

**CENTRO UNIVERSITÁRIO LUSÍADA**  
**CURSO DE BIOMEDICINA**

**MANUELA BIANCHINI SILVA**

**AVALIAÇÃO DA VIA DE HIPÓXIA EM PACIENTES PÓS COVID**

**SANTOS**

**2023**

**CENTRO UNIVERSITÁRIO LUSÍADA**  
**CURSO DE BIOMEDICINA**

**AVALIAÇÃO DA VIA DE HIPÓXIA EM PACIENTES PÓS COVID**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro Universitário Lusíada como requisito para a obtenção do título de bacharel em Biomedicina, orientado pelo Professor Me. Edgar Matias Bach Hi.

**SANTOS**

**2023**

**MANUELA BIANCHINI SILVA**

**AVALIAÇÃO DA VIA DE HIPÓXIA EM PACIENTES PÓS-COVID**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro Universitário Lusíada como requisito para a obtenção do título de bacharel em Biomedicina, orientado pelo Professor Me. Edgar Matias Bach Hi.

**DATA: 21/11/2023**

---

**Professor Me. Edgar Matias Bach Hi**

---

**Professora Me. Thais Ludmilla Moretto**

---

**Professora Me. Eliana Cláudia Perroud Morato Ferreira**

**SANTOS**

**2023**

Este trabalho é dedicado a todos que estiveram ao meu lado ao longo desses quatro anos, oferecendo apoio constante e incentivando meu progresso contínuo, sem vocês nada seria possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Rita de Cássia e Carlos Roberto, que sempre me incentivaram a buscar o conhecimento, ir atrás dos meus sonhos e enfrentar os obstáculos. Obrigada por nunca, mesmo diante das dificuldades, deixarem de apoiar minha jornada acadêmica.

A minha irmã, Marcela, que me inspira a buscar a melhoria constante, a fim de ser um modelo que ela possa admirar e seguir.

Aos amigos que fiz ao longo da vida, obrigada por aturarem todos os meus surtos relacionados a faculdade, mesmo quando vocês nem entendiam sobre o que. Obrigada por sempre se fazerem presentes e vibrarem por todas as minhas conquistas.

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup> Me. Edgar Matias, que me acolheu no meu primeiro ano e que fez a diferença na minha formação. Obrigada por sempre acreditar no meu potencial e por todos os conselhos, broncas e risadas que compartilhamos.

Ao meu grupo de pesquisa, principalmente a Dra. Raquel Gritte, pela oportunidade, acolhimento e por todos os meses de esforços e trabalho duro. Obrigada covidonas e covidinho, por todas as risadas, fofocas e cafés compartilhados, que tornaram nossas tardes de trabalho mais leves e inesquecíveis.

Aos amigos que fiz durante a graduação e que fizeram com que esses quatro anos passassem voando e que tornaram o processo muito mais leve. Todos os grupos que fiz parte e todos os laços que criei estarão pra sempre comigo. Obrigada a cada um que tornou minhas manhãs melhores.

A todos os professores e biomédicos que contribuíram para minha formação, os momentos e conhecimentos compartilhados serão sempre lembrados com carinho.

A Biomedicina Santos, por ter sido minha segunda família por quatro anos, por ter me recebido de braços abertos e ter me proporcionado experiências que nunca esquecerei.

**DOIAQUIJÊ.**

*“A ciência e a vida cotidiana não podem e não devem ser separadas.”*

*Rosalind Franklin*

## RESUMO

A COVID-19 é uma doença infecciosa primordialmente do trato respiratório, desencadeada pelo vírus SARS-CoV-2. Manifestou-se inicialmente em Wuhan, China, no ano de 2019 e disseminou-se tomando proporções pandêmicas. Analisando as alterações fisiopatológicas, verifica-se correlação entre a infecção por coronavírus e quadros de sepse. Muitos pacientes que sobrevivem a sepse desenvolvem a síndrome pós-sepse (SPS). Uma das manifestações clínicas da SPS é o quadro de hipóxia, que pode se agravar de acordo com o volume de oxigênio consumido associado a diminuição na extração de oxigênio pelos tecidos periféricos e alterações profundas na microcirculação. O objetivo deste trabalho é verificar se a via de hipóxia se mantém alterada em pacientes que tiveram COVID-19 grave e sobreviveram em comparação com indivíduos que nunca apresentaram teste positivo para COVID-19. Os monócitos foram isolados do sangue e submetidos a qPCR para avaliação da expressão gênica de HIF-1 $\alpha$  e outros genes associados a vida da hipóxia. As avaliações foram realizadas em 46 pacientes diagnosticados com COVID-19 e provenientes do Hospital Municipal Guilherme Álvaro e Santa Casa de Santos, na cidade de Santos. Os resultados foram analisados usando o teste não paramétrico de Mann Whitney, considerando estatisticamente significante  $p < 0.05$ . A expressão do HIF-1 $\alpha$  se mostrou diminuído no grupo COVID quando em comparação ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ), os outros genes avaliados não demonstraram diferença estatística significativa. Desta forma, ainda é necessário a realização de estudos complementares para melhor compreensão da via de hipóxia em pacientes pós-COVID.

**Palavras-chaves:** COVID-19; síndrome pós-covid (SPC); HIF-1a.

## ABSTRACT

COVID-19 is an infectious disease primarily of the respiratory tract, triggered by the SARS-CoV-2 virus. It initially manifested itself in Wuhan, China, in 2019 and spread to pandemic proportions. Analyzing the pathophysiological changes, there is a correlation between coronavirus infection and sepsis. Many patients who survive sepsis develop post-sepsis syndrome (SPS). One of the clinical manifestations of SPS is hypoxia, which can worsen according to the volume of oxygen consumed associated with a decrease in oxygen extraction by peripheral tissues and profound changes in microcirculation. The aim of this study is to verify whether the hypoxia pathway remains altered in patients who had severe COVID-19 and survived compared to individuals who never tested positive for COVID-19. The monocytes were isolated from the blood and submitted to qPCR to evaluate the gene expression of HIF-1 $\alpha$  and other genes associated with hypoxia life. The evaluations were carried out on 46 patients diagnosed with COVID-19 and from the Guilherme Álvaro and Santa Casa de Santos Municipal Hospital, in the city of Santos. The results were analyzed using the non-parametric Mann-Whitney test, considering it statistically significant  $p < 0.05$ . The expression of HIF-1 $\alpha$  was decreased in the COVID group when compared to the control group ( $p < 0.0001$ ), the other genes evaluated did not show statistically significant difference. Thus, it is still necessary to carry out complementary studies to better understand the hypoxia pathway in post-COVID patients.

**Keywords:** COVID-19; post-COVID syndrome (PCS); HIF-1 $\alpha$ .

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 - Estrutura do SARS-CoV-2. ....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 2 - Mecanismo de infecção e replicação do SARS-Cov-2. ....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 3- Mecanismo da hiperinflamação causada pela infecção da COVID-19.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 4- Manifestações Extrapulmonares da infecção por SARS-CoV-2. ....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 5- Família de dioxigenases, denominadas HIF hidroxilases.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 6 - Via do Fator Induzido por Hipóxia (HIF).....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 7- Fluxograma Metodológico. ....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 8 - Esquematização do n amostral (n= 68).....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 9 - Expressão de mRNA do TLR4. ....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 10 - Expressão de mRNA do IL-1B. ....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 11 - Expressão de mRNA do HIF-1a. ....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 12 - Expressão de mRNA do NLRP3.....</b>	<b>40</b>

## ABREVIATURAS

<b>ARDS</b>	Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>CD11B</b>	Cluster diff
<b>CD14</b>	Cluster diff 14
<b>CD18</b>	Cluster diff 18
<b>CMP</b>	Progenitor mieloide comum
<b>CCL-2</b>	Beta-quimiocina 2
<b>CCL-3</b>	Beta-quimiocina 3
<b>CCL-4</b>	Beta-quimiocina 4
<b>CXCL10</b>	Alfa-quimiocina 10
<b>DAMPs</b>	Padrões Moleculares Relacionados ao Dano
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ECA-2</b>	Enzima conversora da angiotensina 2
<b>ECMO</b>	Oxigenação por membrana extracorpórea
<b>ERGIC</b>	Compartimento intermediário Retículo Endoplasmático-Golgi
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FIH</b>	Fator de inibição do HIF
<b>FMO</b>	Falência múltipla de órgãos
<b>GM-CSF</b>	fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
<b>HIF</b>	Fator induzido por hipóxia
<b>HIF-1A</b>	Fator induzido por hipóxia 1 alfa
<b>HIF-2A</b>	Fator induzido por hipóxia 2 alfa
<b>HIF-3A</b>	Fator induzido por hipóxia 3 alfa
<b>HIF-1B</b>	Fator induzido por hipóxia 1 beta
<b>HRE</b>	Elemento de resposta a hipóxia
<b>IFN-g</b>	Interferon gama
<b>IL-1B</b>	Interleucina 1 beta
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>IL-10</b>	Interleucina 10

<b>IL-13</b>	Interleucina 13
<b>IL-18</b>	Interleucina 18
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LRR</b>	Repetição rica em leucina
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo bacteriano
<b>M1</b>	Macrófagos pró-inflamatórios
<b>M2</b>	Macrófagos anti-inflamatórios
<b>MD2</b>	Proteína de diferenciação mieloide 2
<b>MERS-CoV</b>	Coronavírus da Síndrome Respiratória do Médio Oriente
<b>MØ</b>	Monócitos naive (virgens)
<b>NF-KB</b>	Fator nuclear kappa b
<b>NLRs</b>	Receptores <i>Nod-like</i>
<b>NSPS</b>	Proteínas não estruturais
<b>O<sup>2</sup></b>	Oxigênio
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>ORFs</b>	fases abertas de leitura
<b>PAMPs</b>	Padrão Molecular Associado ao Patógeno
<b>PHD1</b>	Prolil hidroxilase 1
<b>PHD2</b>	Prolil hidroxilase 2
<b>PHD3</b>	Prolil hidroxilase 3
<b>Proteína S</b>	proteína Spike
<b>PRRs</b>	Receptores de Reconhecimento de Padrões
<b>RBD</b>	Receptor Binding Domain
<b>RBM</b>	Receptor Binding Motif
<b>RdRP</b>	RNA polimerase dependente de RNA
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensageiro
<b>RTC</b>	Complexo Replicação-Transcrição
<b>SARS-CoV</b>	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave
<b>SARS-Cov-2</b>	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
<b>SMF</b>	Sistema de fagocitose mononuclear
<b>SPC</b>	Síndrome pós-COVID
<b>TLR</b>	Receptores <i>Toll-like</i>

<b>TLR4</b>	Receptores <i>Toll-Like</i> de classe 4
<b>TMPRSS2</b>	Protease serina transmembranar do tipo II
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>UTI</b>	Unidade de Cuidados intensivos
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
<b>VHL</b>	Proteína <i>Von Hippel-Lindau</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1. COVID-19</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2 Monócitos e Macrófagos</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3. Interconexão Entre Monócitos e Inflamassoma: Implicações na COVID-19</b> ....	<b>23</b>
<b>1.4. Hipóxia</b> .....	<b>26</b>
1.4.1 Fator induzido por hipóxia (HIF) .....	27
1.4.2 HIF-1 $\alpha$ .....	27
<b>1.5. Síndrome Pós COVID e Síndrome Pós-Sepse</b> .....	<b>29</b>
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>32</b>
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1. Seleção dos Pacientes</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2. Seleção do Grupo Controle</b> .....	<b>34</b>
<b>3.3. Prontuários médicos</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4. Separação de Monócitos</b> .....	<b>35</b>
<b>3.5. Extração de RNA</b> .....	<b>36</b>
<b>3.6 Síntese de cDNA dos Monócitos</b> .....	<b>37</b>
<b>3.7. qPCR</b> .....	<b>37</b>
<b>3.8. Gene Constitutivo</b> .....	<b>38</b>
<b>3.9. Análise Estatística</b> .....	<b>38</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>
<b>ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP: CENTRO UNIVERSITÁRIO LUSÍADAS</b> .....	<b>50</b>

<b>ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP: IRMANDADE SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SANTOS .....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO C– PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP: HOSPITAL GUILHERME ÁLVARO.....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>53</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. COVID-19

Em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou estado pandêmico devido à disseminação do vírus denominado Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-Cov-2) (Sohrabi; Alsafi; O'Neill; Khan *et al.*, 2020). Relatado pela primeira vez em Wuhan, China, o SARS-Cov-2, agente causador da doença infecciosa COVID-19, acomete principalmente o trato respiratório (Zhu; Zhang; Wang; Li *et al.*, 2020). Mundialmente, os sistemas de saúde tornaram-se rapidamente sobrecarregados por pacientes infectados, acarretando cerca de 8,5 milhões de óbitos até o primeiro semestre de 2023 (COVID, 2020).

No Brasil foram registrados, até abril de 2023, 1.157.748 óbitos dentre 46,7 milhões de casos de COVID-19. O estado de São Paulo alcançou o número de 277.103 óbitos, sendo 10,7 milhões o total de infectados (Paulo, 2023). No município de Santos – SP, é observado uma incidência de mortalidade de 3.540 pacientes dentre os 105.868 acometidos pelo vírus (Santos, 2023).

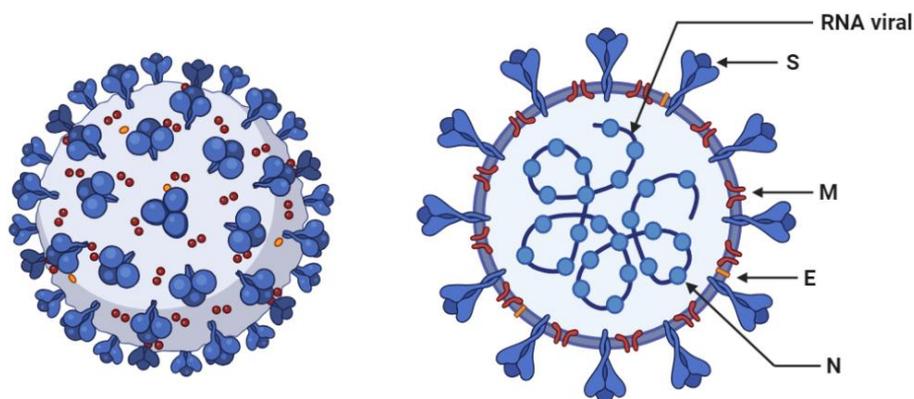
Apesar de tal cenário alarmante, as coronavíruses não eram ao todo desconhecidas. Nos anos de 2002 e 2012, a sociedade foi alvo de dois relevantes vírus da família *Coronaviridae*, sendo eles o Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV) e o Coronavírus da Síndrome Respiratória do Médio Oriente (MERS-CoV) (Hu; Guo; Zhou; Shi, 2021). O SARS-CoV, em 2002, assim como o atual coronavírus, surgiu na China, porém tomou proporções reduzidas, apresentando 8.422 casos e causando a morte de 916 infectados. Posteriormente, em 2012, o MERS-CoV manifestou-se como uma epidemia nos Países Árabes, acometendo cerca de 1.800 indivíduos (Kadam; Sukhramani; Bishnoi; Pable *et al.*, 2021). No final de novembro de 2019 foram contabilizados 2.294 casos, dentre os quais 858 repercutiram em óbito (Souza; Silva; Pinheiro; Santos, 2021).

Com o aumento de quadros de infecções similares à síndrome respiratória causada pelos Coronavírus anteriormente descritos e, com particularidades preocupantes quanto a conduta clínica, foi confirmado, no final de 2019, um novo vírus. Analisado por técnicas da biologia molecular, foi observado que seu genoma era incompatível com qualquer outro previamente sequenciado. Posto isso, o novo coronavírus, foi primeiramente denominado 2019-nCoV (Weiss; Leibowitz, 2011), porém com pesquisas quanto a sua taxonomia, o vírus foi agrupado juntamente com o SARS-CoV na classe dos Betacoronavírus. Em março de 2020, com a

declaração de consenso do Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus, foi renomeado SARS-CoV-2 (Gorbalenya; Baker; Baric; de Groot *et al.*, 2020).

Caracterizados por possuírem morfologia esférica, com pontas claviformes projetadas em sua superfície tal como coroas, os vírus da família taxonômica *Coronaviridae* são responsáveis pelo desencadeamento de quadros infecciosos nomeados como coronavirose (Ravi; Saxena; Panda, 2022). A família *Coronaviridae* é descrita por vírus de diâmetro aproximado de 60 a 140 nm, com genoma RNA de fita-única de sentido positivo, contendo de 26 a 32 quilobases de comprimento e, representando assim o grupo de vírus RNAs de maior tamanho genômico (Kadam; Sukhramani; Bishnoi; Pable *et al.*, 2021). O SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, é classificado como um vírus pertencente a sistemática de ordem *Nidovirales*, sendo essa enquadrada na família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae*, gênero *Betacoronavirinae* e subgênero *Sarbecovirus* (Ravi; Saxena; Panda, 2022).

Os vírus da família *Coronaviridae* dispõem-se de um complexo proteico operacional de grande importância para seus mecanismos de virulência haja visto que tais proteínas, em conjunto, atuam de forma a viabilizar e garantir a infecção viral da célula hospedeira. Em seu genoma estão contidas 14 fases abertas de leitura (ORFs), as quais codificam 27 proteínas, sendo de principal relevância em sua patogenicidade as proteínas estruturais E, N, M e S (Figura 1) (Li; Jia; Tian; Wu *et al.*, 2022).



**Figura 1 - Estrutura do SARS-CoV-2.** O RNA viral é complexado com a proteína N para formar um envelope helicoidal dentro da membrana viral; S, proteína Spike; M, proteína M; E, proteína de envelope; N, proteína de nucleocapsídeo. Adaptado de Weiss, 2011.

A proteína E é uma fração importante do envelope viral altamente expressa em células infectadas pois participa do maquinário de montagem, brotamento, morfogêneses e deslocamento de vírions (Ravi; Saxena; Panda, 2022). É a menor proteína transmembrana integral com proporções aproximadas de 8 a 12 kD. Atua na interação com receptores Toll-Like

de classe 2 (Barnett; Xie; Asakura; Song *et al.*, 2023; Planès; Bert; Tairi; BenMohamed *et al.*, 2022) e na oligomerização de moléculas de viroporinas, as quais exercem a função de condução de íons para a liberação viral da célula (Li; Jia; Tian; Wu *et al.*, 2022; Mandala; McKay; Shcherbakov; Dregni *et al.*, 2020; Zhang; Xiang; Huo; Zhou *et al.*, 2021)

A proteína N (~43–50 kDa) participa do controle da replicação do material genético e consequentemente de toda a envoltura helicoidal do nucleocapsídeo. Além disso, participa da interação vírus-hospedeiro por meio da regulação do ciclo celular da célula infectada, haja visto que coordena mecanismos apoptóticos para a facilitação da disseminação viral (Kadam; Sukhramani; Bishnoi; Pable *et al.*, 2021; Li; Jia; Tian; Wu *et al.*, 2022). A proteína M (~25–30 kDa), por sua vez, é de suma importância na estabilidade da montagem dos vírions e atua de modo a definir a forma do envelope viral. Sua interação com a proteína S promove a retenção da mesma no compartimento intermediário Retículo Endoplasmático-Golgi (ERGIC), atuando na incorporação de novas partículas virais. (Li; Jia; Tian; Wu *et al.*, 2022).

Disposta como uma camada de espículos na superfície viral, a proteína Spike (S) é uma glicoproteína dimérica de aproximadamente 150 kDa composta de 1273 aminoácidos. Tal estrutura conformacional permite a adesão e fusão do vírus à sua célula hospedeira, sendo assim classificada como uma proteína de fusão de classe 1. A subunidade S1 é formada pela sequência de sinalização RBD (Receptor Binding Domain), a qual possui o receptor RBM (Receptor Binding Motif), responsável pela ligação com a enzima conversora da angiotensina 2 (ECA-2) possibilitando a entrada na célula hospedeira. Essa ligação leva a uma mudança de conformação na subunidade S2, promovendo a fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira e iniciando assim o processo de endocitose (Li; Jia; Tian; Wu *et al.*, 2022; Ravi; Saxena; Panda, 2022; Zhang; Xiang; Huo; Zhou *et al.*, 2021) (**Figura 1**).

Para além de tais proteínas estruturais mencionadas, os mecanismos patogênicos virais contam com a ação de proteínas não estruturais, categorizadas como nsps (non-structural proteins). Dentre as 16 nsps de funcionalidade viral, destacam-se as de correlação fisiopatológica nsp1, nsp2 e nsp3.

Ligando-se à subunidade 40s ribossomal, a nsp1 atua na inibição da tradução proteica da célula hospedeira. Outro mecanismo de interação envolve as proteínas humanas prohibitin 1 e prohibitin 2, as quais quando ligadas a nsp2, acarretam em uma disfunção na morfologia mitocondrial e na proliferação celular (Kadam; Sukhramani; Bishnoi; Pable *et al.*, 2021). A nsp3, por sua vez, é uma proteína de múltiplos domínios, sendo um dos quais o ADP-ribose fosfatase (ADRP) que apresenta um sítio de ligação ADP-ribose (ADPr) responsável pela interação com vias de resposta imunológica, como a via de sinalização do fator nuclear kappa

B (NF- $\kappa$ B) (Li; Jia; Tian; Wu *et al.*, 2022). Seus demais domínios correlacionam-se com processos de desubiquitinação, levando ao escape de proteólise, e com a inibição de processos traducionais do hospedeiro (Kadam; Sukhramani; Bishnoi; Pable *et al.*, 2021).

Apresentando tais características patogênicas, o SARS-CoV-2 propagou-se rapidamente por todo o mundo demonstrando uma alta capacidade de transmissibilidade e, sendo assim uma ameaça para a saúde pública mundial. Bem como os outros coronavírus respiratórios, o contato direto e as gotículas respiratórias são as principais vias de transmissão, podendo ter como via de entrada a mucosa dos olhos, nariz ou boca quando os infectados tosse ou espirram (Barnett; Xie; Asakura; Song *et al.*, 2023; Li; Jia; Tian; Wu *et al.*, 2022; Mandala; McKay; Shcherbakov; Dregni *et al.*, 2020; Tay; Poh; Rénia; MacAry *et al.*, 2020)

Após a infecção, o período de incubação média é de 4 a 5 dias, tendo início dos sintomas no intervalo de 6 a 9 dias, de modo que 97,5% dos doentes sintomáticos desenvolvem sintomas no prazo médio de 11,5 dias (Tay; Poh; Rénia; MacAry *et al.*, 2020). A carga viral, quando mensurada em indivíduos acometidos pela COVID-19, foi correlacionada com um pior prognóstico do quadro clínico, visto que em pacientes mais graves a quantificação foi mais elevada e de maior duração (Umakanthan; Sahu; Ranade; Bukelo *et al.*, 2020).

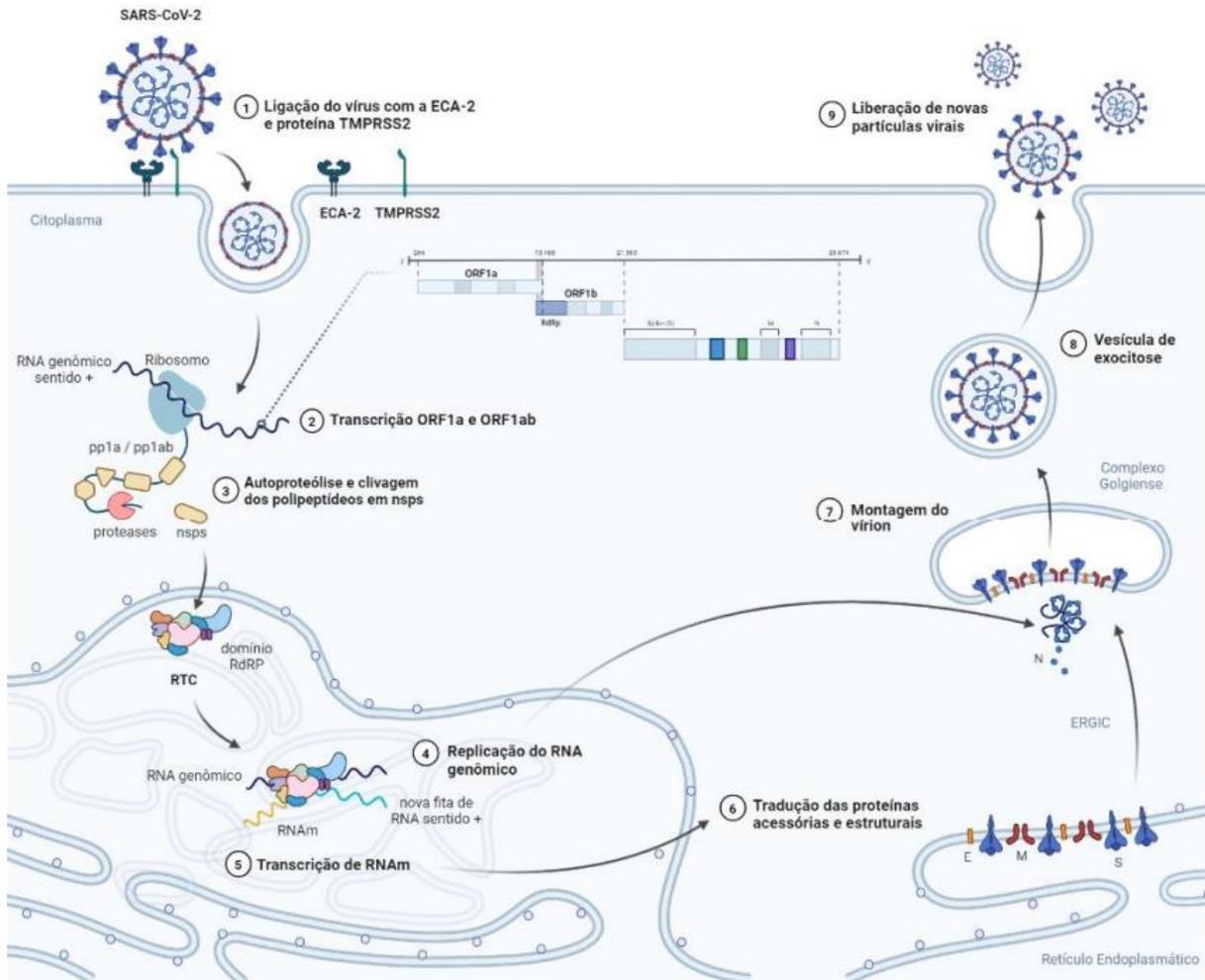
A infecção da COVID-19 inicia-se com a ligação do receptor RBM da subunidade S1 com o domínio da peptidase ECA-2 (Li; Jia; Tian; Wu *et al.*, 2022), tendo, portanto, como principais alvos, células epiteliais das vias respiratórias, células endoteliais vasculares e macrófagos nos pulmões, uma vez que essas expressam em abundância o receptor de entrada (Li; Jia; Tian; Wu *et al.*, 2022; Zhang; Xiang; Huo; Zhou *et al.*, 2021).

A internalização na célula depende da ativação da proteína S realizada por diferentes mecanismos. A clivagem em seus dois domínios, é feita pela ação enzimática proteolítica da furina, resultando em uma mudança conformacional da subunidade S2. O domínio protease da TMPRSS2 (host type II transmembrane serine protease2), cliva e apra a porção S2 expondo assim o peptídeo de fusão e inserindo-o na membrana da célula hospedeira. Em sequência, a estrutura HR do domínio S2 forma um complexo com feixes antiparalelos de 6 hélices, aproximando a partícula viral da membrana celular. As proteases Catepsina B e L são de suma importância para o proceder da infecção, uma vez que, em pH ácido, assumem sua forma ativa e realizam a fusão com a membrana endossomal, permitindo a liberação do genoma de RNA viral (**Figura 2 - Etapa 1**) (Li; Jia; Tian; Wu *et al.*, 2022; Zhang; Xiang; Huo; Zhou *et al.*, 2021).

Como o genoma do SARS-CoV-2 consiste em uma molécula de RNA de polaridade positiva, o mesmo pode ser imediatamente transcrito pela maquinaria celular, produzindo os

polipeptídeos pp1a e pp1ab, pelas fases abertas de leitura ORF-1a e ORF-1b (**Figura 2 - Etapa 2**). Tais polipeptídeos passam por um processo de clivagem proteolítica originando as proteínas não estruturais (nsps) (**Figura 2 - Etapa 3**) (Kadam; Sukhramani; Bishnoi; Pable *et al.*, 2021; Karki; Kanneganti, 2022; Li; Jia; Tian; Wu *et al.*, 2022; Malone; Urakova; Snijder; Campbell, 2022; V'Kovski; Kratzel; Steiner; Stalder *et al.*, 2021; Yan; Zheng; Zeng; He *et al.*, 2022). Para a garantia da amplificação viral, é de suma importância a formação do Complexo Replicação-Transcrição (RTC), estabelecido principalmente pela nsp 12 em conjunto com as nsps 7 e 8, constituintes do domínio RdRP (RNA polimerase dependente de RNA), o qual atua de modo a replicar o material genômico viral formando novas moléculas de RNA de sentido positivo (**Figura 2 - Etapa 4**) (V'Kovski; Kratzel; Steiner; Stalder *et al.*, 2021) (Wu; O'Kane; Peng; Bi *et al.*, 2020; Yan; Zheng; Zeng; He *et al.*, 2022).

O RTC se responsabiliza pela transcrição de RNAm de caráter subgenômico, codificantes de proteínas acessórias e estruturais (**Figura 2 - Etapa 5**), os quais são traduzidos na membrana do retículo endoplasmático rugoso (**Figura 2 - Etapa 6**) e em seguida encaminhadas ao ERGIC. Em seguida os vírions maduros são montados (**Figura 2 - Etapa 7**) e liberados por brotamento em vesículas pelo complexo Golgiense (**Figura 2 - Etapa 8**), e ao migrar para a membrana celular é liberado por exocitose (**Figura 2 - Etapa 9**), iniciando uma nova fase de infecção no organismo (**Figura 2 - Etapa 5**) (Kadam; Sukhramani; Bishnoi; Pable *et al.*, 2021; Li; Jia; Tian; Wu *et al.*, 2022; V'Kovski; Kratzel; Steiner; Stalder *et al.*, 2021; Wu; O'Kane; Peng; Bi *et al.*, 2020).



**Figura 2 - Mecanismo de infecção e replicação do SARS-Cov-2.** Proteína S (Spike) do SARS-Cov-2 interage com receptor ECA-2 da célula hospedeira, ocorrendo ação da protease TMPRSS2 para que ocorra a fusão, endocitose e desnudamento do vírus; 2 - As fases abertas de leitura ORF1a e ORF1b do RNA viral são traduzidas pelo maquinário celular produzindo os polipeptídeos pp1a e pp1ab; 3 - Os polipeptídeos passam por um processo de clivagem proteolítica originando as proteínas não estruturais (nsps); 4 - O domínio RdRP do complexo RTC replica o RNA genômico; 5 - Os RNAs subgenômicos são transcritos pelo RTC em RNAm codificante de proteínas estruturais e não estruturais; 6 - RNAm virais são traduzidos no retículo endoplasmático; 7 - As proteínas estruturais recém sintetizadas seguem para o ERGIC, juntamente com o novo nucleocapsídeo (formado pelo RNA genômico e proteína N), para a montagem do vírion; 8 - Uma nova molécula viral é formada numa vesícula de exocitose; 9 - Exocitose e liberação de novos vírus. Adaptado de (Karki; Kanneganti, 2022; Tucker; Lee; Glaunsinger, 2022).

A presença de partículas virais caracteriza-se ao sistema imunológico como moléculas PAMPs (Padrão Molecular Associado ao Patógeno), que são ativadoras da imunidade inata por meio da ligação com receptores Toll-like (TLRs). Assim como rege o tropismo do SARS-CoV-2 pelo parênquima pulmonar, são ativados TLRs, que desencadeiam uma série de eventos intracelulares importantes para os processos fisiopatológicos condizentes à infecção viral (Tay; Poh; Rénia; MacAry *et al.*, 2020).

Em um panorama geral, a sintomatologia da COVID-19 é heterogênea, variando de acordo com o grau de severidade do quadro e a capacidade de resposta de cada organismo. Os

sintomas mais frequentemente observados na clínica médica são: febre ( $>37.5^{\circ}\text{C}$ ), fadiga, cefaléias, mialgia/artralgia; além daqueles relacionados às vias aéreas como tosse, perda de olfato, perda de paladar, dor de garganta, rinorreia e congestão nasal (Bivona; Agnello; Ciaccio, 2021; Salepci; Turk; Ozcan; Bektas *et al.*, 2021).

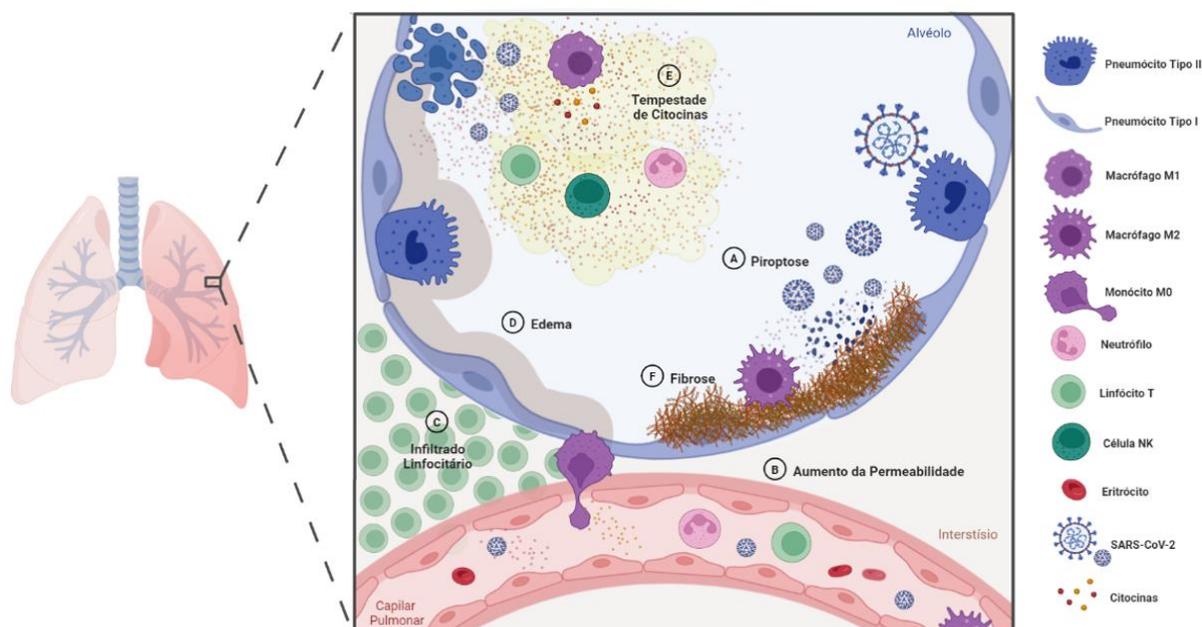
Contrapondo os casos mais leves em que a homeostase é atingida em um curto período de tempo e sem grandes complicações, os quadros graves da infecção apresentam uma resposta inflamatória desregulada e disfuncional desencadeando assim uma exacerbação de marcadores imunológicos a nível plasmático. Essa hiperinflamação como mecanismo de resposta ao vírus, está diretamente correlacionada com a severidade e o mal prognóstico do quadro clínico, tanto à efeitos locais quanto sistêmicos (Tay; Poh; Rénia; MacAry *et al.*, 2020).

Posteriormente à entrada e à realização do ciclo de replicação viral, a exocitose de novas partículas virais desencadeia a piroptose da célula hospedeira (**Figura 3 – A**), o que repercute em um dispersamento de componentes celulares e, por conta do aumento da permeabilidade vascular, há um extravasamento de elementos plasmáticos ao parênquima pulmonar (**Figura 3 – B**) (Guan; Ni; Hu; Liang *et al.*, 2020). Com a estimulação do sistema imune inato a partir do reconhecimento de PAMPs e de Padrões Moleculares Relacionados ao Dano (DAMPs), decorre a produção e secreção de mediadores inflamatórios como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CXCL10, CCL2, CCL3, e CCL4. Desta forma, observa-se uma infiltração mononuclear no espaço intersticial por meio da liberação de determinados sinais quimiotáticos (**Figura 3 – C**) (Gustine; Jones, 2021).

Além disso, sintomas pulmonares associam-se ao dano estrutural acarretado pela lise dos pneumócitos infectados, que promove um exsudato proteico e a consequente formação de edema pulmonar (Figura 3 – D) e processos fibróticos (Figura 3 – F). Elevados índices sistêmicos de tais citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias são usualmente denominados como tempestade de citocinas (Figura 3 – E) (Attiq; Yao; Afzal; Khan, 2021), pacientes que apresentaram tais índices elevados manifestaram febre, hipotensão e hipoxemia como sintomatologia (Wang; Yu; Chang; Zhang *et al.*, 2023). Tal quadro imunomolecular atua de modo a recrutar leucócitos para o sítio da inflamação em um mecanismo de feedback positivo, destacando-se monócitos, que se polarizam em subtipos clássicos - macrófagos M1 - e/ou subtipos alternativos de caráter profibrótico - macrófago M2 (Gustine; Jones, 2021; Prompetchara; Ketloy; Palaga, 2020; Saghazadeh; Rezaei, 2020; Yuki; Fujiogi; Koutsogiannaki, 2020).

Estes mediadores são responsáveis pela intensificação e extensão do dano tecidual podendo induzir o desencadeamento da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), quadros

de pneumonia viral, choque séptico, falência múltipla de órgãos (FMO) e em muitos casos à morte (Cameron; Bermejo-Martin; Danesh; Muller *et al.*, 2008; Gustine; Jones, 2021; Prompetchara; Ketloy; Palaga, 2020).



**Figura 3- Mecanismo da hiperinflamação causada pela infecção da COVID-19.** A. Piroptose da célula hospedeira devido a exocitose de novas partículas virais; B. Aumento da permeabilidade vascular do capilar pulmonar, favorecendo o edema e a quimiotaxia dos leucócitos; C. Infiltrado Linfocitário no interstício; D. Edema do tipo exsudato; E. Tempestade de Citocinas – liberação exacerbada de mediadores pró-inflamatórios; F. Fibrose como mecanismo de reparo tecidual. Adaptado de Gustine, 2021.

Para além da tempestade de citocinas, os eventuais sintomas pulmonares associam-se ao característico dano estrutural acarretado pela lise dos pneumócitos infectados, a qual promove um exsudato proteico e a consequente formação de edema alveolar e processos fibróticos. Dado todos os eventos fisiopatológicos, é evidente uma diminuição na capacidade de hematose pulmonar, notada clinicamente por dispneia e diminuição da saturação de oxigênio, podendo assim levar a necessidade de intervenções médicas críticas como ventilação mecânica e oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO) (Tian; Hu; Niu; Liu *et al.*, 2020).

À vista dos díspares levantados quanto às evidências clínicas da infecção por SARS-CoV-2, foi observado uma não restrição à porção broncoalveolar, sendo demonstrado efeitos nocivos da afecção em sistemas extrapulmonares. Exames *post-mortem* de tecido cardíaco, renal, hepático (Monteil; Kwon; Prado; Hagelkrüys *et al.*, 2020), assim como hemato linfóide, vascular e de cunho nervoso central de infectados indicaram efeito direto da COVID-19 sobre tais sistemas (Bryce; Grimes; Pujadas; Ahuja *et al.*, 2021). A **Figura 4** explicita a sintomatologia extrapulmonar da infecção por SARS-CoV-2 representando os principais órgãos afetados.

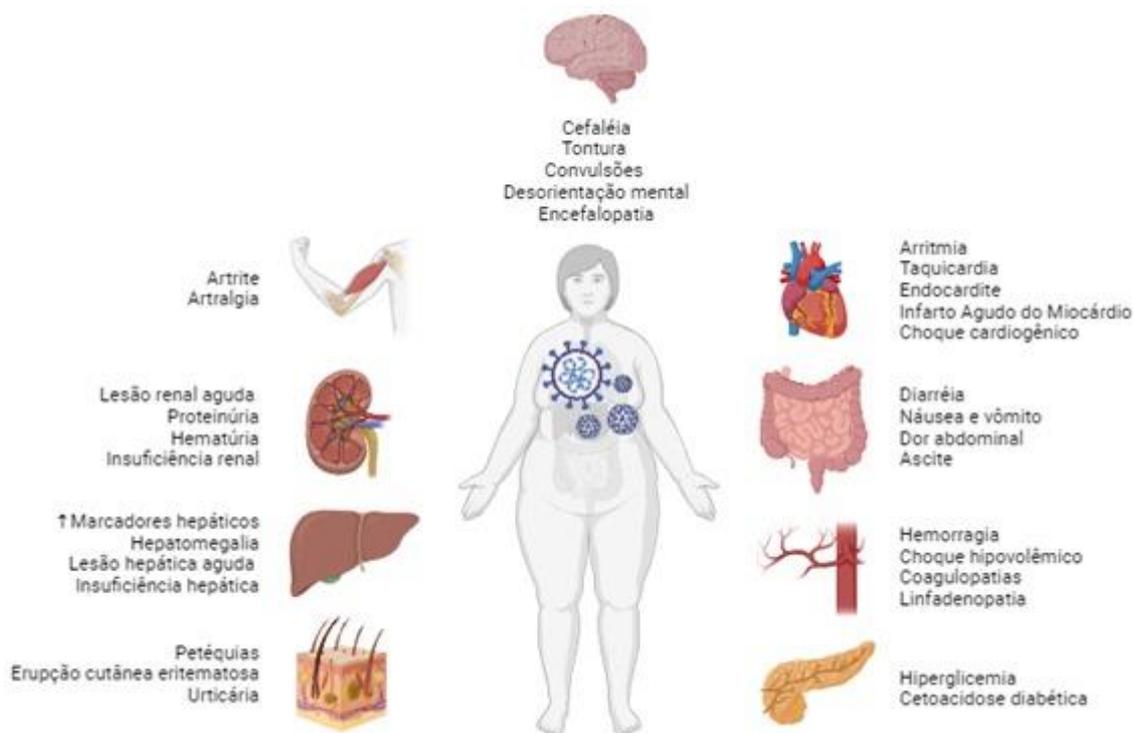


Figura 4- Manifestações Extrapulmonares da infecção por SARS-CoV-2. Autoria própria.

## 1.2 Monócitos e Macrófagos

Proveniente da hematopoiese medular, os monócitos são células leucocitárias pertencentes a imunidade inata, parte do sistema de fagocitose mononuclear (SMF), juntamente com células dendríticas e macrófagos (Knoll; Schultze; Schulte-Schrepping, 2021). Acendem-se da linhagem mielóide por um progenitor em comum (CMP) em conjunto com eritrócitos, plaquetas e leucócitos granulares (Guilliams; Mildner; Yona, 2018).

Definidos como células sanguíneas circulantes, os monócitos constituem aproximadamente 10% dos leucócitos periféricos. Tais células, quando parte da circulação sanguínea, categorizam-se como monócitos *naive* ( $M\emptyset$ ), os quais apresentam uma meia-vida curta de aproximadamente 9 horas.

A caracterização da função monocitária é decorrente da heterogeneidade de tais células, as quais apresentam uma significativa plasticidade fenotípica diferenciando-se, de acordo com as demandas do microambiente e com a regência de imunomediadores (Alexander; Varvara; Nikita; Veronika *et al.*, 2019; Guermonprez; Helft, 2019; Juhas; Ryba-Stanisławowska; Szargiej; Myśliwska, 2015). No decurso de um processo inflamatório, direcionam-se aos tecidos por um processo intitulado diapedese. Diferenciam-se então por estímulos dependentes em células dendríticas, as quais atuam na apresentação de antígenos e ativação de células T

*naive* (Guilliams; Ginhoux; Jakubzick; Naik *et al.*, 2014), e em macrófagos (Espinoza; Emmady, 2023).

Em vista das trocas gasosas durante a respiração, a árvore brônquica é um fácil acesso para entrada de patógenos devido à exposição do lúmen alveolar, tornando-se alvo de afecções. Considerando a vulnerabilidade das células pulmonares, os macrófagos residentes são as células imunes de maior abundância tecidual em condições homeostáticas, sendo a primeira linha de defesa contra antígenos que adentram o sistema respiratório, quer esses de caráter patogênico, ou não. O fenótipo funcional desses macrófagos alveolares depende fortemente do microambiente local, portanto, em condições fisiológicas, mantém-se em um estado de quiescência com pouca atividade fagocitária, evidenciada pela expressão desregulada do receptor fagocítico CD11b (Knoll; Schultze; Schulte-Schrepping, 2021; Lambrecht, 2006).

Perante a perspectiva de processos inflamatórios, as partículas antigênicas detectadas através de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) são indicadores de perigo para a homeostasia. Logo, tem-se como necessidade o recrutamento de mais células leucocitárias, mecanismo este, realizado através da liberação de citocinas e quimiocinas (Gustine; Jones, 2021; Juhas; Ryba-Stanisławowska; Szargiej; Myśliwska, 2015; Knoll; Schultze; Schulte-Schrepping, 2021). Nesse foco inflamatório recém formado, os monócitos circulantes são um eixo fundamental, visto que irão adquirir fenótipos funcionais. Primordialmente, estabeleceram-se dois principais fenótipos dicotômicos entre si – macrófagos M1 (pró-inflamatório) e macrófagos M2 (anti-inflamatório), ativados respectivamente pelas vias clássica e alternativa (Guilliams; Ginhoux; Jakubzick; Naik *et al.*, 2014; Juhas; Ryba-Stanisławowska; Szargiej; Myśliwska, 2015; Lawrence; Natoli, 2011; Weber; Bittner; Shankar; Liu *et al.*, 2020).

### **1.3. Interconexão Entre Monócitos e Inflamassoma: Implicações na COVID-19**

Baseando-se no papel desempenhado pelos monócitos e macrófagos em um contexto de desequilíbrio da homeostase, observa-se sua importância crucial como controladores do processo inflamatório (Mussbacher; Derler; Basílio; Schmid, 2023). Diante disso, o perfil funcional M1 apresenta como uma de suas rotas de resposta a formação do inflamassoma (Awad; Assrawi; Jumeau; Georjgin-Lavialle *et al.*, 2017), um complexo multimérico de proteínas circunscritos no citosol em decorrência ao reconhecimento de riscos proeminentes ao organismo (Paik; Kim; Silwal; Sasakawa *et al.*, 2021). Caracteriza-se então, o pilar central da sinalização da imunidade inata promovendo a secreção de mediadores inflamatórios e

culminando na morte celular programada por uma medida inflamatória imediata, denominada piroptose (Pandey; Shen; Feng; Man, 2021; Wang; Yu; Chang; Zhang *et al.*, 2023).

Em termos gerais a estrutura base do inflamassoma consiste na interação de moléculas sensores, eventuais adaptadores e seu respectivo efetor, que são designados de acordo com os diferentes estímulos (Pandey; Shen; Feng; Man, 2021). Na literatura são descritos aproximadamente 20 tipos de inflamassomas, dentre os quais ganha destaque em sua elucidação o inflamassoma NLRP3, nomeado a partir do tipo seu sensor NLRs (receptor NOD-like) (Chen; Ye; He; Ouyang, 2021).

A disposição elementar do inflamassoma NLRP3 é constituída pelo sensor NLRP3 (receptor NOD-like contendo domínio PYD N-terminal 3), pela molécula adaptadora ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) e por sua proteína efetora Pró-caspase-1.

Para o desencadear do complexo do inflamassoma NLRP3 se faz necessário um processo de duas etapas, conceituadas fases de preparação e ativação, conhecidas como Sinais 1 e 2, respectivamente (Chen; Xu, 2022; Paik; Kim; Silwal; Sasakawa *et al.*, 2021). O sinal 1 é resultante do reconhecimento de moléculas padrões pelos receptores PRR, dentre os quais ressalta o TLR4 ou a sinalização por TNF (Paik; Kim; Silwal; Sasakawa *et al.*, 2021). Em consequência a esse reconhecimento, há a ativação transcricional de NLRP3, pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18 por meio da via de sinalização do Fator Nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) (Guo; Callaway; Ting, 2015; Liu; Zhang; Joo; Sun, 2017). Entretanto, a fase de preparação é um processo multifacetado, dispondo-se também de mecanismos pós-transcricionais (McKee; Coll, 2020), como desubitiquinização, fosforilação/defosforilação, acetilação/desacetilação, entre outros (Paik; Kim; Silwal; Sasakawa *et al.*, 2021). Assim sendo, evidenciou-se que a ativação do inflamassoma não é inteiramente dependente de processos transcricionais (McKee; Coll, 2020).

Subsequentemente, a fase de ativação ocorre em resposta ao reconhecimento de diversos agonistas de NLRP3, como nigericina, ATP extracelular, cristais/partículas, ácidos nucleicos e patógenos fúngicos, bacterianos ou virais. Desencadeiam assim uma ampla gama de eventos intracelulares, sejam essas alterações da homeostase intracelular como o efluxo de potássio (K<sup>+</sup>), efluxo de cloreto (Cl<sup>-</sup>) e fluxo intracelular de cálcio (Ca<sup>2+</sup>); ou alterações metabólicas como disfunções mitocondriais, liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e desestabilização lisossomal, caracterizando o segundo sinal para formação do inflamassoma (Chen; Xu, 2022; Guo; Callaway; Ting, 2015; McKee; Coll, 2020; Paik; Kim; Silwal; Sasakawa *et al.*, 2021).

Após ativado, ocorrem mudanças conformacionais do NLRP3 provocadas pela ação da quinase NEK7 (NIMA-related kinase 7), permitindo a oligomerização do mesmo e propiciando uma plataforma favorável ao recrutamento de moléculas adaptadoras ASC (Lara-Reyna; Caseley; Topping; Rodrigues *et al.*, 2022; McKee; Coll, 2020). Tal processo possibilita a interligação por meio de interações proteína-proteína nos domínios PYD de ambas moléculas. Uma vez formado o complexo NLRP3-ASC o domínio C-terminal CARD do adaptador permite a interação com a molécula efetora do inflamassoma – pró-caspase-1– pela interação CARD-CARD (Chen; Xu, 2022; Paik; Kim; Silwal; Sasakawa *et al.*, 2021; Schroder; Tschopp, 2010).

Decorrente a essas interações tem-se a formação do complexo do inflamassoma NLRP3, o qual resulta na ativação por clivagem autoproteolítica da caspase-1 (Chen; Ye; He; Ouyang, 2021; Guo; Callaway; Ting, 2015). Por sua vez, a caspase-1 ativada atua clivando as formas imaturas pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18, convertendo-as em suas formas ativas – IL-1 $\beta$  e IL-18 (Wang; Yu; Chang; Zhang *et al.*, 2023).

Posto isso, têm-se claro a importância dos PRRs na resposta macrocitária, sendo esse um grupo heterogêneo de estruturas proteicas solúveis acopladas a membrana celular ou localizadas no citoplasma (Bode; Ehling; Häussinger, 2012). Destrinchando tal conjunto de receptores, subcategorizam-se as famílias: receptores do tipo ausente no melanoma 2 (AIM2), receptores do tipo gene induzível pelo ácido retinóico I (RIG-I) (RLRs), receptores da GMP-AMP sintase (cGAS), receptores de lectina do tipo C (CLRs), receptores do tipo NOD (NLRs) e receptores do tipo Toll (TLRs), entre outros; sendo o último o mais caracterizado na literatura (Chen; Xu, 2022).

Os receptores Toll-Like são glicoproteínas transmembranares do tipo 1, estruturadas em distintos domínios de acordo com sua vertente à membrana celular. Apresenta-se, na porção extracelular e/ou na porção extramembranar do endossomo, com um número variado de repetições ricas em leucinas flanqueadas (LRR) caracterizando um de seus domínios funcionais. Em contrapartida, voltado ao ambiente intracelular e/ou intraendossomal, os TLRs contam com um domínio de sinalização homólogo ao receptor de IL-1 (IL-1R) denominado domínio TIR (Toll/IL-1R) (MANTOVANI *et al.*, 2023). Caracterizados em células humanas, são descritos 10 subtipos de TLRs (TLR1-10), os quais podem estar diferentemente localizados na bicamada lipídica (TLR1, 2, 4, 5, 6 e 10) ou como constituintes da membrana endossomal (TLR3, 7, 8 e 9) (Bode; Ehling; Häussinger, 2012; Mantovani; Oliviero; Varchetta; Renieri *et al.*, 2023).

Ponderando as evidências da complexa rede de sinalização e resposta regida pela imunidade inata nos macrófagos, dá-se notoriedade aos eventos decorrentes ao estímulo de TLR4 (Bode; Ehling; Häussinger, 2012). Como pressuposto, várias moléculas PAMPs e

DAMPs são capazes de interagir e estimular os receptores Toll-like-4, exemplificando as moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas, as quais apresentam-se com maior relevância aos estudos de tal via de sinalização. Por um olhar mais detalhado, observa-se a composição de LPS em três partes: o oligossacarídeo central, a cadeia lateral e o lipídio A, sendo o último a principal fração antigênica molécula (Lu; Yeh; Ohashi, 2008).

Para que haja o reconhecimento eficiente do LPS por TLR4, fazem-se necessárias interações da porção de lipídio A com as proteínas CD14 (cluster diff 14) e MD2 (proteína de diferenciação mielóide 2) (Bode; Ehlting; Häussinger, 2012). A interatividade MD-2 com o lipídio A promove a dimerização de TLR4 estimulados, conectando-os intracelularmente por meio de seus domínios TIR, em uma interação TIR-TIR (Kuzmich; Sivak; Chubarev; Porozov *et al.*, 2017). Perera *et al.*, elucidou que para um repertório completo de genes induzidos por LPS, a sinalização intracelular envolvendo CD14, TLR4, CD11b e CD18 necessita ser estruturada e coordenada. Com isso, evidencia-se a correlação entre TLR4 e macrófagos, uma vez que tais marcadores de superfície caracterizam sua identidade fenotípica (Perera; Mayadas; Takeuchi; Akira *et al.*, 2001).

#### 1.4. Hipóxia

As células eucarióticas geram energia metabólica dentro das mitocôndrias na forma de trifosfato de adenosina (ATP), utilizando oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) como aceptor final de elétrons no metabolismo oxidativo da glicose, conhecido como fosforilação oxidativa (Taylor; Pouyssegur, 2007). Deste modo, é essencial que as células recebam um suprimento ininterrupto de O<sub>2</sub> para manter a estabilidade bioenergética.

O oxigênio, essencial para esse propósito, é disponibilizado pela cooperação dos sistemas pulmonar, hematopoiético e cardiovascular, os quais transportam o O<sub>2</sub> da atmosfera para as células de maneira independente. A homeostase da oxigenação dos tecidos é, portanto, determinada por um equilíbrio entre o consumo de O<sub>2</sub> pelas mitocôndrias e o suprimento de oxigênio pelos eritrócitos nos capilares (Semenza, 2001).

A hipóxia, que se refere a diminuição da disponibilidade de oxigênio, é um estímulo tanto fisiológico quanto patológico para as células. Diferentes tecidos são expostos a diferentes níveis de oxigênio e, quando a demanda por oxigênio é superior à sua oferta, ocorre a hipóxia (D'Ignazio; Rocha, 2016; Prabhakar; Semenza, 2015)

A resposta ao quadro hipóxico pode variar consideravelmente dependendo do tipo celular, suas necessidades metabólicas e sua capacidade de se adaptar a essa situação. Em

alguns casos, as células podem se adaptar adequadamente aos diferentes graus de hipóxia, enquanto em outros, a resposta pode culminar na morte celular (MacIntyre, 2014).

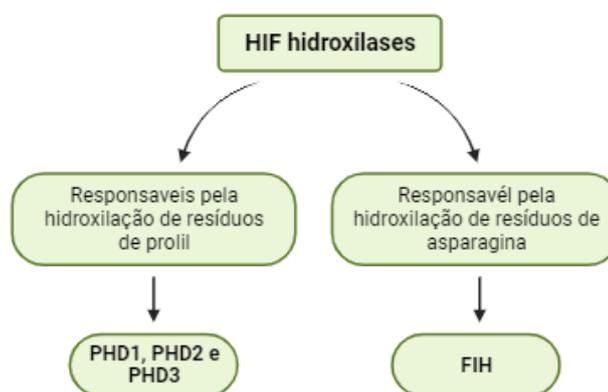
A hipóxia induz um programa transcricional abrangente que envolve a ativação da família do fator de transcrição fator induzido por hipóxia (HIF). O HIF é responsável pela indução de vários genes envolvidos em muitos processos diferentes, entre eles angiogênese, proliferação celular, morte celular e autofagia (Kenneth; Rocha, 2008; Moniz; Biddlestone; Rocha, 2014).

#### 1.4.1 Fator induzido por hipóxia (HIF)

No nível transcricional, os HIFs funcionam como principais reguladores da homeostase do oxigênio, controlando a oferta e a demanda de O<sub>2</sub> (Prabhakar; Semenza, 2015). O HIF é constituído por três subunidades alfa dependentes de oxigênio, nomeadamente HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  e HIF-3 $\alpha$ , além de uma subunidade beta insensível ao oxigênio que é expressa de forma constitutiva, conhecida como HIF-1 $\beta$ /ARNT (Malkov; Lee; Taylor, 2021). Tanto o HIF-1 $\alpha$  quanto o HIF-2 $\alpha$  compartilham uma estrutura semelhante e estão associados ao aumento da expressão gênica em condições de hipóxia, no entanto, eles regulam conjuntos sobrepostos, porém distintos, de genes-alvo, dependendo da disponibilidade de oxigênio e do tipo de tecido (Dengler; Galbraith; Espinosa, 2014).

#### 1.4.2 HIF-1 $\alpha$

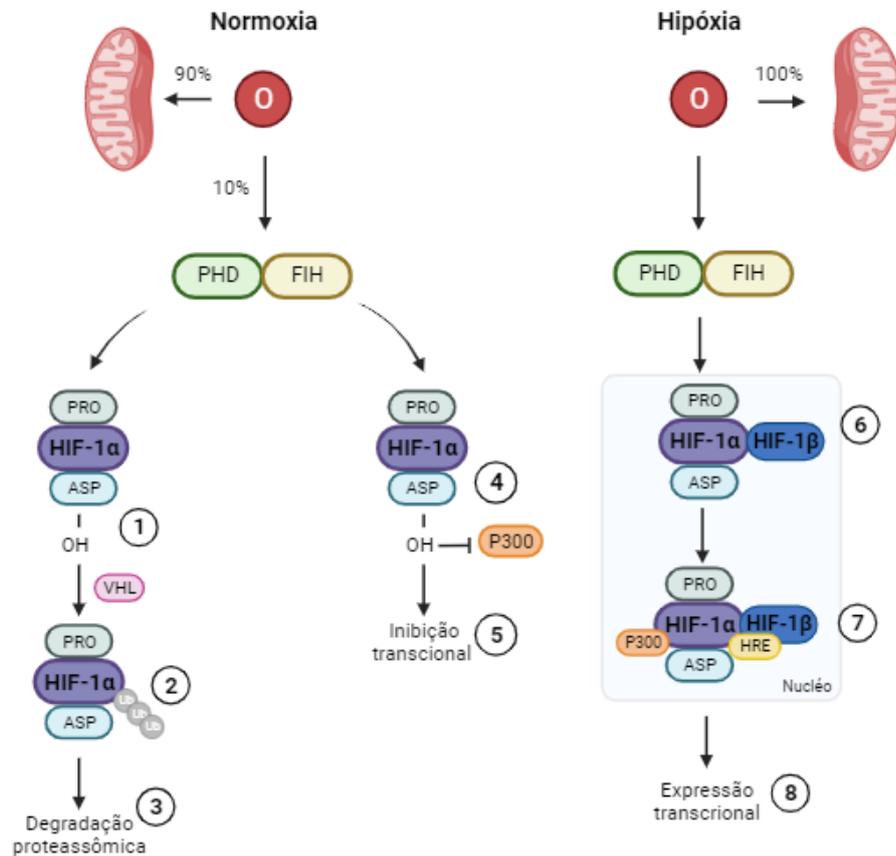
O HIF-1 $\alpha$  é sintetizado constitutivamente em um nível alto em normóxia (Taylor; Pouyssegur, 2007), mas seu nível é reprimido por uma família de dioxigenases denominadas HIF hidroxilases. Há quatro membros dessa família, três dos quais hidroxilam resíduos de prolil (PHD1, PHD2 e PHD3) e um que hidroxila resíduos de asparagina, denominado Fator de inibição do HIF (FIH) (Scholz; Taylor, 2013), assim como demonstrado na figura (**Fig. 5**):



**Figura 5-** Família de dioxigenases, denominadas **HIF hidroxilases**. Autoria própria, 2023.

Especificamente, as dioxigenases PHD2 e FIH-1 utilizam oxigênio e  $\alpha$ -cetogluturato como substratos para hidroxilar resíduos de prolina e asparagina nas subunidades HIF- $\alpha$ . Essas modificações têm efeitos distintos na estabilidade da proteína e na atividade transcricional do HIF (Prabhakar; Semenza, 2015). A hidroxilação das prolil pelo PHD2 resulta na ligação da proteína von Hippel-Lindau (VHL) (**Figura 6 – etapa 1**), que por sua vez recruta uma ubiquitina ligase que marca as subunidades HIF- $\alpha$  (**Figura 6 – etapa 2**) para degradação proteossômica (**Figura 6 – etapa 3**). Por outro lado, a hidroxilação dos resíduos de asparagina pelo FIH-1 bloqueia a interação da proteína coativadora p300 com o HIF (**Figura 6 – etapa 4**), interferindo assim na atividade transcricional (**Figura 6 – etapa 5**) (D'Ignazio; Rocha, 2016; Scholz; Taylor, 2013).

Em condições de hipóxia, as PHDs se tornam inativas, uma vez que necessitam de oxigênio como cofator (Malkov; Lee; Taylor, 2021). Nesse contexto, o HIF-1 $\alpha$  é estabilizado e tem a capacidade de formar um heterodímero com o HIF-1 $\beta$  no núcleo da célula (**Figura 6 – etapa 6**). Esse complexo resultante pode se ligar à sequência de nucleotídeos 5'-RCGTG-3' presente no elemento de resposta à hipóxia (HRE), que é um padrão cis consensual encontrado nos enhancers e/ou promotores dos genes-alvo do HIF (**Figura 6 – etapa 7**). Portanto, a estabilização do HIF-1 $\alpha$  possibilita que a célula execute um programa de transcrição adequado às condições hipóxicas do ambiente (**Figura 6 – etapa 8**) (Dengler; Galbraith; Espinosa, 2014; Moniz; Biddlestone; Rocha, 2014).



**Figura 6 - Via do Fator Induzido por Hipóxia (HIF).** Adaptado de Malkov, *et al.*, 2021.

### 1.5. Síndrome Pós COVID e Síndrome Pós-Sepse

Conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS), a síndrome pós-COVID-19 é definida como uma condição que "ocorre em indivíduos com uma história de infecção pelo SARS-CoV-2, três meses após o início da COVID-19, cujas manifestações persistem durante pelo menos dois meses e não podem ser explicadas por um diagnóstico alternativo". Esta entidade, classificada pela OMS como nova e emergente, foi denominada "COVID-19 de longa duração".

Devido à incapacidade que causa e ao aumento da prevalência desta doença, a síndrome pós-COVID-19 surgiu como um problema de saúde pública. Em relação às manifestações clínicas, trata-se de uma doença complexa e variada, que pode ser diagnosticada em diversos grupos, abrangendo desde os pacientes que desenvolveram COVID-19 grave aos assintomáticos (Proal; VanElzakker, 2021). A qualidade de vida dos doentes é limitada e a sua reintegração em suas atividades regulares é atrasada devido a seus sinais e sintomas que são multissistêmicos, variáveis, sobrepostos, crônicos, exacerbados e em constante mudança. Para

mencionar alguns, incluem sintomas gastrointestinais e cardíacos, fadiga, disfunção cognitiva, cefaleias, perturbação de stress pós-traumático, perturbação do sono, dispneia, tosse, mialgia, artralgia, anosmia e síndrome de taquicardia postural ortostática (Carrillo-Esper, 2022; Davis; McCorkell; Vogel; Topol, 2023).

O conceito de "Covid longo" é empregado para fazer referência à manifestação contínua de sintomas em pessoas infectadas pelo SARS-CoV-2 (Raveendran; Jayadevan; Sashidharan, 2021). Os efeitos de longa duração associados a essa condição abrangem a persistência de sintomas, o prolongamento do comprometimento dos órgãos e a possibilidade de desenvolvimento de novas doenças.

Até julho de 2022, aproximadamente 33 milhões de casos confirmados da doença foram registrados no Brasil, apresentando uma taxa de recuperação superior a 96%. Entretanto, mesmo após receberem alta hospitalar, alguns indivíduos ainda lidam com sintomas persistentes como falta de ar e fadiga, os quais podem impactar negativamente sua habilidade de se exercitar e manter independência nas tarefas cotidianas (Ostolin; Miranda; Abdala, 2023).

Uma meta-análise realizada em 2021 (Karakike; Giamarellos-Bourboulis; Kyprianou; Fleischmann-Struzek *et al.*, 2021) revelou que uma parcela significativa dos pacientes com casos graves de COVID-19 (78%) atendia aos critérios definidos pela Sepsis 3.0 (Singer; Deutschman; Seymour; Shankar-Hari *et al.*, 2016) para diagnóstico de sepse e choque séptico, com a síndrome respiratória aguda grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome – SARS*) sendo a disfunção orgânica de maior prevalência. A sepse é uma resposta inflamatória do organismo a uma infecção, com a capacidade de afetar múltiplos órgãos. Esse estado é desencadeado por endotoxinas, que desencadeiam um processo inflamatório que, se não for tratado, pode resultar em consequências fatais (Fernandes; Ribeiro; Comin; Dagostin *et al.*, 2021). Cerca de um sexto dos indivíduos que sobrevivem à sepse manifestam incapacidade física severa e/ou comprometimento cognitivo durante o acompanhamento a longo prazo. O seguimento desses pacientes ressalta a vulnerabilidade deles, já que cerca de 50%, requer reinternação hospitalar dentro de 3 a 6 meses após receberem alta da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (Teixeira; Rosa; Friedman, 2021).

As deficiências imunológicas, cardiovasculares e cognitivas associadas à síndrome pós sepse perduram durante muito tempo após a alta hospitalar, levando a reinternamentos mais frequentes por sepse, a uma menor qualidade de vida e a taxas mais elevadas de comorbilidade e mortalidade (van der Slikke; An; Hancock; Bouma, 2020).

As consequências a longo prazo são uma semelhança extremamente marcante entre os fenótipos da COVID-19 e a sepse bacteriana, ambas podem deixar sequelas como fadiga,

dificuldade respiratória, problema de memória, saúde mental reduzida, entre outros sintomas que podem ser evidenciados. A alta hospitalar não significa a cura completa em nenhum dos dois grupos de doentes e é geralmente seguida de repercussões duradouras e incapacitantes (Gritte; Souza-Siqueira; Curi; Machado *et al.*, 2020; Herminghaus; Osuchowski, 2022)

## **2. OBJETIVO**

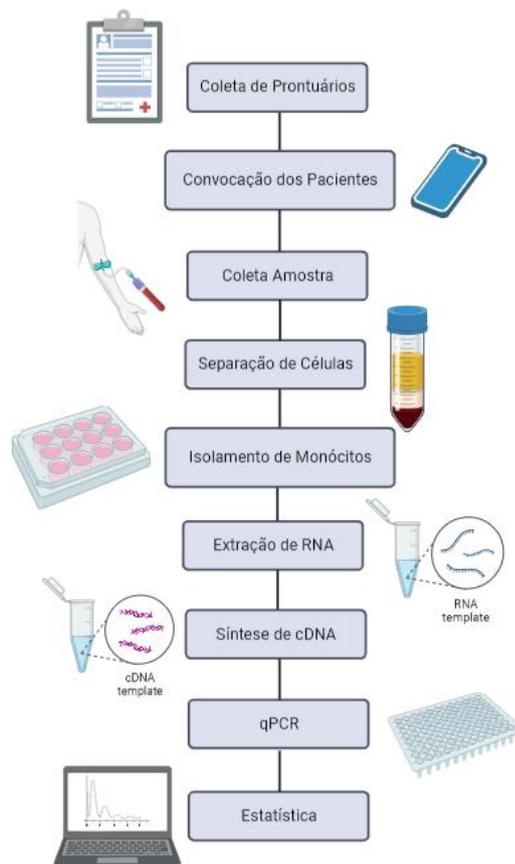
Este estudo teve por objetivo verificar se houve alguma alteração na via de hipóxia dos pacientes sobreviventes que tiveram COVID-19 moderada a grave e necessitaram de internação, quando comparados com pacientes de grupo controle .

### 3. METODOLOGIA

A proposta do presente estudo foi submetida e aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição proponente (**Anexo 1**) e pelos Hospitais em que foram coletados os prontuários (CAAE 51925221.5.0000.5436, 51925221.5.3001.5448 e 51925221.5.3002.0139) (**Anexo 2**). Todos os pacientes incluídos no estudo receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) com explicações sobre a pesquisa (**Anexo 3**).

A realização da pesquisa em seus aspectos práticos está denotada no fluxograma abaixo.

**Figura 7.**



**Figura 7- Fluxograma Metodológico.** Sequência dos protocolos estabelecidos para a realização do presente trabalho.

#### 3.1. Seleção dos Pacientes

A pesquisa foi desenvolvida na região da Baixada Santista - SP, ponderando indivíduos de todas as cidades do litoral paulista atendidos nos hospitais Santa Casa de Santos e Hospital Municipal Guilherme Álvaro devido a complicações do quadro de COVID-19.

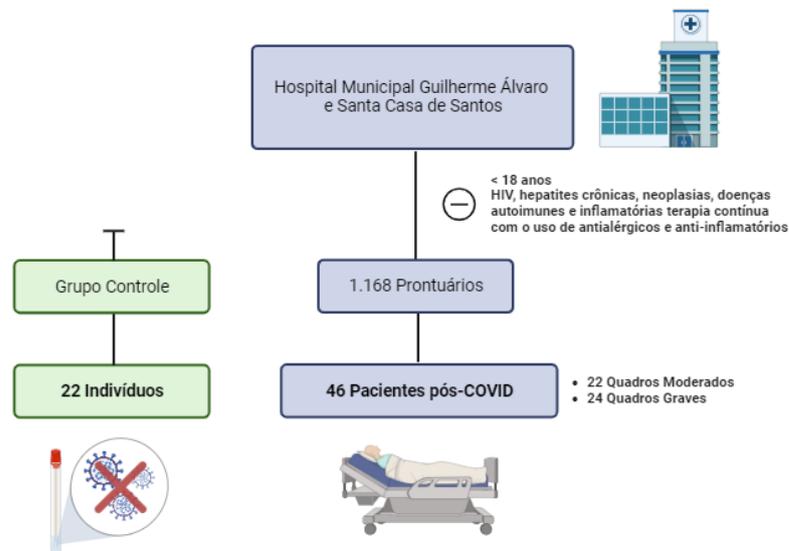
A apuração dos pacientes foi realizada com base nos critérios de maioria e resultado positivo para SARS-CoV-2 no teste molecular de qPCR (swab nasofaríngeo). Descartou-se

indivíduos menores de 18 anos ou que foram comprovadamente diagnosticados com HIV, hepatites crônicas, neoplasias e outras doenças autoimunes e inflamatórias. Excluíram-se também indivíduos sob terapia contínua com uso de antialérgicos (anti-histamínicos/corticóides) e/ou anti-inflamatórios (não esteróides/corticóides) uma vez que o comprometimento do sistema imunológico possui influência direta nas análises realizadas e assim também na veracidade dos resultados obtidos.

O estudo contou com  $n$  amostral de 68 indivíduos, distribuídos em um grupo controle ( $n= 22$ ) e um grupo de COVID ( $n= 46$ ), tal como é esquematizado na **Figura 8**. Para a caracterização do grupo pós-COVID foram incluídos pacientes segundo a necessidade de hospitalização e/ou intubação, sendo assim atrelados às formas moderadas e graves da infecção.

### 3.2. Seleção do Grupo Controle

Os indivíduos do grupo controle ( $n= 22$ ) foram triados e selecionados pareando-os em idade e gênero. Destaca-se que para a participação no estudo foram considerados indivíduos que nunca apresentaram resultado positivo para SARS-CoV-2 no teste molecular de qPCR (swab nasofaríngeo). Além disso, devido a maioria dos pacientes ter realizado a vacinação, não foi possível a realização de testes imunológicos para verificar se o indivíduo teve ou não contato com o SARS-COV-2.



**Figura 8 - Esquematização do  $n$  amostral ( $n= 68$ ).** Ao grupo pós-COVID foram atribuídos 46 pacientes e ao grupo controle, foram selecionados 22 indivíduos. Ambos os grupos foram estabelecidos pautando-se nos critérios de inclusão e exclusão mencionados.

### 3.3. Prontuários médicos

Com base nos prontuários médicos disponibilizados pelos hospitais, foram coletadas informações como gênero e idade dos participantes; comorbidades (diabetes, hipertensão, asma, problemas cardiovasculares, doenças pulmonares, etc.); tempo de internação e necessidade de intubação. Tais informações são apresentadas na tabela abaixo: (**Tabela 1**).

<i>Gênero</i>	Feminino	28 (60.87%)
	Masculino	18 (39.13%)
<i>Idade</i>	Média (SD)	47.49 (13.43)
	Mediana (min-max)	47 (26-85)
<i>Tempo de internação (dias)</i>	Média (SD)	11.11 (13.32)
	Mediana (min-max)	6 (2-65)
<i>Intubação Orotraqueal</i>	<b>Ausente n (%)</b>	<b>Presente n (%)</b>
	39 (84.7)	7 (15.3)
<i>Comorbidades n (%)</i>	Hipertensão arterial	7 (15.22)
	Diabetes mellitus	5 (10.87)
	Obesidade	9 (19.57)
	Asma	2 (4.35)
	Dislipidemia	1 (2.17)

**Tabela 1 - Características dos pacientes do grupo pós-COVID (n: 46).** Santos, 2022-2023. SD: Desvio Padrão; min: Valor Mínimo; max: Valor Máximo. Período após a alta hospitalar se refere ao tempo em meses em que a coleta foi realizada após a alta hospitalar.

### 3.4. Separação de Monócitos

Cerca de 40 mL de sangue venoso foi coletado em tubos EDTA e centrifugado por 10 min à 400G, em temperatura ambiente. Depois da centrifugação, o sangue foi separado em partes correspondentes ao plasma e aos elementos figurados. Os elementos figurados foram transferidos para um tubo falcon e então diluídos com PBS na proporção 1:1. Cuidadosamente, a diluição foi transferida à tubos com Histopaque® seguindo a proporção 1:2. Centrifugou-se os tubos por 30 min à 400G em temperatura ambiente para a separação da amostra segundo seu gradiente de concentração de modo que uma nuvem de mononucleares (contendo MØ) dispôs-se entre os polimorfonucleares e o excedente de plasma e PBS.

O excesso de plasma e PBS foi descartado e a nuvem de mononucleares, transferida a um tubo falcon e diluída em PBS em uma proporção 1:2. Após uma centrifugação de 10 minutos a 400G/4°C, o sobrenadante foi descartado para obtenção do sedimento referente à monócitos e linfócitos.

O sedimento rendeu um número de células suficiente para ser distribuído em três poços. Portanto, para ressuspender o sedimento de mononucleares, foram adicionados 3 mL de meio

de cultura RPMI no tubo MØ, homogeneizando até se dissolver. Para proporcionar o ambiente adequado, foram adicionados 2 mL de meio de cultura RPMI em cada poço.

A placa de cultura foi levada para a estufa e incubada por 1-2 horas para permitir a adesão dos monócitos. Após a incubação, os linfócitos estariam no sobrenadante. Após retirado o sobrenadante, foi adicionado 1 mL de Trizol em cada poço e homogeneizado vigorosamente. Em seguida, os monócitos foram armazenados em tubos *ependorf* e levados ao freezer -80°C para o seguimento da pesquisa.

### 3.5. Extração de RNA

Para a extração de RNA das amostras estudadas foi utilizado o *kit PureLink RNA Mini Kit® (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA)*. O RNA total foi extraído também utilizando o reagente *Trizol® (Invitrogen)* e, para iniciar o protocolo, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio. Os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. A separação das fases aquosas e proteicas obtidas foi realizada por centrifugação a 12.000G por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa contendo o RNA de interesse foi transferida para outro tubo *ependorf* e, para cada 0,1 mL de amostra na fase aquosa foram adicionados 0,05 mL de etanol 100%. Por diante, iniciou-se o uso de colunas para a separação de RNA, assim foram adicionados 150 µL de amostra sobre a coluna sendo realizada uma centrifugação rápida. Tal procedimento foi repetido até que todo o volume da amostra fosse passado pela coluna.

Ainda na coluna, a amostra foi lavada com a solução de lavagem 1 e por mais duas outras vezes com a solução de lavagem 2, ambas fornecidas pelo kit. Terminada as lavagens, a coluna foi colocada em um novo tubo *ependorf* de 1,5 mL. Foi adicionado 50 µL de água RNase-Free ao centro da coluna, a qual foi incubada em temperatura ambiente por 1 minuto e, após a incubação, a coluna foi centrifugada a 12.000G por 2 minutos obtendo-se ao final do procedimento a amostra de RNA para as experimentações do estudo.

As amostras foram submetidas ao tratamento de 1 µg de RNA com 1µL de DNase I Amp Grade (100 U, ThermoFisher) acrescido de 1 µL do tampão 10 X (10X DNase I Reaction Buffer) completando o volume para 10 µL com água RNase-free. Logo após, as amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C e posteriormente a isso, foi adicionado 1 µL de EDTA (25 mM) e realizada a incubação por 10 minutos a 65°C.

A concentração do RNA foi determinada por espectrofotometria utilizando o equipamento Thermo Scientific NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

### 3.6 Síntese de cDNA dos Monócitos

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total extraído e tratado conforme descrito acima. Para tal protocolo foi utilizado 1 µL de “Random primers” (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, ThermoFisher); 50 U da enzima transcriptase reversa (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, ThermoFisher); 2 µL do tampão da enzima (10X); e, 0,8 µL de dNTP (100 mM) em um volume final de reação de 20 µL. Tal mistura foi incubada por 10 minutos a 25°C para permitir a hibridização dos oligonucleotídeos randômicos ao RNA e, em seguida, aquecida a 37°C por 120 minutos e em 85°C por 5 minutos. Assim, o cDNA foi obtido e armazenado a -80° até a realização da análise de qPCR em tempo real.

### 3.7. qPCR

As sequências dos *primers* utilizados para as análises de expressão de mRNA estipuladas para o estudo foram obtidas de acordo com padronizações anteriores do grupo de pesquisa (Gritte 2022). Os genes determinados e seus respectivos primers são apresentados na tabela abaixo: (**Tabela 2**).

Gene	Foward Sequence	Reverse Sequence
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	ACCTATGACCTCGTTGGTGC	GGCTGTGTCGACTGAGGAAA
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	CCTGAGCTCGCCAGTGAAAT	TGTCCATGGCCACAACAAC
<b>NLRP3</b>	GGCAACACTCTCGGAGACAA	TGTGACGTGAGGTTGCAGTT
<b>TLR4</b>	AGAAACTGCTCGGTCAGACG	GGATTCACACCTCCACGCA

**Tabela 2 - Genes alvos e seus respectivos primers.**

A temperatura de hibridação dos *primers* foi previamente padronizada para compor o modelo de ensaio da PCR em tempo real em estudos anteriores do grupo.

A quantificação do mRNA foi determinada utilizando-se o kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher) utilizando o equipamento QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific) e os resultados, analisados utilizando o software, QuantStudio 3 v1.5.1 (Thermo

Fisher). O valor da quantificação relativa de cada gene alvo foi expresso por meio do método comparativo de CT (Ct = *threshold cycle*; número de ciclo no qual o produto da PCR atinge o limiar de detecção) (Livak and Schmittgen 2001, Pfaffl 2001).

Para os resultados, foram realizados o cálculo de  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Todos os protocolos empregados em testes com monócitos e macrófagos foram validados por estudos anteriores do grupo (Gritte; Souza-Siqueira; Curi; Machado *et al.*, 2020).

### 3.8. Gene Constitutivo

Um gene constitutivo é caracterizado como aquele que o nível de expressão não se altera por condições experimentais variáveis. Possibilita assim a normalização dos resultados obtidos nos genes de interesse ao estudo (Tanaka; To; O'Brien; Donnelly *et al.*, 2017).

De acordo com estudos anteriores do grupo, foram selecionados quatro genes referências mais bem caracterizados em suas expressões, sendo eles: GAPDH, HPRT1, PGK1 e STX5A (Gritte; Souza-Siqueira; Curi; Machado *et al.*, 2020) (**Tabela 3**). Para normalização dos dados, fizemos a média geométrica dos resultados de expressão gênica dos genes acima citados.

Gene	Forward Sequence	Reverse Sequence
GAPDH	TTCAACAGCGACACCCACT	TTCCTCTTGTGCTCTTGCT
HPRT1	CCTGGCGTCGTGATTAGTGA	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT
PGK1	CCACTGTGGCTTCTGGCATA	ATGAGAGCTTTGGTTCCCCG
STx5A	GAACACGGATCAGGGTGTCTA	ACGTTCTCGTCGATCCTCTG

**Tabela 3 - Genes Constitutivos e seus respectivos primers.** GAPDH- gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; HPRT1- hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; PGK1- Phosphoglycerate Kinase 1;STx5A- Syntaxin 5.

### 3.9. Análise Estatística

Os dados aqui apresentados dizem respeito aos parâmetros de média e desvio padrão. Para comparação de médias, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann Whitney utilizando o software GraphPad Prism 6 e considerado nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

Ressalta-se que os dados estão sendo analisados por um profissional estatístico antes da publicação dos resultados, garantindo assim a aplicação de testes mais coerentes e precisos.

#### 4. RESULTADOS

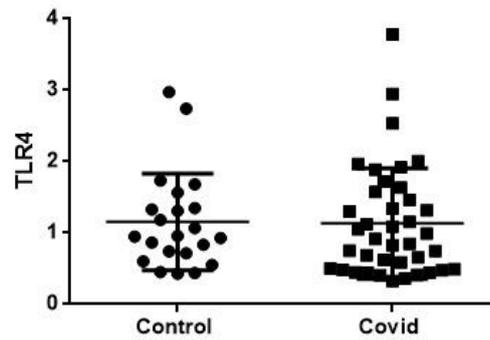


Figura 9 - Expressão de mRNA do TLR4.

A expressão de mRNA de TLR4 não mostrou diferença estatística entre o grupo Covid e o grupo controle. (Fig. 9).

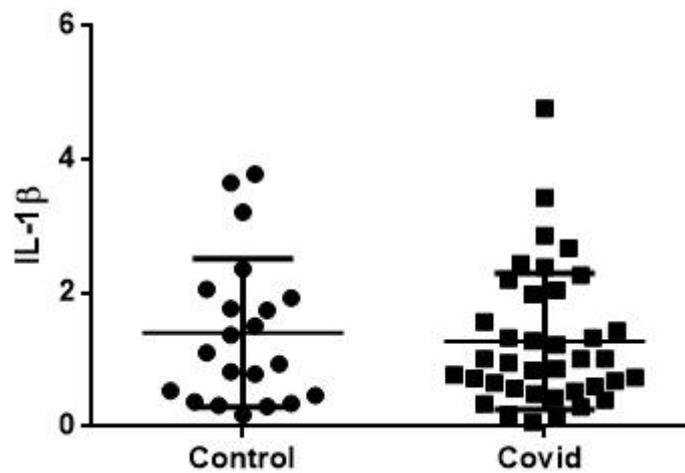
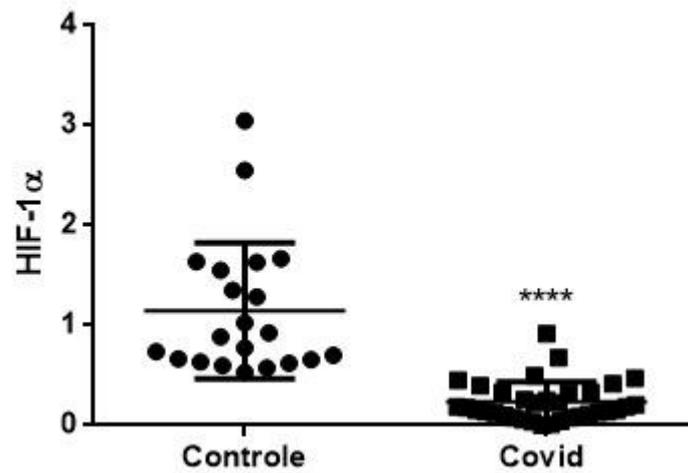


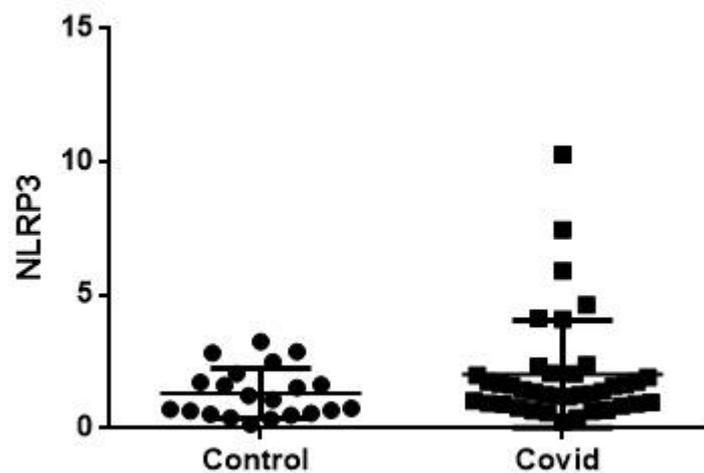
Figura 10 - Expressão de mRNA do IL-1B.

A expressão de mRNA de IL-1B não mostrou diferença estatística entre o grupo Covid e o grupo controle. (Fig. 10).



**Figura 11 - Expressão de mRNA do HIF-1a.** (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$  vs Controle.

A expressão de mRNA de HIF-1a mostrou-se diminuída no grupo Covid quando em comparação ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ). (Fig 11).



**Figura 12 - Expressão de mRNA do NLRP3.**

A expressão de mRNA de NLRP3 não mostrou diferença estatística entre o grupo Covid e o grupo controle. (Fig. 12).

## 5. DISCUSSÃO

Foi suposto por outros estudos que a presença de uma resposta inflamatória imune nos pacientes com COVID-19 em fase inicial de recuperação, sugere que os mesmos ainda estão vulneráveis após a alta hospitalar (Wen; Su; Tang; Le *et al.*, 2020). Hipótese essa que foi levantada anteriormente pelo grupo de pesquisa, quando considerados quadros de sepse, onde os pacientes continuavam doentes mesmo após alta hospitalar (Gritte; Souza-Siqueira; Curi; Machado *et al.*, 2020).

Com base nos estudos realizados anteriormente pelo grupo, ponderamos a possibilidade de que, dado a notável semelhança entre a síndrome pós-sepse e a síndrome pós-COVID, os pacientes afetados pela COVID-19 prolongada também pudessem enfrentar desafios substanciais em sua recuperação, persistindo a presença de diversos sintomas e sem melhorias significativas mesmo após a liberação hospitalar.

O fator induzível por hipóxia (HIF) é uma das principais proteínas que regulam a transcrição durante a hipóxia, além de desempenhar um papel fundamental na adaptação do tecido à condição de hipóxia (Yucel; Fuat Gurbuz, 2022). O HIF-1 $\alpha$  desempenha um papel crucial na ativação da glicólise e na resposta inflamatória, sugerindo que seus efeitos na patogênese da COVID-19 são significativos (Codo; Davanzo; Monteiro; de Souza *et al.*, 2020).

Em casos graves de COVID-19, a ativação do HIF-1 $\alpha$  pode levar à tempestade de citocinas por meio da ativação e estabilização de células imunológicas, provocando a produção de altas quantidades de citocinas inflamatórias, vazamento vascular (por *upregulation* do VEGF) e destruição das barreiras do complexo epitelial alveolar-intersticial-endotelial (Jahani; Dokaneheifard; Mansouri, 2020).

Em 2021, foi realizado um estudo no qual observaram um aumento na atividade da via de sinalização do HIF-1 $\alpha$  nas amostras de sangue de pacientes com COVID-19 ativo (Tian; Liu; Li; Zhao *et al.*, 2021). Isso sugere a importância do HIF-1 $\alpha$  na modulação das respostas imunológicas e inflamatórias após a infecção viral. Além disso, o estudo constatou que os níveis de mRNA do HIF-1 $\alpha$  estavam consideravelmente mais elevados nos pacientes infectados em comparação com os indivíduos saudáveis. Entretanto, os dados obtidos em nosso trabalho correspondem a amostras de sangue de pacientes no período de 2 anos pós-infecção, evidenciando uma diminuição da expressão de HIF-1 $\alpha$  quando comparado a indivíduos controle.

Os sintomas da síndrome pós-covid (SPC), conhecido também como Covid longa, podem ser similares ou não aos sintomas da infecção ativa da COVID-19 (Iosef; Knauer;

Nicholson; Van Nynatten *et al.*, 2023). Inflamação persistente é um dos mecanismos patológicos estabelecidos na covid longa, mesmo quando a infecção e a replicação do SARS-COV-2 não pode mais ser detectada. Os pacientes que apresentam a SPC ainda demonstram anormalidades imunológicas, caracterizadas pela expressão contínua de citocinas inflamatórias quando em comparação a indivíduos que não foram infectados anteriormente (Hallek; Adorjan; Behrends; Ertl *et al.*, 2023).

A inflamação persistente foi notada sobretudo no sistema nervoso central, no coração e nos pulmões. Especificamente, no caso dos pulmões, nossa pesquisa levantou a hipótese de que a expressão contínua de citocinas inflamatórias poderia resultar em hipoxemia, o que, por sua vez, poderia levar à ativação do HIF-1 $\alpha$ . No entanto, surpreendentemente, nossos resultados revelaram uma redução na expressão do mRNA do HIF-1 $\alpha$  no grupo de pacientes 2 anos após infecção pelo COVID-19 em comparação com o grupo de controle ( $p < 0,0001$ ). Portanto, são necessários estudos adicionais para uma compreensão mais profunda do papel do HIF-1 $\alpha$  no contexto do quadro pós-infecção por COVID-19.

Em relação aos outros genes pesquisados, nenhum deles apresentou diferença estatística significativa entre os grupos envolvidos. Houve um estudo produzido em 2020 onde, através de qPCR, foi possível elucidar que a expressão de TLR4 esteve aumentada em amostras de sangue de pacientes infectados por COVID-19 (Sohn; Lee; Kim; Cheon *et al.*, 2020). Além disso, o estudo também apontou que a IL-1B se encontrava drasticamente aumentada nos mesmos pacientes, desta forma, os dados sugerem que os perfis aumentados dessas moléculas estão associados a respostas imunes alteradas, ativação de citocinas e que podem contribuir para a inflamação patológica descontrolada. Já no que diz respeito ao NLRP3, pacientes com pneumonia por COVID-19 manifestaram intensa expressão do inflamassoma NLRP3 (Wang; Yu; Chang; Zhang *et al.*, 2023).

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS**

Nossa pesquisa enfrentou algumas limitações e desafios. Além disso, a escassez de literatura que respaldasse a interpretação dos nossos resultados representou um obstáculo significativo, especialmente devido à utilização de pacientes que se encontravam dois anos após a infecção. Adicionalmente, encontramos dificuldades no que tange a metodologia, visto que vários pacientes contatados optaram por não participar da pesquisa. Além disso, observamos que alguns pacientes atendidos nos hospitais usados para a coleta de prontuários não eram residentes da Baixada Santista, e alguns nem mesmo do país.

Para abordar as lacunas que permanecem em nossa compreensão sobre o estado dos pacientes anos após a infecção inicial, o grupo pretende conduzir futuros estudos que fornecerão uma visão mais completa desse cenário.

Portanto, é fundamental continuar a investigar a via de hipóxia em pacientes após a infecção por COVID-19, a fim de determinar se ela permanece ou não alterada e se pode representar uma preocupação para os pacientes que enfrentam a síndrome pós-COVID. Estudos aprofundados são essenciais para ampliar nossa compreensão dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes a resposta do organismo após a infecção e podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias de tratamento e manejo eficazes para os indivíduos afetados pela síndrome pós-COVID.

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, N. O.; VARVARA, A. O.; NIKITA, G. N.; VERONIKA, A. M. *et al.* Monocyte differentiation and macrophage polarization. **Vessel Plus**, 3, p. 10, 2019.
- ATTIQ, A.; YAO, L. J.; AFZAL, S.; KHAN, M. A. The triumvirate of NF- $\kappa$ B, inflammation and cytokine storm in COVID-19. **Int Immunopharmacol**, 101, n. Pt B, p. 108255, Dec 2021.
- AWAD, F.; ASSRAWI, E.; JUMEAU, C.; GEORGIN-LAVIALLE, S. *et al.* Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation. **PLoS One**, 12, n. 4, p. e0175336, 2017.
- BARNETT, K. C.; XIE, Y.; ASAKURA, T.; SONG, D. *et al.* An epithelial-immune circuit amplifies inflammasome and IL-6 responses to SARS-CoV-2. **Cell Host Microbe**, 31, n. 2, p. 243-259.e246, Feb 8 2023.
- BIVONA, G.; AGNELLO, L.; CIACCIO, M. Biomarkers for Prognosis and Treatment Response in COVID-19 Patients. **Ann Lab Med**, 41, n. 6, p. 540-548, Nov 1 2021.
- BODE, J. G.; EHLTING, C.; HÄUSSINGER, D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. **Cell Signal**, 24, n. 6, p. 1185-1194, Jun 2012.
- BRYCE, C.; GRIMES, Z.; PUJADAS, E.; AHUJA, S. *et al.* Pathophysiology of SARS-CoV-2: the Mount Sinai COVID-19 autopsy experience. **Mod Pathol**, 34, n. 8, p. 1456-1467, Aug 2021.
- CAMERON, M. J.; BERMEJO-MARTIN, J. F.; DANESH, A.; MULLER, M. P. *et al.* Human immunopathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS). **Virus Res**, 133, n. 1, p. 13-19, Apr 2008.
- CARRILLO-ESPER, R. Post-COVID-19 syndrome. **Gac Med Mex**, p. 115-117, 2022.
- CHEN, C.; XU, P. Activation and Pharmacological Regulation of Inflammasomes. **Biomolecules**, 12, n. 7, Jul 20 2022.
- CHEN, M. Y.; YE, X. J.; HE, X. H.; OUYANG, D. Y. The Signaling Pathways Regulating NLRP3 Inflammasome Activation. **Inflammation**, 44, n. 4, p. 1229-1245, Aug 2021.
- CODO, A. C.; DAVANZO, G. G.; MONTEIRO, L. B.; DE SOUZA, G. F. *et al.* Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1 $\alpha$ /Glycolysis-Dependent Axis. **Cell Metab**, 32, n. 3, p. 437-446.e435, Sep 1 2020.
- COVID, J. Dashboard by the center for systems science and engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU). **Baltimore, Maryland: John Hopkins University Coronavirus Resource Centre**, 2020.
- D'IGNAZIO, L.; ROCHA, S. Hypoxia Induced NF- $\kappa$ B. **Cells**, 5, n. 1, Mar 8 2016.
- DAVIS, H. E.; MCCORKELL, L.; VOGEL, J. M.; TOPOL, E. J. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. **Nature Reviews Microbiology**, 21, n. 3, p. 133-146, 2023.
- DENGLER, V. L.; GALBRAITH, M.; ESPINOSA, J. M. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, 49, n. 1, p. 1-15, Jan-Feb 2014.

ESPINOZA, V. E.; EMMADY, P. D. Histology, Monocytes. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Prabhu Emmady declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: StatPearls Publishing  
Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC., 2023.

FERNANDES, T.; RIBEIRO, R.; COMIN, M.; DAGOSTIN, V. *et al.* Análise do perfil de pacientes que sobrevivem à sepse. **Revista de Administração em Saúde**, 21, 04/17 2021.

GORBALENYA, A. E.; BAKER, S. C.; BARIC, R. S.; DE GROOT, R. J. *et al.* The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, 5, n. 4, p. 536-544, 2020/04/01 2020.

GRITTE, R. B.; SOUZA-SIQUEIRA, T.; CURI, R.; MACHADO, M. C. C. *et al.* Why Septic Patients Remain Sick After Hospital Discharge? **Front Immunol**, 11, p. 605666, 2020.

GUAN, W.-j.; NI, Z.-y.; HU, Y.; LIANG, W.-h. *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. 382, n. 18, p. 1708-1720, 2020.

GUERMONPREZ, P.; HELFT, J. Inflammasome activation: a monocyte lineage privilege. **Nat Immunol**, 20, n. 4, p. 383-385, Apr 2019.

GUILLIAMS, M.; GINHOUX, F.; JAKUBZICK, C.; NAIK, S. H. *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. **Nat Rev Immunol**, 14, n. 8, p. 571-578, Aug 2014.

GUILLIAMS, M.; MILDNER, A.; YONA, S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. **Immunity**, 49, n. 4, p. 595-613, Oct 16 2018.

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nat Med**, 21, n. 7, p. 677-687, Jul 2015.

GUSTINE, J. N.; JONES, D. Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. **Am J Pathol**, 191, n. 1, p. 4-17, Jan 2021.

HALLEK, M.; ADORJAN, K.; BEHRENDTS, U.; ERTL, G. *et al.* Post-COVID Syndrome. **Dtsch Arztebl Int**, 120, n. 4, p. 48-55, Jan 27 2023.

HERMINGHAUS, A.; OSUCHOWSKI, M. F. How sepsis parallels and differs from COVID-19. **EBioMedicine**, 86, 2022.

HU, B.; GUO, H.; ZHOU, P.; SHI, Z. L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nat Rev Microbiol**, 19, n. 3, p. 141-154, Mar 2021.

IOSEF, C.; KNAUER, M. J.; NICHOLSON, M.; VAN NYNATTEN, L. R. *et al.* Plasma proteome of Long-COVID patients indicates HIF-mediated vasculo-proliferative disease with impact on brain and heart function. **J Transl Med**, 21, n. 1, p. 377, Jun 10 2023.

JAHANI, M.; DOKANEHEIFARD, S.; MANSOURI, K. Hypoxia: A key feature of COVID-19 launching activation of HIF-1 and cytokine storm. **Journal of Inflammation**, 17, n. 1, p. 33, 2020/10/29 2020.

JUHAS, U.; RYBA-STANISŁAWOWSKA, M.; SZARGIEJ, P.; MYŚLIWSKA, J. Different pathways of macrophage activation and polarization. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, 69, p. 496-502, Apr 22 2015.

KADAM, S. B.; SUKHRAMANI, G. S.; BISHNOI, P.; PABLE, A. A. *et al.* SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. **J Basic Microbiol**, 61, n. 3, p. 180-202, Mar 2021.

KARAKIKE, E.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; KYPRIANOU, M.; FLEISCHMANN-STRUZEK, C. *et al.* Coronavirus disease 2019 as cause of viral sepsis: a systematic review and meta-analysis. **Critical care medicine**, 49, n. 12, p. 2042, 2021.

KARKI, R.; KANNEGANTI, T. D. Innate immunity, cytokine storm, and inflammatory cell death in COVID-19. **J Transl Med**, 20, n. 1, p. 542, Nov 22 2022.

KENNETH, N. S.; ROCHA, S. Regulation of gene expression by hypoxia. **Biochem J**, 414, n. 1, p. 19-29, Aug 15 2008.

KNOLL, R.; SCHULTZE, J. L.; SCHULTE-SCHREPPING, J. Monocytes and Macrophages in COVID-19. **Front Immunol**, 12, p. 720109, 2021.

KUZMICH, N. N.; SIVAK, K. V.; CHUBAREV, V. N.; POROZOV, Y. B. *et al.* TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. **Vaccines (Basel)**, 5, n. 4, Oct 4 2017.

LAMBRECHT, B. N. Alveolar macrophage in the driver's seat. **Immunity**, 24, n. 4, p. 366-368, Apr 2006.

LARA-REYNA, S.; CASELEY, E. A.; TOPPING, J.; RODRIGUES, F. *et al.* Inflammasome activation: from molecular mechanisms to autoinflammation. **Clin Transl Immunology**, 11, n. 7, p. e1404, 2022.

LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nat Rev Immunol**, 11, n. 11, p. 750-761, Oct 25 2011.

LI, J.; JIA, H.; TIAN, M.; WU, N. *et al.* SARS-CoV-2 and Emerging Variants: Unmasking Structure, Function, Infection, and Immune Escape Mechanisms. **Front Cell Infect Microbiol**, 12, p. 869832, 2022.

LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D.; SUN, S. C. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. **Signal Transduct Target Ther**, 2, p. 17023-, 2017.

LU, Y. C.; YE, W. C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, 42, n. 2, p. 145-151, May 2008.

MACINTYRE, N. R. Tissue hypoxia: implications for the respiratory clinician. **Respir Care**, 59, n. 10, p. 1590-1596, Oct 2014.

MALKOV, M. I.; LEE, C. T.; TAYLOR, C. T. Regulation of the Hypoxia-Inducible Factor (HIF) by Pro-Inflammatory Cytokines. **Cells**, 10, n. 9, Sep 7 2021.

MALONE, B.; URAKOVA, N.; SNIJDER, E. J.; CAMPBELL, E. A. Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 23, n. 1, p. 21-39, Jan 2022.

MANDALA, V. S.; MCKAY, M. J.; SHCHERBAKOV, A. A.; DREGNI, A. J. *et al.* Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. **Nat Struct Mol Biol**, 27, n. 12, p. 1202-1208, Dec 2020.

MANTOVANI, S.; OLIVIERO, B.; VARCHETTA, S.; RENIERI, A. *et al.* TLRs: Innate Immune Sentries against SARS-CoV-2 Infection. **Int J Mol Sci**, 24, n. 9, Apr 29 2023.

MCKEE, C. M.; COLL, R. C. NLRP3 inflammasome priming: A riddle wrapped in a mystery inside an enigma. **J Leukoc Biol**, 108, n. 3, p. 937-952, Sep 2020.

MONIZ, S.; BIDDLESTONE, J.; ROCHA, S.  $\text{HIF}_2$ : the HIF system, energy homeostasis and the cell cycle. **Histol Histopathol**, 29, n. 5, p. 589-600, May 2014.

MONTEIL, V.; KWON, H.; PRADO, P.; HAGELKRÜYS, A. *et al.* Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. **Cell**, 181, n. 4, p. 905-913.e907, May 14 2020.

MUSSBACHER, M.; DERLER, M.; BASÍLIO, J.; SCHMID, J. A. NF- $\kappa$ B in monocytes and macrophages - an inflammatory master regulator in multitasked immune cells. **Front Immunol**, 14, p. 1134661, 2023.

OSTOLIN, T. L. V. D. P.; MIRANDA, R. A. d. R.; ABDALA, C. V. M. Mapa de evidências sobre sequelas e reabilitação da covid-19 pós-aguda: uma versão atualizada em julho de 2022. **Revista Panamericana de Salud Pública**, 47, p. e30, 2023.

PAIK, S.; KIM, J. K.; SILWAL, P.; SASAKAWA, C. *et al.* An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. **Cell Mol Immunol**, 18, n. 5, p. 1141-1160, May 2021.

PANDEY, A.; SHEN, C.; FENG, S.; MAN, S. M. Cell biology of inflammasome activation. **Trends Cell Biol**, 31, n. 11, p. 924-939, Nov 2021.

PAULO, G. d. E. d. S. **São Paulo contra o novo Coronavirus: Boletim Completo**. 2023. Disponível em: <https://www.seade.gov.br/coronavirus/>.

PERERA, P.-Y.; MAYADAS, T. N.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. *et al.* CD11b/CD18 Acts in Concert with CD14 and Toll-Like Receptor (TLR) 4 to Elicit Full Lipopolysaccharide and Taxol-Inducible Gene Expression<sup>1 2 3</sup>. **The Journal of Immunology**, 166, n. 1, p. 574-581, 2001.

PLANÈS, R.; BERT, J. B.; TAIRI, S.; BENMOHAMED, L. *et al.* SARS-CoV-2 Envelope (E) Protein Binds and Activates TLR2 Pathway: A Novel Molecular Target for COVID-19 Interventions. **Viruses**, 14, n. 5, May 8 2022.

PRABHAKAR, N. R.; SEMENZA, G. L. Oxygen Sensing and Homeostasis. **Physiology (Bethesda)**, 30, n. 5, p. 340-348, Sep 2015.

PROAL, A. D.; VANELZAKKER, M. B. Long COVID or Post-acute Sequelae of COVID-19 (PASC): An Overview of Biological Factors That May Contribute to Persistent Symptoms. **Front Microbiol**, 12, p. 698169, 2021.

PROMPETCHARA, E.; KETLOY, C.; PALAGA, T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. **Asian Pac J Allergy Immunol**, 38, n. 1, p. 1-9, Mar 2020.

RAVEENDRAN, A.; JAYADEVAN, R.; SASHIDHARAN, S. Long COVID: an overview. **Diabetes Metabolic Syndrome: Clinical Research Reviews**, 15, n. 3, p. 869-875, 2021.

RAVI, V.; SAXENA, S.; PANDA, P. S. Basic virology of SARS-CoV 2. **Indian J Med Microbiol**, 40, n. 2, p. 182-186, Apr-Jun 2022.

SAGHAZADEH, A.; REZAEI, N. Immune-epidemiological parameters of the novel coronavirus - a perspective. **Expert Rev Clin Immunol**, 16, n. 5, p. 465-470, May 2020.

SALEPCI, E.; TURK, B.; OZCAN, S. N.; BEKTAS, M. E. *et al.* Symptomatology of COVID-19 from the otorhinolaryngology perspective: a survey of 223 SARS-CoV-2 RNA-positive patients. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, 278, n. 2, p. 525-535, Feb 2021.

SANTOS, P. d. **Coronavirus**. 2023. Disponível em: <https://www.santos.sp.gov.br/?q=portal/coronavirus#>.

SCHOLZ, C. C.; TAYLOR, C. T. Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity. **Curr Opin Pharmacol**, 13, n. 4, p. 646-653, Aug 2013.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, 140, n. 6, p. 821-832, Mar 19 2010.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. **Trends Mol Med**, 7, n. 8, p. 345-350, Aug 2001.

SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C. S.; SEYMOUR, C. W.; SHANKAR-HARI, M. *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **Jama**, 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SOHN, K. M.; LEE, S.-G.; KIM, H. J.; CHEON, S. *et al.* COVID-19 Patients Upregulate Toll-like Receptor 4-mediated Inflammatory Signaling That Mimics Bacterial Sepsis. **J Korean Med Sci**, 35, n. 38, 9/ 2020.

SOHRABI, C.; ALSAFI, Z.; O'NEILL, N.; KHAN, M. *et al.* World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). **Int J Surg**, 76, p. 71-76, Apr 2020.

SOUZA, L.; SILVA, T.; PINHEIRO, A.; SANTOS, F. SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2: uma revisão narrativa dos principais Coronavírus do século / SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2: a narrative review of the main Coronaviruses of the century. **Brazilian Journal of Health Review**, 4, p. 1419-1439, 01/01 2021.

TANAKA, A.; TO, J.; O'BRIEN, B.; DONNELLY, S. *et al.* Selection of reliable reference genes for the normalisation of gene expression levels following time course LPS stimulation of murine bone marrow derived macrophages. **BMC immunology**, 18, n. 1, p. 1-12, 2017.

TAY, M. Z.; POH, C. M.; RÉNIA, L.; MACARY, P. A. *et al.* The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nat Rev Immunol**, 20, n. 6, p. 363-374, Jun 2020.

TAYLOR, C. T.; POUYSSEGUR, J. Oxygen, hypoxia, and stress. **Ann N Y Acad Sci**, 1113, p. 87-94, Oct 2007.

TEIXEIRA, C.; ROSA, R. G.; FRIEDMAN, G. Sepsis após a alta da UTI: um problema de saúde pública. **Clinical biomedical research**, 1, 41, 2021.

TIAN, M.; LIU, W.; LI, X.; ZHAO, P. *et al.* HIF-1 $\alpha$  promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19. **Signal Transduct Target Ther**, 6, n. 1, p. 308, Aug 18 2021.

TIAN, S.; HU, W.; NIU, L.; LIU, H. *et al.* Pulmonary Pathology of Early-Phase 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Pneumonia in Two Patients With Lung Cancer. **J Thorac Oncol**, 15, n. 5, p. 700-704, May 2020.

TUCKER, J.; LEE, J.; GLAUNSINGER, B. Life Cycle of Coronavirus Template. **biorender.com Template**, 2022.

UMAKANTHAN, S.; SAHU, P.; RANADE, A. V.; BUKELO, M. M. *et al.* Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Postgrad Med J**, 96, n. 1142, p. 753-758, Dec 2020.

V'KOVSKI, P.; KRATZEL, A.; STEINER, S.; STALDER, H. *et al.* Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nat Rev Microbiol**, 19, n. 3, p. 155-170, Mar 2021.

VAN DER SLIKKE, E. C.; AN, A. Y.; HANCOCK, R. E. W.; BOUMA, H. R. Exploring the pathophysiology of post-sepsis syndrome to identify therapeutic opportunities. **EBioMedicine**, 61, p. 103044, Nov 2020.

WANG, M.; YU, F.; CHANG, W.; ZHANG, Y. *et al.* Inflammasomes: a rising star on the horizon of COVID-19 pathophysiology. **Front Immunol**, 14, p. 1185233, 2023.

WEBER, A. N. R.; BITTNER, Z. A.; SHANKAR, S.; LIU, X. *et al.* Recent insights into the regulatory networks of NLRP3 inflammasome activation. **J Cell Sci**, 133, n. 23, Dec 3 2020.

WEISS, S. R.; LEIBOWITZ, J. L. Coronavirus pathogenesis. **Adv Virus Res**, 81, p. 85-164, 2011.

WEN, W.; SU, W.; TANG, H.; LE, W. *et al.* Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing. **Cell Discov**, 6, p. 31, 2020.

WU, L.; O'KANE, A. M.; PENG, H.; BI, Y. *et al.* SARS-CoV-2 and cardiovascular complications: From molecular mechanisms to pharmaceutical management. **Biochem Pharmacol**, 178, p. 114114, Aug 2020.

YAN, W.; ZHENG, Y.; ZENG, X.; HE, B. *et al.* Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. **Signal Transduct Target Ther**, 7, n. 1, p. 26, Jan 27 2022.

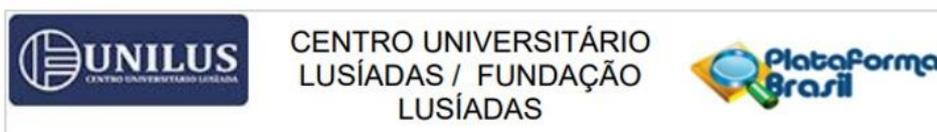
YUCEL, K.; FUAT GURBUZ, A. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and ischemia-modified albumin levels in intensive care COVID-19 Patients. **Horm Mol Biol Clin Investig**, 43, n. 4, p. 415-420, Dec 1 2022.

YUKI, K.; FUJIOGI, M.; KOUTSOGIANNAKI, S. COVID-19 pathophysiology: A review. **Clin Immunol**, 215, p. 108427, Jun 2020.

ZHANG, Q.; XIANG, R.; HUO, S.; ZHOU, Y. *et al.* Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. **Signal Transduct Target Ther**, 6, n. 1, p. 233, Jun 11 2021.

ZHU, N.; ZHANG, D.; WANG, W.; LI, X. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med**, 382, n. 8, p. 727-733, Feb 20 2020.

## ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP: CENTRO UNIVERSITÁRIO LUSÍADAS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** FATORES PREDITIVOS DA OCORRÊNCIA DE SÍNDROME PÓS-COVID

**Pesquisador:** Edgar Matias Bach Hi

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 51925221.5.0000.5436

**Instituição Proponente:** Fundação Lusíada / Centro Universitário Lusíada - UNILUS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.012.568

#### Considerações Finais a critério do CEP:

Em reunião do colegiado, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro Universitário Lusíada (CEPSH/UNILUS), AVALIOU o referido Protocolo submetido à Plataforma Brasil, constando em ATA.

Conforme a Resolução No. 466 de 12 de dezembro de 2012, item IV.5, alínea d, "O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deverá, ainda: ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local e da CONEP, quando pertinente".

As modificações ou emendas ao Projeto de Pesquisa deverão ser apresentadas ao CEPSH/UNILUS de forma clara e sucinta, identificando a parte do Projeto de Pesquisa a ser modificada e suas justificativas.

Solicitamos que sejam apresentados ao CEPSH/UNILUS relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas a eventuais modificações, efeitos adversos, cancelamento, encerramento, destino dos conhecimentos obtidos e relatório final, conforme a Resolução nº 466/2012.

#### Situação do Parecer:

Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTOS, 01 de Outubro de 2021

Assinado por:  
**Frederico Kauffmann Barbosa**  
 (Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Batista Pereira, nº 265, sala 28  
**Bairro:** Macuco **CEP:** 11.015-100  
**UF:** SP **Município:** SANTOS  
**Telefone:** (13)3202-4100 **Fax:** (13)3221-4488 **E-mail:** cepsh@lusiada.br

## ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP: IRMANDADE SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SANTOS

IRMANDADE SANTA CASA DE  
MISERICÓRDIA DE SANTOS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** FATORES PREDITIVOS DA OCORRÊNCIA DE SÍNDROME PÓS-COVID

**Pesquisador:** Edgar Matias Bach Hi

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 51925221.5.3002.0139

**Instituição Proponente:** IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE SANTOS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.036.959

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

Sem pendências

#### Considerações Finais a critério do CEP:

#### Situação do Parecer:

Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTOS, 14 de Outubro de 2021

---

**Assinado por:**  
**FERNANDA MARTINS DA SILVA SANTOS**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** AV. DOUTOR CLAUDIO LUIS DA COSTA 50

**Bairro:** JABAQUARA

**CEP:** 11.075-900

**UF:** SP

**Município:** SANTOS

**Telefone:** (13)3202-0600

**E-mail:** cep@scsantos.com.br

## ANEXO C– PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP: HOSPITAL GUILHERME ÁLVARO

HOSPITAL GUILHERME  
ÁLVARO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** FATORES PREDITIVOS DA OCORRÊNCIA DE SÍNDROME PÓS-COVID

**Pesquisador:** Edgar Matias Bach Hi

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 51925221.5.3001.5448

**Instituição Proponente:** Hospital Guilherme Alvaro - Santos - SP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.075.908

#### Recomendações:

Recomendo incluir no projeto mais claramente a forma de recrutamento do grupo de controle, bem como no TCLE.

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

Sem pendências ou inadequações. Existiram pendências documentais na validação documental que foram cumpridas.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

Deverá ser entregue uma via na íntegra do TCLE ao participante da pesquisa, atentar no item que o participante da pesquisa tem liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer parte da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado. As modificações ou emendas ao protocolo devem ser enviadas a Plataforma Brasil para conhecimento e avaliação deste Comitê, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Solicitamos que sejam enviados ao CEP/HGA, via Plataforma Brasil, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas da mesma, eventos adversos, cancelamento, encerramento, destino dos conhecimentos obtidos e relatório final.

#### Situação do Parecer:

Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTOS, 03 de Novembro de 2021

Assinado por:  
Maria Aparecida Pedrosa dos Santos  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Oswaldo Cruz nº 197  
**Bairro:** Boqueirão **CEP:** 11.045-904  
**UF:** SP **Município:** SANTOS  
**Telefone:** (13)3202-1306 **Fax:** (13)3202-1306 **E-mail:** hga-cep@saude.sp.gov.br

## ANEXO D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o(a) Sr(a) para participar da Pesquisa “FATORES PREDITIVOS DA OCORRÊNCIA DE SÍNDROME PÓS-COVID”, sob a responsabilidade dos pesquisadores MARCEL CERQUEIRA CÉSAR MACHADO, EDGAR MATIAS BACH HI e RAQUEL BATISTA GRITTE, a qual pretende identificar e caracterizar os fatores preditivos da Síndrome Pós-Covid (SPC) em pacientes atendidos na cidade de Santos.

Sua participação é voluntária, por onde você deverá comparecer as consultas agendadas previamente para as seguintes ações:

- Coleta de sangue para realização de exames
- Responder um questionário para sabermos como anda sua saúde

Algumas coisas poderão ocorrer durante esta consulta (riscos):

- Dor ou incômodo no local da coleta de sangue

Se algo ocorrer teremos profissionais prontos para atendê-lo da melhor forma possível.

Se o(s) Sr(a) aceitar participar, estará contribuindo para avaliar sua qualidade de vida e poder proporcionar conhecimentos sobre a doença.

Se depois de consentir em sua participação o(s) Sr(a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a Vossa Senhoria. O(a) Sr(a) não terá qualquer despesa e também não receberá qualquer remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, sendo sua identidade preservada e guardada em sigilo.

Sua amostra biológica (sangue) poderá ser armazenada em um Biobanco ou Biorrepositório. De acordo com a Resolução CNS N° 441 de 2012, item 10, o participante da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado em Biobanco ou Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. I - A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, pelo participante da pesquisa ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes.

Para qualquer outra informação, o(a) Sr(a) pode entrar em contato com o pesquisador responsável EDGAR MATIAS BACH HI, pelo telefone (11) 99179-3444 (Whatsapp) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Cruzeiro do Sul, Av. Dr. Ussiel Cirilo, 225, São Miguel, São Paulo, SP, telefone (11) 2037 5805; ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Lusíada, Rua Batista Pereira 262, Macuco, Santos/SP, Telefone (13) 3204-4100.

Se o(a) Sr(a) se sentir suficientemente esclarecido sobre essa pesquisa, objetivo, procedimentos e eventuais riscos e benefícios, convido-o(a) a assinar este Termo, elaborado em duas vias, sendo que uma ficará com o(a) Sr(a) e a outra com o pesquisador.

Santos, de \_\_\_\_\_ de 2023.

**Identificação do Participante:**

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

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

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

Endereço: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Declaração do pesquisador:**

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária, o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante (ou representante legal) para a participação neste estudo. Declaro ainda que me comprometo a cumprir todos os termos aqui descritos.

Nome do pesquisador: Marcel Cerqueira César Machado

Assinatura:

Data: 09/09/2022

\_\_\_\_\_  
Rubrica do participante\_\_\_\_\_  
Rubrica do pesquisador