	CAPÍTULO 6 - DISCUSSÃO	83
7	CAPÍTULO 7 - CONCLUSÃO	92
6	CAPÍTULO 8 – ARTIGO	93
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
	APÊNDICE.....	110
	Apêndice 1. Ficha Clínica utilizada no estudo.....	111
	ANEXOS	113

1 CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO

O coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda (SARS-CoV-2) é o vírus responsável pela doença COVID-19, surgindo em novembro de 2019 na província de Wuhan – China (KUMAR *et al.*, 2021). Os últimos dados publicados em de 10 março de 2023 pelo *Dashboard - Johns Hopkins University* apontaram que já são mais de 676.609.955 milhões de pessoas acometidas pelo SARS-CoV-2 com 6.881.955 óbitos no mundo. Segundo a Secretária de Saúde do Estado da Bahia (SESAB) - (2023), no Brasil já são mais de 37.145.514 milhões de casos confirmados com cerca de 699.634 mortos, a Bahia acumulou 1.794.715 casos de infecção confirmada pelo SARS-CoV-2 com mais 31.481 óbitos. A doença COVID-19 é caracterizada por uma gama de manifestações clínicas heterogêneas e multifatoriais, cursando com sintomas leves a sintomas graves, acometendo em torno de 20% da população infectada de forma agressiva, resultando em morbidade e mortalidade (ABOU-ISMAIL *et al.*, 2020; LOO *et al.*, 2021; SHANG *et al.*, 2021).

Alguns fatores como idade e comorbidades: diabetes mellitus, hipertensão, doenças pulmonares e cardiovasculares e homens, vem sendo associados a gravidade do COVID-19 (KNOLL *et al.*, 2020; AKBARIQOMI *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020). Embora, desde o início da pandemia, a comunidade científica buscou entender os mecanismos da COVID-19, os biomarcadores da gravidade ainda não são bem definidos. Diversos estudos clínicos foram desenvolvidos por muitos pesquisadores, na tentativa de traçar um perfil, estratificando os pacientes com base no espectro de gravidade do COVID-19, mediante a identificação de biomarcadores alterados em pacientes que desenvolveram a forma grave da COVID-19 (PONTI *et al.*, 2020).

O que ficou claro até o presente momento, é que a COVID-19 grave é uma doença multissistêmica que afeta vários órgãos e envolve diversos sistemas do corpo humano (MCNARRY *et al.*, 2022). Neste sentido, vários biomarcadores têm sido investigados, incluindo: biomarcadores da tempestade de citocinas, hematológicos, desregulação imunológica, tromboinflamação, hipercoagulabilidade, assim como de lesão endotelial, pois estes eventos hiperinflamatórios são eventos pontuais e marcantes na COVID-19 grave (PONTI *et al.*, 2020).

Assim, a tempestade de citocinas e resposta imunológica exacerbada do hospedeiro vem sendo apontadas como principais gatilhos na fisiopatologia da gravidade, resultando em complicações vasculares graves associadas à disfunção endotelial e hiperinflamação sistêmica,

microangiopatia trombótica evoluindo com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (HOTTZ *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2021; FLAUMENHAFT *et al.*, 2022; TARASEV *et al.*, 2022; DE MORAIS BATISTA *et al.*, 2022). A ativação endotelial e a disfunção vascular sistêmica foram associadas a resultados graves e fatais, pois diversos estudos em espécimes pulmonares humanos revelaram comprometimento microvascular e macrovascular, lesão endotelial grave, infiltrados de linfócitos, macrófagos, principalmente de neutrófilos com presença de trombos de plaquetas-fibrina em alvéolos dos pacientes mortos (AID *et al.*, 2020; CARSANA *et al.*, 2020).

Biomarcadores de lesão endotelial e de resposta imune desregulada vêm sendo investigados em diversos estudos clínicos. Estudos recentes correlacionam alguns genes responsáveis por codificarem moléculas provenientes do estresse metabólico em leucócitos totais como resposta ao SARS-CoV-2, dentre esses genes destaca-se o ARG1, responsável por codificar a arginase-1 (DEAN *et al.*, 2021). O efluxo de células imunológicas favorece o aumento de células imunes jovens com fenótipos desregulados e alta produção de moléculas nocivas para os tecidos, como a arginase-1 (AGRATI *et al.*, 2020; REIZINE *et al.*, 2021; FALCK-JONES *et al.*, 2021). A arginase-1 é uma das cinco enzimas que participam do ciclo da ureia, sua função é eliminar a amônia através da conversão da L-arginina em L-ornitina e ureia (CALDWELL *et al.*, 2018). A expressão aumentada da arginase-1 foi identificada em pacientes com COVID-19 grave (BOST *et al.*, 2021). Em pacientes com COVID-19 grave a arginase-1 estava associado a depleção de L-arginina resultou em disfunção de células T, produção prejudicada de óxido nítrico e aumento da disfunção de células endoteliais (DEAN *et al.*, 2021). A expressão do gene *ARG1* estava significativamente aumentada em pacientes com COVID-19 grave, em comparação com indivíduos saudáveis (DERAKHSHANI *et al.*, 2021).

Outra enzima envolvida com as atividades da arginase-1 é a óxido nítrico sintase induzível 2 (NOS2/iNOS), sendo produzida em células imunes mieloides e linfoides através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (BUZZO *et al.*, 2017; DUARTE *et al.*, 2022). A iNOS tem a função de viabilizar a produção do óxido nítrico (ON) sendo uma molécula vasodilatadora, importante para o mecanismo microbicida, produzido pelo sistema imunológico inato (MAHNKE *et al.*, 2014). Todavia, a expressão de ON prejudicada pela ausência da NOS2 foi associada a maior suscetibilidade e acometimento por doenças infecciosas (GELZO *et al.*, 2022). A concentração sérica da enzima iNOS estava diminuída em pacientes com desfecho grave da COVID-19 (GELZO *et al.*, 2022). Possivelmente, a iNOS/NOS2 pode ser um biomarcador útil da gravidade no COVID-19

(DUARTE *et al.*, 2022; GELZO *et al.*, 2022).

Uma variedade de infecções virais pode induzir alterações em diversas moléculas, como a integrina VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ - CD49d/ITGA-4), codificada pelo gene *ITGA4*, está envolvida em uma variedade de processos patológicos, entre eles: reparo de feridas, inflamação, tráfego de leucócitos e metástase tumoral (SARTORI *et al.*, 2021). A $\alpha 4\beta 1$ é expressa por monócitos e linfócitos, natural killer (NK), eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, sendo um marcador de inflamação pulmonar em ratos (KOURO *et al.*, 2014; HADDAD *et al.*, 2021). Em doenças com resposta infecciosa intensas como a doença COVID-19 poderá fomentar a expressão do gene *ITGA4* ou elevar a concentração da integrina $\alpha 4\beta 1$ (SARTORI *et al.*, 2021). Embora, até o momento não foi demonstrado se existe uma correlação com o aumento na expressão do gene *ITGA-4*, assim como da proteína VLA-4/ $\alpha 4\beta 1$ com a gravidade da COVID-19.

Um biomarcador de lesão endotelial importante é a P-selectina solúvel (sP-selectina/CD62), sendo uma proteína de superfície, responsável por mediar a interação entre plaquetas ou células endoteliais ativadas (em estado não quiescente) com os leucócitos totais (KAUR *et al.*, 2017). Além da forma membranar, a P-selectina solúvel também possui um papel importante em patologias inflamatórias vasculares e trombose (KAUR *et al.*, 2017). Em doenças hiperinflamatórias virais, ocorre lesão e disfunção do endotélio, levando a uma expressão aumentada da P-selectina (LIBBY & LÜSCHER, 2020, JACKSON *et al.*, 2019). As células endoteliais ativadas por mediadores inflamatórios, tais como: trombina, cisteinil leucotrienos, oxidantes e histamina e citocinas como fator de necrose tumoral (TNF) são responsáveis por ativarem os corpos de Weibel-Palade (WPB). Os WPB produzem a P-selectina expressando na superfície do endotélio, viabilizando adesão entre plaquetas e leucócitos pela via do ligante de glicoproteína P-selectina-1 (PSGL-1 / (CD162) (JACKSON *et al.*, 2019; IVANOV *et al.*, 2019).

O PSGL-1 é expresso como um homodímero em células linfóides e mielóides, incluindo plaquetas (TINOCO *et al.*, 2017, JIN *et al.*, 2020). A proteína PSGL-1 é codificada pelo gene *SELPLG*, desempenhando um papel importante na adesão e rolamento das células imunes (BELMONTE *et al.*, 2021). Sua principal função é estabelecer a ligação entre P-, E- e L-selectina (TINOCO *et al.*, 2017, JIN *et al.*, 2020, BELMONTE *et al.*, 2021). O complexo P-selectina-PSGL-1 favorece a interação entre as células endoteliais e leucócitos induzido os monócitos a produzirem fator tecidual (FT) (IVANOV *et al.*, 2019). Por outro lado, estudos anteriores demonstraram que uma forma solúvel de PSGL-1 (sPSGL-1) foi identificada, além de PSGL-1 ligada à membrana de leucócitos (SAKO *et al.*, 1993). A molécula de PSGL-1 solúvel

(sPSGL-1) atua como um antagonista, competindo para se ligar a P-selectina membranar ou solúvel (STRAUSS *et al.*, 1999; AJDUKOVIC *et al.*, 2015). Até o momento, foi demonstrado que a P-selectina solúvel estava aumentada, assim como foi demonstrado um aumento na expressão do gene *SELPLG* em pacientes com COVID-19 grave (GARCIA *et al.*, 2022; KARSLI *et al.*, 2021; YATIM *et al.*, 2021). Embora, ainda não esteja claro o papel do complexo P-selectina-PSGL-1 na gravidade da COVID-19 (YATIM *et al.*, 2021).

Diante da necessidade de estratificar e caracterizar pacientes com COVID-19, o objetivo deste estudo foi analisar a expressão de *ARG1*, *SELPLG*, *ITGA4* e *NOS2* em leucócitos totais, e determinar os níveis plasmáticos de P-selectina e proteínas PSGL-1, verificando a associação desses marcadores com a gravidade da COVID 19.

2 CAPÍTULO 2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agente patogênico

A doença COVID-19 foi um grave problema de saúde pública, afetando principalmente a saúde da humana e a economia (SHANG *et al.*, 2021). A COVID-19 tem como agente patogênico o SARS-CoV-2. Os coronavírus (CoVs) são membros da subfamília *Orthocoronavirinae* família *Coronaviridae*, ordem *Nidovirales*. A subfamília *Orthocoronavirinae* é composta de quatro gêneros - *Alphacoronavirus* (α -CoV), *Betacoronavirus* (β -CoV), *Gammacoronavirus* (γ -CoV) e *Deltacoronavirus* (δ -CoV) (YAO *et al.*, 2020). O SARS-CoV-2 possui um RNA de fita simples e senso positivo [ssRNA (+)], sendo um vírus envelopado (SALVI *et al.*, 2021).

Os virions coronavírus possuem quatro proteínas-chave responsáveis pela sua replicação e sobrevivência: proteína do nucleocapsídeo (N), proteína da membrana (M), proteína do envelope (E) e glicoproteína spike (S), sendo proteínas estruturais. O SARS-CoV-2, entra na célula hospedeira pela clivagem da enzima conversora da angiotensina II (ACE2) que expõe o sítio de ligação com auxílio da protease transmembrana, serina 2 (TMPRSS2) da célula hospedeira (JACKSON *et al.*, 2022). A literatura aponta que o receptor ACE2 atua como receptor para a proteína estrutural S do SARS-CoV-2, que facilita a entrada do vírus na célula hospedeira (HOFFMANN *et al.*, 2020). A entrada do SARS-CoV-2 ocorre por meio da ativação da glicoproteína S e clivagem do segmento C-terminal da ACE2 por proteases, a exemplo, TMPRSS2 e FURIN presentes no tecido pulmonar (PINTO *et al.*, 2020).

2.2.1 Transmissão do SARS-CoV-2

Segundo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos da América (EUA), o SARS-CoV-2 é disseminado de forma fácil e eficiente, o principal modo pelo qual pessoas saudáveis se infectam com o vírus SARS-CoV-2 é pela exposição a material biológico de pessoas contaminadas, tais como os fluidos respiratórios que transportam os vírus viáveis (CDC, 2020; MUKHRA; KRISHAN; KANCHAN, 2020; ARAV; KLAUSNER; FATTAL, 2021; RATHNASINGHE *et al.*, 2022). Dito isso, a exposição ocorre de três maneiras principais: inalação via nasal de gotículas respiratórias muito finas e partículas de aerossol; a deposição de gotículas e partículas respiratórias em membranas mucosas expostas na boca, nariz ou olhos por respingos e sprays diretos e, por fim a transmissão também ocorre

pelo contato com as mãos contaminadas que toca as membranas mucosas depositando os fluidos respiratórios contendo vírus ou de forma indireta, tocando superfícies com vírus (CDC, 2020). A literatura evidencia que a tosse é capaz de produzir aproximadamente 3.000 gotículas de fluído, enquanto o espirro libera cerca de 40.000 gotículas de fluidos (DOLIN *et al.*, 2005; DHAND & LI, 2020). Em um estudo conduzido por Santarpia *et al.* (2020), foram coletadas amostras do ar e superfície de quartos ocupados por pacientes acometidos pela COVID-19, os resultados revelaram que havia RNA viral no ar dentro e fora dos quartos e nas grades de ventilação (SANTARPIA *et al.*, 2020). Pesquisa recente destaca que a probabilidade de infecção diminuiu com a distância da pessoa infectada das pessoas saudáveis (BALE *et al.*, 2022).

2.3 Espectro de gravidade da infecção por SARS-CoV-2

Segundo o National Institutes of Health (NIH) (2020), pacientes com infecção por SARS-CoV-2 podem apresentar um espectro grande de manifestações clínicas, desde ausência de sintomas até doença crítica. Geralmente, os pacientes adultos com infecção por SARS-CoV-2 são distribuídos em cinco categorias de sintomas: assintomáticos, leves, moderados, graves e críticos. Contudo, os critérios de inclusão podem variar de acordo com as diretrizes clínicas e os ensaios clínicos, podendo ser modificados ao longo do tempo, os critérios levados em consideração, globalmente estão descritos a seguir (Tabela 01).

Há indícios que maioria das pessoas com COVID-19 apresenta doença paucissintomática e não grave (KIM *et al.*, 2021). Todavia, cerca de 20% dos pacientes desenvolvem COVID-19 grave com necessidade de hospitalização, e cerca de 5% que são internados na unidade de terapia intensiva evoluem para a forma crítica (CAUSSY *et al.*, 2020).

Tabela 01. Espectro da gravidade e sintomas manifestados em pacientes com COVID-19.

		SINTOMAS	
80%	Doença Assintomática	Pacientes com teste positivo para SARS-CoV-2, mas que não apresentam sintomas.	
	Doença Leve	Pacientes que apresentam vários sinais e sintomas de COVID-19 (febre, tosse, dor de garganta, mal-estar, dor de cabeça, dor muscular, náusea, vômito, diarreia, perda de paladar e olfato), sem necessidade de hospitalização.	
	Doença Moderada	Pacientes que apresentam evidência de doença respiratória inferior em avaliação médica ou imagem com saturação de oxigênio (SpO ₂) ≥94%. Demanda cuidados ambulatoriais.	
15%	Doença Grave	Paciente com SpO ₂ < 94%, uma relação entre pressão parcial arterial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio (PaO ₂ /FiO ₂) <300 mm Hg, frequência respiratória >30 respirações/ min, ou infiltrados pulmonares >50%. Requer hospitalização.	
5%	Doença Crítica	Pacientes com insuficiência respiratória, choque séptico e/ou disfunção de múltiplos órgãos. Requer hospitalização.	

Fonte. Tabela baseada no National Institutes of Health, (2020).

2.3.1 Manifestações clínicas das infecções pelo SARS-CoV-2

Os sintomas clínicos promovidos pela infecção do SARS-CoV-2 são análogos aos de uma gripe comum, tais como: a febre, tosse, dor de cabeça, mialgia generalizada, mal-estar, sonolência, diarreia, confusão, dispneia, pneumonia e calafrios (MUKHRA; KRISHAN; KANCHAN, 2020).

Em um estudo de revisão sistemática, 152 pesquisas clínicas com 41.409 pacientes diagnosticados por COVID-19, evidenciaram que os sintomas mais prevalentes foram: febre (58,66%), tosse (54,52%), dispneia (30,82%), mal-estar (29,75%), fadiga (28,16%) e escarro/secreção (25,33%), sintomas neurológicos (20,82%), manifestações dermatológicas (20,45%), anorexia (20,26%), mialgia (16,9%), espirros (14,71%), dor de garganta (14,41%), rinite (14,29%), arrepios (13,49%), cefaleia (12,17%), dor torácica (11,49%) e diarreia (9,59%) (DA ROSA MESQUITA, *et al.*, 2021).

Além do mais, um estudo incluindo 184 pacientes admitidos em UTI com pneumonia comprovada por COVID-19, evidenciou que cerca de 31% destes pacientes apresentaram complicações trombóticas (KLOK *et al.*, 2020). Além do prolongamento do tempo em UTI,

outros fatores de riscos foram sugeridos e associados a tromboembolismo venoso, os resultados sugeriram uma contagem mais alta de glóbulos brancos, maior proporção de neutrófilos em relação aos linfócitos e um nível elevado de D-dímero (MIDDELDORP *et al.*, 2020).

2.3.2 Fatores de riscos

A COVID-19 é uma doença que pode evoluir para o desfecho grave, alguns fatores de riscos são associados a desfechos desfavoráveis para os pacientes - tanto a idade quanto as comorbidades crônicas veem sendo relatadas em estudos clínicos como fatores para desfecho de gravidade e mortalidade (ZHOU *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2021). Evidências científicas demonstraram que pacientes com hipertensão, diabetes, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença renal crônica e doenças cardiovasculares possuíam maiores chances de evoluírem para o desfecho grave da COVID-19 (MOLANI *et al.*, 2022).

Outra comorbidade associada a gravidade da COVID-19 é a obesidade, esta condição pode potencializar condições secundárias como hipoxemia e pneumonia que são preditores da mortalidade (RATHNASINGHE *et al.*, 2022). Um estudo observacional prospectivo utilizou o banco de dados *International Severe Acute Respiratory and Emerging Infections Consortium* (ISARIC), incluindo registros clínicos a partir de janeiro de 2020 a maio de 2021, referente a 442.643 pacientes com infecções por SARS-CoV-2 confirmadas em laboratório em 61 países. Os pacientes foram caracterizados de acordo com o sexo, sendo (55%) homens e mulheres (45%), com idade média de 77 anos. As comorbidades mais prevalentes na admissão foram doença renal crônica (19%), asmáticos (13%) e diabetes mellitus (13%) (WRIGHT *et al.*, 2021).

Um estudo brasileiro de análise de casos confirmados por COVID-19 foi realizado, através de coleta de dados em sites oficiais de cada Secretaria Estadual de Saúde. Este estudo envolveu pacientes acometidos pelo SARS-CoV-2 desde o início da pandemia, cerca de 276.703 pacientes foram incluídos neste estudo. Um total de 11.278 (4,8%) pacientes foram internados em UTI e 17.752 (6,4%) pacientes evoluíram para o óbito (PACHIEGA *et al.*, 2020). Na maioria dos estados brasileiros (58,6%) dos pacientes eram do sexo masculino, e pacientes com idade superior a 60 anos (71,4%) foram acometidos por COVID-19 grave tiveram o desfecho de óbito, respectivamente. As comorbidades foram avaliadas em 15 estados brasileiros para pacientes em óbito, as mais prevalentes foram: doenças cardíacas crônicas (35%), diabetes (28,7%), doenças pulmonares crônicas (8,2%), doenças renais (5,9%), acidente vascular

cerebral (5,3%), hipertensão (5,1%), obesidade (4,4%) e doenças imunossupressoras (3,8%) (PACHIEGA *et al.*, 2020).

Ressaltamos que as comorbidades descritas anteriormente, segundo o CDC (2022), estão associadas a COVID-19 grave em adultos, independentemente da idade. Além disso, pessoas negras também correm maiores riscos de desfecho grave e morte, devido as desigualdades sociais (CDC, 2022).

2.4 Imunopatologia e tempestade de citocinas na COVID-19

A tempestade de citocinas é caracterizada por níveis elevados de citocinas teciduais e circulantes promovendo hiperativação de células imunes, podendo ser deflagrada por patógenos, cânceres e doenças autoimunes (FAJGENBAUM & JUNE, 2020). A patologia ocasionada pela infecção do SARS-CoV-2 é atribuída a uma interação complexa entre o vírus e a capacidade de resposta imunológica do hospedeiro. Esta interação promovendo a ativação de inúmeras vias pró-inflamatórias desencadeando a tempestade de citocinas, bem como hiperinflamação, culminando em dano tecidual, síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e falência de multiorgânica (MEHTA & FAJGENBAUM, 2021; TAN, KOMARASAMY, BALASUBRAMANIAM, 2021).

A resposta inflamatória exacerbada apresentada na infecção por SARS-CoV-2 é sugerida por ZHOU *et al.* (2020), com uma associação a um influxo maciço de células imunes inatas (neutrófilos e monócitos), que podem promover o agravamento da lesão pulmonar contribuindo para a SDRA. Um estudo conduzido por Aid *et al.* (2020), investigou o tecido pulmonar, através de necrópsia em espécimes de pacientes acometidos por COVID-19 grave *post-mortem*. Além disso, comparou os cortes pulmonares humanos como cortes histológicos de pulmões provenientes de macacos rhesus infectados com SARS-CoV-2. A imunohistoquímica revelou lesões microvasculares e macrovasculares, lesão endotelial grave e infiltrados linfocitários nos alvéolos humanos. Semelhantemente, nos macacos rhesus foram observados endotélio hiperplásico, proliferação intimal com aderência de macrófagos e linfócitos TCD8+ ancorados ao endotélio e espaço perivascular (AID *et al.*, 2020).

Outros resultados foram observados em uma coorte com 67 pacientes que sucumbiram a infecção por COVID-19 grave. Neste estudo foram realizadas autopsias de espécimes pulmonares humanos *post-mortem*. Os resultados evidenciaram marcadores inflamatórios elevados, tais como: ferritina, proteína C reativa, procalcitonina, bem como alterações nos

níveis de leucócitos totais com destaques para a neutrofilia. Além disso, valores elevados de citocinas, tais como: IL-6, IL-8 e TNF α foram observados em pacientes com COVID-19 grave. Ainda, foi evidenciado embolias pulmonares em quatro casos, bem como microtrombos no cérebro (BRYCE *et al.* 2020).

Sabe-se que as células imunes inatas são a primeira linha de defesa primária, diante de um dano inflamatório, independente do patógeno que acomete o hospedeiro. Um estudo aponta que citocinas (IL-6, IL-8, G-CSF, GRO α , MCP-3, IL-1 α , MCP-1 e TNF- α) foram produzidas de forma exacerbada em paciente com COVID-19 grave. Ademais, essas citocinas são produzidas por células imunes inatas especializadas e não especializadas, tais como: neutrófilos, monócitos, células dendríticas e fibrócitos (PETREY *et al.*, 2021).

Além disso, outra citocina muito importante na resposta antiviral é o interferon gama (INF- γ), entretanto, evidências apontam que quando produzida de forma exacerbada pode promover hiperinflamação (ANDREAKOS, 2022). A COVID-19, possui sua fisiopatologia relacionada com a hiperinflamação, eventos de coagulopatias e imunotrombose. A gravidade é atribuída à exacerbção da resposta imune do hospedeiro, com um aumento de células da imunidade inata, e dos mediadores inflamatórios em resposta a infecção viral e à coagulopatia (BOAVENTURA *et al.*, 2021).

A coagulopatia/coagulação pode se apresentar como um processo dinâmico, sendo deflagrado pela ativação proteolítica regulada por fatores de coagulação em vasos lesionados. Neste sentido, os fatores de coagulação, com exceção do fator VIII (FVIII), são sintetizados por células endoteliais sinusoidais hepáticas e pelo tecido linfático (WINTER *et al.*, 2020). Um estudo realizado por Komi *et al.* (2021), reuniu três grupos de pacientes (35 pacientes críticos, 35 pacientes graves e 35 controles saudáveis) para investigar os eventos de coagulopatia que, possivelmente estariam presentes na patogênese da COVID-19 grave. Este estudo investigou as seguintes moléculas: Testes de coagulação incluindo tempo de protrombina (PT), tempo de tromboplastina parcial (PTT), fibrinogênio (FIB), anticoagulante lúpico (LAC), proteínas C e S, antitrombina III (ATIII), D-dímero e produtos de degradação da fibrina (FDPs) no plasma dos pacientes. Os resultados evidenciaram que o D-dímero, FIB, PT, PTT, LAC, proteína S, FDP e proteína C mostraram significância no prognóstico dos pacientes com COVID-19 grave.

Corroborando com estes achados, um estudo conduzido por Cacciola *et al.* (2020), investigou a inflamação, marcadores endoteliais e hemostáticos, incluindo IL-6 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-a), fator tecidual (TF), fator von Willebrand (vWF) e inibidor da via

do fator tecidual (TFPI) em 100 pacientes diagnosticados com COVID-19 grave e 60 pacientes com COVID-19 leve e assintomáticos. Os resultados mostraram um aumento nos seguintes marcadores: IL-6 e TNF- α , TF, vWF e TFPI em pacientes graves em comparação com pacientes leves e assintomáticos. Os pesquisadores sugeriram que na COVID-19 grave ocorre uma inflamação profunda e esta pode estar associada à endoteliopatia grave, bem como alterações nas atividades hemostáticas (CACCIOLA *et al.*, 2020).

2.5 Biomarcadores do COVID-19

Desde o início da pandemia, a comunidade científica busca entender os mecanismos do COVID-19. Estudos clínicos transversais foram desenvolvidos em diversos países a fim de traçar um perfil estratificando os pacientes com base no espectro de gravidade da doença a partir de biomarcadores alterados em pacientes com COVID-19 grave, quando comparado a COVID-19 leve e assintomático (PONTI *et al.*, 2020).

Neste sentido, a urgente necessidade de identificar biomarcadores laboratoriais e preditores clínicos que sejam capazes de prever a progressão para formas graves e fatais do COVID-19 movimentou inúmeras pesquisas clínicas (HENRY *et al.*, 2020). Então, a partir de estudos clínicos preliminares, diversos biomarcadores foram classificados como preditores da gravidade no COVID-19: biomarcadores hematológicos, imunológicos, tromboinflamação e de lesão endotelial. A identificação dos biomarcadores eficazes, seriam úteis e determinantes para triagem, manejo clínico e prevenção de complicações graves, com terapias personalizadas, mitigando a mortalidade no COVID-19 (PONTI *et al.*, 2020).

2.5.1 Biomarcadores hematológicos no COVID-19

O processo inflamatório desempenha um papel central contribuindo para o agravamento do COVID-19. O quadro inflamatório grave em resposta a infecção do SARS-Cov-2, leva ao desequilíbrio das respostas imunológicas, cursando com a função imune adaptativa enfraquecida (SIMADIBRATA *et al.*, 2021). Identificar de forma precoce fatores de riscos que favoreçam a gravidade clínica em pacientes com COVID-19 é urgentemente necessário, a fim de viabilizar cuidados adequados ou permitir acesso a tratamentos intensivos, mitigando a mortalidade no COVID-19 grave (ZHANG *et al.*, 2020).

Neste sentido, o comportamento das células sanguíneas desde o início da pandemia vem intrigando pesquisadores. Comumente, é esperado que em infecções virais os parâmetros

hematológicos apresentem uma linfocitose, respondendo a grande demanda do sistema imunológico em produzir células adaptativas. Contudo, apesar do COVID-19 ser uma doença, cujo o patógeno é um vírus, diversos estudos apresentam um quadro de leucocitose com neutrofilia, contrariando as expectativas (JAVADI *et al.*, 2022; SAURABH *et al.*, 2022).

A disfunção leucocitária é crucial para o desfecho de doenças infecciosas. A neutrofilia e a tempestade de citocinas são presentes na COVID-19 grave, este quadro de desequilíbrio leucocitário prejudica as respostas imunes das células T, estando correlacionado com a gravidade da doença (BOST *et al.*, 2021). Um estudo de coorte investigou 201 pacientes com pneumonia por COVID-19, dentre os principais fatores de riscos, a neutrofilia foi associada a SDRA e morte (WU *et al.*, 2020).

Até o momento, os biomarcadores hematológicos mais utilizados para estratificar os pacientes em estágios do COVID-19, são: contagem de leucócitos, contagem de linfócitos, contagem de neutrófilos, razão neutrófilos-linfócitos (RNL), razão plaquetas-linfócitos (RPL), contagem de plaquetas, contagem de eosinófilos e contagem de monócitos (PONTI *et al.*, 2020; HENRY *et al.*, 2020; QU *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2020; MA *et al.*, 2022).

Em um estudo conduzido por Qin *et al.* (2020), foram analisados biomarcadores correlacionados com a desregulação da resposta imune em uma coorte de 452 pacientes diagnosticados com COVID-19. Os resultados demonstraram que pacientes graves exibiram linfopenia, leucocitose, razão neutrófilos-linfócitos (RNL) elevada, assim como porcentagens mais baixas de monócitos, eosinófilos e basófilos, quando comparados a pacientes com sintomas leves do COVID-19 (QIN *et al.*, 2020).

Um estudo de coorte demonstrou que os achados hematológicos apresentaram maior contagem de neutrófilos com leucocitose na coorte investigada, posteriormente estes mesmos pacientes foram a óbito, devido a infecção ocasionada pelo SARS-CoV-2. Por outro lado, os pacientes desta mesma coorte apresentaram uma contagem de linfócitos menor, plaquetas e hemoglobina mais baixa em comparação a coorte de sobreviventes acometidos pelo COVID-19 (BAIRWA *et al.*, 2021).

Além do mais, estudos clínicos demonstraram que os subconjuntos de células T e B apresentaram alterações nos pacientes com COVID-19 grave. Entre as alterações encontradas em pacientes gravemente afetados por COVID-19, estavam a baixa contagem de células T, cursando com aumento nas células T auxiliares *naive*, assim como uma redução considerável das células T auxiliares de memória (COSSARIZZA *et al.*, 2020). Outro estudo demonstrou que a diminuição de subconjuntos específicos de linfócitos, tais como: linfócitos ($<500/\mu\text{L}$), células

T CD3+ (<200/ μ L), células T CD4+ (<100/ μ L), células T CD8+ (<100/ μ L) e células B (<50/ μ L), foram classificados e correlacionados com a morte intra-hospitalar e gravidade do COVID-19 (BO *et al.*, 2020).

2.5.2 Biomarcadores de desregulação imunológica, Razão Neutrófilos-linfócitos (RNL) e Razão Plaquetas-linfócitos (RPL)

A razão de neutrófilos-linfócitos é determinada a partir da contagem de neutrófilos dividido pela contagem de linfócitos, dosados no sangue periférico. Este parâmetro biológico simples reflete o equilíbrio entre dois aspectos do sistema imunológico: inflamação aguda e crônica (conforme indicado por contagem de neutrófilos) e imunidade adaptativa (contagem de linfócitos) (SONG *et al.*, 2022). A razão neutrófilos-linfócitos vem sendo utilizada pela praticidade e baixo custo, podendo ser utilizado como um biomarcador para a inflamação e previsão de resultados (LI *et al.*, 2022).

Notavelmente, os neutrófilos e linfócitos e suas altas proporções possuem papel de destaque na fisiopatologia do COVID-19 (REGOLO *et al.*, 2022). A razão de neutrófilos-linfócitos (RNL) foi útil para prever a mortalidade em outras doenças, tais como: sepse, acidente vascular cerebral e neoplasias (LI *et al.*, 2022). Dito isso, a literatura vem identificando alterações na razão neutrófilo-linfócito (NLR) sendo considerados como biomarcadores que predizem a gravidade no COVID-19 (JUNEJA *et al.*, 2022). Um estudo clínico transversal comparou a RNL em coorte de pacientes infectados com o vírus Influenza, vírus sincicial humano (RSV) e com SARS-CoV-2. Para pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, a NLR foi associada prognósticos desfavoráveis (PROZAN *et al.*, 2021).

Outro biomarcador muito importante e de baixo custo é a razão plaquetas-linfócitos (RPL). Um estudo clínico demonstrou que existe uma alta relação entre a proporção de plaquetas divididas por contagem de linfócitos em pacientes com COVID-19 grave (QU *et al.*, 2020). Recentemente, foi reafirmado em estudo clínico que a RPL é maior em pacientes com COVID-19 grave, quando comparado a pacientes não graves (CARRANZA LIRA & GARCIA ESPINOSA, 2022). A Razão neutrófilo-linfócito (NLR) e razão plaqueta-linfócito (PLR) foram classificados como preditores de gravidade do COVID-19 em pacientes chineses com idade menor que 40 anos (MA *et al.*, 2022).

2.5.3 Biomarcadores da tomboinflamação

A tomboinflamação desempenha um papel importante na fisiopatologia da COVID-19, com alteração de diversos biomarcadores envolvendo sistema imunológico e sistema de coagulação. Complicações como o tromboembolismo venoso é marcante e exacerbada em pacientes que evoluíram com quadro do COVID-19 grave, resultando em embolia pulmonar a complicação trombótica mais comum, culminando na síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (CUI *et al.*, 2020; KLOK *et al.*, 2020).

Neste contexto, um estudo de coorte prospectivo exibiu em seus resultados que o evento de embolia pulmonar foi a causa diretamente associada ao óbito de mais de 30% dos pacientes com COVID-19 grave, em autópsia *post-mortem* foi detectado trombose venosa (WICHMANN *et al.*, 2020). Outros estudos clínicos investigaram biomarcadores da tromboinflamação em pacientes com COVID-19. Eles observaram que, havia anormalidades nos eventos da coagulação, cursando com aumento dos níveis de produtos de degradação da fibrina, fator de von Willebrand, tempo de protrombina aumentada (TAP) e trombocitopenia, D-dímero no grupo de pacientes hospitalizados com gravidade do COVID-19 (ZHOU *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2020; LIPPI *et al.*, 2020; LIBBY *et al.*, 2020).

Além do mais, autópsias de espécimes pulmonares humanos mortos por complicações do COVID-19, demonstraram trombos de plaquetas-fibrina, revelando comprometimento microvascular. Conseqüentemente, o tecido pulmonar demonstrou características anormais com lesão endotelial aguda, aumento da permeabilidade capilares e microvasculatura distorcidas (ACKERMANN *et al.*, 2020; BRADLEY *et al.*, 2020). A alta incidência dos eventos de trombose e lesões vasculares reveladas pelas autópsias pulmonares traz novas especulações sobre ventilação-perfusão e oxigenação prejudicada dos tecidos afetados pelas complicações do COVID-19 grave (GATTINONI *et al.*, 2020). Os eventos de trombos microvasculares foram detectados nos principais órgãos humanos, incluído coração, rim e fígado de pacientes com COVID-19 grave e crítica, esses achados foram caracterizados como microangiopatia trombótica dos múltiplos órgãos (RAPKIEWICZ *et al.*, 2020).

2.6 Disfunção endotelial no COVID-19

O evento de disfunção endotelial, anteriormente foi associado a infecções ocasionadas pela família dos coronavírus como um evento fisiopatológico importante, a disfunção endotelial

pode ser causada pela infecção direta das células endoteliais (HAMMING *et al.*, 2004; BOAVENTURA *et al.*, 2021). O SARS-CoV-2 pode infectar células endoteliais vasculares, promovendo dano celular, disfunção, levando estas células a morte não programada, estas alterações no metabolismo das células endoteliais determina a perda ou diminuição da capacidade antitrombótica do endotélio fisiológico (WICHMANN *et al.*, 2020; TEUWEN *et al.*, 2020).

Achados clínicos de lesão endotelial foram descritos em diversos estudos recentes, incluindo: danos alveolares, edema na parede dos vasos, trombos hialinos, micro-hemorragia e microtrombose difusa na microvasculatura periférica, levando a insuficiência respiratória na COVID-19 (FOX *et al.*, 2020; WICHMANN *et al.*, 2020; TIAN *et al.*, 2020).

Outros estudos tentaram identificar biomarcadores e mecanismos que causam os eventos de trombose em pacientes com COVID-19, incluindo ativação plaquetária; ativação dos leucócitos, formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), ativação do sistema complemento, alteração no sistema de coagulação e disfunção das células endoteliais (WICHMANN *et al.*, 2020; PARANJPE *et al.*, 2020; BARNES *et al.*, 2020). Contudo, possivelmente a lesão das células endoteliais possa favorecer o mau funcionamento do sistema vascular, sendo a característica patológica central no COVID-19 grave (BARNES *et al.*, 2020; LEVI *et al.*, 2020; PRANDONI *et al.*, 2020; PAAR *et al.*, 2021).

Estudos clínicos recentes observaram em seus resultados que existia inflamação endotelial generalizada em diversos órgãos, incluindo pulmões, coração, fígado, rim, intestino e pele de pacientes que sucumbiram a infecção do SARS-CoV-2 (ACKERMANN *et al.*, 2020; VARGA *et al.*, 2020; FOX *et al.*, 2020; NEGRINI *et al.*, 2020; CARNEVALE *et al.*, 2021). Além disso, autópsias pulmonares humanas evidenciaram perda da integridade juncional das células endoteliais (ACKERMANN *et al.*, 2020). Neste sentido, estudos clínicos procuram biomarcadores que possam caracterizar disfunção endotelial e classificar o estado de gravidade em pacientes com COVID-19 (ESCHER *et al.*, 2020; CRIPPA *et al.*, 2020; FRASER *et al.*, 2021).

2.6.1 Biomarcadores da disfunção endotelial no COVID-19

Biomarcadores moleculares da disfunção endotelial, incluindo o fator de von Willebrand, aumento das células endoteliais (ECs) na circulação, aumento dos níveis das selectinas responsáveis pela adesão entre células endoteliais-plaquetas-leucócitos P-selectina,

E-selectina, molécula intercelular solúvel-1 e angiopoietina-2, são exacerbados em pacientes gravemente acometidos pelo COVID-19, quando comparados a pacientes com desfecho leve do COVID-19 (ESCHER *et al.*, 2020; GUERVILLY *et al.*, 2020; NERI *et al.*, 2020; SMADJA *et al.*, 2020; SPADARO *et al.*, 2021). A lesão endotelial é marcante no COVID-19, sendo provocada, tanto pela infecção direta das células endoteliais pelo SARS-CoV-2, quanto de forma indireta pelo aumento do estresse metabólico e hiperinflamação presente no COVID-19 (NICOSIA *et al.*, 2021).

Conforme dito anteriormente, a atividade das células endoteliais sofre alterações em infecções graves e críticas do COVID-19. Um estudo observou que a dilatação da artéria braquial estava reduzida em jovens infectados pelo SARS-CoV-2, a diminuição da capacidade elástica da artéria braquial neste grupo foi correlacionada maior rigidez, quando comparado aos controles saudáveis do estudo (RATCHFORD *et al.*, 2021). Esse resultado sugere possíveis alterações na produção de óxido nítrico (ON) em pacientes com COVID-19 grave (DOMINIC *et al.*, 2021). Recentemente, alterações no metabolismo da proteína eNOS/iNOS em leucócitos totais dos pacientes gravemente afetados pelo COVID-19 foram observados (GELZO *et al.*, 2022). Esses dados podem justificar em parte a perda da vasodilatação em pacientes com COVID-19.

Neste contexto, o endotélio possui uma camada chamada de glicocálice endotelial, o glicocálice desempenha a função sensorial, sendo capaz de detectar estímulos biomecânicos. Esse mecanismo possibilita alterações moleculares, favorecendo à ativação de eNOS, consequentemente produzindo ON molecular, levando a vasodilatação do endotelial, combatendo infecções (ZHANG *et al.*, 2019). Estudos clínicos observaram a degradação do glicocálice em pacientes gravemente enfermos pelo COVID-19 (FRASER *et al.*, 2020; DU PREEZ *et al.*, 2022).

Ademais, a desintegração do glicocálice estava associada a agregação das plaquetas ao endotélio, devido a perda da capacidade anticoagulante natural do endotélio nestes pacientes (FRASER *et al.*, 2020). Além do infiltrado leucocitário na parede do vaso pela perda do glicocálice, é provável que as alterações no metabolismo da proteína eNOS em pacientes com COVID-19 seja multifatorial, devido ao estresse oxidativo sistêmico (CHANG *et al.*, 2021). O metabolismo da eNOS nos leucócitos está associado ao metabolismo e atuação da enzima arginase-1, dito isso, estudos clínicos demonstraram maior expressão do gene *ARG1* em pacientes graves com COVID-19 (DERAKHSHANI *et al.*, 2021; DEAN *et al.*, 2021). Recentemente, foi sugerido que tanto o gene *ARG1*, como a proteína arginase-1 sejam

biomarcadores associados a gravidade do COVID-19 (BOST *et al.*, 2021; DERAKHSHANI *et al.*, 2021; DEAN *et al.*, 2021, DUARTE *et al.*, 2022).

2.6.2 O possível papel da proteína Arginase -1 e gene *ARG1* na fisiopatologia do COVID-19

A arginase é uma das cinco enzimas que participam do ciclo da ureia com objetivo final para dispor de amônia, mediante a conversão de L-arginina em L-ornitina e ureia (CALDWELL *et al.*, 2018). A molécula de arginase existe em duas isoenzimas distintas: arginase 1 (ARG1) e arginase-2 (ARG2), que diferem na distribuição nos tecidos e na localização intracelular (ASH, 2004). A arginase 1 (ARG1) possui a função fisiológicas de desintoxicação da amônia no ciclo da ureia, já arginase 2 (ARG2) atua na produção da ornitina necessária para a síntese de prolina e poliaminas que possuem papéis cruciais na regeneração e proliferação celular (CALDWELL *et al.*, 2018).

A enzima Arginase-1 pode influenciar na regulação das respostas imunes, visto que, praticamente todos os tipos de células mieloides produzem a Arginase-1. Neste sentido, o aminoácido L-arginina é crucial para as respostas imunológicas eficientes, sendo metabolizado em células mieloides por um conjunto de quatro enzimas distintas: ARG1, óxido nítrico sintase induzível (iNOS/NOS2), arginina descarboxilase (ADC) e arginina glicina amidinotransferase (AGAT) (GRZYWA *et al.*, 2020). Além disso, a Arginase-1 é expressa constitutivamente em neutrófilos, sendo liberada no microambiente, mediante a processos inflamatórios e infecciosos (MUNDER, 2009).

A literatura evidencia que a expressão exacerbada do gene ARG1 promove sinalizações intracelulares e produção de diversas moléculas pró-inflamatórias como: interleucina (IL) -13, IL-4, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), bem como a síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos leucócitos; nitrogênio e hipóxia (CHERIAN *et al.*, 2004; CALDWELL *et al.*, 2018). Consequentemente, fatores de transcrição tais como: transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT) -6 / STAT-3 fator induzível por hipóxia (HIF) -1 estão envolvidos neste processo inflamatório (ZHU *et al.*, 2015).

Ressaltamos que estudos conduzidos por Derakhshani *et al.*, (2021) e Dean *et al.*, (2021) demonstraram uma maior expressão do gene ARG1 em leucócitos, bem como em célula mononuclear do sangue periférico (PBMC) de pacientes com COVID-19 grave, quando comparado ao grupo controle saudável. Ademais, a proteína arginase-1, estava com níveis plasmáticos exacerbados em pacientes graves. Os pesquisadores evidenciaram também que, houve um aumento na expressão dos genes envolvidos em funções de granulócitos, entre eles

mieloperoxidase (MPO) presentes nas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET's) e proteínas de degranulação de neutrófilos PRTN3. Desde modo, possivelmente existe uma resposta imunológica desregulada (DEAN *et al.*, 2021). O gene *ARG1* foi considerado um biomarcador para a gravidade em pacientes com COVID-19 (DERAKHSHANI *et al.*, 2021).

Uma pesquisa conduzida por Bost *et al.*, (2021), mapeou a resposta imunológica em uma coorte de pacientes com COVID-19. Realizaram o mapeamento do perfil dos monócitos de PD-L1, ARG1 e HLA-DR por citometria de fluxo. Os resultados apontaram para uma relação clara entre a expressão média de ARG1 em monócitos imunossupressores de pacientes com COVID-19 grave (BOST *et al.*, 2021). Semelhantemente, outro estudo sugeriu que uma população de neutrófilos imaturos, sendo células supressoras derivadas de mieloides granulocíticas (G-MDSC / CD66b+) constituíram a população de leucócitos em pacientes com COVID-19 grave (Dean *et al.*, 2021). Logo, essas células possuem um inflamassoma desregulados, sendo comuns em sepse, câncer trauma, transplante de medula óssea, distúrbios autoimunes (MORTAZ *et al.*, 2020). Os resultados obtidos por Dean *et al.*, (2021) em um ensaio de imunohistoquímica em espécimes pulmonares (*post mortem*) revelou que pacientes com COVID-19 grave expressavam 10 vezes mais neutrófilos (G-MDSC / CD66b+), quando comparado aos controles normais, além de níveis baixos de L-arginina plasmática (Figura 01).

Células cancerígenas são dependentes da L-arginina, mediante a metabolização da arginase-1. A linha celular do carcinoma epitelial cervical humano (HeLa), bem como a linha celular de glioblastoma humano (SF268) sofrem apoptose na ausência da L-arginina (GARCÍA-NAVAS *et al.*, 2021). Estas linhagens celulares HeLa e SF268 cultivadas *in vitro* promoveram o aumento das células G-MDSC-CD66b+ neutrófilos com fenótipo imaturo expressam níveis exacerbados de ARG1, levando a depleção no microambiente do aminoácido L-arginina (GARCÍA-NAVAS *et al.*, 2021). Além disso, existe uma relação antagônica entre as enzimas responsáveis pelo metabolismo da L-arginina: NOS e arginase-1. Quando aumentada a arginase-1 favorece a restrição da biodisponibilidade arginina no microambiente, levando ao desacoplamento do NOS, mitigando a produção de ON levando a produção de radicais livres, como o superóxido (KIM *et al.*, 2009).

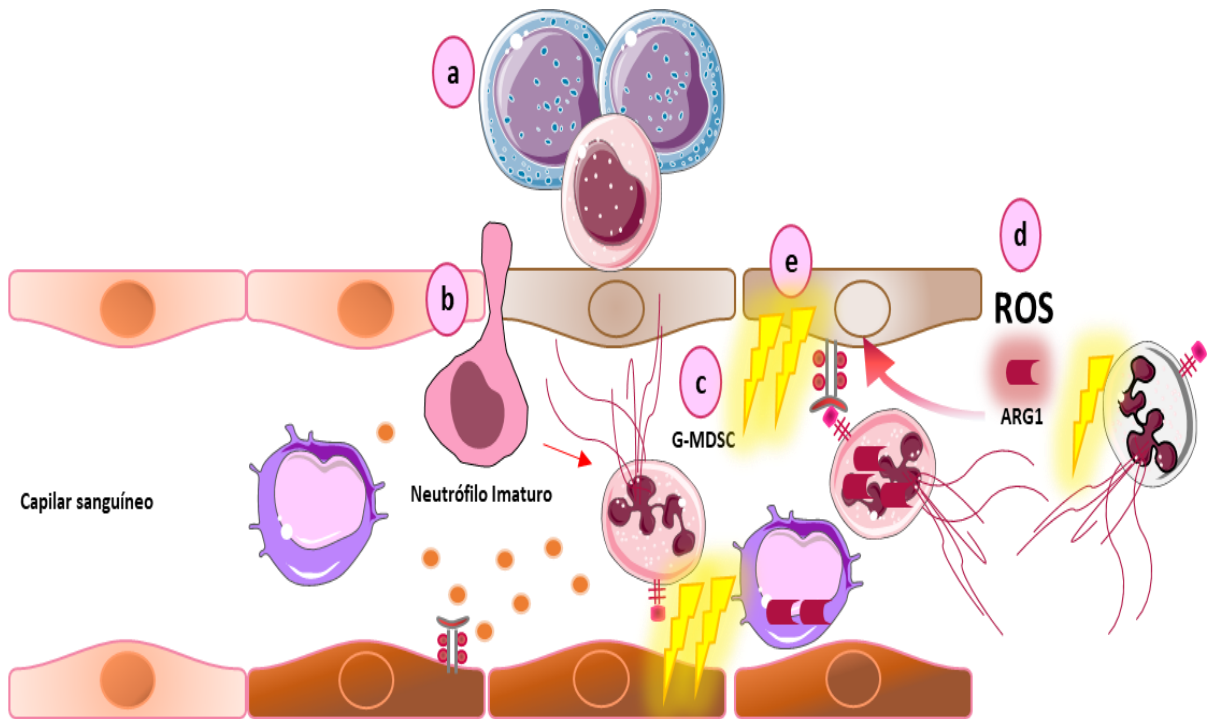


Figura 01. Migração das células imunes imaturas GMDSC's para o sítio de infecção na COVID-19 grave.

(A) células progenitoras das G-MDSC's (B) G-MDSC (C) G-MDSC produzindo NET's em uma resposta imunológica desregulada (D) produção de espécies reativas de oxigênio pelas células G-MDSC em macrófagos (E) morte das células endoteliais por exaustão e danos sofridos ocasionados pelas G-MDSC.

Fonte. Próprio autor, (2023).

Neste sentido, em um experimento realizado com cocultura de hESCs e PBMC ativados, os resultados evidenciaram que células tronco embrionárias humanas (hESCs) bloquearam a síntese de citocinas, bem como a proliferação de células T. Esses mecanismos podem ser influenciados em parte, pela expressão exacerbada de arginase-1 e consumo de L- arginina, promovendo a pouca expressão da cadeia ζ de TCR em linfócitos T (YACHIMOVICH-COHEN, 2010), influenciando nas respostas antivirais, mediadas por células, além da depleção de NO mitigando a respostas antivirais (YACHIMOVICH-COHEN, 2010).

Dito isso, o ensaio realizado com células T cultivadas em arginina $<50\mu\text{M}$ evidenciou a expressão diminuída da cadeia zeta do receptor de células T (CD3 ζ - TCR) em pacientes com COVID-19 grave, quando comparado ao grupo controle saudável. Sabe-se que existem outras vias para a disfunção das células T, todavia estes resultados apontaram para uma proliferação das células T prejudicada e a produção de IFN- γ insuficiente (RODRIGUEZ *et al.*, 2009, DEAN *et al.*, 2021).

2.6.3 Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS/NOS2) na fisiopatologia do COVID-19

Outro gene que vem sendo investigado no processo inflamatório em doenças virais é a óxido nítrico sintase (NOS). A NOS faz a catalise e conversão de arginina em citrulina e óxido nítrico (NO) (DECKER & PUMIGLIA, 2018). Existem três isoformas expressas do NOS nos vertebrados, são elas: NOS neuronal – expressas por neurônios (nNOS ou NOS1) e NOS endotelial (eNOS ou NOS3), expressas por células endoteliais. Por outro lado, a NOS induzível (iNOS ou NOS2), não se restringe a tecidos específicos, sendo induzida por várias citocinas nos leucócitos ou por moléculas da parede celular bacteriana e partículas virais (ESHELMAN *et al.*, 2019).

Contribuindo com este cenário, a hipóxia é uma condição presente em doenças infecciosas, possuindo diversos efeitos sob a molécula de NOS2: o primeiro é que a hipóxia bloqueia parcialmente a síntese de óxido nítrico (ON) pela NOS2, pois depende do oxigênio molecular como substrato (MAHNKE *et al.*, 2014). Assim, um segundo efeito é que hipóxia interrompe a ligação entre NOS2 e a proteína adaptadora α -actinina. Esse evento bloqueia a ligação de NOS2 ao citoesqueleto de actina, promovendo a desativação do NOS2 e por fim, o gene induzido transcricionalmente por HIF-1 α está presente nas células mieloides (MAHNKE *et al.*, 2014).

A síntese da iNOS/NOS2 por parte das células imunes inatas ocorre via receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). A expressão de iNOS/NOS2 leva a síntese molecular de ON. O ON é um importante para o mecanismo microbicida, produzido pelo sistema imunológico inato, além da capacidade vasodilatadora. Todavia, a expressão de ON prejudicada pela ausência da NOS2 foi associada a maior suscetibilidade e acometimento por doenças infecciosas (BUZZO *et al.*, 2017).

Neste contexto, a literatura sugere que as enzimas iNOS/NOS2 e arginase-1 são capazes de modular as respostas imunológicas, mediante ao catabolismo do L-arginina (DUARTE *et al.*, 2022). Os macrófagos são subdivididos em dois principais subtipos, incluindo os macrófagos M1 e M2. Os macrófagos M1 metabolizam o L-arginina a partir de iNOS. Os macrófagos M1 sofre influência das citocinas T helper 1 (Th1), interferon (IFN), interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral- α (TNF α). Esse tipo de célula atua na primeira fase de resposta imune a insultos inflamatórios (DUARTE *et al.*, 2022). O estímulo contínuo das citocinas Th1 mantém a circulação do L-arginina e cofatores que auxiliam a iNOS para fomentar a síntese de ON. Os macrófagos M1 desempenha atividade microbicida e pró-

inflamatórias, eliminando diversos tipos de microrganismos, incluindo vírus, bactérias, fungos, protozoários e células tumorais a partir do ON (KARUPIAH *et al.*, 1995; KAWANISHI *et al.*, 1995).

Anteriormente foi descrito que o SARS-CoV-1 tem seu ciclo de replicação influenciado por ON da seguinte forma: na primeira etapa o ON reduz a afinidade ou interação da proteína spike com o receptor ACE2; na segunda etapa o ON reduz a produção de RNA do SARS-CoV-1, mediante, bloqueio químico das cisteína proteases, responsáveis por codificar a proteína do Orf1a do SARS-CoV-1 (DUARTE *et al.*, 2022). O SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 são semelhantes, sendo possível que este mecanismo desenvolvido contra o SARS-CoV-1 pelo ON seja igual para o vírus SARS-CoV-2 (DUARTE *et al.*, 2022).

Por outro lado, os macrófagos M2 atuam na metabolização do aminoácido L-arginina, mediante a ação enzimática da arginase-1. As citocinas responsáveis por atuarem nestes eventos são as T helper 2 (Th2), incluindo a interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13), essas duas citocinas são responsáveis por estimulam a expressão de arginase-1 em células mieloides, sendo responsáveis pela principal característica dos macrófagos M2 (LOUIS *et al.*, 1999). A principal função dos macrófagos M2 é atuar na segunda fase da resposta imunológica contra a microrganismos invasores, mitigando a inflamação. Assim, mediante ocorre um redirecionamento do aminoácido L-arginina, sendo metabolizado pela arginase-1 que promove o reparo tecidual com produção de poliaminas e prolina (ALBINA *et al.*, 1998).

Além disso, a arginase-1 é expressa em neutrófilos, bem como células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs) (MUNDER *et al.*, 2009; RODRIGUEZ *et al.*, 2017). Os neutrófilos e MDSCs são capazes de secretar arginase no meio extracelular. A arginase no meio extracelular promove à depleção do L-arginina, resultando na atenuação e supressão das células T (DUARTE *et al.*, 2022). Recentemente, isso foi demonstrado com células de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, onde ocorreu o bloqueio da cadeia zeta do receptor de células T (CD3 ζ - TCR) em presença reduzida do L-arginina (DEAN *et al.*, 2021).

Um estudo desenvolvido por Karki *et al.* (2020), investigou o envolvimento da iNOS na patogênese da COVID-19. Para tanto, os pesquisadores utilizaram camundongos *Irf1*^{-/-} *Irf2*^{-/-} e camundongos transgênicos K18-ACE-2 que foram infectados com o SARS-CoV-2. Os pesquisadores tratam os camundongos com fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ), posteriormente analisaram a expressão gênica do NOS2. Este estudo demonstrou baixa expressão do gene NOS2 nas células dos camundongos, semelhantemente com baixa concentração da proteína *iNOS* no soro após o tratamento com TNF- α e IFN- γ (KARKI

et al., 2020).

Dominic *et al.* (2021), conduziram um estudo avaliando ON e o sulfeto de hidrogênio (H₂S) em amostras de pacientes com COVID-19 grave e controle. Os resultados evidenciaram uma redução significativa para a disponibilidade de ON e H₂S em pacientes com COVID-19 grave, quando aos controles saudáveis. em pacientes com COVID-19 grave, quando comparado ao grupo controle. Essas alterações de ON compromete a homeostase do organismo na resposta antiviral, estando correlacionada com a atividade iNOS/NOS2 e eNOS causando estresse oxidativo nos leucócitos e no endotélio (DOMINIC *et al.*, 2021). Desta forma, existem possíveis vias para arginina, bem como possibilidades de bloqueio e desequilíbrio, mediante a infecção por SARS-CoV-2 (Figura 02).

Um estudo clínico conduzido por Gelzo *et al.* (2022), investigou o papel da enzima NOS2 em uma coorte de pacientes com COVID-19 grave e pacientes controles. A proteína iNOS exibiu níveis séricos diminuídos em pacientes com desfecho grave do COVID-19 (GELZO *et al.*, 2022).

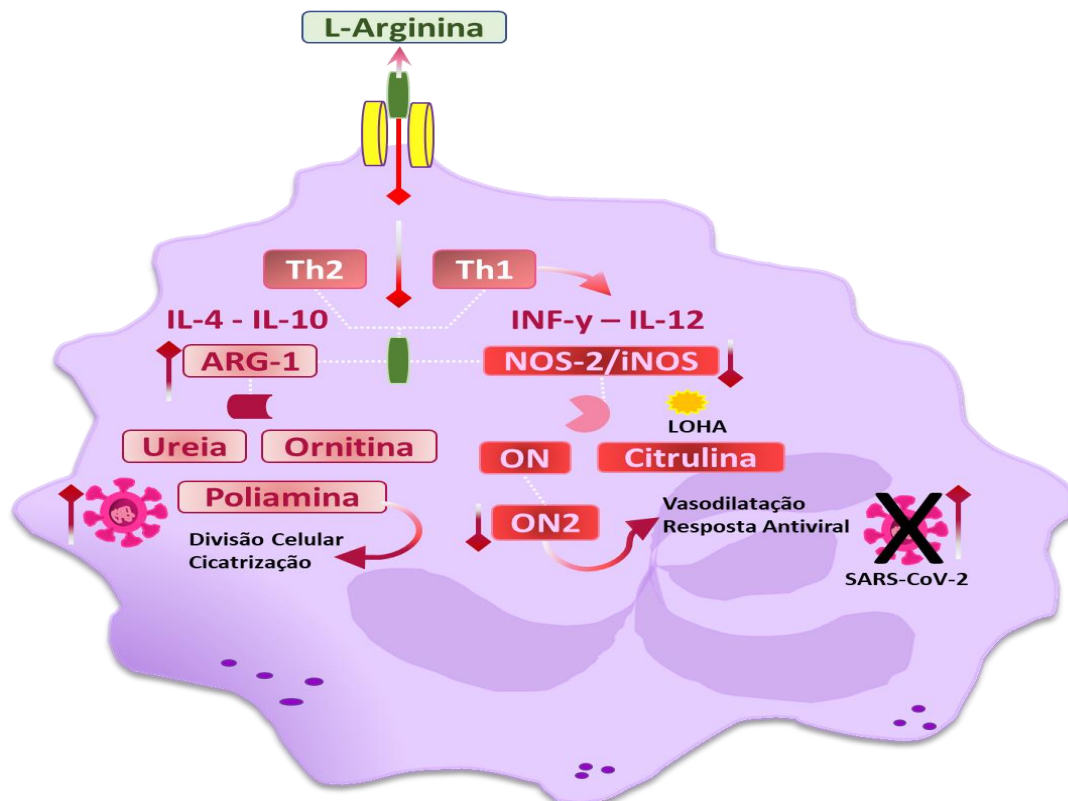


Figura 02. Possíveis mudança no metabolismo das células imunes inatas na infecção grave do SARS-CoV-2.

Fonte. Próprio autor, (2023).

A resposta Th2 fomenta a síntese de Arginase-1 em neutrófilos, macrófagos e monócitos infectados pelo SARS-CoV-2. Com a replicação exacerbada do vírus na COVID-19 grave, ocorre uma maior produção da ARG-1, principalmente nas GMDSC's, monócitos e macrófagos reativos/disfuncionais. O iNOS/NOS2 através da enzima LOHA, N ω -hidroxi-L-arginina induz a produção de NO promovendo vasodilatação. Porém, a literatura vem sugerindo que na infecção pelo SARS-CoV-2, tanto iNOS/NOS2 estão diminuídas, como também o ON está expresso em baixos níveis, sugerindo a que essa via Th1 estaria parcialmente bloqueada.

2.6.4 Subunidade Alfa 4 do Receptor VLA-4 (*ITGA-4*)

A integrina $\alpha 4\beta 1$ é codificada pelo gene *ITGA4* (codifica a subunidade $\alpha 4$), esta integrina está envolvida nos procedimentos de adesão e migração de leucócitos (DARDIOTIS *et al.*, 2019). A integrina $\alpha 4\beta 1$ é expressa em uma gama de células hematopoiéticas, desempenhando diversas funções, sendo peça chave na resposta imune celular: mediando ancoragem de leucócitos, rolagem, ligação e diapedese para tecidos inflamatórios (LI *et al.*, 2008; HARJUNPÄÄ *et al.*, 2019; SARTORI *et al.*, 2021). A integrina $\alpha 4\beta 1$ pertence à família das integrinas leucocitárias, sendo um possível alvo terapêutico importante, devido ao seu papel primário na mediação de inflamações, em doenças autoimunes, bem como neoplasias (SARTORI *et al.*, 2021).

Assim, a integrina $\alpha 4\beta 1$ é expressa por monócitos e linfócitos (PERCIANI *et al.*, 2019). Ademais, outros subtipos de leucócitos: natural killer (NK), eosinófilos, neutrófilos, macrófagos (HADDAD *et al.*, 2021). Com base nisto, as doenças que promovem o acúmulo de leucócitos, tais como: doenças autoimunes; asma; doença de crohn; síndrome do olho seco; pneumonia; infecções, doença falciforme (DF) e sepsis, possivelmente podem apresentar aumento na concentração da integrina $\alpha 4\beta 1$, assim como do gene *ITGA-4* (TSOKOS & FEHLAUER, 2001; KOURO *et al.*, 2014; KADIOGLU *et al.*, 2011; HADDAD *et al.*, 2021).

Por conseguinte, na DF, o antígeno-4 muito tardio (VLA-4 ou integrina $\alpha 4\beta 1$) é responsável por promover a adesão de reticulócitos ao endotélio hiperinflamado. Esse importante evento é uma peça chave na promoção de episódios vaso-oclusivos (VOEs) na DF e fomenta crises aos pacientes, podendo levar ao óbito (PERKINS *et al.*, 2020).

Por outro lado, infecções promovidas por diversos patógenos, tais como: vírus, bactérias e fungos são responsáveis por pneumonias, insuficiência respiratória, bem como a síndrome respiratória aguda grave (SDRA) (LOU *et al.*, 2021). Isso posto, a infecção exacerbada ocasionada pelo SARS-CoV-2 tem uma marca registrada por deflagrar a SARS em pacientes que desenvolvem a forma grave da COVID-19 (DIAO *et al.*, 2020; BUNDGAARD *et al.*, 2021). Associados a este quadro em infecções graves ocasionados pelo SARS-CoV-2 outros eventos causais, tais como a hipercoagulabilidade e neutrofilia contribuem para a progressão

da gravidade com tempestade de citocinas, disfunção multiorgânica e óbito, sendo marca registrada no COVID-19 (VERAS *et al.*, 2020; DE LA MORENA-BARRIO *et al.*, 2021).

Primeiramente, o estado de hipercoagulabilidade na COVID-19 possui várias moléculas envolvidas: integrinas, células imunes inatas, plaquetas e fatores da cascata de coagulação Zhang *et al.* (2020), e células endoteliais (MARCHETTI *et al.*, 2022). No que se refere as plaquetas, além de suas funções hemodinâmicas, coordenam as funções vasculares e a integridade da vasculatura, mediante a interação com células endoteliais e leucócitos por meio de sinalização celular heterotípicas e sinais justacrinos das integrinas (POPA *et al.*, 2018; HOTTZ *et al.*, 2020).

Além do mais, outras moléculas como as integrinas são fundamentais na interação com leucócitos, plaquetas e eritrócitos em diversas patologias. Sendo as integrinas $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 4\beta 7$ imprescindíveis nas interações célula-a-célula, assim como célula e matriz extracelular no efluxo leucocitário (CROOKS *et al.*, 2010). Consequentemente, patologias que envolvem hiperinflamação, possivelmente tenha o envolvimento da integrina $\alpha 4\beta 1$.

Desta forma, postula-se que pode ocorrer um aumento na concentração plasmática da proteína/integrina $\alpha 4\beta 1$, como também, aumento na expressão do gene *ITGA-4* na imunopatologia da COVID-19 grave. Todavia, até o presente momento, não existem estudos clínicos suficientes para comprovar o envolvimento da $\alpha 4\beta 1$, tão pouco do gene *ITGA-4* na imunopatologia da infecção pelo SARS-CoV-2.

2.6.5 Ligante de glicoproteína P-selectina 1 (PSGL-1) e P-selectina

Para que os leucócitos realizem o processo de diapedese eles interagem com as integrinas da superfície de células endoteliais que recobrem as vênulas e capilares (SREERAMKUMAR *et al.*, 2014). O receptor homodimérico do tipo mucina ligada por dissulfeto conhecido como ligante de glicoproteína P-selectina-1 (PSGL-1 / CD162), é uma proteína transmembrana de 120kd expressa, principalmente como um homodímero em células linfoides e mieloides. O PSGL-1 é um contra-receptor para P-, E- e L-selectina, mediante ao terminal N do domínio extracelular (TINOCO *et al.*, 2021; JIN *et al.*, 2020; HE *et al.*, 2021). A proteína PSGL-1 é codificado pelo gene *SELPLG* (Figura 03) (SHEIKH & GROOM, 2010).

Mediante ao processo inflamatório agudo, a P-selectina (CD62) das células endoteliais sinaliza para os neutrófilos que aderem na monocamada endotelial (PAN *et al.*, 2015). Desta forma, o PSGL-1 neutrofílico se ligando ao seu receptor endotelial VCAM-1 ou P-selectina

(PAN *et al.*, 2015). Além disso, em outras patologias como a asma, o processo adesão e rolagem dos eosinófilos, também é realizado com o intermédio do PSGL-1 à P-selectina (Figura 03) (WOLTMANN *et al.*, 2000).

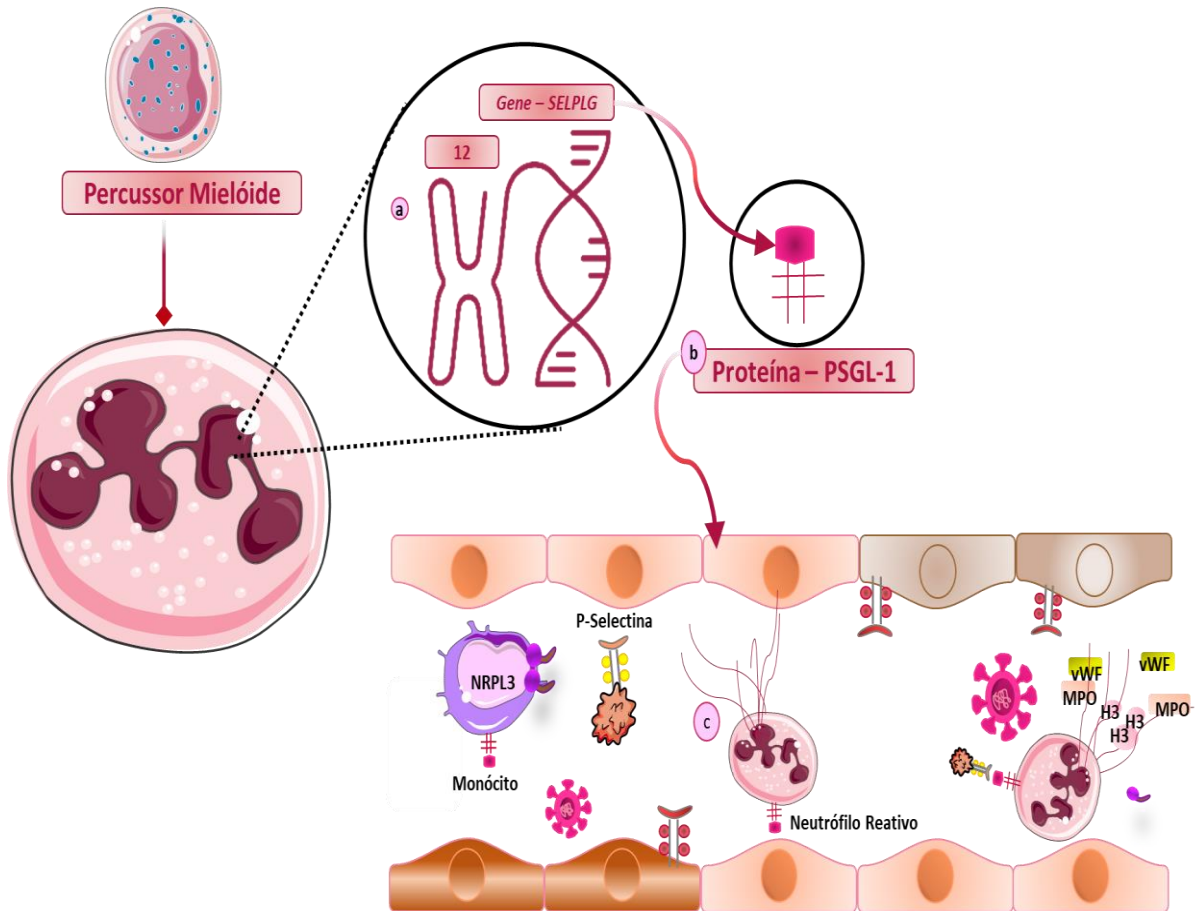


Figura 03. Fluxo sugerido para síntese da proteína PSGL-1 em leucócitos totais mediante a estímulos.

A) o cromossomo 12 abriga o gene *SELPLG* responsável por codificar a proteína PSGL-1 humana (B) proteína PSGL-1 transcrita (C) PSGL-1 ativada interagindo com a P-selectina endotelial.

Fonte. Próprio autor, (2023).

A interação da P-selectina com PSGL-1 induz a ativação de leucócitos, consequentemente, fomentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em neutrófilos (UMEKI *et al.*, 2013). A literatura aponta que o ROS pode promover a morte das células endoteliais, contribuindo para a necrose tecidual via hipoxia (IVANOV *et al.*, 2019). Além do mais, aponta que o PSGL-1 possibilita a expressão do fator tecidual (FT) em monócitos (IVANOV *et al.*, 2019).

Anteriormente, foi sugerido que os sinais responsáveis pela ativação dos leucócitos foram transduzidos, em parte, através da integrina PSGL-1 que é responsável pela migração de leucócitos para tecidos inflamados (BA *et al.*, 2005). Ademais, a interação P-selectina-PSGL-

1 desencadeia a cascata de fosforilação da proteína tirosina e proteínas quinases ativadas por mitógeno em neutrófilos humanos (BA *et al.*, 2005; UMEKI *et al.*, 2013).

Além disso, neutrófilos reativos recrutados liberam de armadilhas (NETs), ativando o fator de coagulação XII e, conseqüentemente, a via de coagulação dependente de contato (BOAVENTURA *et al.*, 2021). Os NETs capturam o fator de von Willebrand (vWF), recrutando mais plaquetas. As histonas tipo 3 (H3) ativam mais plaquetas, bem como a elastase de neutrófilos (NE) e mieloperoxidase (MPO) aderidas nos NETs (BOAVENTURA *et al.*, 2021). As moléculas H3, NE e MPO clivam e inativam anticoagulantes naturais - inibidor da via do fator tecidual (TFPA) e trombosmodulina (TM). E, finalmente, NETs expostas ao meio externo ligadas aos TF, ativam a via extrínseca da coagulação (BOAVENTURA *et al.*, 2021).

Atualmente, foi relatado que a infecção promovida pelo SARS-CoV-2 desencadeia um processo de imunotrombose. Os leucócitos reativos que interagem com plaquetas, fatores de coagulação e células endoteliais, contribuem para a formação de coágulos intravasculares e complicações microtrombóticas nos pulmões humanos (BONAVENTURA *et al.*, 2021).

Segundo Nossent *et al.* (2021), a P-selectina solúvel (sP-selectina) é um dos indícios de ativação das plaquetas. Logo, resultados demonstraram que pacientes com a forma grave da infecção pelo SARS-CoV-2 apresentaram aumento da P-selectina, tanto no lavado brônquio alveolar (BAL) quanto no plasma, quando comparados aos pacientes controles (NOSSENT *et al.* 2021). Outros estudos clínicos investigaram o papel dos níveis séricos de P-selectina na gravidade do COVID-19. Estes estudos evidenciaram que pacientes com pneumonia moderada a grave apresentavam níveis séricos maiores de P-selectina, quando comparados aos pacientes sem pneumonia, levando a aumento do risco de endotelopatia e trombose (KARSLI *et al.*, 2021; HOTTZ *et al.*, 2022) (Figura 04).

Naturalmente, existem moléculas que protegem a integridade do endotélio, impedido que ocorra lesões na matriz / monocamada endotelial, impedindo a adesividade de células imunes e plaquetas ao lúmen do endotélio (NOSSENT *et al.*, 2021). Todavia, é sugerido que mediante a processos infecciosos ou agressões mecânicas a barreira endotelial se rompe e expõem o vWF, bem como fatores coagulação que são depositados no local da lesão (NOSSENT *et al.*, 2021). Assim as plaquetas aderem e interagem com vWF com interação, através de integrinas α Ib β 3, α 2 β 1 e α 6 β 1 promovendo agregação plaquetária e formação de trombo (Figura 04) (BOULAFTALI *et al.*, 2013; HELMS *et al.*, 2013).

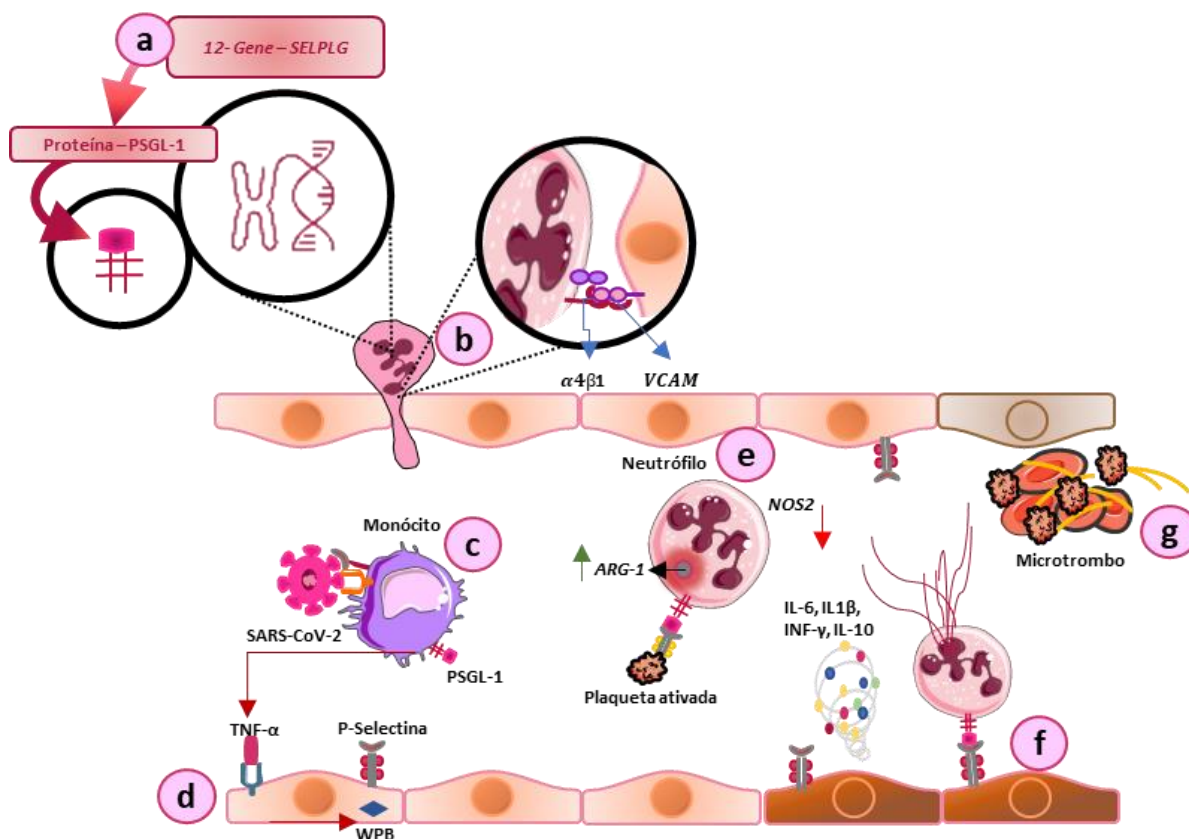


Figura 04. Imunotrombose sugerida na infecção por SARS-CoV-2 mediada por células imunes expressando o PSGL-1 e P-selectina.

Fonte. Próprio autor, (2023).

(A) O gene *SELPLG* codifica a proteína PSGL-1 em células mieloides e linfoides (B) o gene *ITGA4* codifica a parte beta da integrina $\alpha4\beta1$ responsável pela ligação entre as células endoteliais e células de defesa no processo de diapedese em processos inflamatórios (C) o monócito infectado pelo SARS-CoV-2 aumenta a expressão da integrina PSGL-1 e aumenta a produção de fator de nefrose tumoral (TNF- α) (D) o TNF α promove síntese de corpos de Weibel Palade (WPB) nas células endoteliais, liberando P-selectina endotelial (E) os neutrófilos aumentam a produção da proteína arginase-1 e diminui a produção de óxido nítrico sintase redutível 2 (NOS2) tornando o neutrófilo desregulado e expressando em sua superfície a proteína PSGL-1 que se liga a plaquetas ativadas pela infecção do SARS-CoV-2 via P-selectina plaquetária (F) células endoteliais desreguladas aumentam a expressão de P-selectina endotelial e aumentam o rolamento e adesão de células imunes levando a lesão do endotélio (G) microtrombos formados pelo desregulamento das células imunes, células endoteliais e plaquetas

A segunda é via da sinalização do receptor acoplado à proteína G (GPCR), dentro desses grânulos contém moléculas como: ADP, ATP, GDP, 5-HT, pirofosfato, magnésio e cálcio e TXA2. O TXA2 age nas próprias plaquetas fomentando a secreção e recrutamento de mais plaquetas no local de lesão, gerando um feedback positivo (GOLEBIEWSKA & POOLE, 2015). Quando ativadas as plaquetas são capazes de modular as respostas leucocitárias de forma ostensiva, com migração e secreção e extrusão de armadilhas extracelulares de neutrófilos (HOTTZ *et al.*, 2020; PAN *et al.*, 2015). Sendo assim, aumenta mais ainda a expressão de fator

tecidual em monócitos, desencadeando a trombose sistêmica (IVANOV *et al.*, 2019).

Em estudo um de coorte foram feitos experimentos com objetivo de identificar a interação de plaquetas e monócitos, medindo os níveis de moléculas trombogênicas. Os resultados sugerem que a P-selectina apresentou maior expressão no grupo COVID-19 grave em relação ao grupo controle, leve e assintomáticos. A molécula de TXA2 estava mais expressa em pacientes com COVID-19 grave em relação ao grupo controle, leve e assintomáticos, além disso, foi observado aumento expressivo de TF em monócitos de pacientes COVID-19 grave, em relação aos controles (HOTTZ *et al.*, 2020). Recentemente, foi observado que a concentração de P-selectina apresentou-se mais elevada no plasma de pacientes com COVID-19 grave, quando comparado aos pacientes com COVID-19 leve e assintomáticos (DE MORAIS BATISTA *et al.*, 2022).

Corroborando com estes achados, Ivanov *et al.* (2019), estimularam plaquetas e monócitos de indivíduos saudáveis com agonistas PAR1, PAR1-AP (SFLLRN-amida), com a intenção de provocar a expressão de P-selectina. Os dados resultantes dos experimentos sugerem que as plaquetas em seu estado não quiescente promovem imediatamente a exposição superficial de TF em monócitos, mediante a interação com P-selectina e seu contrareceptor em PSGL-1 nos monócitos (IVANOV *et al.*, 2019).

2.6.6 Características do Ligante de glicoproteína P-selectina 1 (PSGL-1) solúvel

Por outro lado, foi demonstrado anteriormente que uma forma solúvel de PSGL-1 (sPSGL-1) foi identificada, além de PSGL-1 ligada à membrana de leucócitos (SAKO *et al.*, 1993). A molécula de PSGL-1 solúvel (sPSGL-1) mantém suas características e funções iguais ao PSGL-1 membranar, ou seja, a sPSGL-1 se torna antagonista da PSGL-1 de membrana competindo para se ligar a P-selectina solúvel (STRAUSS *et al.*, 1999; AJDUKOVIC, 2015).

No cenário das infecções virais, um estudo clínico identificou o PSGL-1 como um fator inibitório regulado por IFN- γ , contribuindo para o bloqueio da infecciosidade do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) (LIU *et al.*, 2019). Um estudo clínico anterior demonstrou que o aumento do sPSGL-1 no soro de pacientes com fibrose pulmonar, estava associado a maior capacidade respiratória, podendo ser um fator protetor contra a doença (YANABA *et al.*, 2004). Ademais, a administração de sPSGL-1 (rsPSGL-Ig e PS/2) reduziu em proporções diferentes os infiltrados leucocitários no pulmão de camundongos BALB/cJ, resultando na redução de 80% de eosinófilos e 50% de linfócitos no líquido de lavagem broncoalveolar no

modelo de hiperreatividade das vias aéreas (AHR) (BORCHERS *et al.*, 2001).

Recentemente, um estudo sugeriu que o PSGL-1 bloqueou a incorporação da proteína Spike do SARS-CoV-2 em experimento *in vitro*, demonstrando que o PSGL-1 possivelmente, poderá mitigar ou inibir a replicação do coronavírus em células que expressam PSGL-1 (HE *et al.*, 2020). Além disso, evidências apontam que o sPSGL-1 desempenha atividade antiviral de amplo espectro (FU *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020). Por outro lado, um estudo mostrou um aumento na expressão do gene *SELPLG* em pacientes com COVID-19 grave, quando comparado aos pacientes controles saudáveis (YATIM *et al.*, 2022). Embora, o desempenho de valores preditivos e o papel para P-selectina e *SELPLG/PSGL-1* em casos graves da COVID-19 necessitem de maiores investigações em estudos clínicos para melhor compreensão (YATIM *et al.*, 2022).

3 CAPÍTULO 3 - JUSTIFICATIVA

A COVID-19 é uma patologia multissistêmica com evolução não linear e potenciais implicações para saúde humana a longo prazo (MCNARRY *et al.*, 2022). A pandemia ocasionada pelo SARS-CoV-2 foi um grave problema de saúde pública, afetando mais 6,7 milhões de pessoas em todo mundo (<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>). Recentemente, em 5 de maio de 2023, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou em Genebra, na Suíça, o fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), referente a doença COVID-19, devido ao controle parcial da doença, mediante a imunização.

Atualmente, a vacinação contra o SARS-CoV-2 minimizou consideravelmente o número de óbitos em todo mundo (WATSON *et al.*, 2022). A imunização é muito importante na prevenção da doença grave, porém, pacientes portadores de fatores de riscos, incluindo comorbidades pré-existentes, idosos ou imunossuprimidos são mais susceptíveis ao desenvolvimento do COVID-19 grave. Segundo a SESAB (2022), na Bahia dados da cobertura vacinal até 26 de setembro de 2022, revelou que foram 38.764.307 milhões de pessoas vacinadas contra o SARS-CoV-2. Contudo, na faixa etária maior que 40 anos, o público estipulado para receber a segunda dose era de 5.666.587, entretanto, apenas 41,72% das pessoas receberam o reforço. Isso pode explicar, em parte porque a taxa de letalidade na Bahia ainda é alta, girando em torno de 1,75% mesmo após as campanhas da imunização (SESAB, 2023).

Outro fator que pode justificar a taxa de letalidade elevada do COVID-19 está associada aos diferentes tipos de respostas imunológicas desempenhadas pelo hospedeiro na infecção do SARS-CoV-2 que, desempenha um papel fundamental no gerenciamento do processo inflamatório agudo e sistêmico da doença (GUPTA *et al.*, 2022). A resposta imunológica no COVID-19 grave cursa com liberação de citocinas pró-inflamatórias, pneumonia, promovendo dano alveolar difuso e infiltrados de células mieloides nos tecidos alveolares (HORBY *et al.*, 2021; GUPTA *et al.*, 2022). Neste sentido, diversos estudos sugerem que o desequilíbrio das respostas imunológicas contribui de forma decisiva para a evolução da gravidade (GHAZAVI *et al.*, 2013; ALEEBRAHIM-DEHKORDI *et al.*, 2022).

A imunopatologia do COVID-19 é complexa, devido a uma interação ainda não esclarecida entre o sistema imunológico do hospedeiro e SARS-CoV-2 (QUINTI *et al.*, 2020; D'ONOFRIO *et al.*, 2022). Alterações vasculares, incluindo microangiopatia trombótica, eventos como coagulação intravascular difusa e trombose generalizada estão correlacionados com a mortalidade no COVID-19 (LIU *et al.*, 2020; TANG *et al.*, 2020). Além disso, a forma

grave do COVID-19 possivelmente está relacionada com a exacerbação da resposta imunológica, assim como aos eventos associados à lesão vascular (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2020; ALHAZZANI *et al.*, 2020; AID *et al.*, 2020).

Neste contexto, diversos estudos investigaram o amplo espectro de respostas imunológicas no COVID-19, na tentativa de compreender as diferentes respostas imunes em pacientes com sintomas leves e sintomas graves para identificar possíveis biomarcadores, com objetivo de desenvolver novas terapias específicas mitigando a mortalidade da doença (DE MORAIS BATISTA *et al.*, 2022; PONTI *et al.*, 2020; CHÁVEZ-OCAÑA *et al.*, 2023). Até o momento, foram sugeridos biomarcadores de alterações em parâmetros hematológicos, desregulação imunológica, trombinflamação, parâmetros bioquímicos e biomarcadores de lesão vascular e endotelial (PONTI *et al.*, 2020; DE MORAIS BATISTA *et al.*, 2022; DUARTE *et al.*, 2022; CHÁVEZ-OCAÑA *et al.*, 2023).

Além disso, novos biomarcadores relacionados ao dano endotelial vêm sendo sugeridos por estudos clínicos, incluindo a expressão do gene *SELPLG*, sP-selectina, sPSGL-1 e *ITGA4*, assim como biomarcadores de estresse metabólico, tais como o gene a expressão de *ARG1* e *NOS2*, vêm sendo associados com o estresse metabólico nos leucócitos e ao dano endotelial na microvasculatura em pacientes com a forma grave do COVID-19 (REES *et al.*, 2021; BOST *et al.*, 2021; DEAN *et al.*, 2021; DERAKHSHANI *et al.*, 2021; GARCIA *et al.*, 2022; YATIM *et al.*, 2022; GELZO *et al.*, 2022). Embora, diversos estudos clínicos tenham sido desenvolvidos para determinar os principais biomarcadores na gravidade do COVID-19, os mecanismos que desencadeiam estes eventos e o envolvimento de *ARG1*, *NOS2*, *PSGL-1* e *ITGA4* ainda são pouco compreendidos na infecção do SARS-CoV-2, necessitando de maiores investigações para determinar o valor prognóstico destas moléculas na gravidade do COVID-19 (CARSANA *et al.*, 2020; KARSLI *et al.*, 2021; DEAN *et al.*, 2021; DERAKHSHANI *et al.*, 2021; GARCIA *et al.*, 2022; YATIM *et al.*, 2022; GELZO *et al.*, 2022).

Diante do atual cenário, tornando-se imprescindível o conhecimento dos mecanismos envolvidos na imunopatologia da infecção pelo SARS-CoV-2, assim como identificar biomarcadores da gravidade no COVID-19, contribuindo para um melhor manejo clínico e terapias personalizadas, mitigando a morbidade e mortalidade da doença.

3.1 Hipótese

O presente estudo avalia a hipótese alternativa que há diferença na expressão dos genes *ARG-1*, *NOS2*, *ITGA4* e *SELPLG* nos leucócitos totais, nos níveis plasmáticos das proteínas P-selectina e *PSGL-1* solúveis, e nos parâmetros hematológicos entre os grupos de pacientes com diferentes formas de COVID-19, e esta diferença está associada a gravidade da doença.

3.2 Objetivo geral

Avaliar a expressão dos genes *ARG1*, *NOS2*, *ITGA4* e *SELPLG* em leucócitos totais e mensurar os níveis das proteínas P-selectina e PSGL-1 no plasma de pacientes com COVID-19 associando com a gravidade da doença.

3.2.1 Objetivos Específicos

- ✧ Caracterizar a população estudada a partir dos dados clínicos, sociodemográficos e parâmetros hematológicos;
- ✧ Analisar a expressão relativa dos genes *SELPLG*, *ARG1*, *NOS2* e *ITGA-4* nos leucócitos totais de pacientes com desfecho grave e desfecho leve do COVID-19;
- ✧ Quantificar as proteínas P-selectina e PSGL-1 no plasma de pacientes COVID-19;
- ✧ Avaliar a possível correlação da expressão dos genes com fatores solúveis no plasma, marcadores de parâmetros hematológicos e o quadro clínico dos pacientes.

4 CAPÍTULO 4 - MATERIAL E MÉTODO

4.1 Critérios Éticos

Trata-se de um estudo transversal que fez parte do projeto guarda-chuva intitulado “**Estudo da Assinatura Molecular para a Determinação de Gravidade da Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19)**”. Este presente projeto foi previamente submetido e obteve aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (Processo 30764720.1.0000.0053 N° **Parecer: 4.014.165**) (anexo 2) e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa humana do ICS (CAAE 30764720.1.3004.5662, N° **Parecer: 4.040.329**) (anexo 3), tendo como coordenadora a Professora Dra. Soraya Castro Trindade (Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS), e colaboração do LabImuno/UFBA.

4.1.1 Local do estudo e pacientes

O presente estudo foi desenvolvido nas duas principais cidades do Estado da Bahia em Salvador e Feira de Santana. O recrutamento e a coleta das amostras biológicas ocorreram no período de junho a dezembro de 2020, anterior ao período de vacinação nacional. Um total de 117 pacientes foram recrutados no município de Salvador - Instituto Couto Maia e no município de Feira de Santana no Hospital Geral Clériston Andrade (HGCA) e Hospital EMEC com amostragem por conveniência. Para as coletas domiciliares foram realizadas visitas agendadas para aplicação de questionário em forma de entrevista, mediante a aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram obtidos de todos os participantes elegíveis, após o aceite em participar da pesquisa e coleta da assinatura do paciente.

4.1.2 Cálculo amostral

Para o cálculo do tamanho amostral, considerou-se uma exposição com aumento na expressão dos genes marcadores de resposta inflamatória, adesão e-lesão endotelial de 50% no grupo com desfecho leve do COVID-19 (proporção 1) e de 75% no grupo com desfecho grave (proporção 2). Para tanto, utilizamos o site cálculo amostra da UNESP – Bauru (http://calculoamostral.bauru.usp.br/calculoamostral/ta_diferenca_proporcao.php).

Consideramos o erro alfa (α , nível de significância) de 5% e erro beta (β , poder da amostra) de 20%, numa proporção de 1:1, foram calculados uma amostra com 58 pacientes em cada grupo.

4.1.3 Desenho do Estudo

Os grupos estudados foram definidos de acordo com os sintomas clínicos apresentados pelos pacientes. O grupo que não precisou do auxílio de suporte ventilatório, tendo apenas sintomas de resfriado, em ambiente domiciliar, sem maiores problemas foram classificados como desfecho leve. Por outro lado, os pacientes hospitalizados, dependentes de ventilação mecânica invasiva ou suporte de oxigênio, cursando com saturação de pulso e saturação de oxigênio inferior a 90%, foram considerados pacientes do com desfecho grave, segundo OMS (2021), (Tabela 02). O grupo com desfecho grave foi composto por 58 indivíduos e o grupo com desfecho leve consistiu em 59 pacientes.

Tabela 02. Definição dos grupos estudados.

Grupo com desfecho leve	Grupo com desfecho grave
Paciente com RT-PCR positivo e com sintomas de resfriado, sem necessidade de internação, considerado o desfecho leve .	Pacientes RT-PCR positivo com sintomas graves, tais como: SDRA, saturação de oxigênio <94%, pneumonia admitidos em UTIs foram classificados como desfecho grave .

Fonte. Próprio autor, (2023).

4.1.4 Critérios de Inclusão e Exclusão

Os critérios de inclusão e exclusão estão descritos a seguir (Tabela 03).

Tabela 03. Critérios de inclusão e exclusão para os participantes.

Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão
Paciente com idade maior ou igual a 18 anos. Com diagnóstico molecular por meio do RT-qPCR para SARS-CoV-2 dentro de uma janela de 18 dias após o primeiro sintoma.	<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes imunossuprimidos; • Pacientes gestantes ou lactantes.

Fonte. Próprio autor, 2023.

4.1.5 Questionário e coleta dos dados clínicos e demográficos

O questionário do tipo semiestruturado foi aplicado para a coleta de dados clínicos e demográficos dos pacientes do grupo com desfecho leve realizada sob forma de entrevista individual, por um dos membros da equipe de pesquisa (Apêndice). Com relação aos dados dos pacientes do grupo grave, o acesso foi realizado por meio do sistema de prontuários dos hospitais envolvidos neste estudo.

4.2 Diagnóstico da COVID-19

O diagnóstico e detecção da presença do material genético do vírus SARS-CoV-2 para os pacientes com desfecho leve, foi realizado pelo Laboratório de Saúde Pública da Bahia Gonçalo Muniz (LACEN/BA). A partir da coleta do material biológico proveniente das vias aéreas superiores com swab, este material foi submetido a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real com transcrição reversa (RT-qPCR) para detecção do RNA viral. Os pacientes com desfecho grave foram diagnosticados em laboratórios hospitalares onde encontravam-se internados pelo método de RT-qPCR. O acesso aos prontuários, bem como acesso aos exames laboratoriais, dados clínicos e sociodemográficos foram liberados pela equipe hospitalar.

4.3 Coleta do material biológico

4.3.1 Coleta e transporte das amostras biológicas

Foram coletados 6mL de sangue periférico em dois tubos contendo ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA) e dois tubos com heparina de cada paciente de ambos os grupos (leve e grave) entre o décimo dia ao décimo quinto dia após inícios dos sintomas. As amostras provenientes do grupo com desfecho foram coletadas pela equipe hospitalar parceira nas UTIs. O transporte das amostras foi realizado com auxílio de uma caixa térmica apropriada, onde os tubos estavam em racks fixadas para melhor estabilidade e preservação das amostras.

Para a realização do hemograma do grupo com desfecho leve foram disponibilizadas 500 µL de sangue total de cada paciente (Figura 05), mediante identificação de cada tudo e foram entregues para o Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da Universidade Federal da Bahia (LABIMUNO) com o objetivo de mensurar parâmetros hematológicos deste grupo.

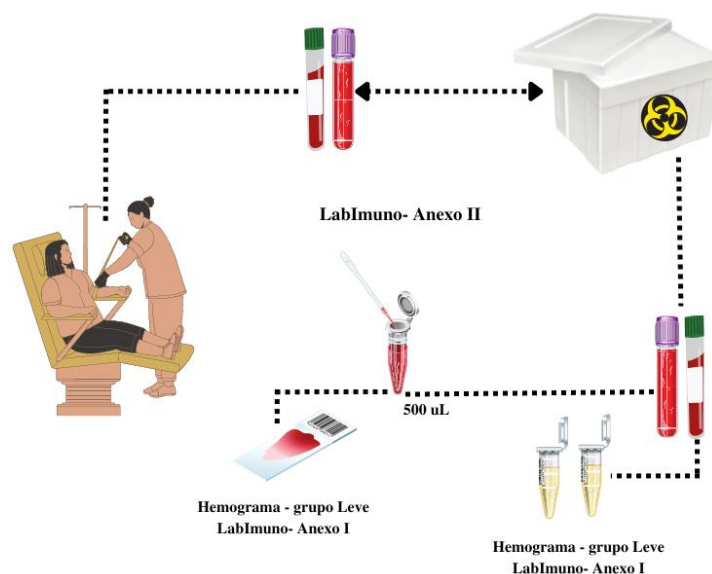


Figura 05. Esquema de coleta das amostras.

Fonte. Próprio autor.

4.3.2 Hemograma

Os hemogramas dos pacientes com desfecho grave e leve foram realizados no laboratório do Instituto Couto Maia e no laboratório da Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da Universidade Federal da Bahia (LABIMUNO). Foram confeccionados esfregaços sanguíneos para análise da morfologia das células sanguíneas e contagem diferencial dos leucócitos totais. As leituras foram feitas no analisador automático mirandray – modelo BC – 6200 Vyttra.

4.3.3 Separação do plasma

Um repositório de plasma foi montado para analisar posteriormente as proteínas solúveis nos grupos participantes do estudo. O objetivo principal em preservar o plasma dos pacientes foi para mensurar em análises posteriores proteínas, cujas amostras apresentassem maior expressão no ensaio do RT-qPCR. Para tanto, 2,5 mL de sangue com heparina foi centrifugado a 2500 rpm por \approx 10 minutos a 4°C. Em seguida, após a separação as série vermelha e branca, o plasma ficou no sobrenadante, assim foi alíquotado em tubos de 1,5 mL e armazenados a -80°C para a realização posterior do ensaio de ELISA (Figura 06).

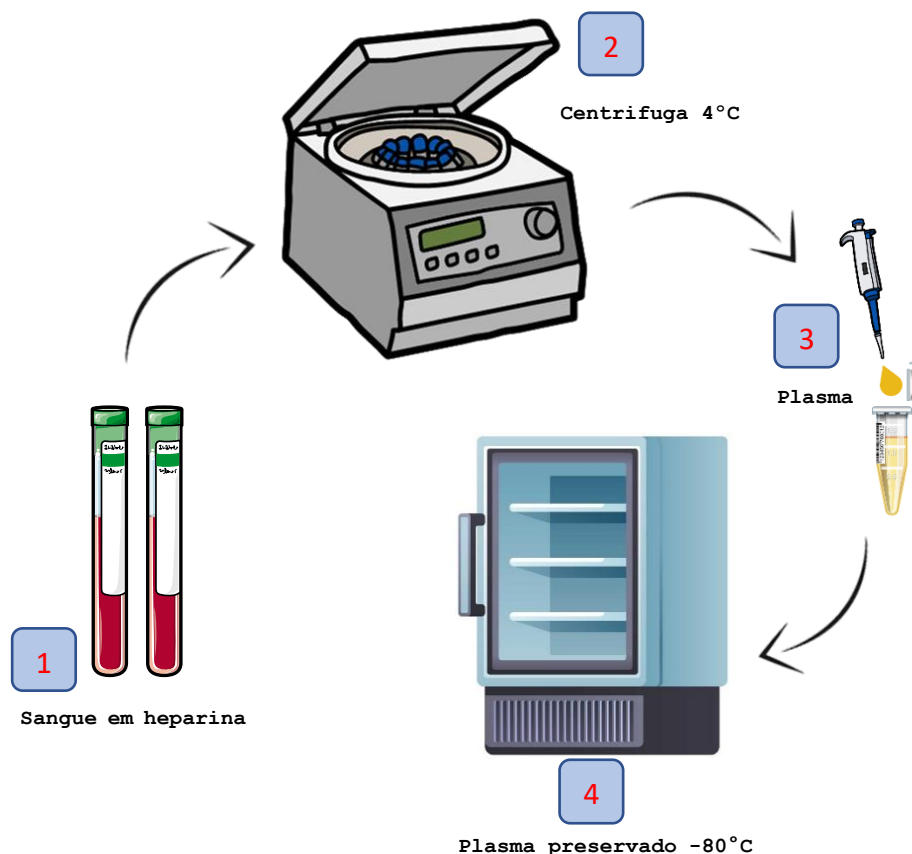


Figura 06. Separação do plasma.

Fonte. Próprio autor, (2023).

4.3.4 Lise dos eritrócitos e separação dos leucócitos totais

O método utilizado para separação dos leucócitos totais foi realizado da seguinte forma: os tubos de cada paciente contendo 6mL de sangue total foram submetidos a lise dos eritrócitos, através do tampão de solução para lise (1X), na proporção 1:10. Em seguida homogeneizou-se a amostra no vórtex, posteriormente as amostras foram incubadas a 4°C \approx 10 minutos.

As amostras de cada paciente foram submetidas a centrifugação por \approx 10 minutos a 2200 rpm a 4°C, após a centrifugação, observou-se a formação do pellet (contendo os leucócitos totais) na lateral do tubo Falcon. Em seguida, foi aspirado todo o sobrenadante, o pellet foi ressuscitado em PBS glicose (1X) para lavagem (quantas vezes fosse necessário), após homogeneização em vórtex o pellet se despreendeu e foi submetido novamente a centrifugação 10 minutos 2200rpm a 4°C.

Ao final da centrifugação foi observado a formação do pellet limpo que em seguida foi ressuscitado em de 500 μ L do reagente Trizol TM (Invitrogen), sendo jateado nas paredes do

tudo Falcon de acordo com as orientações do fabricante. Por fim, o conteúdo foi transferido para tubos de 1,5 μ L e armazenados a -80°C até o momento da extração do RNA (Figura 07).

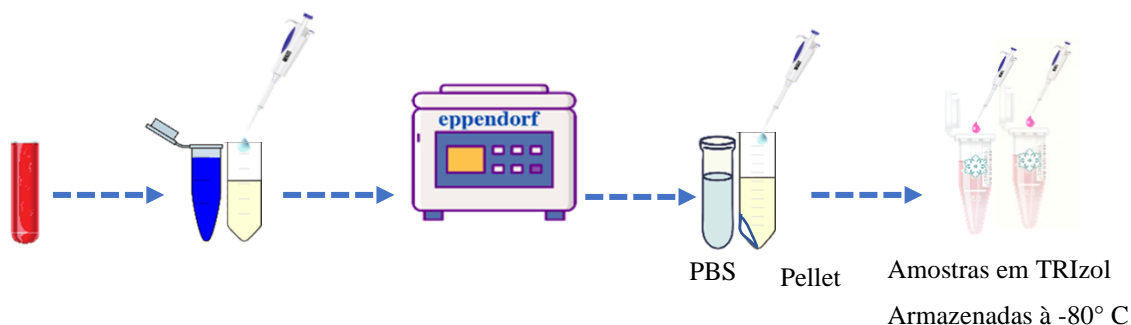


Figura 07. Lise dos eritrócitos e separação dos leucócitos totais
Fonte. Próprio autor.

4.4 Extração do RNA com o reagente TRIzol®

A extração do RNA foi realizada com o reagente TRIzol™ (Invitrogen) de acordo com orientações do fabricante, da seguinte forma: 200 μ L de clorofórmio foi adicionado em cada amostra. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas no vórtex por 10 segundos para a obtenção de uma solução leitosa. Após isso, as amostras foram incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente, em seguida observou-se a formação das três fases nas amostras (fase aquosa onde se encontrava o RNA, a fase branca composta pelo DNA e a fase rosa contendo proteínas) – as amostras foram centrifugadas a 14000rpm ou 12000g a 4°C por 15 minutos.

A fase aquosa/transparente foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL. Foram adicionados 500 μ L de isopropanol 100% em cada amostra, após a homogeneização por inversão as amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida foi realizado a centrifugação a 14000rpm ou 12000g a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1mL de etanol a 75% ao pellet formado. Para retirar o excesso de etanol a 75% os tubos foram invertidos e deixados para secar por 10 minutos dentro do fluxo laminar. Em seguida, o pellet foi eluído em 25 μ L de água RNase free, mediante incubação em banho-maria por 10 minutos (Figura 08).

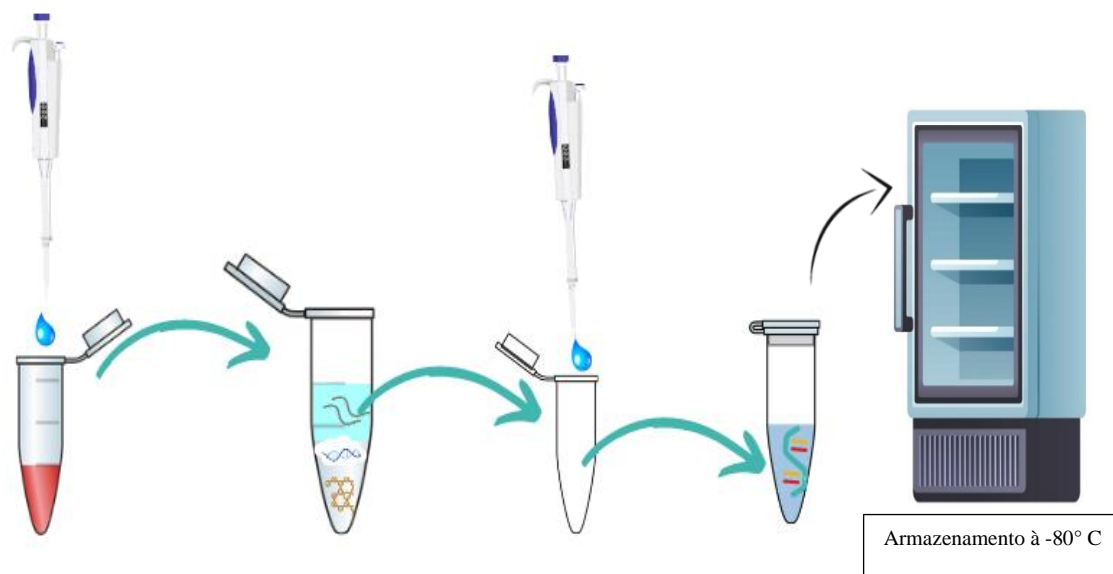


Figura 08. Extração do RNA dos leucócitos totais.
Fonte. Próprio autor.

4.4.1 Quantificação do RNA por espectrometria

A concentração do RNA foi determinada por densidade óptica das amostras em espectrofotômetro NanoDrop – usando a absorbância/ relação de $A_{260\text{nm}}/280\text{nm}$. A pureza das amostras foi verificada para determinar se havia presença ou não de contaminantes (proteínas/fenóis), o grau de pureza foi considerado satisfatório $\geq 2,0$ (Biosystems, 2008).

4.4.2 Eletroforese do RNA isolado

As amostras de RNA foram submetidas a eletroforese com gel de agarose (Sigma) à 1% em 100mL do tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA (1X) e 5 μL de brometo de étidio com voltagem de 150V 400mA por 25 minutos. A amostra foi diluída com um intercalante de RNA SYBR Green na proporção de 1:4 (1 μL de RNA com 100ng para 4 μL do tampão de amostra). Utilizamos 5 μL tampão de amostra para controle negativo da corrida de eletroforese (Figura 09).



Figura 09. Corrida de eletroforese com controle negativo da corrida e amostras
Fonte. Próprio autor, 2023.

4.5 Preparo da biblioteca de cDNA

A biblioteca de cDNA foi sintetizada a partir do RNA mensageiro (mRNA) isolado dos leucócitos totais, utilizando o kit SuperScript IV Reverse Transcriptase de acordo com as orientações do fabricante (Invitrogen – lotes: 00719351 e 2319760). O equipamento utilizado para a síntese do cDNA foi termociclador BioRad (modelo T100). Utilizamos 3 μL de RNA total de cada amostra com concentração máxima de 100ng/ μL (BIOSYSTEMS, 2008; BUSTIN *et al*, 2009). Com o tudo no gelo adicionamos 4 μL do master mix de reação (SuperScript Villo), 3 μL do RNA total, e 13 μL de água RNase free, totalizando 20 μL de reação, em seguida a reação foi homogeneizada e colocada na temperatura de 25°C por 10 minutos, após esse período a reação foi homogeneizada mais uma vez. Na etapa seguinte, o tubo contendo a reação foi incubado a 42°C por 60 minutos, a reação foi finalizada na etapa de inativação a 85°C por 5 minutos de acordo com orientações do fabricante. Ao final da reação, a biblioteca de cDNA foi armazenada à -80°C até o momento do ensaio de RT-qPCR.

4.5.1 Desenho de primers para o Real-Time qPCR

Para desenho dos primers foram utilizados as sequências depositadas no Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) e o Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A seguir na (Tabela 04) estão descritas as

sequências dos primers utilizadas em nosso estudo.

Tabela 04. Sequência dos primers utilizados no estudo.

Genes de Interesse	Sequências Forward	Sequências Reverse	Referência
<i>SELPLG</i>	TTTGCTGAACTTGAACAGGAAG	CTCATATTCGGTGGCCTGTC	SACCHI <i>et al.</i> , 2020.
<i>ARG1</i>	TGATGTTGACGGACTGGACC	ATCTAATCCTGAGAGTAGCCCTGT	DERAKHS HANI <i>et al.</i> , 2021.
<i>NOS2</i>	AGATAAGTGACATAAGTGACCTG	CATTCTGCTGCTTGCTGAG	SACCHI <i>et al.</i> , 2020.
<i>ITGA4</i>	CCCTACAACGTGGACACT	CTCCATTAGGGCTACCCAG	HE <i>et al.</i> , 2020.
Genes de Referência			
<i>HPRT-1</i>	ACCAGTCAACAGGGGACATAA	CTTCGTGGGGTCCTTTTCACC	GRÖGER <i>et al.</i> , 2020.
<i>PSMB2</i>	ATCCTCGACCGATACTACACAC	GAACACTGAAGGTTGGCAGAT	WU <i>et al.</i> , 2018.

Fonte. Próprio autor, 2023.

Utilizamos os primers e diluímos para as concentrações recomendadas pelo fabricante (Exntend®). A fim de manter o banco master livre de contaminações, sintetizamos o banco intermediário e por fim o banco de trabalho na concentração de 400 nM para cada primer (Figura 10). Todos os primers foram armazenados à -20°C até o momento uso.

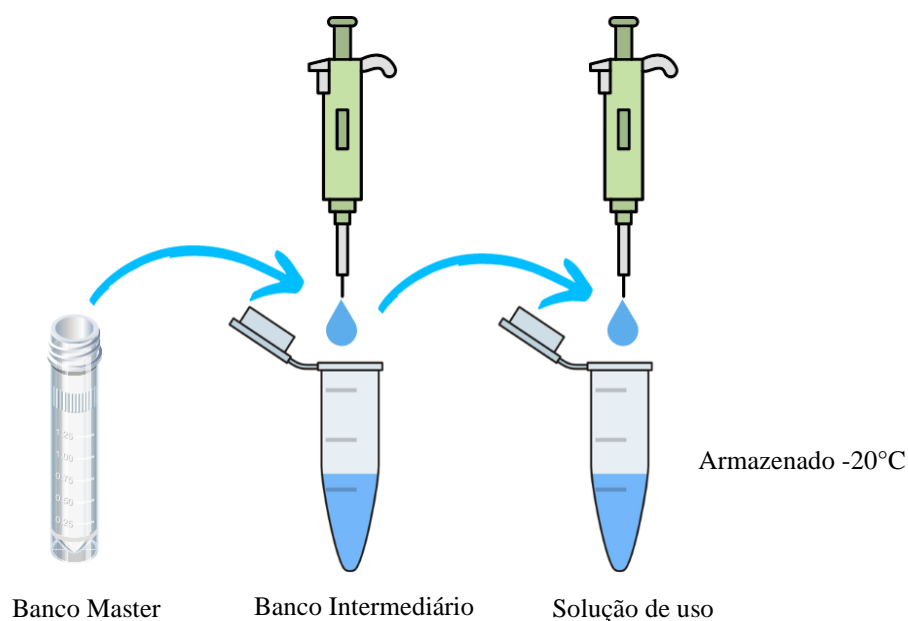


Figura 10. Fluxo de diluição do banco master e solução de uso dos primers.
Fonte. Próprio autor, 2023.

4.6 Curva de eficiência dos primers

Para determinar a curva de eficiência de cada primers foram realizados com base nas instruções do MIQE guidelines (BUSTIN *et al.*, 2009). Inicialmente, foram determinadas quatro concentrações para a diluição dos primers - (Forward-Reverse) para cada gene alvo *ARG1*, *NOS2*, *SELPLG* e *ITGA4* e gene referência *HPRT-1* (200nM, 400nM, 600nM e 800nM). Foi utilizado um pool de quatro amostras de cDNA com diluição de 1:150 e concentração inicial de 100ng/μL para realizar uma curva padrão, o principal objetivo foi verificar a eficiência de amplificação da reação do ensaio de RT-qPCR. As amostras foram feitas em triplicata, com controles negativos para cada gene em duplicata. Utilizamos 6 μL do master mix SYBR Green para amplificação dos primers, 3 μL dos primers diluídos para as quatro concentrações (200nM, 400nM, 600nM e 800nM) e 3 μL do pool de cDNA das amostras, de acordo com a recomendação do fabricante (Applied Biosystems). A RT-qPCR foi realizada no QuantStudio5 com ciclos de amplificação: 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 1 minuto a 60°C para anelamento dos primers e extensão. Após o final da corrida de amplificações foi realizado o estágio adicional referente à curva de dissociação (Melt curve) para verificar a especificidade das reações.

Foi utilizado o parâmetro paralelismo entre as curvas dos genes alvo e referência (slope) calculando a eficiência de amplificação das reações, através da fórmula $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$. Obtivemos a curva padrão pelo gráfico de regressão linear (figura 11), a partir dos valores dos ciclos de amplificação Ct (cycle threshold) sobre o log das diluições dos primers. Sendo aceitável e descrito por Bustin *et al.* (2009), que o coeficiente angular da curva padrão de -3,32 com 100% de eficiência na reação ou com porcentagem da eficiência girando em torno de 94% a 110%. A eficiência de amplificação para os genes alvos e do gene referência variação ($\pm 10\%$). Os valores de Slope, r^2 e porcentagem da eficiência foram descritos na (Tabela 05).

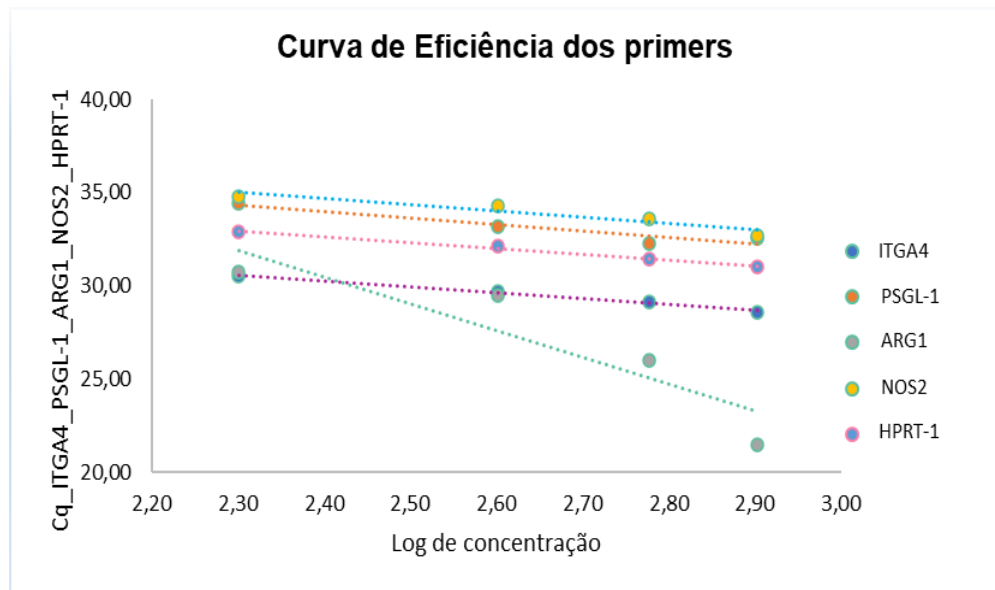


Figura 11. Curva de eficiência obtida para o gene referência *HPRT-1* e genes alvos *ITGA4*, *SELPLG*, *ARG1*, *NOS2*.

Fonte. Próprio autor, 2023.

Tabela 05. Valores para as curvas de eficiência dos primers utilizados no estudo.

GENES ALVO	SLOPE	r^2	EFICIÊNCIA DA CURVA
<i>ITGA4</i>	-31443	0,99	108%
<i>SELPLG</i>	-3,4766	0,89	94%
<i>ARG1</i>	-3,1133	0,94	110%
<i>NOS2</i>	-3,3471	0,90	99%
<i>HPRT-1</i>	-3,1584	0,99	107%

Fonte. Próprio autor, 2023.

4.6.1 Diluição e padronização das amostras de cDNA

As amostras foram diluídas em três concentrações distintas com objetivo de identificar contaminantes ou inibidores provenientes do processo de extração. Para tanto, foi realizado diluições seriadas, em três tubos estéreis adicionamos a água livre de RNase e a amostra (cDNA). Diluímos as amostras de 1:30; 1:150 e 1:300.

Com o objetivo de testar as três diluições das amostras, realizamos o experimento de RT-qPCR com os primers na concentração de 400nM e analisamos os resultados de expressão gênica com gráficos de regressão linear, conforme recomendado e descrito por (BIOSYSTEMS, 2008). Realizamos 8 experimentos, sendo: 4 amostras do grupo com desfecho

grave e 4 amostras do grupo desfecho leve. Destes experimentos, conclui-se que a diluição 1:30 era inadequada para o uso, pois continha inibidores da reação de RT-qPCR por apresentar muita oscilação no gene referência HPRT-1, a diluição de 1:300 as amostras ficaram muito diluídas. Desta forma, utilizamos em experimentos a diluição 1:150 (Figura 12).

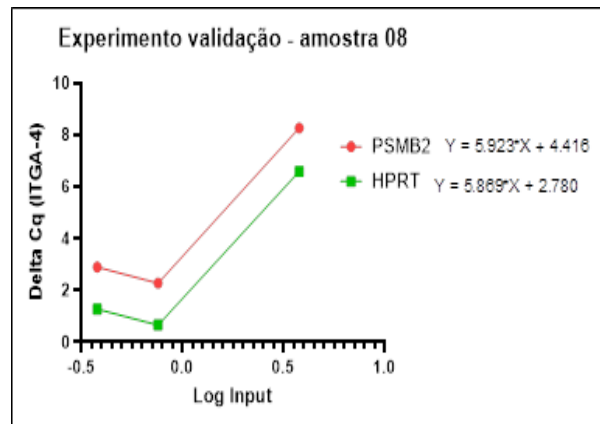


Figura 12. Regressão linear das três diluições analisadas no experimento de padronização.
Fonte. Próprio autor, 2023.

4.7 Análise da expressão gênica por Real-Time qPCR

Os ensaios de RT-qPCR foram realizados com base nas instruções do MIQE guidelines (BUSTIN et al., 2009). Foi realizado experimentos de padronização para calcular a eficiência dos primers e diluição das amostras, conforme recomendações do fabricante. Selecionamos 20 pacientes do grupo grave e 20 pacientes do grupo leve pareados por sexo e idade (± 10 anos) - todas as amostras com replicatas técnicas, o RNA total foi extraído das amostras selecionadas. Utilizamos 6 μ L do master mix SYBR Green para amplificação dos primers, 3 μ L (200nM do primer forward e 200nM do primer reverse totalizando 400 nM do total de primer) dos primers diluídos e 3 μ L do cDNA de cada amostra de acordo com a recomendação do fabricante (Applied Biosystems) (Figura 13). A RT-qPCR foi realizada no QuantStudio5 (ThermoFisher), com os seguintes ciclos de amplificação: 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 1 minuto a 60°C para anelamento dos primers e extensão. Após o final da corrida de amplificações foi realizado o estágio adicional referente à curva de dissociação (Melt curve) para verificar a especificidade das reações. Todas as reações foram feitas em duplicatas. Para análise da expressão relativa utilizamos o método do $2^{-\Delta CT}$, conforme descrito anteriormente (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). As curvas de amplificação do ensaio

de RT-qPCR são apresentadas na figura 14.

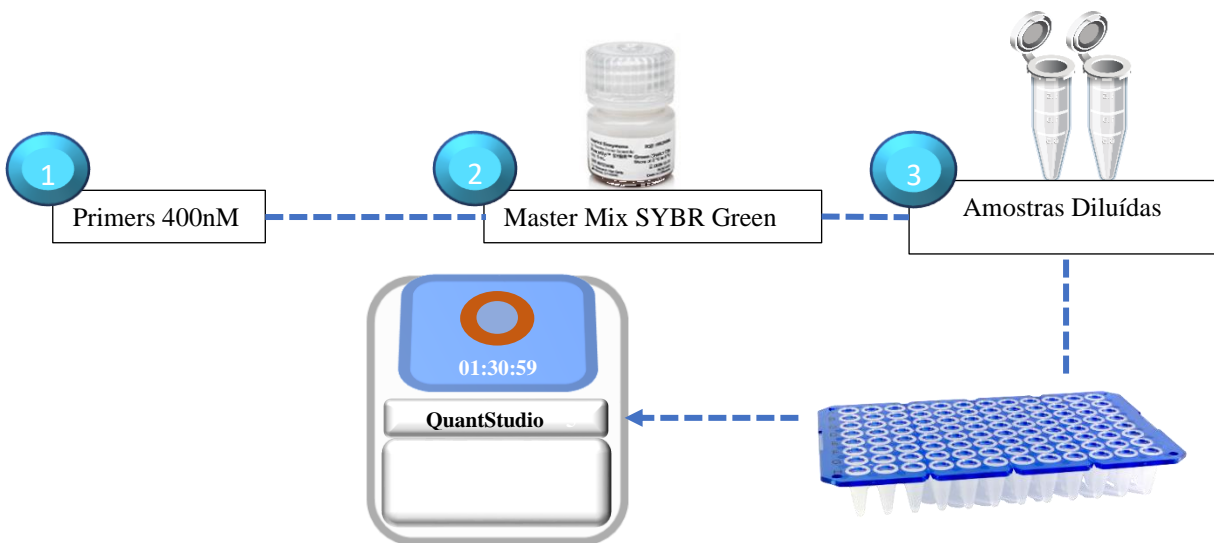


Figura 13. Fluxo do experimento de RT-qPCR.

Fonte. Próprio autor, 2023.

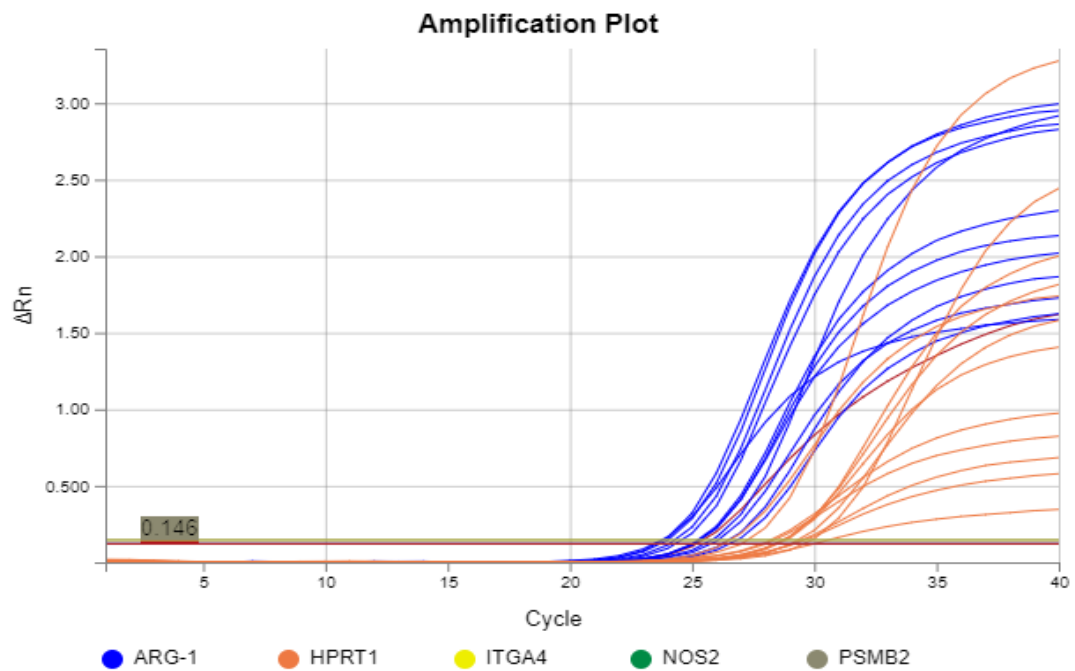


Figura 14. Curva de amplificação para o gene alvo *ARG1* e gene referência *HPRT-1*.

Fonte. Próprio autor, 2023.

4.7.1 Análise da temperatura de Melting (TM)

A curva de Melting foi analisada após amplificação dos genes alvos com objetivo de avaliar a capacidade dos primers de se desanelarem na sua temperatura ótima específica, essa análise permitiu avaliar se havia contaminantes sendo amplificados juntos com o primer alvo

(Figura 15) (Biosystems, 2008).

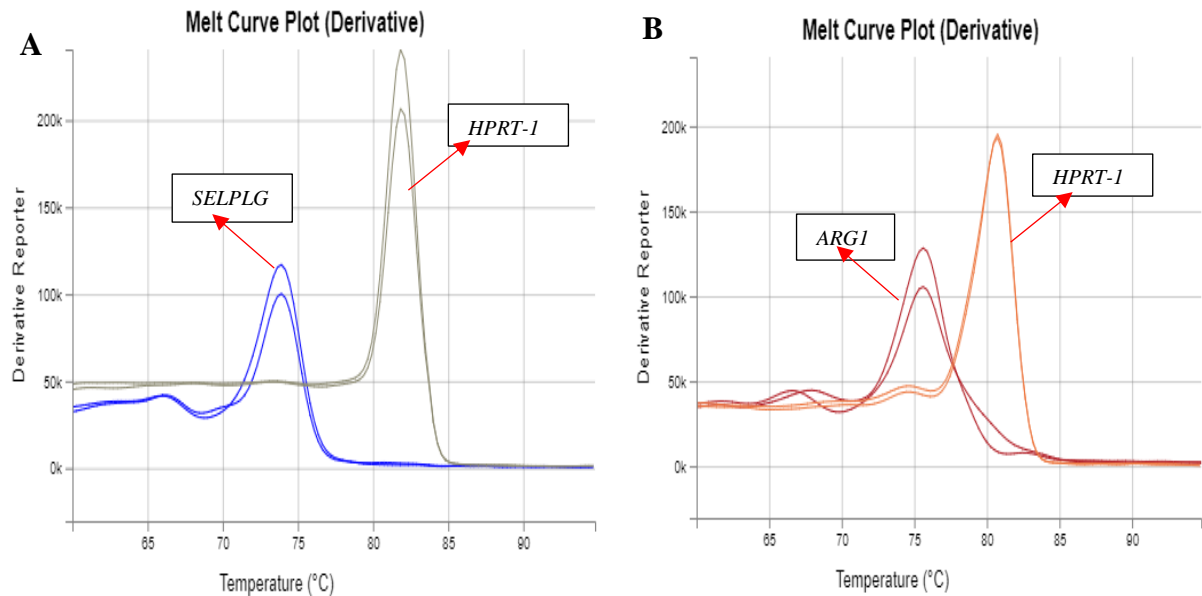


Figura 15. Curva de dissociação, em duplicata para gene alvo *SELPLG* e gene referência *HPRT-1* (A). Curva de dissociação, em duplicata para gene alvo *ARG1* e gene referência *HPRT-1* (B).

Fonte. Próprio autor, 2023.

4.8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

4.8.1 Padronização e diluição das amostras de plasma

Para padronização do ensaio de ELISA foram feitas diluições seriadas das amostras (sem diluição, 1:2, 1:4, 1:8, 1:32 e 1:64) em dois ensaios com quatro amostras de plasma, sendo duas amostras do grupo com desfecho grave e duas amostras do grupo desfecho leve para os dois marcadores investigados no plasma, o sP-selectina/CD62P e o sPSGL-1/CD162. Diante dos resultados obtidos, procurando não extrapolar a curva do padrão de cada marcador, padronizamos para a sP-selectina a diluição de 1:2 em nossos ensaios, por outro lado, não diluímos a amostra para o sPSGL-1.

4.8.2 Princípio do ensaio de ELISA

Utilizamos os kits human P-Selectin/CD62P DuoSet ELISA (lote: P325106) e humano PSGL-1/CD162 DuoSet ELISA (lote:P294917) de acordo com orientações do fabricante (R&D Systems). Ambos os kits possuíam o princípio do ELISA sanduíche.

4.8.3 Ensaio de ELISA

As placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços (R&D Systems) foram sensibilizadas com 100 µL do anticorpo de captura diluído BSA (1%), sendo incubada em overnight na temperatura ambiente. Após incubação o anticorpo de captura foi descartado e a placa foi lavada com 300µL/ poço de wash buffer (1%) por 90 minutos. Posteriormente, a placa foi bloqueada com BSA (1%). Após realização de nova lavagem, 100µL de amostras ou 100µL de cada padrão foram adicionados em cada poço e incubada por 2 horas. Em seguida, a placa foi lavada com BSA (1%). Foi adicionado 100µL de anticorpo de detecção, previamente diluído em BSA (1%) em cada poço e incubado por 2 horas. Em seguida, após lavagem da placa, foi adicionada 100µL da Streptavidin-HRP por 20 minutos em ausência de luz, após incubação e lavagem foi adicionado 100µL de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) em cada poço e incubado por 20 minutos na ausência de luz. Foi utilizado ácido sulfúrico (2n) para parar a reação enzimática. A densidade ótica (DO) das amostras e padrão foram dosadas em dois comprimentos de ondas de acordo com a recomendação do fabricante (450nm e 570nm) no equipamento de espectrofotômetro Multiskan Go (ThermoFisher). Em cada teste foi feito um “branco” da reação, este constitui-se da reação sem a presença da amostra e padrão para observar a reatividade de fundo (back-ground) da reação.

4.9 Cálculo para a determinação do RNL e RPL

Para calcular a razão neutrófilos-linfócitos foi utilizando como parâmetro o estudo de LIU e colaboradores (2021), onde o score ≥ 5 foi definido como ponto de corte (*Cut off*) para estratificar pacientes com COVID-19 grave e leve. Para tanto, o valor absoluto dos neutrófilos dividido pelo valor absoluto dos linfócitos.

A razão plaquetas-linfócitos foram calculadas a partir do valor absoluto de plaquetas dividido pelo valor absoluto de linfócitos. O um ponto de corte (*Cut off*) $\geq 0,20$ foi determinado através do índice de Youden, considerando o maior ponto de sensibilidade e especificidade da curva ROC para estratificar pacientes com desfecho grave e leve da COVID-19.

4.10 Tabulação dos dados e análise estatística

Todos os dados coletados no questionário foram tabulados no excel, bem como os

resultados encontrados nos experimentos de RT-qPCR e ELISA. Os resultados foram analisados usando os programas: GraphPad Software v.8 (GraphPad Prism) e O Statistical Package for Social Science for Windows (SPSS) v.25. O teste de normalidade Shapiro-Wilk, foi aplicado nos conjuntos de dados. Para as variáveis categóricas *utilizamos o* teste Qui-quadrado com (ODDS ratio) ou teste exato de Fisher e intervalo de confiança de 95% (IC). Para avaliar os dados não paramétricos aplicamos o teste U de *Mann-Whitney e* correlação de Spearman, por outro lado, para dados paramétricos aplicamos teste *t Student*, a curva característica de operação do receptor (ROC) foi utilizada para determinar o valor diagnóstico dos biomarcadores. O valor da significância (*p*) considerado significativo foi de $\geq 0,05$.

Para estimar a associação entre as variáveis independentes e a gravidade do COVID-19, foram testados quatro modelos de análise padrão: 1. *ARG1* e gravidade do COVID-19; 2. *SELPLG* e gravidade da COVID-19; 3. Gravidade de *sPSGL-1* e COVID-19; 4. *sPselectin* e gravidade da COVID-19. Essas variáveis independentes foram categorizadas em dois grupos, de acordo com o ponto de corte determinado na curva ROC. Assim, para obter as medidas de associação mencionadas, foram estimados odds ratio (OR) brutos e intervalos de confiança de 95% por meio do teste de Mantel-Haenszel.

5 CAPÍTULO 5 - RESULTADOS

5.1 Análise de prevalência das características clínicas da população estudada

Analizamos as características clínicas e sociodemográficas dos pacientes nos grupos com desfecho leve vs. desfecho grave (entre 10 a 15 dias de sintomas ou internamento em UTI), comparando o sexo, faixa etária, sintomas e comorbidade pré-existentes entre os grupos. Os resultados estão descritos na (Tabela 06).

Nossos resultados demonstram que cerca de 65,5% dos pacientes no grupo com desfecho grave eram do sexo masculino com 2,77 mais vezes chances de fazerem parte do desfecho grave (**p<0,007; IC= 1,273 - 5,971). No grupo grave houve um predomínio de pacientes adultos 55,17 % e destes a maioria era idosos 44,82% (****p<0,0001; IC= 1,273 - 5,971) com cerca de 7,04 vezes mais chances de acometer essa faixa etária, quando comparado ao grupo leve. Observamos que o grupo com desfecho grave apresentou uma maior prevalência de negros 86,20% (****p< 0,0001; 0,1031 - 0,6029; OR=0,25) quando comparado aos pacientes com desfecho leve, por outro lado, observamos que o grupo com desfecho leve apresentou uma maior frequência de pacientes brancos 37,30% (****p< 0,0001; IC= 0,0278 - 0,3127; OR 0,09) em relação aos pacientes com desfecho grave. Os sintomas mais frequentes para pacientes do grupo grave foram tosse seca 65,5% (p<0,48; IC= 0,6289 - 2,756; OR=1,3), dispneia 67,2% (****p< 0,0001; IC= 3,201 - 15,52; OR=7,26), febre 63,8 % (**p<0,002; IC=1,455 - 6,974; OR=3,18) e fadiga/mialgia 29,3% (****p<0,0001; IC= 0,06777 - 0,3403; OR=6,48).

As comorbidades mais prevalentes para pacientes com desfecho grave foram: hipertensão 39,7 % (*p<0,026; IC= 1,111 - 5,636; OR=2,57), diabetes mellitus 46,6 % (****p<0,0001; 4,859 - 53,04; OR=16,26), doenças cardiovasculares 46,6 % (****p<0,0001; 5,825 - 108,9; OR=24,8), e doença renal 15,52% (****p<0,0001; 1,247 - 24,79; OR= 5,2).

Tabela 06. Comparação das características clínicas entre os grupos estudados.

*VARIÁVEIS	TODOS PACIENTES (n=117)	GRUPO LEVE (n=59)	GRUPO GRAVE (n=58)	p	† ODDS RATIO	‡ IC – 95%
SEXO (%)						
Masculino	62 (53%)	24 (40,7%)	38 (65,5%)	<0,007	2,77	1,273 - 5,971
Feminino	55 (47%)	35 (59,3%)	20 (34,5%)			

FAIXA ETÁRIA (%)						
Adulto (≥18 anos)	85 (72,64%)	53 (89,83 %)	32 (55,17 %)	< 0,0001	7,04	0,05301 - 0,3689
Idoso (≥65 anos)	32 (27,35)	6 (10,16%)	26 (44,82 %)			
RAÇA/ COR (%)						
Amarelo	3 (2,56%)	1 (1,70%)	2 (3,40%)	> 0,99	2,03	0,2304 - 29,94
Branco	16 (13,70%)	13 (37,30%)	3 (5,20%)	< 0,0001	0,09	0,0278 - 0,3127
Negros	86 (73,50%)	36 (61,00%)	50 (86,20%)	< 0,0001	0,25	0,1031 - 0,6029
Não Informado	3 (2,56%)	0 (0,0%)	3 (5,20%)			
SINTOMAS (%)						
Tosse seca	73 (62,4%)	35 (59,3%)	38 (65,5%)	<0,48	1,3	0,6289 - 2,756
Tosse produtiva	9 (7,7%)	5 (8,5 %)	4 (6,9 %)	>0,74	1,22	0,2356 - 2,884
Dispneia	52 (44,4%)	13 (22 %)	39 (67,2%)	< 0,0001	7,26	3,201 - 15,52
Febre	58 (49,6%)	21 (35,6 %)	37 (63,8 %)	<0,002	3,18	1,455 - 6,974
Fadiga/Mialgia	60 (51,3%)	43 (72,9 %)	17 (29,3 %)	< 0,0001	6,48	0,06777 - 0,3403
COMORBIDADES (%)						
Hipertensão	35 (29,9%)	12 (20,3%)	23 (39,7 %)	<0,026	2,57	1,111 - 5,636
Diabetes Mellitus	30 (25,6%)	3 (5,1%)	27 (46,6 %)	<0,0001	16,26	4,859 - 53,04
Doenças Cardiovasculares	29 (24,8%)	2 (3,4%)	27 (46,6%)	<0,0001	24,8	5,825 - 108,9
Doenças renal	11 (9,4%)	2 (3,4%)	9 (15,5%)	<0,0001	5,2	1,247 - 24,79
Obesidade	28 (24%)	13 (22%)	15 (25,8%)	>0,62	1,2	0,5247 - 3,016
⌘ DPOC	14 (23,2%)	6 (10,17%)	7 (12,28%)	>0,71	1,4	0,2213 - 2,326

Nota: as variáveis categóricas foram analisadas com o teste Qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fischer. Consideramos o valor absoluto (porcentagem) de cada variável investigada. O valor de significância é de $p < 0,05$.

Legenda: † Razão de chances (OR); ‡ Intervalo de confiança (IC) de 95%; ⌘ Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC).

Fonte. Próprio autor, 2023.

5.2 Comparação dos parâmetros hematológicos na população estudada

Analisamos os resultados dos parâmetros hematológicos com teste *t student* (dados paramétricos) ou teste *U de Mann-Whitney* (dados não paramétricos) (tabela 07). Dentre os

pacientes recrutados neste estudo para os parâmetros hematológicos, analisamos 39 pacientes no grupo grave e 28 no grupo com desfecho leve. Observamos que pacientes com desfecho grave apresentaram número de hemácias significativamente menores ($3,8 \pm 0,98$ vs. $5,6 \pm 1,14$), hemoglobina 12,5 ([IQR] 9-14,2) vs. 16,4 ([IQR] 14,25-18,50), porcentagem de hematócrito 35,6 ([IQR] 27,9-39,1) vs. 55,2 ([IQR] 46,7-61,3), volume corpuscular médio (VGM) ($87,1 \pm 7,06$ vs. $96,3 \pm 6,9$), ($p < 0,0001$, respectivamente), quando comparado aos pacientes com desfecho leve. Em comparação com os pacientes leves, os pacientes com desfecho grave tiveram a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) (30 [IQR] 29,4-30,6) vs. 34,1 [IQR] 32,8-35,5, $p < 0,0001$) significativamente maiores. Contudo, não houve diferença estatística significativa para a concentração de hemoglobina corpuscular média (HGM) ($29,31 \pm 1,42$ vs. $29,5 \pm 2,34$, $p = 0,57$) e porcentagem de RDW (14 [IQR] 13,2-14,4 vs. 14,8 [IQR] 13,3-15,8, $p = 0,57$), entres os grupos estudados.

Tabela 07. Comparação dos parâmetros hematológicos entre pacientes investigados.

Variáveis	Grupo Leve (N=28)	Grupo Grave (N=39)	P
Hemácias (RBC) $10^6/\mu\text{L}$ ^a	$5,6 \pm 1,14$	$3,8 \pm 0,98$	<0,0001
Hemoglobina g/dL ^b	16,4 (14,25-18,50)	12,5 (9-14,2)	<0,0001
Hematócrito (%)	55,2 (46,7-61,3)	35,6 (27,9-39,1)	<0,0001
VGM (fL) ^a	$96,3 \pm 6,9$	$87,1 \pm 7,06$	<0,0001
HGM (pg/mL) ^a	$29,31 \pm 1,42$	$29,5 \pm 2,34$	0,57
CHCM g/dL ^b	30 (29,4-30,6)	34,1(32,8-35,5)	<0,0001
RDW (%) ^b	14(13,2-14,4)	14,8 (13,3-15,8)	0,53
Leucócitos Totais (mm^3) ^b	6.760 (5.382,5 - 7.850)	13.080 (9.360 - 18.520)	<0,0001
Neutrófilos (mm^3) ^b	3.670 (2.527,5 - 4.460)	11.589(6.888 – 16.702,5)	<0,0001
Linfócitos (mm^3) ^b	2.145 (1.832,5– 2.788,5)	966,28 (611 – 1488,24)	<0,0001
Monócitos (mm^3) ^b	475 (342,5 - 665)	526 (290,7 – 1065)	0,66
Eosinófilo (mm^3) ^b	150,0 (62,5 - 167,5)	0,00 (0,00 - 52,20)	<0,0001
Basófilo (mm^3) ^b	20 (10 – 30)	13,5 (0,00 – 13,4)	0,15
Plaquetas (mil/mm^3) ^a	$229,2 \pm 52,1$	$316,5 \pm 112,3$	<0,0003

Nota: ^a as variáveis paramétricas foram avaliadas pelo teste *t student*; ^b as variáveis não paramétricas foram avaliadas com teste U de Mann-Whitney. O valor de significância é de $p < 0,05$. **Legenda.** Desvio Padrão (\pm). Número total de pacientes (N). Volume Corpuscular Médio (VGM). Hemoglobina Corpuscular Média (HGM).

Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (**CHCM**). Distribuição das Células Vermelhas (**RDW**). Fentolitro (**fL**). Picograma por mililitro (**pg/mL**). Grama por mililitro (**g/mL**). Porcentagem (%). Milímetro cúbico (**mm³**).

Fonte: próprio autor, 2023.

A seguir avaliamos a contagem global e diferencial dos leucócitos em pacientes com desfecho grave e leve, durante a infecção por SARS-CoV-2 (tabela 07). Nossos resultados evidenciaram uma leucocitose (6.760 [IQR] 5.382,5 - 7.850 vs. 13.080 [IQR] 9.360 - 18.520, $p < 0,0001$) e neutrófilia (3.670 [IQR] 2.527,5 - 4.460 vs. 11.589 [IQR] 6.888 - 16.702,5, $p < 0,0001$), em pacientes com desfecho grave em relação a pacientes com desfecho leve. Nossos resultados sugerem uma linfopenia no grupo com desfecho grave (2.145 [IQR] 1.832,5 - 2.788,5 vs. 966,28 [IQR] 611 - 1488,24, $p < 0,0001$) e eosinopenia (150,0 [IQR] 62,5 - 167,5 vs. 0,00 [IQR] 0,00 - 52,20, $p < 0,0001$), quando comparado aos pacientes com desfecho leve. Não houve significância estatística para contagem de monócitos (475 [IQR] 342,5 - 665 vs. 526 [IQR] 290,7 - 1065, $p = 0,66$) e basófilos (20 [IQR] 10 - 30 vs. 13,5 [IQR] 0,00 - 13,4, $p = 0,66$), entre os grupos avaliados neste estudo.

Investigamos as plaquetas dos grupos estudados (Tabela 07). A contagem de plaquetas foi significativamente maior em pacientes com desfecho grave da COVID-19 em relação aos pacientes com sintomas leves (229,2 \pm 52,1 vs. 316,5 \pm 112,3, **** $p < 0,0003$).

5.2.1 Razão dos neutrófilos-linfócitos (RNL) e razão plaquetas-linfócitos (RPL) nos grupos investigados

Avaliamos se a razão neutrófilos-linfócitos dos pacientes com desfecho graves vs. leves estava alterada. Nossos resultados mostraram que, no grupo de pacientes com desfecho grave (87,6%) apresentaram a razão de neutrófilos-linfócitos (RNL) com escore maior que >5 (11,8 [IQR] 6,38 - 20,6) no primeiro dia de internação na UTI, quando comparado aos pacientes com desfecho leve com escore menor que <5 com mediana 1,58 (1,21 - 2,35) (Tabela 08).

Tabela 08. Razão Neutrófilos-Linfócitos (RNL)

	Todos os pacientes (N= 67)	Desfecho Leves (N=28)	Desfecho Graves (N=39)	p - valor
RNL	4,36 (1,77 -12,4)	1,59 (1,22 -2,32)	10 (6,50 -20,5)	$p < 0,001$

≥ 5	34 (50,7%)	0 (0,0%)	34 (87,2%)	p < 0,001
< 5	33 (49,3%)	28 (100%)	5 (12,8%)	

Nota. Os dados foram apresentados em mediana e intervalos interquartílicos. Os valores de p comparando os pacientes graves aos pacientes leves foram do teste Qui-Quadrado, teste exato de Fischer ou Teste U de Mann-Whitney. Nível de significância é $p < 0,05$. O score foi baseado no trabalho de LIU et al., 2021. **Legenda:** Razão Neutrófilos-Linfócitos (**RNL**).

Fonte: próprio autor, 2023.

Observamos que o valor referente ao RPL foi significativamente maior em pacientes graves quando comparados aos pacientes leves (0,29 [IQR: 0,21-0,52] vs. 0,10 (0,07- 0,13), $p < 0,0001$) (Tabela 09). Além disso, o RPL apresentou alteração em cerca de 76,9% dos pacientes com desfecho grave do COVID-19 demonstraram $RPL \geq 0,20$ em tratamento na unidade de terapia intensiva ($p < 0,001$).

Tabela 09. Razão de Plaqueta-Linfócito (RPL)

	Todos os pacientes (N= 67)	Grupo leve (N=28)	Grupo Grave (N=39)	p - Valor
RPL	0,18 (0,10 -0,33)	0,10 (0,07- 0,13)	0,29 (0,21 -0,52)	p < 0,001
$\geq 0,20$	34 (50,7%)	3 (10,7%)	30 (76,9%)	p < 0,001
< 0,20	33 (49,3%)	25 (89,3%)	6 (23,1%)	

Nota. Os dados são apresentados como mediana e intervalos interquartis, n (%), onde N corresponde ao número total de pacientes com dados disponíveis. (b) Os valores de p comparando pacientes graves a pacientes leves foram do teste Qui-quadrado, teste exato de Fisher ou teste U de Mann-Whitney. O nível de significância é $p < 0,05$. O ponto de corte foi determinado a partir do cálculo com índice de Youden. **Legenda:** razão plaqueta-linfócito (RPL).

Fonte: próprio autor, 2023.

5.2.2 A RNL e RPL apresentaram potencial valor prognóstico no COVID-19

Analizamos se a razão RNL e RPL apresentavam valor prognóstico em pacientes com desfecho grave do COVID-19. Os nossos resultados sugerem um valor prognóstico significativo para a razão de neutrófilos-linfócitos em pacientes graves, quando comparado a pacientes leves (AUC= 0,97; **** $p < 0,0001$; especificidade 85,71 e sensibilidade 97,44), bem como para razão plaquetas-linfócitos (AUC= 0,89; **** $p < 0,0001$; especificidade 92,86 e sensibilidade 76,92), respectivamente, para pacientes com desfecho grave (Figura 16).

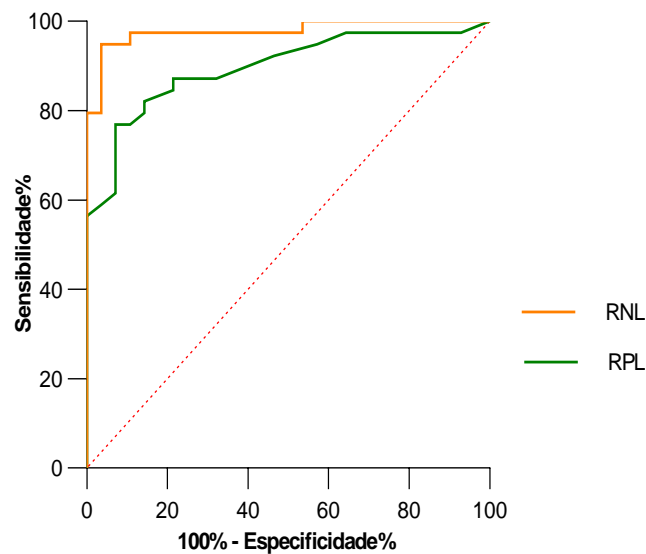


Figura 16. Análise de curva ROC para os parâmetros hematológicos RNL, RPL dos grupos com desfecho grave comparado ao grupo com desfecho leve.

7.2 Análise da expressão relativa por RT-qPCR

Investigamos se os genes de interesse: *SELPLG*; *ARG1*; *NOS2* e *ITGA4* apresentavam maior expressão nos grupos de estudos em relação ao gene referência *HPRT-1*. Como demonstrado na Figura 17A, houve uma expressão relativa significativamente maior do gene *SELPLG* no grupo de pacientes COVID-19 com desfecho grave, em relação ao grupo com desfecho leve COVID-19, tendo como referência a expressão do gene *HPRT-1* (**** $p < 0,0001$). O grupo com desfecho grave do COVID-19 apresentou maior expressão do gene *SELPLG* em comparação aos pacientes do grupo leve (1.125, [IQR] 0,6750-1,913 vs. 0,2700, [IQR] 0,065-0,7875). Em seguida, comparamos a expressão relativa do gene *ARG1* nos grupos com desfecho leve e grave. Observamos que, houve um aumento da expressão relativa significativamente maior para o gene *ARG1* em pacientes com desfecho grave e leve do COVID-19, quando comparados ao gene referência *HPRT-1* (2.850, [IQR] 1.100-6.425 vs. 1.420, [IQR] 0,540-3.010), (* $p = 0,032$) (figura 17B).

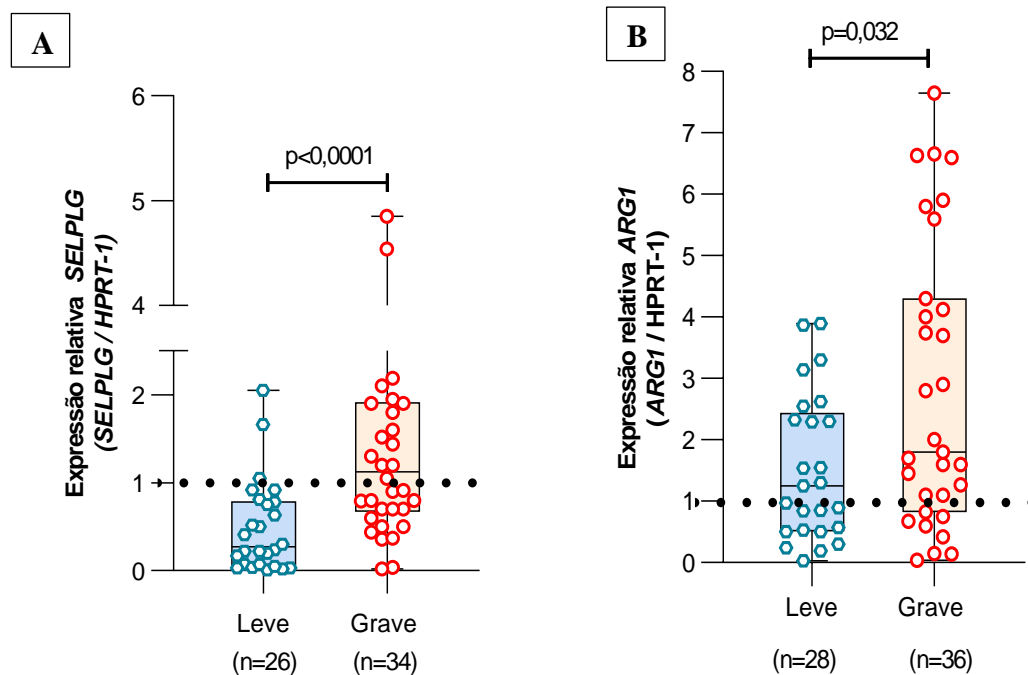


Figura 17. Comparação da expressão reativados para os genes (A) *SELPLG* (B) *ARG1* em pacientes com desfechos leve e grave em relação ao gene referência *HPRT-1*. A linha tracejada representa a expressão do gene referência *HPRT-1*. As linhas horizontais nos gráficos de caixa representam a mediana, as bordas da caixa representam os intervalos interquartis e os bigodes indicam o valor mínimo e máximo em cada grupo. Teste U de *Mann-Whitney* $p^{****}0,0001 - p^{*}0,032$.

Avaliamos os genes *NOS2* e *ITGA-4* através da expressão relativa entre os grupos investigados em comparação ao gene referência *HPRT-1*. Os resultados estão expressos na (Figura 18A, B). Estes resultados demonstram uma diferença não significativa para a expressão relativa do gene *NOS2* nos grupos de pacientes desfecho leve e grave em relação ao gene referência *HPRT-1* ($p > 0,45$). Comparamos as medianas e intervalos interquartis entre os grupos leve e grave. Como demonstrado, não houve uma maior expressão para o gene *NOS2* no grupo grave (0.300 [IQR] 0.0600 – 0.400 vs. 0.100 [IQR] 0.0500 – 0.4400) em relação ao grupo com desfecho leve. Além disso, observamos em nossos resultados uma expressão relativa não significativa para o gene *ITGA4* no grupo com desfecho leve e grave, quando comparado ao gene referência *HPRT-1* ($p = 0,085$). A comparação da mediana e intervalos interquartis não apresentou uma maior tendência de expressão para o gene *ITGA4* no grupo com desfecho grave (0.6450 [IQR] 0.2900 – 1.583 vs. 0.4150 [IQR] 0.1425 – 0.7675).

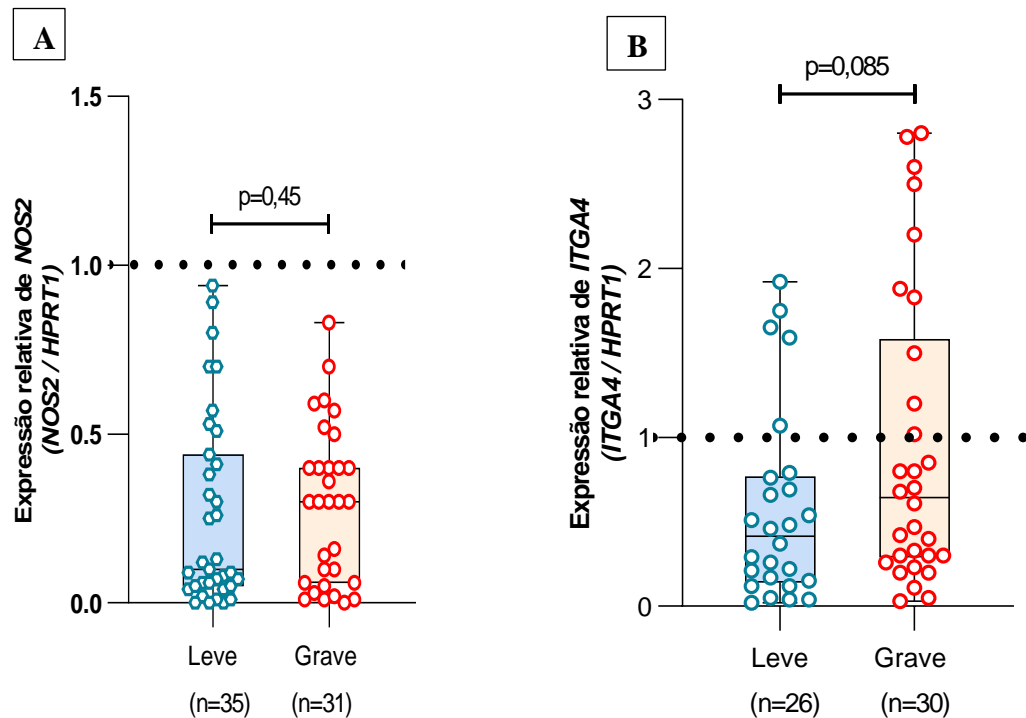


Figura 18. Comparação da expressão relativa dos genes (A) *NOS2* e (B) *ITGA4* em pacientes com desfechos leve e grave em relação ao gene referência *HPRT-1*. A linha tracejada representa a expressão do gene referência *HPRT-1*. As linhas horizontais nos gráficos de caixa representam a mediana, as bordas da caixa representam os intervalos interquartis e os bigodes indicam o valor mínimo e máximo em cada grupo. Teste U de *Mann-Whitney* $p=0,45$ – $p=0,085$.

5.3 Correlação entre o Cq dos genes *ARG1* e *SELPLG* entre os grupos com desfecho leve e grave do COVID-19

Analisamos uma possível correlação entre os genes *PSGL-1* e *ARG1* nos grupos de pacientes com desfechos leve e grave do COVID-19 (Figura 19 e 20), através do teste de correlação de Spearman. Conforme demonstrado, existe uma correlação positiva moderada entre as expressões dos genes avaliados. À medida que o Cq do gene *ARG1* aumenta, também aumenta o Cq do gene *PSGL-1* no mesmo paciente com desfechos leve do COVID-19 ($R^2=0,56$; correlação = 0,77 e $*p=0,001$). Nos pacientes graves, também observou-se correlação entre estes genes ($R^2=0,27$, correlação de 0,42 e $*p=0,007$).

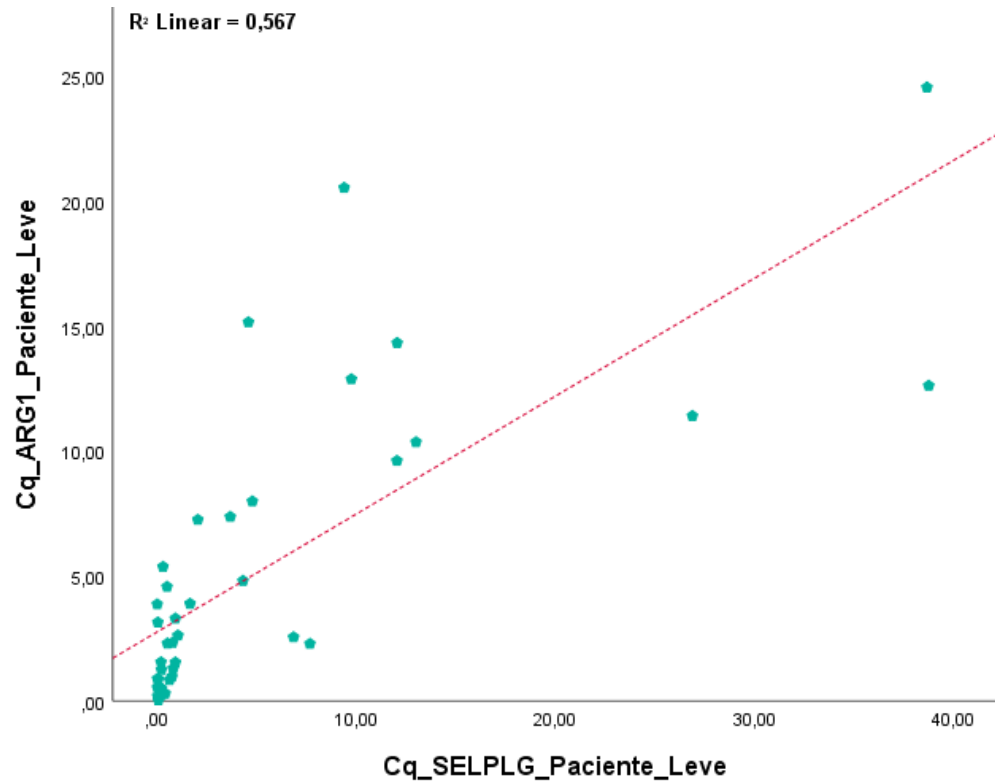


Figura 19. Correlação de Spearman entre os genes *ARG1* e *SELPLG* no mesmo paciente com desfecho leve do COVID-19.

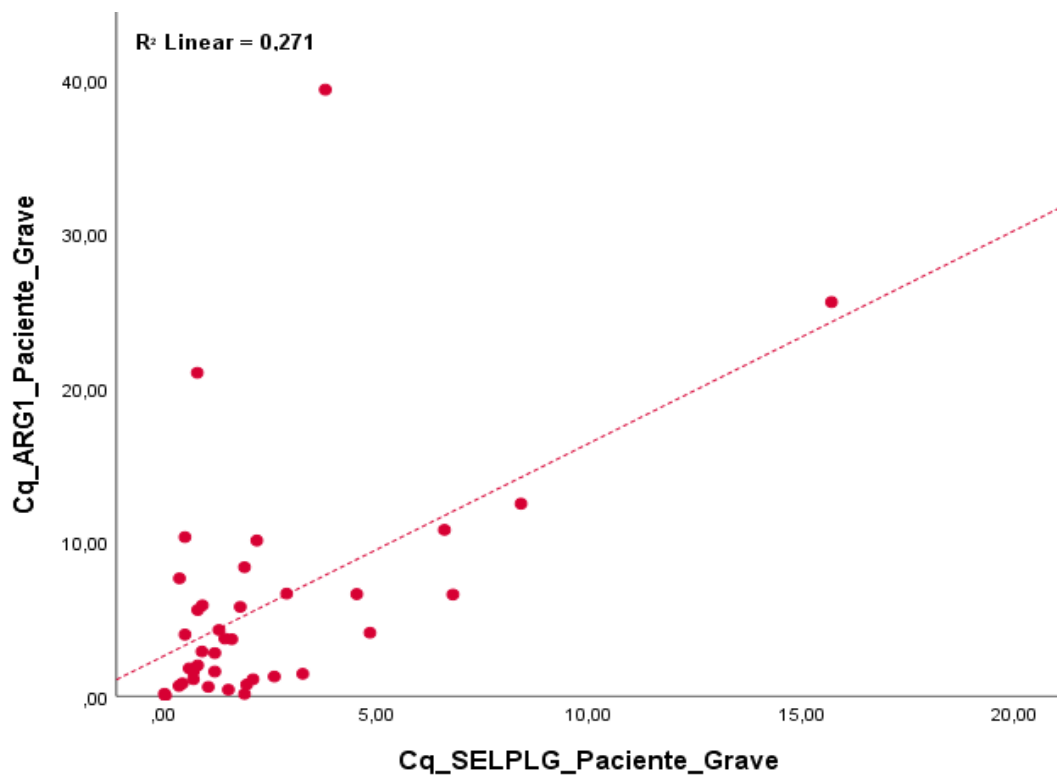


Figura 20. Correlação de Spearman entre os genes *ARG1* e *SELPLG* no mesmo paciente com desfecho grave do COVID-19.

5.4 Os genes *SELPLG* e *ARG1* são potenciais biomarcadores com valor prognóstico na COVID-19 grave

Analizamos se a expressão do gene *SELPLG* apresentava valor prognóstico para pacientes com COVID-19 grave, através da análise de curva ROC. Os nossos resultados mostraram que a expressão do gene *SELPLG* mostrou um valor diagnóstico significativo em pacientes com desfecho grave, quando comparados aos pacientes com desfecho leve (AUC= 0,82 com sensibilidade de 87,1% e especificidade de 62,5%, (**** $p < 0,0001$) (Figura 21).

Analizamos se a expressão do gene *ARG1* apresentava valor prognóstico em pacientes com desfecho grave no COVID-19, através da análise de curva ROC. Observamos em nossos resultados um valor diagnóstico significativo para a expressão do gene *ARG1* em pacientes com desfecho grave, quando comparados aos pacientes com desfecho leve (AUC= 0,66 com sensibilidade de 62,5 % e especificidade de 64%, * $p = 0,032$) (Figura 21). Além disso, estimamos os valores de corte relacionados aos genes *ARG1* e *SELPLG* foram de 1.575 e 0,4250, respectivamente (Tabela 10).

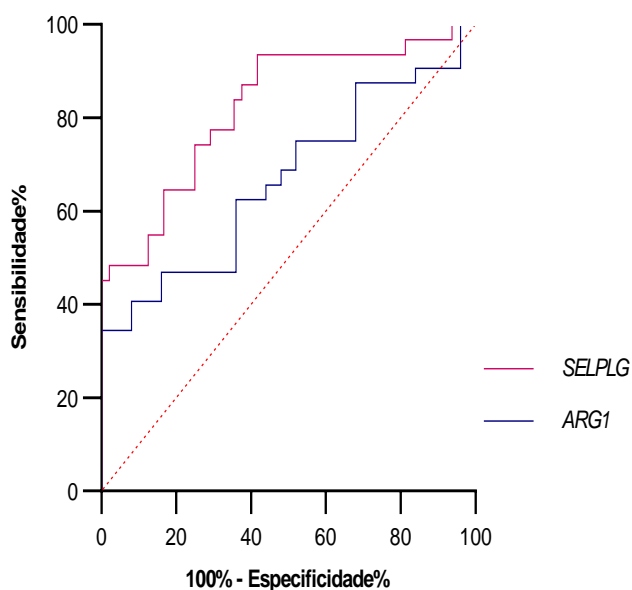


Figura 21. Análise de curva ROC para os genes *SELPLG* e *ARG1* entre os grupos investigados.

Tabela 10. Valor diagnóstico para os genes *ARG1* e *PSGL-1* associadas à gravidade da COVID-19.

Parâmetros	AUC (95% CL)	Ponto de corte	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	P value
<i>ARG1</i>	0.66 (0.947–1.000)	1.575	62.50%	64.0 %	0,032

SELPLG	0.82 (0.713-0,933)	0,4250	87.10%	62.50%	<0,0001
---------------	-----------------------	--------	--------	--------	---------

Nota. Abreviações: área sob a curva (AUC); O ponto de corte foi determinado a partir do cálculo com índice de Youden.

Fonte: próprio autor, 2023.

5.5 Níveis plasmáticos das proteínas P-selectina e PSGL-1 estão alterados em pacientes com desfecho grave do COVID-19

Investigamos os níveis das proteínas P-selectina/CD62P e seu contra-receptor PSGL-1/CD162 no plasma dos pacientes avaliados neste estudo. Conforme apresentado na figura 22A, nossos resultados demonstraram um aumento significativo nos níveis plasmáticos da proteína solúvel PSGL-1 no grupo com desfecho grave - mediana de 634,4 pg/mL ([IQR] 232,3-927,1), quando comparado ao grupo com desfecho leve - mediana de 215,1 pg/mL ([IQR] 49,33-815,4, ** $p=0,002$), respectivamente. Observamos que 13 pacientes do grupo grave e 5 pacientes do grupo leve tiveram resultados inferior a faixa de detecção do kit de ELISA utilizado, por este motivo foram retirados da análise. Além disso, nossos resultados demonstraram aumento significativo da proteína solúvel P-selectina no plasma dos pacientes com desfecho grave - mediana de 2.807 pg/mL ([IQR] 2.500-3.240), quando comparado ao grupo leve - mediana de 2.662 pg/mL [IQR] 2.083-3.111, * $p=0,039$), respectivamente (figura 22B).

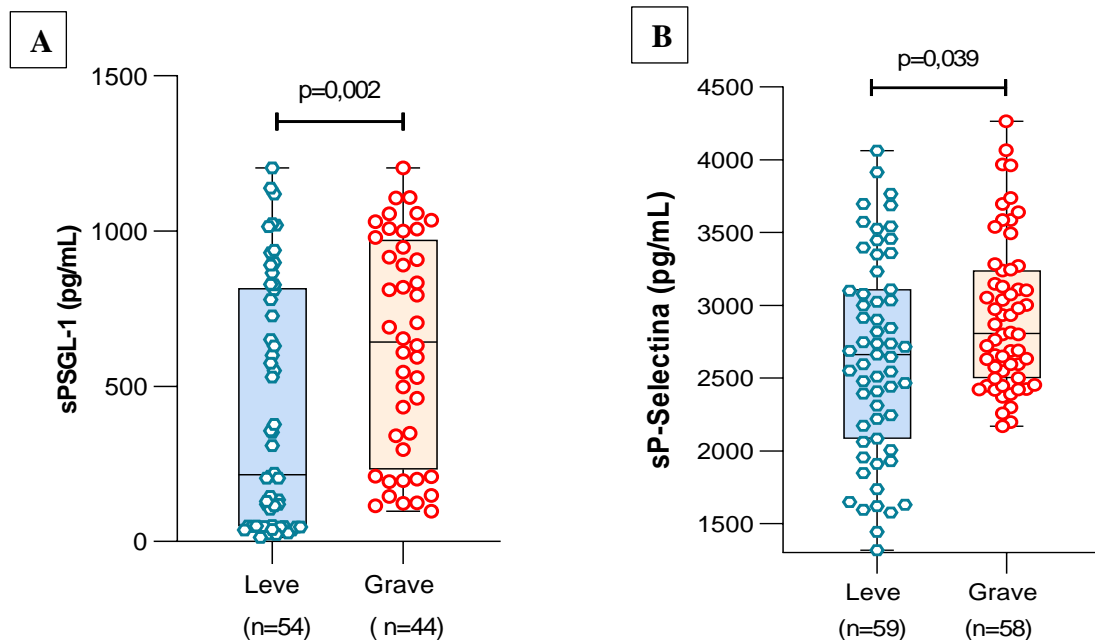


Figura 22. Níveis plasmáticos das proteínas (A) sPSGL-1 (B) sP-selectina nos grupos estudados. As linhas horizontais nos gráficos de caixa representam a mediana, as bordas da caixa representam os intervalos interquartis e os bigodes indicam o valor mínimo e máximo em cada grupo. Teste U de Mann-Whitney $p^{**}0,002 - p^{*}0,039$.

5.5.1 As proteínas sP-selectina e sPSGL-1 são potenciais biomarcadores da gravidade no COVID-19

Analisamos se as proteínas sPSGL-1 e sP-selectina possuíam ou não um valor diagnóstico em pacientes com desfecho grave do COVID-19, pelo teste da curva ROC (Figura 23). Os resultados apresentaram valor diagnóstico significativo da proteína sPSGL-1 para pacientes graves, em comparação aos pacientes com desfecho leve (** $p=0,002$, AUC= 0,67 com especificidade 59,26% e sensibilidade 68,18%), assim como a proteína sP-selectina apresentou valor diagnóstico significativo de gravidade na COVID-19 (* $p=0,039$, AUC= 0,61 com especificidade 52,54% e sensibilidade 58,62%). Os pontos de corte relacionados as proteínas sP-selectina e sPSGL-1 foram de 2.689 pg/ μ L, 0,4250 pg/ μ L, respectivamente (Tabela 11).

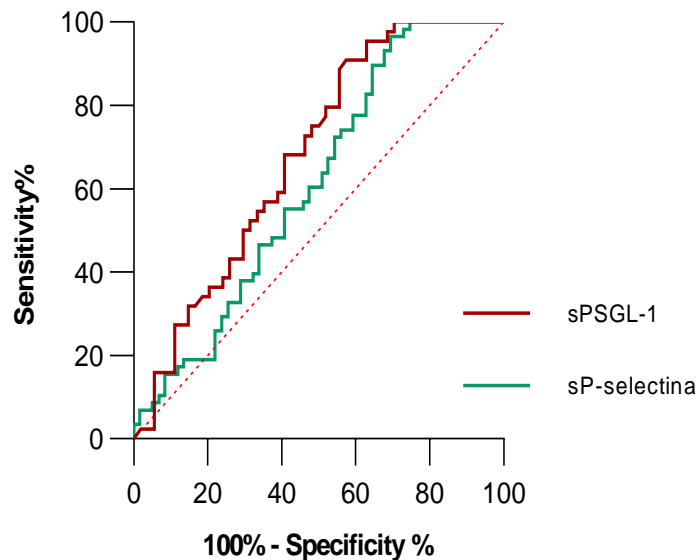


Figura 23. Análise de curva ROC para as proteínas sPSGL-1 e sP-selectina nos grupos investigados.

Tabela 11. Valor prognóstico para as proteínas associadas à gravidade da COVID-19.

Parâmetros	AUC (95% CL)	Ponto de corte	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	P value
sP-Selectina	0,61 (0.508-0.713)	2.689 pg/mL	58,62%	52,54%	0,039
sPSGL-1	0,67 (0.575-0.784)	405,2 pg/mL	68,18%	59,26%	0,002

Nota. Abreviações: área sob a curva (AUC); P-selectina solúvel (sP-selectina); glicoproteína ligante da P-selectina-1 (PSGL-1). O ponto de corte foi determinado a partir do cálculo com índice de Youden.

Fonte: próprio autor, 2023.

5.6 Correlação entre sPSGL-1 e sP-selectina por paciente

Investigamos uma possível correlação entre o aumento da proteína sPSGL-1 e o aumento da proteína sP-selectina nos pacientes com desfechos leve e grave da COVID-19 (Figura 24 e 25). Para tanto, comparamos os níveis plasmáticos da proteína PSGL-1 e P-selectina com o teste de correlação de Spearman. Conforme observado, os resultados sugerem que existe uma correlação positiva (fraca) entre estas duas proteínas. À medida que aumentou os níveis plasmáticos de PSGL-1, ocorreu o aumento da P-selectina nos pacientes com desfecho leve da COVID-19 ($R^2=0,064$, correlação de 0,32 e $*p=0,009$). Além disso, observamos em nossos resultados uma correlação positiva fraca entre o aumento dos níveis plasmáticos de PSGL-1 e P-selectina nos pacientes com desfecho grave da COVID-19. Conforme aumentava os níveis plasmáticos de PSGL-1, a P-selectina se elevava ($R^2=0,148$, correlação de 0,32 e $*p=0,006$).

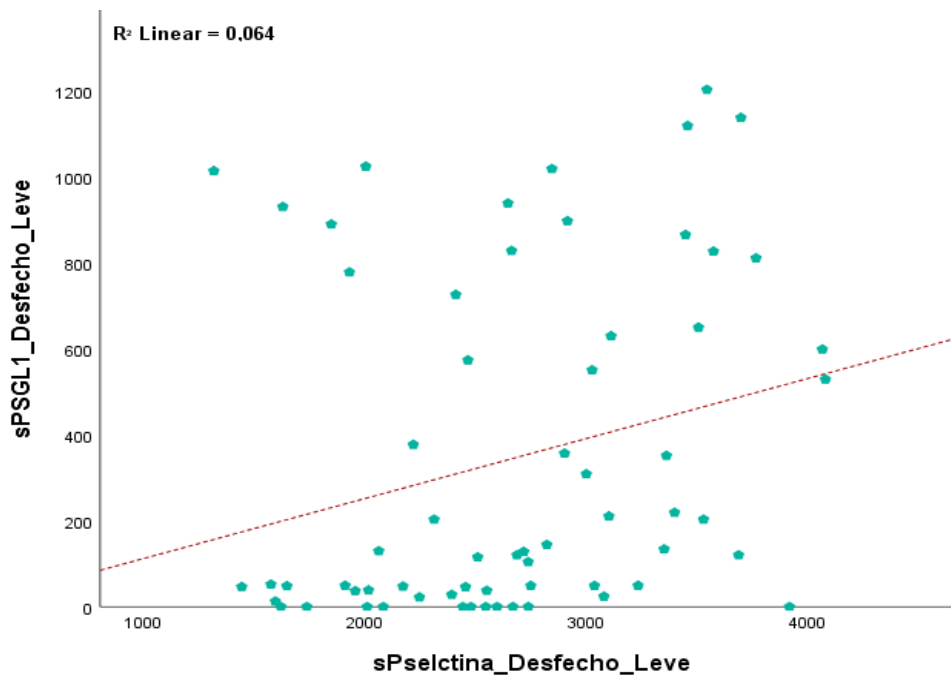


Figura 24. Correlação de Spearman entre a proteína sPSGL-1 e sP-selectina em pacientes com COVID-19 leve.

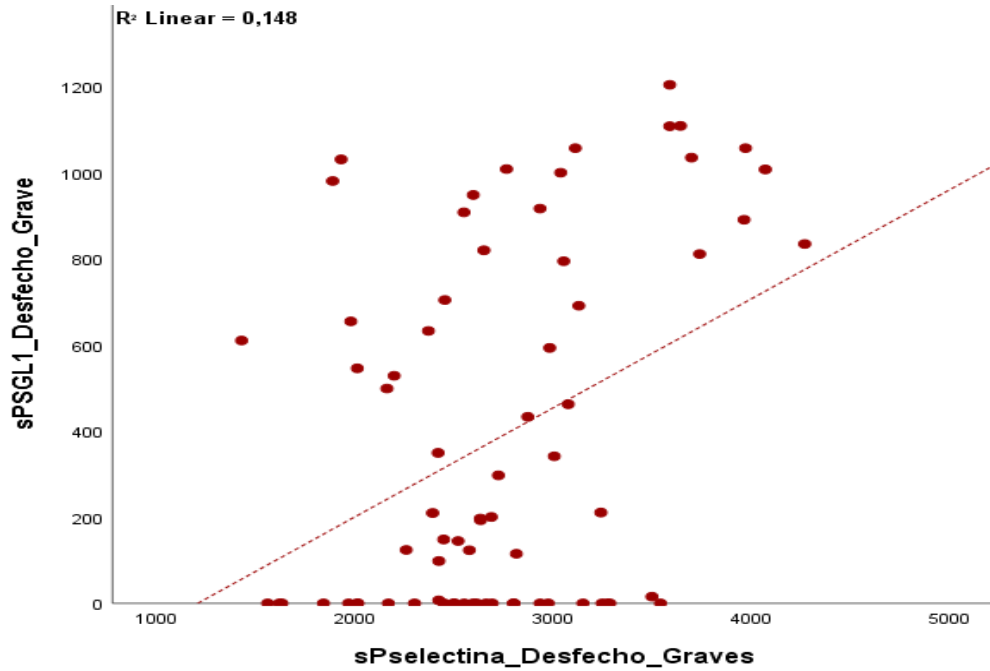


Figura 25. Correlação de Spearman entre a proteína sPSGL-1 e sP-selectina em pacientes com COVID-19 leve.

5.7 Razão sPSGL-1-sP-selectina

Como sPSGL-1 é um ligante de alta afinidade para sP-selectina, investigamos se a relação sP-selectina/sPSGL-1 pode prever o resultado da doença de COVID-19 (Tabela 12). Observamos que a relação sP-selectina/sPSGL-1 foi significativamente maior no grupo leve (13,04 [IQR] 3,30 – 31,76, $p < 0,007$) em comparação ao grupo grave (4,57 [IQR] 3,24 – 11,89). Não houve significância dos escores entre os grupos ($p = 0,15$).

Tabela 12. Razão sP-selectina-sPSGL-1

	Todos os pacientes (N= 104)	Pacientes Leves (N=50)	Pacientes Graves (N=54)	p - valor
Razão sP-selectina-sPSGL-1				$p < 0,007$
≤ 5	47 (45,2%)	19 (38%)	28 (51,9%)	$p = 0,15$
≥ 5	57 (54,8%)	31 (62%)	26 (48,1%)	

Nota. Os dados foram apresentados em mediana e intervalos interquartílicos. Os valores de p comparando os pacientes graves aos pacientes leves foram do teste Qui-Quadrado, teste exato de Fischer ou Teste U de Mann-Whitney. Nível de significância é $p < 0,05$. **Legenda:** razão sP-selectina-sPSGL-1(RPP).

Fonte: próprio autor, 2023.

5.8 Análise Multivariada

A presença de modificadores de efeito e confundidores foi investigada por meio da construção de um modelo teórico conceitual sobre as associações investigadas. Em seguida, também foi investigada a presença de covariáveis de interação por meio do teste de máxima verossimilhança ($p < 0,05$) e, na sequência, foi realizada a identificação de covariáveis de confusão por meio da estratégia backward caso a covariável tivesse produzido uma diferença relativa de 10% na associação medição em relação ao modelo saturado. Na análise de regressão logística múltipla, as medidas de associação ajustadas foram estimadas considerando as covariáveis idade, sexo e raça/cor da pele como fatores de confusão. A Tabela 3 resume as características dos pacientes.

Tabela 13. Análise multivariada de marcadores moleculares associados a dados clínicos e sociodemográficos

Parâmetros	Análise Ajustada*		
	P	OR	IC
RNL	0,001	50,67	6.72- 260.7
RPL	0,004	14,40	2.76-57.3
<i>ARG1</i>	0,479	1,695	0,393-7,311
<i>SELPLG</i>	0,005	15,758	2,264-109,670
sPSGL-1	0,004	5,749	1,728-19,123
sPselecitina	0,059	2,696	0,964-7,543

* Análise ajustada por sexo, idade e raça/cor

Observamos na análise univariada, que as variáveis idade, sexo, raça, RNP, RNL, expressão gênica relativa de *ARG1*, *SELPLG*, assim como os níveis plasmáticos de sP-selectina e sPSGL-1 demonstraram associações significativas com a gravidade da COVID 19. Contudo, após uma análise ajustada, observamos que para idade, sexo e raça, apenas os parâmetros NLR, PLR e a expressão de *SELPLG* e sua proteína sPSGL-1 demonstraram ser preditores independentes da gravidade na COVID-19.

5.9 Ensaio de expressão genica e dados sociodemográficos

Investigamos as características clínicas e sociodemográficas da coorte submetida ao ensaio de RT-qPCR para os genes investigados. Pacientes graves com COVID-19 apresentaram maior frequência de sintomas como dispneia (n= 10, 47,6%), febre (n= 13, 61,9%) e comorbidades diabetes (n=7, 33,3%) e doenças cardiovasculares (n= 9, 48,8%). Na coorte com COVID-19 leve, o sintoma mais frequente foi fadiga/mialgia (n= 16, 76,1%). A Tabela 4 resume as características dos pacientes.

Tabela 14. Análise de dados sociodemográficos para coorte avaliada na expressão gênica

Variáveis	Desfecho Leve (n=21)	Desfecho Grave (n=21)	OR	p-value
Idade (anos)^a	43,0 (33,5-55,0)	50,0 (39,5-58)		0,29
Sexo feminino (n, %) ^b	12 (57,14%)	12 (57,14%)		> 0,99
Etnia (n, %) ^b				
Branco	6 (28,5%)	2 (9,5%)	0,26	0,11
Negros	15 (71,4%)	18 (85,7%)	2,40	0,25
Outros	0 (0,0%)	1 (4,7 %)		0,31
Sintomas (n, %) ^b				
Tosse seca	12 (57,1%)	15 (71,4%)	0,53	0,33
Dispneia	2 (9,5%)	10 (47,6%)	0,11	0,006
Febre	6 (28,5%)	13 (61,9%)	0,24	0,030
Fadiga/ Mialgia	16 (76,1%)	6 (30,0%)	7,40	0,003
Comorbidade (n, %) ^b				
Hipertensão	3 (14,2%)	8 (38,1%)	0,27	0,070
Diabetes Mellitus	1 (4,7%)	7 (33,3%)	0,10	0,018
Doenças Cardiovascular	1 (4,7%)	9 (48,8%)	0,06	0,003
Doença Renal	4 (19,0%)	6 (30,0%)	0,54	0,41
Obesidade	4 (19,0%)	7 (33,3%)	0,47	0,29
DPOC*	1 (4,7%)	1 (4,7 %)		> 0,99

(a) Mediana (intervalo interquartil); (b) Teste qui-quadrado; Abreviações: *DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.

6 CAPÍTULO 6 - DISCUSSÃO

O COVID-19 é uma patologia multissistêmica tendo como eventos determinantes a tempestade de citocinas, desregulação imunológica, hiperinflamação, hipercoagulabilidade e lesão endotelial (AID *et al.*, 2020; FAN *et al.*, 2022; GARCIA *et al.*, 2022; VAN *et al.*, 2022). A identificação precoce de pacientes em risco na COVID-19 grave pode evitar a sobrecarga do sistema de saúde e garantir que o tratamento adequado seja fornecido aos que mais precisam. Este estudo investigou uma coorte de pacientes nas duas principais cidades da Bahia: Feira de Santana e Salvador. Foram analisados seis biomarcadores e destes quatro biomarcadores (*SELPLG*, *ARG1*, sP-selectina e sPSGL-1) mostraram diferenças significativas nos níveis entre pacientes com sintomas leves e graves da COVID-19. Descobrimos em nossos resultados que pacientes com desfecho grave da doença COVID-19, uma prevalência de idosos (> 60 anos), homens (65,5%, $p = 0,007$) e maior prevalência de indivíduos negros (86,2%, $p < 0,0001$). Os sintomas mais comuns observados foram tosse, febre, mialgia e dispneia. Os parâmetros laboratoriais de inflamação (NLR e PLR) foram significativamente maiores na COVID-19 grave ($p < 0,0001$), indicando processo inflamatório sistêmico em andamento. O aumento da expressão de *SELPLG* e *ARG1* em leucócitos, juntamente com níveis plasmáticos elevados de sP-selectina e sPSGL-1, foram associados a sintomas graves e podem ser indicadores prognósticos potenciais para COVID-19. Este conjunto de resultados são indicadores de desregulação nas respostas imunológicas e células endoteliais, em homens idosos e negros e estão correlacionados com a gravidade na COVID-19.

Identificamos em nossa coorte de pacientes com desfecho grave uma maior prevalência de homens idosos, portadores de comorbidade, tais como hipertensão arterial, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e doenças renais, estes fatores clínicos estavam associados à gravidade da doença. Demostramos em nossa coorte que pacientes com desfecho grave eram em sua maioria pretos. Corroborando com nosso resultado, um estudo brasileiro mostrou resultados similares aos nossos dados, concernente a raça, cerca de (45,7%) eram pardos (MALTA *et al.*, 2021). Um estudo conduzido nos Estados Unidos – Atlanta demonstrou que pacientes afro-americanos foram mais afetados pelo COVID-19, quando comparados aos pacientes de outras raças (MARMARCHI *et al.*, 2021). Estes resultados demonstram que, possivelmente, o COVID-19 grave acometeu, principalmente as pessoas economicamente menos favorecidas. Demostramos que os sintomas mais frequentes para pacientes com desfecho grave foram tosse seca, dispneia, febre e fadiga/mialgia. Resultados semelhantes foram

evidenciados em um estudo epidemiológico conduzido no estado de Minas Gerais que, investigou 325 infectados por SARS-CoV-2 (SILVA *et al.*, 2022). Corroborando com nossos dados, outro estudo demonstrou que a maior prevalência foi do sexo masculino (60,76%) no grupo com desfecho grave do COVID-19 (SILVA *et al.*, 2022). Em contrapartida, um estudo realizado no Pernambuco teve sua população majoritariamente, composta pelo sexo feminino (50,38%) no grupo grave (DE MAGALHÃES *et al.*, 2020). Por outro lado, no Japão um estudo foi conduzido por Kojima *et al.* (2023), investigou 450 pacientes mostrando uma prevalência (66,4%) para o sexo masculino com idade média de 58 anos, além disso esta coorte apresentou pelo menos uma comorbidade pré-existente (KOJIMA *et al.*, 2023). Esses dados sugerem que, uma maior frequência do sexo masculino, ser idoso com comorbidades são fatores de risco que favorecerem o agravamento do quadro clínico no COVID-19.

Demostramos em nossos resultados evidências de alterações nos parâmetros hematológicos dos pacientes com desfecho grave acometidos pelo COVID-19. Os parâmetros hematimétricos, tais como: hemácias, hemoglobina, hematócrito e volume corpuscular médio (VGM), estavam significativamente menores em pacientes com desfecho grave, por outro lado, houve uma maior proporção do número de plaquetas para pacientes com desfecho grave em relação aos pacientes com desfecho leve. Neste sentido, um estudo observacional retrospectivo desenvolvido na Itália mostrou resultados semelhantes com redução significativa para hemoglobina e hematócrito em pacientes graves, quando comparado a pacientes com sintomas leves/moderados do COVID-19 (HENRY *et al.*, 2020). Contrapondo estes achados, um estudo caso-controle conduzido em Jeddah evidenciou uma diminuição significativa na contagem de plaquetas em pacientes com COVID-19 grave em relação aos pacientes controles (KAMEL *et al.*, 2021). Além disso demonstramos que existem diferenças nas células do sistema imunológicos, observamos que pacientes com desfecho grave apresentaram leucocitose, neutrofilia e linfopenia. Corroborando com nossos achados, um estudo brasileiro investigou uma amostra populacional no estado do Paraná com 121 pacientes, este estudo demonstrou que pacientes graves exibiram leucocitose com neutrofilia em relação aos pacientes com COVID-19 moderado e controle. Porém, em contraste com nossos achados, este mesmo estudo não foi capaz de demonstrar diferença significativa entre os grupos de pacientes investigados para a contagem de linfócitos (OLIVEIRA *et al.*, 2022). Por outro lado, um estudo transversal de centro único, desenvolvido em Jharkhand – Índia com 148 pacientes estratificados em COVID-19 leve, moderado e grave, demonstrou leucocitose com neutrofilia e linfopenia em pacientes com COVID-19 grave (ANURAG *et al.*, 2020). Estes resultados podem ser explicados de

forma parcial, pois existem diferenças genéticas, devido à alta miscigenação apresentada pela população brasileira, além da diferença do número amostral da população investigada em nosso estudo. Mesmo com estas possíveis diferenças entre as populações investigadas, a maioria dos estudos concordam que a leucocitose, com neutrofilia e linfopenia são parâmetros associados a gravidade no COVID-19.

Além disso, demonstramos em nossos achados que, cerca de 97% dos pacientes com desfecho grave internados em UTI apresentaram RNL aumentada, assim como, 89% exibiram alterações no RPL, sendo biomarcadores marcantes nesta população investigada. Retificando nossos dados, um estudo retrospectivo conduzido no Hospital das Clínicas em Campinas, investigou 320 prontuários de pacientes internados sobreviventes e não sobreviventes ao COVID-19 grave. Os autores evidenciaram em seus resultados que o RNL era maior desde o momento da internação em pacientes não sobreviventes, quando comparado aos pacientes sobreviventes a infecção do COVID-19. Ademais, os autores demonstraram que RPL apresentou redução significativa em pacientes não sobreviventes (ALAGBE *et al.*, 2021). Um estudo clínico conduzido na Cidade do México demonstrou que a RPL era maior em pacientes com COVID-19 grave, quando comparado a pacientes não graves (CARRANZA LIRA & GARCIA ESPINOSA, 2022). Confirmando estes achados, um estudo avaliou 411 pacientes com COVID-19 grave internados em um hospital da Catania-Itália, a análise mostrou que o RNL (AUC=0,77) e RPL (AUC=0,57) foram parâmetros preditivos para morte intra-hospitalar (REGOLO *et al.*, 2022). Outro estudo demonstrou que pacientes graves apresentaram o RNL significativamente maior (score ≥ 5), quando comparado aos pacientes não graves com COVID-19 (score < 5) (LIU *et al.*, 2020). De acordo com estes dados, a relação neutrófilos-linfócitos (RNL) e plaqueta-linfócitos (RPL) são biomarcadores prognósticos e preditivos da gravidade no COVID-19, por serem marcadores de hiperinflamação sistêmica e desregulação imunológica.

Investigamos a expressão relativa dos genes *SELPLG*, *ARG-1*, *NOS2* e *ITGA-4* na população estudada. Descobrimos em nossos resultados que, o gene *NOS2* exibiu uma expressão não significativa entre os grupos investigados. Por outro lado, um estudo desenvolvido em Nápoles por Gelzo *et al.* (2022), investigou 35 pacientes acometidos pela primeira onda do COVID-19 e 153 pacientes compuseram o grupo da segunda onda. Os pacientes sobreviventes ao internamento exibiram uma mediana de 1,3ng/mL da proteína sérica iNOS, quando comparado aos pacientes que sucumbiram ao COVID-19 grave com 3,3ng/mL. Entretanto, de acordo com nossos achados Gelzo *et al.* (2022) afirmou que os pacientes de

segunda onda não exibiram diferença significativa para os níveis séricos de iNOS (GELZO *et al.*, 2022). Um estudo desenvolvido no Irã investigou os níveis de óxido nítrico (NO) em 25 pacientes com pneumonia grave por COVID-19 e 25 pacientes controles. Os resultados mostraram que indivíduos controles exibiram maiores níveis de nitrato e nitrito (metabólitos do NO) no sangue em relação aos pacientes graves com COVID-19 (ALAMADARI *et al.*, 2022). A iNOS tem a função de viabilizar a produção do óxido nítrico (NO) sendo uma molécula vasodilatadora, importante para o mecanismo microbicida produzido pelo sistema imunológico inato (DUARTE *et al.*, 2022). Os resultados discutidos não evidenciaram uma correlação para níveis da proteína iNOS e produção NO nos pacientes investigados com COVID-19 grave. Apesar do aumento significativo na expressão do gene NOS2/iNOS relatado por Gelzo *et al.*, em pacientes com desfecho grave do COVID-19, pode não corresponder ao aumento da atividade da proteína iNOS em infecção do SARS-CoV-2. Embora, altos níveis de iNOS são associados a uma maior biodisponibilidade de NO, estes achados reforçam o entendimento de que não é claro o papel da iNOS/NOS2 no COVID-19 grave, sendo pertinentes novos estudos clínicos para possíveis esclarecimentos.

Os nossos achados evidenciaram uma expressão relativa não significativa do gene *ITGA-4* nos grupos avaliados neste estudo. Um Estudo anterior demonstrou que, as integrina estão ligados à patogênese de muitos estados de doença (neoplasias, trombose, doenças vasculares e doenças autoimunes) (CRUZ-PULIDO; OUMA; KENNEY, 2022). Outro estudo demonstrou a expressão aumentada do gene *ITGA-4* presente em espécimes pulmonares de crianças que faleceram acometidos por doença de Kawasaki (DK), quando comparados a controles saudáveis. Sugerindo que o gene *ITGA-4/* $\alpha^4\beta^1$ provavelmente contribua para patogênese da vasculopatia na KD, promovendo a adesão dos leucócitos e inflamação nas paredes das artérias cardíacas (SARTORI *et al.*, 2022). Embora, até onde sabemos, a literatura não dispõe de achados clínicos associando o gene *ITGA-4/* integrina $\alpha^4\beta^1$ a gravidade em pacientes com COVID-19.

Para investigar o possível estresse metabólico nos leucócitos, mensuramos a expressão relativa do gene *ARG1*. Demostramos que cerca de 66% dos pacientes com desfecho grave apresentaram superegulação do gene *ARG1* nos leucócitos totais, mas, não em pacientes com desfecho leve. Neste sentido, o gene *ARG1* pode ser considerado como possível biomarcador de gravidade no COVID-19. Estudos anteriores mostram expressão exacerbada do gene *ARG1* em pacientes com sepse (CALDWELL *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2022). Confirmando nossos achados, um estudo de caso-controle demonstrou que o gene *ARG1* estava regulado

positivamente em leucócitos de pacientes com COVID-19 grave, além disso, a análise de curva ROC mostrou que cerca de 84% dos pacientes graves apresentaram aumento do gene *ARG1*, demonstrando potencial para biomarcador da gravidade (DERAKHSHANI *et al.*, 2021). Um estudo conduzido por Bost *et al.*, (2021), mapeou a resposta imunológica em uma coorte de pacientes com COVID-19. Os resultados demonstraram que havia uma relação clara entre a expressão média do gene *ARG1* em monócitos imunossupressores de pacientes com COVID-19 grave, quando comparado aos pacientes com sintomas leves/moderados (BOST *et al.*, 2021). Células supressoras derivadas de mieloides granulocíticas (G-MDSC / CD66b+) foram encontradas em autopsia pulmonar de pacientes com COVID-19 grave, as G-MDSC exibiam Arg⁺ em seu citoplasma, além da arginase-1 em maior concentração no plasma (DEAN *et al.*, 2021). A arginase-1 é sugerida como a principal causa para depleção da L-arginina no microambiente, comprometendo a resposta das células inatas e células T pela via do interferon em pacientes com desfecho do COVID-19 (DEAN *et al.*, 2021). Além disso, o aumento da arginase-1 pode favorecer a baixa produção de NO e aumento da L-ornitina desencadeando problemas estruturais na vasculatura (CALDWELL *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2022). Esses dados sugerem uma possível participação do gene *ARG1*, assim como da proteína arginase-1 na gravidade do COVID-19, podendo contribuir para a hipoxia e lesão endotelial, embora mais estudos ainda sejam necessários para determinar os mecanismos envolvidos no aumento na expressão do gene *ARG1* e sua associação com a gravidade do COVID-19.

Para analisar a disfunção endotelial, investigamos o gene *SELPLG* e as proteínas sPSGL-1 e sP-selectina nos grupos avaliados neste estudo. Aqui, mostramos que gene *SELPLG* estava superregulado nos leucócitos totais em cerca de 82% dos pacientes com desfecho grave do COVID-19, em relação aos pacientes com desfecho leve, sendo um biomarcador da gravidade. Ratificando nossos achados, Yatim *et al.* (2021), conduziu um estudo em Paris/França com duas coortes independentes com COVID-19. Corroborando com nossos resultados, Yatim *et al.* (2021), evidenciou que o gene *SELPLG* foi um biomarcador preditivo de intubação para cerca de 80% dos pacientes COVID-19 grave e crítica (YATIM *et al.*, 2021). Semelhantemente, um estudo clínico recente evidenciou que o gene *SELPLG* foi relacionado com a produção de armadilhas extras celulares de neutrófilos (NETs) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (HANATA *et al.*, 2022). Um estudo brasileiro conduzido por Veras *et al.* (2020), revelou que as NETs estão presentes de forma marcante no plasma de pacientes com COVID-19 grave, quando comparado a pacientes controles (VERAS *et al.*, 2020). A expressão aumentada do gene *SELPLG* em pacientes com COVID-19 parece estar associada com a

gravidade da doença.

Investigamos o papel do gene *SELPLG* na COVID-19 grave, para tanto mensuramos a proteína PSGL-1 no plasma dos pacientes participantes deste estudo. Demostramos que as concentrações da sPSGL-1 foram significativamente maiores em pacientes com COVID-19 grave. Notavelmente, cerca de 67% dos pacientes com desfecho grave apresentaram níveis plasmáticos elevados da PSGL-1, sendo um potencial biomarcador da gravidade para este grupo. Corroborando com nossos resultados, um estudo clínico conduzido no México por Fricke-Galindo *et al.* (2022), avaliou 450 pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 estratificados em pacientes dependentes de ventilação mecânica invasiva e não invasiva. Os resultados evidenciaram que os níveis de PSGL-1 aumentaram significativamente em pacientes com COVID-19 grave, quando comparado aos pacientes controles/ leves e moderados (FRICKE-GALINDO *et al.*, 2022). Um estudo *in vitro* demonstrou que monócitos ativados produzem fator tecidual rapidamente pela interação da P-selectina e seu contrareceptor PSGL-1 (IVANOV *et al.*, 2019). Em contrapartida, um estudo *in vitro* com células VERO infectadas com pseudovírus do SARS-CoV-2 neutralizou a incorporação das glicoproteínas spike (S) do SARS-CoV-2 bloqueando a ligação do pseudovírus e a infecção das células-alvo (HE *et al.*, 2020). Este achado foi semelhante em dois estudos anteriores, onde a entrada do vírus da imunodeficiência humana (HIV) em células alvo foram neutralizadas pela proteína PSGL-1 da célula hospedeira (FU *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020). O papel da proteína PSGL-1 em infecção vem sendo investigado a bastante tempo (SAKO *et al.*, 1993). Neste contexto, um estudo clínico anterior avaliou camundongos sensibilizados e desafiados com pólen que posteriormente, desenvolveram sinais clínicos compatíveis com conjuntivite alérgica humana. Os autores demonstraram que, o grupo de camundongos tratados com sPSGL-1 não desenvolveram hiperinflamação ocular, quando comparados ao grupo controle (STRAUSS *et al.*, 1999). Reafirmando estes resultados, um estudo com camundongos desafios com aerossol ovalbumina (Ova) que mimetiza a asma humana e hiper-reatividade das vias aéreas (AHR) em camundongos foi desenvolvido por Borchers *et al.* (2001). Os autores demonstraram em seus resultados que a administração de uma forma solúvel de PSGL-1 resultou na redução de 80% dos eosinófilos e 50% de linfócitos no lavado broncoalveolar das vias aéreas no modelo de hiper-reatividade (AHR) (BORCHERS *et al.*, 2001). Embora, mais estudos sejam necessários para esclarecer o papel da proteína sPSGL-1 na gravidade do COVID-19, nosso estudo demonstrou que existe uma associação da proteína sPSGL-1 e do gene *SELPLG* na gravidade da doença.

Neste contexto, demonstramos com a análise multivariada que o gene SELPLG e a proteína sPSGL-1 como preditores da gravidade na COVID-19. Nossos resultados corroboram com estudos anteriores sobre disfunção e hiperinflamação na patogênese dos resultados da COVID-19 grave (XU, ILYAS & WENG, 2023; RUHL *et al.*, 2021). O gene SELPLG e a proteína sPSGL-1 são integrantes fundamentais presentes nos leucócitos, desempenhando papéis fundamentais na modulação das interações entre leucócitos e endotélio durante a inflamação. Consequentemente, nossos resultados contribuem para a hipótese de que a disfunção endotelial pode contribuir e influenciar significativamente para o desenvolvimento de casos graves na COVID-19, possivelmente mediando respostas imunes aberrantes e complicações vasculares (NICOSIA *et al.*, 2021). Neste sentido, nossos achados destacam a importância de explorar terapias direcionadas para mitigar a disfunção e hiperinflamação como estratégias potenciais para melhorar o manejo clínico de pacientes com casos graves da COVID-19.

Para determinar o estado de adesão dos leucócitos ao endotélio e provável envolvimento com ativação da coagulação, dosamos os níveis plasmáticos da proteína P-selectina. Descobrimos que a sP-selectina estava com níveis plasmáticos significativamente maiores em pacientes com desfecho grave do COVID-19, mas não no grupo com desfecho leve. Ademais, 61% dos pacientes com desfecho grave pelo COVID-19 apresentaram aumento da proteína sP-selectina, sendo um biomarcador da gravidade. Corroborando com nossos achados, Hottz *et al.* (2020), conduziu um estudo de coorte no Rio de Janeiro investigando 35 pacientes admitidos em UTI com COVID-19 grave e pacientes ambulatoriais com sintomas leves e assintomáticos e controles saudáveis. Como resultado, pacientes com desfecho grave exibiram aumento na expressão da P-selectina na superfície das plaquetas (CD63), em relação aos outros grupos investigados (HOTTZ *et al.* 2020). De forma semelhante, outro estudo brasileiro multicêntrico demonstrou níveis maiores de sP-selectina em pacientes com COVID-19, quando comparado aos pacientes leves/moderados (DE MORAIS BATISTA *et al.* 2022). Ainda de acordo com estes achados, um estudo observacional prospectivo desenvolvido na França, avaliou 29 pacientes admitidos em UTI com SDRA por COVID-19 e 9 pacientes com sepse desenvolvida por outros patógenos e controles saudáveis. Os autores evidenciaram que pacientes com COVID-19 grave exibiram níveis significativamente maiores de sP-selectina (CD62P), quando comparado a pacientes controles (GARCIA *et al.*, 2022). Na Turquia pesquisadores demonstraram em estudo de caso-controle que os níveis de sP-selectina foi significativamente maior em pacientes com COVID-19 grave, quando comparado aos pacientes leves (KARSLI *et*

al., 2022). Um estudo de coorte na França demonstrou que pacientes com COVID-19 grave e crítico apresentaram altos níveis de sP-selectina, além disso os autores relataram que a sP-selectina apresentou-se como potencial biomarcador para intubação (AUC = 0,67) e morte intra-hospitalar (AUC = 0,74) na gravidade do COVID-19 (YATIM *et al.*, 2022). Outro estudo clínico de coorte mostrou que a sP-selectina e sE-selectina, estavam significativamente elevados em pacientes que não sobreviveram ao COVID-19, quando comparados aos pacientes sobreviventes (VASSILIOU *et al.*, 2021). Além disso, o SARS-CoV-2 pode infectar plaquetas e monócitos pela com ACE2, ativando de forma intensa monócitos e plaquetas, essa ativação acontece mediante a proteína spike dependente de plaquetas, interagindo com a P-selectina da plaqueta - PGSGL-1 do monócito e CD40L/CD40 (LI *et al.*, 2022).

Neste estudo demonstramos que os níveis da proteína sP-selectina foi 4 vezes maior, quando comparado aos níveis da proteína sPSGL-1 em pacientes graves. Um estudo francês demonstrou que os níveis da proteína PSGL-1 aumentaram de forma progressiva em pacientes com mais de 10 dias com sintomas graves do COVID-19 (FRICKE-GALINDO *et al.*, 2022). Estudos anteriores demonstraram que a molécula de sPSGL-1 mantém suas características e funções iguais a PSGL-1 membranar, ou seja, a sPSGL-1 se torna antagonista da PSGL-1 de membrana competindo para se ligar a P-selectina solúvel (STRAUSS *et al.*, 1999; AJDUKOVIC, 2015). Neste sentido, possivelmente a forma solúvel da proteína sPSGL-1 possa bloquear a sP-selectina, mitigando a adesão exacerbada do endotélio diminuindo a trombinflamação. Contudo, novos estudos clínicos sejam necessários para avaliar e determinar o papel da proteína sPSGL-1 em pacientes com sintomas graves da COVID-19. Além disso, estes resultados mostraram que, possivelmente existe dano ao endotélio e alteração na adesão endotélio-plaqueta-leucócitos, facilitando a tomboinflamação, sendo um dos fatores contribuidor da gravidade em COVID-19.

Nosso estudo apresenta alguns fatores limitantes: primeiro, não conseguimos avaliar os parâmetros bioquímicos dos pacientes envolvidos neste estudo; o segundo fator é que não mensuramos a carga viral de cada paciente, por este motivo não conseguimos correlacionar os resultados de prognóstico desfavorável com a carga viral nos pacientes avaliados; o terceiro fator limitante é referente ao número de pacientes avaliados neste estudo, não conseguimos mostrar algumas correlações entre os parâmetros hematológicos, genes e proteínas solúveis avaliados na referida população; outro fator limitante foi que não conseguimos realizar a dosagem das proteínas no soro do pacientes codificadas pelo genes *NOS2* e *ITGA-4*, investigados pelo ensaio de RT-qPCR; o último fator é que apesar deste estudo ser caracterizado

como caso-controle, seria mais adequado o desenvolvimento do estudo de coorte para mensurar os marcadores, não apenas na admissão e coleta domiciliar, mas coletar de forma seriada as amostras com a finalidade de acompanhar o comportamento de cada marcador durante a infecção do COVID-19.

7 CAPÍTULO 7 - CONCLUSÃO

Compreender os biomarcadores da resposta imunológica e sua correlação com a gravidade do COVID-19 é crucial devido à rápida disseminação e mutabilidade do vírus SARS-CoV-2. Os biomarcadores de disfunção leucocitária e disfunção endotelial investigados neste estudo apresentaram diferenças significativas para pacientes com desfecho grave da COVID-19. Nossos achados indicam que homens idosos, pretos e portadores de comorbidades são grupo de risco para o desenvolvimento da gravidade na COVID-19. Detectamos uma associação do RNL e RPL como possíveis biomarcadores para o COVID-19 grave. Verificamos um aumento na expressão dos genes *SELPLG* e *ARG1*, assim como os níveis plasmáticos das proteínas sPGSL-1 e P-selectina estavam elevadas em pacientes com desfecho grave da COVID-19, podendo servir como indicadores prognósticos para COVID-19 grave. Embora, mais estudos sejam necessários para entender o mecanismo que leva à alteração dessas proteínas e genes, contribuindo para o dano endotelial e imunodesregulação em infecções graves desencadeadas por SARS-CoV-2. O uso desses biomarcadores para identificar pacientes de alto risco pode melhorar o manejo, o prognóstico de pacientes com COVID-19 grave e os serviços de saúde.

6 CAPÍTULO 8 – ARTIGO

Journal Pre-proofs

Exploring Dysregulated Immune Response Genes and Endothelial Dysfunction Biomarkers as Predictors of Severe COVID-19

Fabiane S. Reis-Goes, Nívia N. Silva, Taiane M. Gondim, Ricardo G. Figueiredo, Gabriella de A. O. Evangelista, Silvana B. Marchioro, Ryan S. Costa, Alex José L. Torres, Roberto Jose Meyer, Soraya C. Trindade, Vitor Fortuna



PII: S1567-5769(23)00935-9
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110610>
Reference: INTIMP 110610

To appear in: *International Immunopharmacology*

Received Date: 8 May 2023
Revised Date: 30 June 2023
Accepted Date: 3 July 2023

Please cite this article as: F.S. Reis-Goes, N.N. Silva, T.M. Gondim, R.G. Figueiredo, G. de A. O. Evangelista, S.B. Marchioro, R.S. Costa, A. José L. Torres, R. Jose Meyer, S.C. Trindade, V. Fortuna, Exploring Dysregulated Immune Response Genes and Endothelial Dysfunction Biomarkers as Predictors of Severe COVID-19, *International Immunopharmacology* (2023), doi: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110610>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-ISMAIL, Mouhamed Yazan et al. The hypercoagulable state in COVID-19: Incidence, pathophysiology, and management. **Thrombosis research**, v. 194, p. 101-115, 2020.
- ACKERMANN, Maximilian et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 2, p. 120-128, 2020.
- adults. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2022.
- AGRATI, Chiara et al. Expansion of myeloid-derived suppressor cells in patients with severe coronavirus disease (COVID-19). **Cell Death & Differentiation**, v. 27, n. 11, p. 3196-3207, 2020.
- AID, Malika et al. Vascular disease and thrombosis in SARS-CoV-2-infected rhesus macaques. **Cell**, v. 183, n. 5, p. 1354-1366. e13, 2020.
- AJDUKOVIC, J. et al. Soluble P-selectin glycoprotein ligand-a possible new target in ulcerative colitis. **Bratislavske Lekarske Listy**, v. 116, n. 3, p. 147-149, 2015.
- AKBARIQOMI, Mostafa et al. Clinical characteristics and outcome of hospitalized COVID-19 patients with diabetes: A single-center, retrospective study in Iran. **Diabetes research and clinical practice**, v. 169, p. 108467, 2020.
- ALAGBE, Adekunle Emmanuel et al. Lymphocyte Ratios Progressively Worsen in Non-Survivors of COVID-19. **Blood**, v. 138, n. Supplement 1, p. 4196-4196, 2021.
- ALAMDARI, Daryoush Hamidi et al. Application of methylene blue -vitamin C -N-acetyl cysteine for treatment of critically ill COVID-19 patients, report of a phase-I clinical trial. **Eur J Pharmacol**, v. 885, p. 173494, 2020.
- ALBINA, Jorge E. et al. Arginine metabolism in wounds. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 254, n. 4, p. E459-E467, 1988.
- ALEEBRAHIM-DEHKORDI, Elahe et al. T helper type (Th1/Th2) responses to SARS-CoV-2 and influenza A (H1N1) virus: From cytokines produced to immune responses. **Transplant Immunology**, v. 70, p. 101495, 2022.
- ALHAZZANI, Waleed et al. Surviving Sepsis Campaign: guidelines on the management of critically ill adults with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Intensive care medicine**, v. 46, n. 5, p. 854-887, 2020.
- ANDREAKOS, Evangelos. STINGing type I IFN-mediated immunopathology in COVID-19. **Nature Immunology**, v. 23, n. 4, p. 478-480, 2022.
- ANURAG, Aditya; JHA, Prakash Kumar; KUMAR, Abhishek. Differential white blood cell count in the COVID-19: A cross-sectional study of 148 patients. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 14, n. 6, p. 2099-2102, 2020.

- ARAV, Yehuda; KLAUSNER, Ziv; FATTAL, Eyal. Theoretical investigation of pre-symptomatic SARS-CoV-2 person-to-person transmission in households. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.
- BA, Xueqing et al. Signaling function of PSGL-1 in neutrophil: tyrosine- phosphorylation-dependent and c-Abl-involved alteration in the F-actin-based cytoskeleton. **Journal of cellular biochemistry**, v. 94, n. 2, p. 365-373, 2005.
- BAIRWA, Mukesh et al. Hematological profile and biochemical markers of COVID-19 non-survivors: A retrospective analysis. **Clinical Epidemiology and Global Health**, v. 11, p. 100770, 2021.
- BALE, Rahul et al. Quantifying the COVID19 infection risk due to droplet/aerosol inhalation. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2022.
- BARNES, Geoffrey D. et al. Thromboembolism and anticoagulant therapy during the COVID-19 pandemic: interim clinical guidance from the anticoagulation forum. **Journal of thrombosis and thrombolysis**, v. 50, p. 72-81, 2020.
- BELMONTE, Beatrice et al. Constitutive PSGL-1 correlates with CD30 and TCR pathways and represents a potential target for immunotherapy in anaplastic large T-cell lymphoma. **Cancers**, v. 13, n. 12, p. 2958, 2021.
- BO, X. U. et al. Suppressed T cell-mediated immunity in patients with COVID-19: a clinical retrospective study in Wuhan, China. **Journal of Infection**, v. 81, n. 1, p. e51-e60, 2020.
- BOAVENTURA, Aldo et al. Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 5, p. 319-329, 2021.
- BORCHERS, Michael T. et al. Blockade of CD49d inhibits allergic airway pathologies independent of effects on leukocyte recruitment. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 280, n. 4, p. L813-L821, 2001.
- BOST, Pierre et al. Deciphering the state of immune silence in fatal COVID-19 patients. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2021.
- BRADLEY, Benjamin T. et al. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series. **The Lancet**, v. 396, n. 10247, p. 320-332, 2020.
- BRYCE, Clare et al. Pathophysiology of SARS-CoV-2: targeting of endothelial cells renders a complex disease with thrombotic microangiopathy and aberrant immune response. The Mount Sinai COVID-19 autopsy experience. **MedRxiv**, 2020.
- BUNDGAARD, Henning et al. Effectiveness of adding a mask recommendation to other public health measures to prevent SARS-CoV-2 infection in Danish mask wearers: a randomized controlled trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 174, n. 3, p. 335-343, 2021.
- BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE Guidelines: M inimum I nformation for Publication of Q uantitative Real-Time PCR E xperiments. 2009.

BUZZO, Carina de Lima et al. Epigenetic regulation of nitric oxide synthase 2, inducible (Nos2) by NLRC4 inflammasomes involves PARP1 cleavage. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

CACCIOLA, R. et al. Coagulopathy in patients with severe COVID-19. **Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis**, 2021.

CALDWELL, R. William et al. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease. **Physiological reviews**, v. 98, n. 2, p. 641-665, 2018.

CARNEVALE, Sergio; BERETTA, Paolo; MORBINI, Patrizia. Direct endothelial damage and vasculitis due to SARS-CoV-2 in small bowel submucosa of CoViD-19 patient with diarrhea. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 1, p. 61, 2021.

CARRANZA LIRA, Sebastian; GARCIA ESPINOSA, Maritza. Differences in the neutrophil/lymphocyte ratio and the platelet/lymphocyte ratio in pregnant women with and without COVID-19. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 157, n. 2, p. 296-302, 2022.

CARSANA, Luca et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. **The Lancet infectious diseases**, v. 20, n. 10, p. 1135-1140, 2020.

CAUSSY, Cyrielle et al. Prevalence of obesity among adult inpatients with COVID-19 in France. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 8, n. 7, p. 562-564, 2020.

CDC COVID-19 Science Briefs. SARS-CoV-2 Transmission. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2020 - [Updated 2021 May 7]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570442/>
Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Comorbidities the CDC classifies as risk factors for severe COVID-19.** <https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=PC%2F127477>. Acessado em 23 de Julho 2022.

CHANG, Ryan et al. SARS-CoV-2 mediated endothelial dysfunction: the potential role of chronic oxidative stress. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 605908, 2021.

CHÁVEZ-OCAÑA, Sonia del Carmen et al. Parameters to Predict the Outcome of Severe and Critical COVID-19 Patients when Admitted to the Hospital. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 4, p. 1323, 2023.

CHERIAN, Leela; HLATKY, Roman; ROBERTSON, Claudia S. Nitric oxide in traumatic brain injury. **Brain pathology**, v. 14, n. 2, p. 195-201, 2004.

COSSARIZZA, Andrea et al. SARS-CoV-2, the virus that causes COVID-19: cytometry and the new challenge for global health. **Cytometry**, v. 97, n. 4, p. 340, 2020.

CRIPPA, S. et al. Stroke in a young adult with mild COVID-19 suggesting endotheliitis. **New microbes and new infections**, v. 38, p. 100781, 2020.

CROOKS, Christine V.; CROSS, Martin L.; WALL, Clare R. Age-related differences in integrin expression in peripheral blood lymphocytes. **Immunity & Ageing**, v. 7, n. 1, p. 1-5, 2010.

CRUZ-PULIDO, Diana; OUMA, Wilberforce Zachary; KENNEY, Scott P. Differing coronavirus genes alter shared host signaling pathways upon viral infection. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2022.

CUI, Songping et al. Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 6, p. 1421-1424, 2020.

D'ONOFRIO, Valentino et al. Studying the clinical, radiological, histological, microbiological, and immunological evolution during the different COVID-19 disease stages using minimal invasive autopsies. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1360, 2022.

DA ROSA MESQUITA, Rodrigo et al. Clinical manifestations of COVID-19 in the general population: systematic review. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 133, n. 7, p. 377-382, 2021.

DARDIOTIS, Efthimios et al. Gene variants of adhesion molecules predispose to MS: A case-control study. **Neurology Genetics**, v. 5, n. 1, 2019.

DE LA MORENA-BARRIO, María Eugenia et al. Prognostic value of thrombin generation parameters in hospitalized COVID-19 patients. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2021.

DE MAGALHÃES, Jurandy Júnior Ferraz et al. Epidemiological and clinical characteristics of the first 557 successive patients with COVID-19 in Pernambuco state, Northeast Brazil. **Travel medicine and infectious disease**, v. 38, p. 101884, 2020.

DE MORAIS BATISTA, Fabiani et al. Serum biomarkers associated with SARS-CoV-2 severity. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 15999, 2022.

DE OLIVEIRA, Douglas Câmara et al. Evaluation of lymphocyte count, T-cell subsets and neutrophil-to-lymphocyte ratio as early predictors for severity and outcome of COVID-19 disease—a report from a highly complex hospital in Brazil. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, 2022.

DEAN, Matthew J. et al. Transcriptome and Functions of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Determine their Association with Disease Severity of COVID-19. **medRxiv**, 2021.

DECKER, Brandee; PUMIGLIA, Kevin. mTORc1 activity is necessary and sufficient for phosphorylation of eNOS1177. **Physiological Reports**, v. 6, n. 12, p. e13733, 2018.

DERAKHSHANI, Afshin et al. Arginase 1 (Arg1) as an Up-Regulated Gene in COVID-19 Patients: A Promising Marker in COVID-19 Immunopathy. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 5, p. 1051, 2021.

- DHAND, Rajiv; LI, Jie. Coughs and sneezes: their role in transmission of respiratory viral infections, including SARS-CoV-2. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 202, n. 5, p. 651-659, 2020.
- DIAO, Bo et al. Human kidney is a target for novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection. **MedRxiv**, 2020.
- DIAO, Bo et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in immunology**, p. 827, 2020.
- DOLIN, Raphael et al. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. In: **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**. 2005. p. 1727-3662.
- DOMINIC, Paari et al. Decreased availability of nitric oxide and hydrogen sulfide is a hallmark of COVID-19. **Redox biology**, v. 43, p. 101982, 2021.
- DU PREEZ, Heidi N. et al. Pathogenesis of COVID-19 described through the lens of an undersulfated and degraded epithelial and endothelial glycocalyx. **The FASEB Journal**, v. 36, n. 1, p. e22052, 2022.
- DURANTE, William. Targeting arginine in COVID-19-induced immunopathology and vasculopathy. **Metabolites**, v. 12, n. 3, p. 240, 2022.
- ESCHER, Robert; BREakey, Neal; LÄMMLE, Bernhard. Severe COVID-19 infection associated with endothelial activation. **Thrombosis research**, v. 190, p. 62, 2020.
- ESHELMAN, Melanie A. et al. Tristetraprolin targets Nos2 expression in the colonic epithelium. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.
- FALCK-JONES, Sara et al. Functional monocytic myeloid-derived suppressor cells increase in blood but not airways and predict COVID-19 severity. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, n. 6, 2021.
- FAN, Bingwen Eugene et al. Hypercoagulability, endotheliopathy, and inflammation approximating 1 year after recovery: Assessing the long-term outcomes in COVID-19 patients. **American journal of hematology**, v. 97, n. 7, p. 915-923, 2022.
- FLAUMENHAFT, Robert; ENJYOJI, Keiichi; SCHMAIER, Alec A. Vasculopathy in COVID-19. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 140, n. 3, p. 222-235, 2022.
- FOX, Sharon E. et al. Pulmonary and cardiac pathology in African American patients with COVID-19: an autopsy series from New Orleans. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 7, p. 681-686, 2020.
- FRASER, Douglas D. et al. Case report: inflammation and endothelial injury profiling of COVID-19 pediatric multisystem inflammatory syndrome (MIS-C). **Frontiers in Pediatrics**, v. 9, p. 597926, 2021.

FRASER, Douglas D. et al. Endothelial injury and glycocalyx degradation in critically ill coronavirus disease 2019 patients: implications for microvascular platelet aggregation. **Critical Care Explorations**, v. 2, n. 9, 2020.

FRICKE-GALINDO, Ingrid et al. SERPINE1 rs6092 Variant Is Related to Plasma Coagulation Proteins in Patients with Severe COVID-19 from a Tertiary Care Hospital. **Biology**, v. 11, n. 4, p. 595, 2022.

FU, Yajing et al. PSGL-1 restricts HIV-1 infectivity by blocking virus particle attachment to target cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 17, p. 9537-9545, 2020.

GARCIA, Cédric et al. Platelet activation and partial desensitization are associated with viral xenophagy in patients with severe COVID-19. **Blood Advances**, v. 6, n. 13, p. 3884-3898, 2022.

GARCÍA-NAVAS, Rósula; GAJATE, Consuelo; MOLLINEDO, Faustino. Neutrophils drive endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in cancer cells through arginase1 release. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2021.

GATTINONI, Luciano et al. COVID-19 pneumonia: different respiratory treatments for different phenotypes? **Intensive care medicine**, v. 46, p. 1099-1102, 2020.

GELZO, Monica et al. Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS): Why a Different Production in COVID-19 Patients of the Two Waves? **Viruses**, v. 14, n. 3, p. 534, 2022.

GHAZAVI, Ali et al. Cytokine profiles in long-term smokers of opium (Taryak). **Journal of addiction medicine**, v. 7, n. 3, p. 200-203, 2013.

GOLEBIEWSKA, Ewelina M.; POOLE, Alastair W. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. **Blood reviews**, v. 29, n. 3, p. 153-162, 2015.

GRZYWA, Tomasz M. et al. Myeloid cell-derived arginase in cancer immune response. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 938, 2020.

GUERVILLY, Christophe et al. Circulating endothelial cells as a marker of endothelial injury in severe COVID-19. **The Journal of infectious diseases**, v. 222, n. 11, p. 1789-1793, 2020.

GUPTA, Gaurav et al. Th1/Th2/Th17 Cytokine Profile among Different Stages of COVID-19 Infection. **Natl Acad Sci Lett.**, ;45(4):363-369, 2022.

HADDAD, Joseph et al. Molecular Imaging of Very Late Antigen-4 in Acute Lung Injury. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 62, n. 2, p. 280-286, 2021.

HAMMERSCHMIDT, Karina Silveira de Almeida et al. Saúde do idoso em tempos de pandemia COVID-19. **REVISTA COGITARE ENFERMAGEM**. v. 25, 2020, 2020.

HAMMING, Inge et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 203, n. 2, p. 631-637,

2004.

HANATA, Norio et al. Serum extracellular traps associate with the activation of myeloid cells in SLE patients with the low level of anti-DNA antibodies. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 18397, 2022.

HARJUNPÄÄ, Heidi et al. Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1078, 2019.

HE, Sijia et al. PSGL-1 inhibits the incorporation of SARS-CoV and SARS-CoV-2 Spike glycoproteins into pseudovirions and impairs pseudovirus attachment and infectivity. **Viruses**, v. 13, n. 1, p. 46, 2020.

HENRY, Brandon Michael et al. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 58, n. 7, p. 1021-1028, 2020.

HOFFMANN, Markus 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. 271-280. e8, 2020.

HORBY, Peter W. et al. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): preliminary results of a randomised, controlled, open-label, platform trial. **Medrxiv**, 2021.

HOTTZ, Eugenio D. et al. Platelet-monocyte interaction amplifies thromboinflammation through tissue factor signaling in COVID-19. **Blood Advances**, v. 6, n. 17, p. 5085-5099, 2022. **Infection Microbiology**, v. 11, p. 242, 2021.

IVANOV, Ivelin I. et al. Platelet P-selectin triggers rapid surface exposure of tissue factor in monocytes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13397, 2019.

JACKSON, Cody B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 3-20, 2022.

JACKSON, Shaun P.; DARBOUSSET, Roxane; SCHOENWAEELDER, Simone M. Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 133, n. 9, p. 906-918, 2019.

JAVADI, Abdolreza et al. Changes of Routine Hematological Parameters in COVID-19 Patients: Correlation with Imaging Findings, RT-PCR and Outcome. **Iranian Journal of Pathology**, v. 17, n. 1, p. 37, 2022.

JIN, Yuefei et al. Endothelial activation and dysfunction in COVID-19: from basic mechanisms to potential therapeutic approaches. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2020.

KADIOGLU, Aras et al. The integrins Mac-1 and $\alpha 4\beta 1$ perform crucial roles in neutrophil and

T cell recruitment to lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 10, p. 5907-5915, 2011.

KAMEL, Fatemah O. et al. Clinical and hematologic presentations of adults with COVID-19 patients in Jeddah: A case control study. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 6, p. 709-716, 2021.

KARSLI, Emre et al. Soluble P-selectin as a potential diagnostic and prognostic biomarker for COVID-19 disease: a case-control study. **Life Sciences**, v. 277, p. 119634, 2021.

KARUPIAH, Gunasegaran; HARRIS, Nicholas. Inhibition of viral replication by nitric oxide and its reversal by ferrous sulfate and tricarboxylic acid cycle metabolites. **The Journal of experimental medicine**, v. 181, n. 6, p. 2171-2179, 1995.

KAUR, Raminderjit; SINGH, Jatinder; KAUR, Manpreet. Structural and functional impact of SNPs in P-selectin gene: A comprehensive in silico analysis. **Open Life Sciences**, v. 12, n. 1, p. 19-33, 2017.

KAWANISHI, Michiko. Nitric oxide inhibits Epstein-Barr virus DNA replication and activation of latent EBV. **Intervirolgy**, v. 38, n. 3-4, p. 206-213, 1995.

KIM, Cherry et al. COVID-19 infection with asymptomatic or mild disease severity in young patients: Clinical course and association between prevalence of pneumonia and viral load. **PLoS One**, v. 16, n. 4, p. e0250358, 2021.

KIM, Jae Hyung et al. Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. **Journal of applied physiology**, v. 107, n. 4, p. 1249-1257, 2009.

KIM, Lindsay et al. Risk factors for intensive care unit admission and in-hospital mortality among hospitalized adults identified through the US coronavirus disease 2019 (COVID-19)-associated hospitalization surveillance network (COVID-NET). **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. 9, p. e206-e214, 2021.

KLOK, F. A. et al. Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: an updated analysis. **Thrombosis research**, v. 191, p. 148-150, 2020.

KOJIMA, Kensuke et al. Increased lactate dehydrogenase reflects the progression of COVID-19 pneumonia on chest computed tomography and predicts subsequent severe disease. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1012, 2023.

KOMI, Daniel Elieh Ali et al. Investigation of the Molecular Mechanism of Coagulopathy in Severe and Critical Patients With COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

KOURO, Hitomi et al. The novel $\alpha 4B$ murine $\alpha 4$ integrin protein splicing variant inhibits $\alpha 4$ protein-dependent cell adhesion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 23, p. 16389-16398, 2014.

KUMAR, Ashok et al. Wuhan to world: the COVID-19 pandemic. **Frontiers in Cellular and Molecular Biology**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2020.

LI, Li; ZHANG, Hang; FENG, Gui-long. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts in-hospital mortality in intracerebral hemorrhage. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 31, n. 8, p. 106611, 2022.

LI, Tianyang et al. Platelets mediate inflammatory monocyte activation by SARS-CoV-2 spike protein. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 21, n. 1, p. 114-124, 2020.

LI, Zhuozhuo et al. Arginase: shedding light on the mechanisms and opportunities in cardiovascular diseases. **Cell Death Discovery**, v. 8, n. 1, p. 413, 2022.

LIBBY, Peter; LÜSCHER, Thomas. COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. **European heart journal**, v. 41, n. 32, p. 3038-3044, 2020.

LIPPI, Giuseppe; FAVALORO, Emmanuel J. D-dimer is associated with severity of coronavirus disease 2019: a pooled analysis. **Thrombosis and haemostasis**, v. 120, n. 05, p. 876-878, 2020.

LIU, Lei et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, a critical predictor for assessment of disease severity in patients with COVID-19. **International journal of laboratory hematology**, v. 43, n. 2, p. 329-335, 2021.

LIU, Peter P. et al. The science underlying COVID-19: implications for the cardiovascular system. **Circulation**, v. 142, n. 1, p. 68-78, 2020.

LIU, Ying et al. Proteomic profiling of HIV-1 infection of human CD4+ T cells identifies PSGL-1 as an HIV restriction factor. **Nature microbiology**, v. 4, n. 5, p. 813-825, 2019.

LIU, Ying et al. PSGL-1 inhibits HIV-1 infection by restricting actin dynamics and sequestering HIV envelope proteins. **Cell discovery**, v. 6, n. 1, p. 53, 2020.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOO, Joan; SPITTLE, Daniella A.; NEWNHAM, Michael. COVID-19, immunothrombosis and venous thromboembolism: biological mechanisms. **Thorax**, v. 76, n. 4, p. 412-420, 2021.

LOU, Jerry J. et al. Neuropathology of COVID-19 (neuro-COVID): clinicopathological update. **Free neuropathology**, v. 2, 2021.

LOUIS, Claudine A. et al. Regulation of arginase isoforms I and II by IL-4 in cultured murine peritoneal macrophages. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 276, n. 1, p. R237-R242, 1999.

MA, Yan et al. Diagnostic Value of Neutrophil-Lymphocyte Ratio and Platelet-Lymphocyte Ratio in Patients with Severe COVID-19—7 PLADs, China, January 21–February 10, 2020. **China CDC Weekly**, v. 4, n. 10, p. 195, 2022.

MAHNKE, Alexander et al. Hypoxia in *Leishmania major* skin lesions impairs the NO-dependent leishmanicidal activity of macrophages. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 9, p. 2339-2346, 2014.

MALTA, Deborah Carvalho et al. Use of health services and adherence to social distancing by adults with Noncommunicable Diseases during the COVID-19 pandemic, Brazil, 2020. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 26, p. 2833-2842, 2021.

MARCHETTI, Marina et al. Endothelium activation markers in severe hospitalized COVID-19 patients: role in mortality risk prediction. **TH Open**, v. 5, n. 03, p. e253- e263, 2021. **Medicine**, p. 1-9, 2022.

MARMARCHI, Fahad et al. Clinical outcomes of critically ill patients with COVID-19 by race. **Journal of Racial and Ethnic Health Disparities**, p. 1-5, 2021.

MCNARRY, Melitta A. et al. Inspiratory Muscle Training Enhances Recovery Post COVID-19: A Randomised Controlled Trial. **European Respiratory Journal**, 2022.

MEHTA, Puja; FAJGENBAUM, David C. Is severe COVID-19 a cytokine storm syndrome: a hyperinflammatory debate. **Current opinion in Rheumatology**, v. 33, n. 5, p. 419, 2021.

MIDDELDORP, Saskia et al. Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 8, p. 1995-2002, 2020.

MOLANI, Sevda et al. Risk factors for severe COVID-19 differ by age for hospitalized MUKHRA, Richa; KRISHAN, Kewal; KANCHAN, Tanuj. Possible modes of transmission of Novel coronavirus SARS-CoV-2: a review. **Acta Bio Medica: Atenei Parmensis**, v. 91, n. 3, p. e2020036, 2020.

MUNDER, Markus. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. **British journal of pharmacology**, v. 158, n. 3, p. 638-651, 2009.

NEGRINI, S. et al. An unusual case of bullous haemorrhagic vasculitis in a COVID-19 patient. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 34, n. 11, p. e675, 2020.

NERI, Tommaso; NIERI, Dario; CELI, Alessandro. P-selectin blockade in COVID-19-related ARDS. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 318, n. 6, p. L1237-L1238, 2020.

NICOSIA, Roberto F. et al. COVID-19 vasculopathy: mounting evidence for an indirect mechanism of endothelial injury. **The American Journal of Pathology**, v. 191, n. 8, p. 1374-1384, 2021.

NOSENT, Esther J. et al. Pulmonary procoagulant and innate immune responses in critically ill COVID-19 patients. **Frontiers in immunology**, v. 12, 2021.

PAAR, Vera et al. Anti-coagulation for COVID-19 treatment: both anti-thrombotic and anti-inflammatory? **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 51, p. 226-231, 2021.

PACHIEGA, Julianne et al. Chronic heart diseases as the most prevalent comorbidities among deaths by COVID-19 in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, 2020.

PAN, Dingxin et al. P-Rex and Vav Rac-GEFs in platelets control leukocyte recruitment to sites of inflammation. *Blood*, **The Journal of the American Society of Hematology**, v. 125, n. 7, p. 1146-1158, 2015.

PARANJPE, Ishan et al. Association of treatment dose anticoagulation with in-hospital survival among hospitalized patients with COVID-19. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 76, n. 1, p. 122-124, 2020.

PERKINS, Lydia A. et al. Integrin VLA-4 as a PET imaging biomarker of hyper-adhesion in transgenic sickle mice. **Blood advances**, v. 4, n. 17, p. 4102-4112, 2020.

PETREY, Aaron C. et al. Cytokine release syndrome in COVID-19: Innate immune, vascular, and platelet pathogenic factors differ in severity of disease and sex. **Journal of leukocyte biology**, v. 109, n. 1, p. 55-66, 2021.

PONTI, Giovanni et al. Biomarkers associated with COVID-19 disease progression. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 57, n. 6, p. 389-399, 2020.

POPA, Miruna et al. Role of CD40 and ADAMTS13 in von Willebrand factor-mediated endothelial cell-platelet-monocyte interaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 24, p. E5556-E5565, 2018.

PRANDONI, Paolo et al. The hazard of fondaparinux in non-critically ill patients with COVID-19: Retrospective controlled study versus enoxaparin. **Thrombosis Research**, v. 196, p. 395-397, 2020. protein. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 132, n. 4, 2022.

PROZAN, Lior et al. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in COVID-19 compared with Influenza and respiratory syncytial virus infection. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 21519, 2021.

QIN, C. et al. Desregulación de la respuesta inmune en pacientes con coronavirus 2019 (COVID-19) en Wuhan, China. **Enfermedades infecciosas e Infecciones clínicas**, v. 71, n. 15, p. 762-768, 2020.

QIN, Chuan 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, 2020.

QU, Rong et al. Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 9, p. 1533-1541, 2020.

QUINTI, Isabella et al. A possible role for B cells in COVID-19? Lesson from patients with agammaglobulinemia. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 146, n. 1, p. 211-213.

e4, 2020.

RAPKIEWICZ, Amy V. et al. Megakaryocytes and platelet-fibrin thrombi characterize multi-organ thrombosis at autopsy in COVID-19: a case series. **EClinicalMedicine**, v. 24, p. 100434, 2020.

RATCHFORD, Stephen M. et al. Vascular alterations among young adults with SARS-CoV-2. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 2021.

RATHNASINGHE, Raveen et al. Characterization of SARS-CoV-2 Spike mutations important for infection of mice and escape from human immune sera. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 1-14, 2022.

REES, Chris A. et al. Altered amino acid profile in patients with SARS-CoV-2 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 118, n. 25, 2021.

REGOLO, Matteo et al. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio (NLR) is a promising predictor of mortality and admission to intensive care unit of COVID-19 patients. **Journal of clinical medicine**, v. 11, n. 8, p. 2235, 2022.

REIZINE, Florian et al. SARS-CoV-2-induced ARDS associates with MDSC expansion, lymphocyte dysfunction, and arginine shortage. **Journal of clinical immunology**, v. 41, p. 515-525, 2021.

RODRIGUEZ, Paulo C.; OCHOA, Augusto C.; AL-KHAMI, Amir A. Arginine metabolism in myeloid cells shapes innate and adaptive immunity. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 93, 2017.

RUHL, Louisa et al. Endothelial dysfunction contributes to severe COVID-19 in combination with dysregulated lymphocyte responses and cytokine networks. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 6, n. 1, p. 418, 2021.

RUSSELL, Clark D.; LONE, Nazir I.; BAILLIE, J. Kenneth. Comorbidities, multimorbidity and COVID-19. **Nature Medicine**, p. 1-10, 2023.

SAKO, Dianne et al. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. **Cell**, v. 75, n. 6, p. 1179-1186, 1993.

SALVI, Valentina et al. SARS-CoV-2-associated ssRNAs activate inflammation and immunity via TLR7/8. **JCI insight**, v. 6, n. 18, 2021.

SANTARPIA, Joshua L. et al. Transmission potential of SARS-CoV-2 in viral shedding observed at the University of Nebraska Medical Center. **MedRxiv**, 2020.

SARTORI, Andrea et al. New 4-Aminoproline-Based Small Molecule Cyclopeptidomimetics as Potential Modulators of $\alpha 4\beta 1$ Integrin. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 6066, 2021.

SAURABH, Animesh et al. Evaluation of Hematological Parameters in Predicting Intensive Care Unit Admission in COVID-19 Patients. *SN Comprehensive Clinical Medicine*, v. 4, n. 1,

p. 1-5, 2022.

SECRETÁRIA DE SAÚDE PÚBLICA DO ESTADO DA BAHIA (SESAB). Mapa epidemiológico do COVID-19. https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2023/03/Semana-Epidemiologica-11_Boletim-Infografico_20-03-2023-1.pdf. Acessado em março de 2023.

SHANG, Yunfeng; LI, Haiwei; ZHANG, Ren. Effects of pandemic outbreak on economies: evidence from business history context. **Frontiers in Public Health**, v. 9, p. 146, 2021.

SHAO, Siyao et al. Risk assessment of airborne transmission of COVID-19 by asymptomatic individuals under different practical settings. **Journal of aerosol science**, v. 151, p. 105661, 2021.

SILVA, Bruna Raphaela Oliveira et al. Clinical-Epidemiology Aspect of Inpatients With Moderate or Severe COVID-19 in a Brazilian Macroregion: Disease and Countermeasures. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p. 595, 2022.

SIMADIBRATA, Daniel Martin et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio on admission to predict the severity and mortality of COVID-19 patients: A meta-analysis. **The American journal of emergency medicine**, v. 42, p. 60-69, 2021.

SMADJA, David M. et al. Angiopoietin-2 as a marker of endothelial activation is a good predictor factor for intensive care unit admission of COVID-19 patients. **Angiogenesis**, v. 23, p. 611-620, 2020.

SONG, Minkyoo et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and mortality in the United States general population. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 464, 2021.

SPADARO, Savino et al. Markers of endothelial and epithelial pulmonary injury in mechanically ventilated COVID-19 ICU patients. **Critical care**, v. 25, n. 1, p. 1-9, 2021.

SREERAMKUMAR, Vinatha et al. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. **Science**, v. 346, n. 6214, p. 1234-1238, 2014.

STRAUSS, Erich C. et al. Soluble P-selectin glycoprotein ligand 1 inhibits ocular inflammation in a murine model of allergy. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 40, n. 7, p. 1336-1342, 1999.

TAN, Li Yin; KOMARASAMY, Thamil Vaani; RMT BALASUBRAMANIAM, Vinod. Hyperinflammatory immune response and COVID-19: a double edged sword. **Frontiers in immunology**, p. 3981, 2021.

TANG, Ning et al. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. **Journal of thrombosis and haemostasis**, v. 18, n. 5, p. 1094-1099, 2020.

TARASEV, Michael et al. Possible Role of P-selectin Adhesion in Long-COVID: A Comparative Analysis of a Long-COVID Case Versus an Asymptomatic Post-COVID

Case. **medRxiv**, 2022.

TEUWEN, Laure-Anne et al. COVID-19: the vasculature unleashed. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 7, p. 389-391, 2020.

TIAN, Sufang 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. 700-704, 2020.

TINOCO, Roberto et al. PSGL-1: a new player in the immune checkpoint landscape. **Trends in immunology**, v. 38, n. 5, p. 323-335, 2017.

TSOKOS, M.; FEHLAUER, F. Post-mortem markers of sepsis: an immunohistochemical study using VLA-4 (CD49/CD29) and ICAM-1 (CD54) for the detection of sepsis-induced lung injury. **International journal of legal medicine**, v. 114, p. 291-294, 2001.

UMEKI, Saori et al. Anti-adhesive property of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) due to steric hindrance effect. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 6, p. 1271-1285, 2013.

UNEJA, Richa et al. Haematology audit of 801 COVID-19 patients' basics and beyond Prospective observational study. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 11, n. 8, p. 4460-4466, 2022.

University e Medicine Jhons Hopkins. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Acessado em março de 2023.

VAN DREDEN, Patrick et al. Persisting Endothelial Cell Activation and Hypercoagulability after Recovering from COVID-19: The Roadmap-Post COVID-19 Study. **Blood**, v. 140, n. Supplement 1, p. 2783-2785, 2022.

VAN ZEGGEREN, Ingeborg E. et al. Sex steroid hormones are associated with mortality in COVID-19 patients: level of sex hormones in severe COVID-19. **Medicine**, v. 100, n. 34, 2021.

VARGA, Zsuzsanna et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. **The Lancet**, v. 395, n. 10234, p. 1417-1418, 2020.

VASSILIOU, Alice G. et al. ICU admission levels of endothelial biomarkers as predictors of mortality in critically ill COVID-19 patients. **Cells**, v. 10, n. 1, p. 186, 2021.

VERAS, Flavio Protasio et al. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 12, 2020.

WATSON, Oliver J. et al. Global impact of the first year of COVID-19 vaccination: a mathematical modelling study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 9, p. 1293-1302, 2022.

WICHMANN, Dominic et al. Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19: a prospective cohort study. **Annals of internal medicine**, v. 173, n. 4, p. 268-277, 2020.

WOLTMANN, Gerrit et al. Interleukin-13 induces PSGL-1/P-selectin-dependent adhesion of eosinophils, but not neutrophils, to human umbilical vein endothelial cells under flow. *Blood*, **The Journal of the American Society of Hematology**, v. 95, n. 10, p. 3146-3152, 2000.

WRIGHT, Jenny et al. Cycle threshold values are inversely associated with poorer outcomes in hospitalized patients with COVID-19: a prospective, observational cohort study conducted at a UK tertiary hospital. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 111, p. 333-335, 2021.

WU, Chaomin 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. 934-943, 2020.

XU, Suo-wen; ILYAS, Iqra; WENG, Jian-ping. Endothelial dysfunction in COVID-19: an overview of evidence, biomarkers, mechanisms and potential therapies. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 44, n. 4, p. 695-709, 2023.

YACHIMOVICH-COHEN, Nurit et al. Human embryonic stem cells suppress T cell responses via arginase I-dependent mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 3, p. 1300-1308, 2010.

YANABA, K.; TAKEHARA, K.; SATO, S. Serum concentrations of soluble P-selectin glycoprotein ligand-1 are increased in patients with systemic sclerosis: association with lower frequency of pulmonary fibrosis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 63, n. 5, p. 583-587, 2004.

YANG, Xiaobo et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. **The lancet respiratory medicine**, v. 8, n. 5, p. 475-481, 2020.

YANG, Xiaobo et al. Thrombocytopenia and its association with mortality in patients with COVID-19. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 6, p. 1469-1472, 2020.

YATIM, Nader et al. Platelet activation in critically ill COVID-19 patients. **Annals of intensive care**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

ZHANG, Jixiang et al. Risk factors for disease severity, unimprovement, and mortality in COVID-19 patients in Wuhan, China. **Clinical microbiology and infection**, v. 26, n. 6, p. 767-772, 2020.

ZHANG, Xiaohui et al. Endothelial cell dysfunction and glycocalyx—a vicious circle. **Matrix Biology**, v. 71, p. 421-431, 2018.

ZHOU, Fei et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054-1062, 2020.

ZHU, Min et al. FoxO4 promotes early inflammatory response upon myocardial infarction via endothelial Arg1. **Circulation research**, v. 117, n. 11, p. 967-977, 2015.

APÊNDICE

Apêndice 1. Ficha Clínica utilizada no estudo

FICHA CLÍNICA

Nº _____ Aplicado por: _____ Data da coleta: ____/____/____

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____
 Nome da mãe: _____
 Endereço: _____
 Bairro: _____ Cidade: _____
 CEP: _____ Estado: _____
 Telefone: _____ Profissão: _____
 Naturalidade: _____
 Data de Nascimento: ____/____/____

VARIÁVEIS SOCIOECONÔMICAS E SOCIODEMOGRÁFICAS

1 Idade: _____ **2 Sexo:** (0) Masculino (1) Feminino
3 Raça/Cor (autorreferida): (0) Amarelo (1) Branco (2) Preto (3) Pardo
4 Escolaridade: (0) Pós-graduação (1) Ens. superior completo (2) Ens. superior incompleto
 (3) 2º grau completo (4) 2º grau incompleto (5) Ens. fundamental completo (6) Ens. fundamental
 incompleto (7) Analfabeto
5 Anos de estudos: _____
6 Ocupação atual: (0) Desempregado (1) Empregado (2) Aposentado (3) Autônomo (4) Não
 trabalha (5) Outro. Qual? _____
7 Se empregado(a), qual a ocupação atual: _____
8 Possui renda própria? (0) Sim (1) Não.
9 Renda familiar em salários mínimos: (0) 1 (2) <1 (3) 1 a 2 (4) 3 ou mais
10 Número de moradores em sua residência: _____
11 Estado civil: (0) Solteiro (1) Casado (2) Viúvo (3) Divorciado (4) União estável

VARIÁVEIS DE ESTILO DE VIDA

12 É fumante? (0) Não (1) Sim. (2) Ex-fumante.
13 Em caso positivo, há quanto tempo? _____. **E qual a quantidade de cigarros/dia?** _____
14 Se ex-fumante, por quanto tempo fumou? _____ **E há quanto tempo parou de fumar?** _____
15 Consumo de bebida alcoólica: (0) Não (1) Sim (2) Já consumi
 Tipo de bebida: _____. Tempo de consumo (em anos): _____
16 Prática de atividade física: (0) Não (1) Sim **17 Em caso positivo, qual tipo de atividade?** _____
E qual frequência/semana? _____.

VARIÁVEIS DE CONDIÇÃO DE SAÚDE	
--------------------------------	--

- | | |
|--|--|
| 18 Tosse seca: (0) Não (1) Sim | 21 Temp.: (0) $\leq 37,5^{\circ}\text{C}$ (1) $>37,5^{\circ}\text{C} \leq 39^{\circ}\text{C}$
(2) $> 39^{\circ}\text{C}$ |
| 19 Tosse produtiva: (0) Não (1) Sim | 22 Febre: (0) Não (1) Sim |
| 20 Dispneia: (0) Não (1) Sim | 23 Mialgia ou fadiga: (0) Não (1) Sim |
- 24 Hipertensão arterial?** (0) Não (1) Sim. Medicação: _____.
- 25 Diabetes?** (0) Não (1) Sim. Tipo: _____. Medicação: _____.
- 26 Doença renal?** (0) Não (1) Sim. Qual? _____. Medicação: _____.
- 27 Doença cardiovascular?** (0) Não (1) Sim Medicação: _____.
- 28 Doença hepática?** (0) Não (1) Sim Medicação: _____.
- 29 Síndrome do ovário policístico?** (0) Não (1) Sim
- 30 Doença Pulmonar (asma/tuberculose/bronquite/pneumonia/enfisema/DPOC)?** (0) Não (1) Sim Qual? _____. Medicação: _____.
- 31 Alergia?** (0) Não (1) Sim. Qual? _____.
- 32 Obesidade?** (0) Não (1) Sim
- 33 Doença autoimune?** (0) Não (1) Sim Qual? _____.
- 34 Neoplasia maligna (câncer)?** (0) Não (1) Sim Qual? _____.
- 35 Doença neurológica (Alzheimer, Parkinson, Epilepsia, Demência, etc.)?** (0) Não (1) Sim Qual? _____.
- 36 Doença hematológica?** (0) Não (1) Sim Qual? _____.
- 37 Possui alguma outra doença não citada anteriormente?** (0) Não (1) Sim Qual? _____.
- 37 Usa algum outro tipo de medicamento não citado anteriormente?** (0) Não (1) Sim Qual(s)? _____.

OBSERVAÇÕES

Método diagnóstico:

Início dos sintomas:

Outros sintomas:

ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA ASSINATURA MOLECULAR PARA A DETERMINAÇÃO DE GRAVIDADE DA DOENÇA DO CORONAVÍRUS 2019 (COVID-19)

Pesquisador: Soraya Castro Trindade

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30764720.1.0000.0053

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Feira de Santana

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.014.165

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas das Informações Básicas da Pesquisa, arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1536737.pdf", gerado na Plataforma Brasil em 08/04/2020. As demais informações foram retiradas do Projeto Detalhado, arquivo "ProjetoCompleto.pdf" de 07/04/2020.

INTRODUÇÃO

Em 11 de março de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a situação epidemiológica da COVID-19 como Pandemia após o surgimento dos primeiros casos em dezembro na China e expansão de novos casos no. Diante da atual pandemia e da incerteza sobre o impacto das respostas imunes individuais na gravidade das infecções por CoV do tipo SARS, forma-se uma rede de colaboração entre grupos de pesquisadores brasileiros e, especificamente, aqueles atuantes na Imunologia, com a necessidade de colaboração de grupos da Bahia, visto que o número de casos na região aumenta progressivamente. O Brasil apresenta uma curva crescente de casos e medidas de restrição de circulação de pessoas e de precaução são fundamentais para a contenção da transmissão do vírus SARS-CoV-2. Na Bahia, o município de Salvador é classificado como "transmissão comunitária" e, entre 12/03/2020 e 04/04/2020, foram confirmados 183 casos da COVID-19 de residentes de Salvador. O prognóstico da infecção por SARS-CoV-2 pode

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 4.014.165

variar a depender da população acometida, visto que alguns haplótipos HLA supostamente conferiram resistência ao SARS-CoV-1 na China (RAOULT et al., 2020). Portanto, torna-se fundamental estudar a resposta imune na população da Bahia e desenvolver ferramentas adequadas para a resolução dos casos graves nesta população. Do ponto de vista imunológico, a discrepância entre a gravidade dos casos observados na China e os que ocorrem fora da China pode ser resultado da exposição comunitária prévia a não-SARS-CoVs e seus epítomos antigênicos, levando a potencialização dependente de anticorpos (antibody-dependent enhancement) do SARS-CoV-2. Tal potencialização pode provocar inflamação sustentada, linfopenia e / ou tempestade de citocinas, que foram observadas nos casos graves. Isso pode explicar as discrepâncias geográficas de casos graves. E torna ainda mais justificável investir em estudos e tecnologias aplicáveis a cada população, bem como em prevenção, diagnóstico e tratamento adequados. A imunidade contra a infecção ou também padrões de semi-imunidade (capacidade do sistema imunológico de evitar infecções graves) podem ser devido a respostas imunes celulares e não humorais. Dessa forma, é imprescindível obter-se um perfil de moléculas inflamatórias de cada população e, a partir desse resultado, torna-se viável o planejamento da terapia farmacológica adequada para cada população, bem como estudos de aplicação de fármacos já disponíveis. Além disso, o padrão de marcadores obtidos viabilizará a produção de testes para definir o prognóstico da infecção.

HIPÓTESE

Espera-se com este estudo a determinação da expressão de genes relacionados a vias moleculares e à resposta imune que possam estar associadas às formas graves da doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, bem como a determinação de epítomos promissores, reconhecidos em casos graves da COVID-19. Sendo assim, obtenção desse padrão de assinatura poderá fornecer subsídios para o diagnóstico, prognóstico e terapêutica da doença.

METODOLOGIA

Indivíduos com o diagnóstico positivo para a infecção por SARS-CoV-2 serão agrupados de acordo com a gravidade da doença. Aqueles com a forma leve comporão o grupo caso e os considerados com a forma grave comporão o grupo controle. Amostras de secreção de nasofaringe e orofaringe de sangue serão coletadas para o diagnóstico da infecção pelo vírus, avaliação da expressão gênica e imunofenotipagem. A análise da expressão gênica será feita pela técnica do arranjo de PCR em tempo real (RT2 qPCR ARRAY), utilizando 84 genes envolvidos com respostas antivirais. A imunofenotipagem para determinação das expressões de monócitos e subpopulações de

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.014.165

linfócitos, quantificação das imunoglobulinas IgM e IgG e das citocinas interferon gamma (IFN-), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina do tipo 2 (IL-2) será realizada por citometria de fluxo. As tendências de assinatura molecular serão observadas com um mapa de calor e os cálculos de diferença de expressão serão feitos com base no Ct. As comparações entre os grupos serão feitas com o teste T de Student ou o teste Mann-Whitney, a depender da distribuição dos dados. Em seguida, será realizada a identificação de epítomos candidatos para fabricação de vacina adequada para a população e marcadores para diagnóstico de casos graves, utilizando um método de microarranjo proteômico específico para SARS-CoV-2. Para o cálculo do tamanho da amostra, considerou-se uma exposição (aumento na expressão gênica de marcadores de resposta antiviral) de 50% entre os controles, 75% entre os controles. Assim, com nível de confiança (bicaudal) de 95% e poder de 80%, numa proporção de 1:1, serão avaliados 58 indivíduos em cada grupo.

MÉTODO:

- diagnóstico da covid-19
- coleta de secreção de nasofaringe e orofaringe
- coleta de sangue - extração de rna e síntese de cdna
- técnica do arranjo de pcr em tempo real (rt2 qpcr array)
- imunofenotipagem para determinação da expressão de células imunológicas e imunoglobulinas
- avaliação do perfil de citocinas
- análise dos dados
- mapeamento de epítomos de sars-cov2 para produção de vacinas e para o diagnóstico

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Indivíduos com idade maior ou igual a 18 anos
- Diagnóstico laboratorial de infecção ativa por SARS-Cov-19 durante avaliação ambulatorial ou hospitalização

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Doença autoimune em atividade
- Neoplasia maligna em tratamento

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO:

Caracterizar o perfil de expressão gênica e o imunofenótipo associado à gravidade de COVID-19,

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 4.014.165

bem como identificar epítomos de SARS-CoV-2 reconhecidos pela resposta imune humoral na população em estudo.

OBJETIVO SECUNDÁRIO:

- Identificar os genes expressos diferencialmente comparados com a forma leve da doença.
- Classificar o perfil de expressão de macrófagos e monócitos na infecção de SARS-CoV- 2 associando aos graus de evolução da doença;
- Caracterizar distribuição de subpopulações de linfócitos e padrão de expressão das proteínas de superfície celular;
- Avaliar quantificação de anticorpos IgM e IgG específicos contra proteínas do SARSCoV- 2 associando-os ao tempo de infecção e condição clínica do paciente;
- Determinar perfil de citocinas IL-2, IFN-y e TNF-alfa.
- Identificar epítomos de SARS-CoV-2 reconhecidos pela resposta imune humoral (IgM e IgG) na população da Bahia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Os procedimentos de avaliação clínica e laboratorial fazem parte do atendimento padrão ao qual os participantes são submetidos mesmo sem a participação na pesquisa. Segundo as recomendações da sociedade brasileira de patologia clínica / medicina laboratorial para coleta de sangue venoso, as complicações mais comuns decorrentes da coleta são a formação de hematoma, punção acidental de uma artéria, anemia iatrogênica, infecção, lesão nervosa e dor; as quais são minimizadas através da capacitação e treinamento do flebotomista.

Os profissionais de saúde estão capacitados para contorná-las caso ocorram, como descrito a seguir. Tais complicações estão explícitas no TCLE. A punção acidental de uma artéria, a anemia iatrogênica e a lesão nervosa são evitadas quando o flebotomista está capacitado e não devem ocorrer. Se houver a punção acidental de uma artéria, a hemostasia será realizada pelo profissional. Caso ocorram a anemia iatrogênica e a lesão nervosa, o participante estará em atendimento médico e terá suporte ao tratamento. Formação de hematoma e dor podem ocorrer e precisam ser acompanhados pelo médico para o manejo com compressas geladas e analgésicos e para observação da evolução do quadro. A infecção precisa ser evitada através das medidas de biossegurança: antissepsia do local da punção com gaze estéril embebida em álcool 70%, uso de agulha estéril e descartável, adaptador de agulha estéril, uso de EPI pelo profissional e desinfecção

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 4.014.165

das superfícies de trabalho com álcool 70%. Caso ocorra uma infecção, o pesquisador responsável irá, imediatamente, levar o participante para o atendimento médico e dar suporte ao tratamento. Algum indivíduo, devido à presença de distúrbio de coagulação não diagnosticado, pode apresentar hemorragia após a punção venosa. Após os procedimentos emergenciais de hemostasia realizados pelo profissional da saúde em atendimento, será ativado o protocolo de emergência preconizado pelo sistema único de saúde, acompanhado integralmente pela pesquisadora responsável. O participante da pesquisa tem o direito à assistência integral gratuita, pelo tempo que for necessário, garantido pela pesquisadora responsável. O voluntário, devido à ansiedade e medo, pode apresentar agravos à saúde que requeiram condutas emergenciais - manobras básicas do Suporte Básico de Vida (SBV). A ansiedade e o medo podem deflagrar, principalmente: síncope, crise hipertensiva, angina, infarto do miocárdio, hipoglicemia, convulsão, epilepsia e acidente vascular cerebral. Esses agravos devem ser prevenidos observando-se os principais sinais e sintomas de ansiedade e medo para que possam ser controlados: palidez, sudorese, mãos e pés frios ou suados, respiração ofegante, boca seca, dor ou aperto no peito, taquicardia, falta de ar, tremores nas mãos ou outras partes do corpo, sensação de fraqueza ou cansaço e náusea. O participante receberá o suporte retrocitado da pesquisadora responsável e de sua equipe. Caso ocorram os danos à saúde do participante proporcionados pela pesquisa anteriormente citados ou algum dano físico / emocional não previsto, os pesquisadores farão os encaminhamentos necessários, sem nenhum custo para o participante, e a pesquisa será suspensa com notificação aos CEP responsáveis. O participante da pesquisa tem o direito à assistência integral gratuita, devido a danos diretos/ indiretos e imediatos/ tardios, pelo tempo que for necessário, garantido pela pesquisadora responsável (Itens II.3.1 e II.3.2, da Resolução CNS nº 466 de 2012).

BENEFÍCIOS

O participante da pesquisa não receberá nenhum tipo de benefício material, mas contribuirá para proporcionar conhecimento científico à coletividade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo do tipo observacional CASO-CONTROLE para caracterizar expressão gênica e imunofenotípica, em 116 indivíduos, divididos em 2 grupos, que apresentarem a forma grave da COVID-19 (grupo CASO) e indivíduos com a forma leve da doença (grupo CONTROLE).

Participarão os seguintes centros de pesquisa no Brasil:

- Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.014.165

- Emec Empreendimentos Médico Cirúrgicos Ltda
- Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia UFBA
- Bahia Secretaria de Saúde do Estado
- Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos - HUPES

Não haverá armazenamento de amostras.

Orçamento próprio: R\$168.350,94

Previsão de início do estudo: abril/2020

Previsão de encerramento do estudo: abril/2021

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de análise de respostas ao parecer pendente nº 3.987.979 emitido pela Conep em 24/04/2020:

1. Quanto ao orçamento do estudo, solicita-se esclarecimento quanto ao responsável pelo patrocínio do estudo, se será financiamento próprio ou não. Caso o patrocínio tenha outra fonte que não o pesquisador, será necessário adequar os documentos para constar o nome e os dados da pessoa jurídica/física responsável pelo patrocínio, além de se apresentar nova Folha de Rosto e adequação do documento PB Informações Básicas.

RESPOSTA: No projeto Detalhado, no item orçamento do estudo, foi inserido esclarecimento quanto ao responsável pelo patrocínio do estudo, o qual terá financiamento próprio.

ANÁLISE: Pendência atendida.

2 . No documento PB Informações Básicas intitulado

"PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1536737.pdf" gerado em 08/04/2020, quanto ao item "orçamento financeiro", solicita-se que seja apresentado orçamento financeiro mais detalhado, que especifique TODOS os recursos, fontes e destinação (Norma Operacional CNS nº 001 de 2013,

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.014.165

item 3.3.e).

RESPOSTA: o “orçamento financeiro” foi detalhado na plataforma como solicitado.

ANÁLISE: Pendência atendida.

3. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, arquivo “TCLE.pdf”, postado na Plataforma Brasil em 07/04/2020, solicita-se esclarecimento se haverá armazenamento de amostras. Caso afirmativo, solicita-se adequação do protocolo de pesquisa conforme disposto na Resolução CNS nº 441 de 2011 e na Portaria MS nº 2201 de 2011. Solicita-se, ainda, especificar por quanto tempo as amostras serão armazenadas (se for o caso) após o término do estudo e o destino das amostras após o período de armazenamento.

RESPOSTA: No TCLE, foi inserido esclarecimento quanto ao armazenamento de amostras “Todo o material coletado (amostras) será descartado após o término da pesquisa (não será armazenado).”

ANÁLISE: Pendência atendida.

Considerações Finais a critério da CONEP:

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

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1536737.pdf	25/04/2020 11:35:57		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	25/04/2020 11:14:50	Soraya Castro Trindade	Aceito
Outros	CartaResposta.pdf	25/04/2020 11:06:08	Soraya Castro Trindade	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodetalhado.pdf	25/04/2020 11:04:05	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de	HGCA.pdf	25/04/2020	Soraya Castro	Aceito

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.014.165

Instituição e Infraestrutura	HGCA.pdf	11:01:51	Trindade	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	EMEC.pdf	25/04/2020 11:01:26	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	PauloCarvalhoFilho.pdf	08/04/2020 11:23:19	Soraya Castro Trindade	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	08/04/2020 11:16:42	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	VascoAzevedo.pdf	07/04/2020 16:05:27	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TaianeGondim.pdf	07/04/2020 16:05:07	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	SorayaTrindade.pdf	07/04/2020 16:04:11	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	RobertoMeyer.pdf	07/04/2020 16:03:14	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	RicardoFigueiredo.pdf	07/04/2020 16:02:50	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	RebecaSantos.pdf	07/04/2020 16:01:59	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	IsaacGomesFilho.pdf	07/04/2020 16:01:21	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	GubioCampos.pdf	07/04/2020 16:00:57	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	GisellePinto.pdf	07/04/2020 15:59:56	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	EllenSantosLima.PDF	07/04/2020 15:59:29	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AlexTorres.pdf	07/04/2020 15:56:42	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	HUPES.pdf	07/04/2020 15:55:26	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	NUPPIIM.pdf	07/04/2020 15:55:04	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	LABIMUNO.pdf	07/04/2020 15:54:43	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	UEFS.pdf	07/04/2020 15:54:19	Soraya Castro Trindade	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	UFBA.pdf	07/04/2020 15:53:58	Soraya Castro Trindade	Aceito

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.014.165

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 07 de Maio de 2020

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador(a))

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA ASSINATURA MOLECULAR PARA A DETERMINAÇÃO DE GRAVIDADE DA DOENÇA DO CORONAVÍRUS 2019 (COVID-19)

Pesquisador: Soraya Castro Trindade

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30764720.1.3001.5662

Instituição Proponente: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.040.329

Apresentação do Projeto:

Este Comitê de Ética em Pesquisa considera o presente protocolo de pesquisa APROVADO de acordo com o parecer substanciado número 4.014.165 emitido pela CONEP em 7 de maio de 2020.

Objetivo da Pesquisa:

Este Comitê de Ética em Pesquisa considera o presente protocolo de pesquisa APROVADO de acordo com o parecer substanciado número 4.014.165 emitido pela CONEP em 7 de maio de 2020.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Este Comitê de Ética em Pesquisa considera o presente protocolo de pesquisa APROVADO de acordo com o parecer substanciado número 4.014.165 emitido pela CONEP em 7 de maio de 2020.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este Comitê de Ética em Pesquisa considera o presente protocolo de pesquisa APROVADO de acordo com o parecer substanciado número 4.014.165 emitido pela CONEP em 7 de maio de 2020.

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

UF: BA

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-902

Telefone: (71)3283-8951

E-mail: cepics@ufba.br



Continuação do Parecer: 4.040.329

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Este Comitê de Ética em Pesquisa considera o presente protocolo de pesquisa APROVADO de acordo com o parecer consubstanciado número 4.014.165 emitido pela CONEP em 7 de maio de 2020.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Este Comitê de Ética em Pesquisa considera o presente protocolo de pesquisa APROVADO de acordo com o parecer consubstanciado número 4.014.165 emitido pela CONEP em 7 de maio de 2020.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este Comitê de Ética em Pesquisa considera o presente protocolo de pesquisa APROVADO de acordo com o parecer consubstanciado número 4.014.165 emitido pela CONEP em 7 de maio de 2020.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	25/04/2020 11:14:50	Soraya Castro Trindade	Aceito
Outros	CartaResposta.pdf	25/04/2020 11:06:08	Soraya Castro Trindade	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodetalhado.pdf	25/04/2020 11:04:05	Soraya Castro Trindade	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

UF: BA

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-902

Telefone: (71)3283-8951

E-mail: cepics@ufba.br



UFBA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA



Continuação do Parecer: 4.040.329

SALVADOR, 21 de Maio de 2020

Assinado por:
DANIEL DOMINGUEZ FERRAZ
(Coordenador(a))

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

UF: BA

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-902

Telefone: (71)3283-8951

E-mail: cepics@ufba.br