

**CENTRO UNIVERSITÁRIO LUSÍADA
CURSO DE BIOMEDICINA**

MARIANA BARBOSA DE SOUZA

**REPROGRAMAÇÃO DE MONÓCITOS NO PÓS-COVID: CARACTERIZAÇÃO
DOS PERFIS DE POLARIZAÇÃO**

SANTOS

2023

MARIANA BARBOSA DE SOUZA

**REPROGRAMAÇÃO DE MONÓCITOS NO PÓS-COVID:
CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS DE POLARIZAÇÃO**

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

MARIANA BARBOSA DE SOUZA

**REPROGRAMAÇÃO DE MONÓCITOS NO PÓS-COVID: CARACTERIZAÇÃO
DOS PERFIS DE POLARIZAÇÃO**

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.

Aprovado em 21 de Novembro, 2023

Me. Edgar Matias Bach Hi

Dr^a Daniela de Pita Pereira

Dr^o Renato Antonio Migliano Lopes

DEDICATÓRIA

A todos àqueles que, imaginaram, riram, por vezes choraram comigo..., mas em todos os momentos sonharam junto a mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente à Deus, por sua graça e incompreensível amor... por ter sido meu refúgio e fortaleza, meu consolo em meio as angústias e a razão do meu viver. Agradeço pelas oportunidades, pois me alegro em pensar que dentre as infinitas possibilidades, nos mostrou sua precisa e perfeita regência.

Frequentemente pontuo que vivemos e construímo-nos de tudo o que um dia fomos, dos pormenores, das entrelinhas e da exata junção de todos aqueles que passaram por nossas vidas. Por tal motivo, tenho comigo grande gratidão aos que antes de tudo me amaram, me ensinaram a sonhar e acreditaram nos meus sonhos. Aos meus queridos pais, Reinaldo e Alessandra de Souza... vocês fizeram de mim quem sou e por isso os agradeço.

À minha irmã Juliana Barbosa, à minha avó Maria Machado Barbosa, aos meus padrinhos Alexandre Franco e Leila de Lourdes e aos meus tios que são para mim grandes referenciais e cruciais motivadores de todo meu esforço... muito obrigada!

Agradeço também ao meu companheiro e melhor amigo Kaíque Jacques, por ser um dos grandes incentivadores do meu sucesso e felicidade e por todo amor e apoio. Como também agradeço às amizades que trouxeram luz e alegria ao longo do meu percurso nessa graduação e, em especial expresso minha gratidão à minha querida amiga Ingrid Ferreira, que não somente foi uma boa amizade, mas também um dos grandes motivos do porquê o decorrer dessa jornada se tornou algo tão especial...

Agradeço e juntamente a isso, expresso minha admiração ao meu estimado professor e orientador Me. Edgar Matias, que muito me ensinou ao longo desses quatro anos e que, manteve sempre acesa a chama do meu amor e entusiasmo pela ciência. Os meus mais sinceros agradecimentos também à professora Dra. Fabiana Gonzalez que além de muito conhecimento científico, transmitiu a mim preciosíssimas virtudes que exercerei não somente na prática profissional, mas como também no exercício do meu viver... Assim também, agradeço a professora Dra. Marízia do Amaral que proporcionou sólidos alicerces para o meu desenvolvimento educacional durante esses anos. Bem como aos demais professores e biomédicos que contribuíram fundamentalmente na construção do meu conhecimento, agradeço!

Também menciono com gratidão os Doutores Marquel Cerqueira, Rui Curi, Francisco Soriano e Raquel Gritte pela incrível oportunidade de adentrar nesse maravilhoso e complexo mundo de ciência. De mesmo modo agradeço aos meus colegas do grupo de pesquisa... obrigada por partilhar comigo os bons momentos de bancada onde nem hora e nem cansaço importavam e as únicas coisas a que nos apegávamos eram risadas e o prazer de fazer ciência.

Agradeço às instituições que transformaram meus sonhos em realidade e me formaram em conhecimento, sabedoria, disciplina e dedicação – Centro Universitário Lusíada e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Reconheço e agradeço também à CNPq pela bolsa de iniciação científica e pelo reconhecimento e valorização deste trabalho.

Não me restrinjo em expressar o quanto sou encantada pelo que eu faço e o quanto eu amo a busca pelo conhecimento e entendimento das coisas... que me façam conhecer por tais características! Hoje, encerro essa fase não somente como biomédica, mas como uma eterna apaixonada pela ciência e pela complexidade da vida... E por isso, sou grata!

EPIGRAFE

O que me tranquiliza é saber que tudo o que existe, existe com absoluta precisão... Pena é que a maior parte do que existe com tamanha exatidão nos é tecnicamente invisível.

Bom é que a verdade chega a nós como um sentido secreto das coisas. E nós, terminamos adivinhando, confusos, a perfeição...

Clarice Lispector

RESUMO

A COVID-19 é uma doença infecciosa primordialmente do trato respiratório, desencadeada pelo vírus SARS-CoV-2, caracterizada por uma hiperinflamação atrelada a uma resposta imune desregulada, tal como ocorre na sepse. Estudos anteriores do grupo evidenciaram que a sepse induz uma reprogramação de monócitos que perdura mesmo após 3 anos após a alta hospitalar. A correlação entre COVID-19 e sepse instiga a hipótese de uma semelhança no estado posterior a tais quadros em relação à caracterização do perfil de monócitos. Objetivando avaliar o padrão transcricional referente aos perfis de polarização de monócitos e verificar uma possível reprogramação celular após a alta hospitalar, a pesquisa foi desenvolvida na região da Baixada Santista - SP, incluindo indivíduos atendidos nos hospitais Santa Casa de Santos e Hospital Municipal Guilherme Álvaro devido a complicações do quadro de COVID-19. O estudo contou com n de 68 indivíduos distribuídos em: (I) 46 pacientes pós-COVID e (II) 22 controles. A partir da amostra sanguínea coletada, os monócitos foram isolados e submetidos a qPCR para a análise dos padrões transcricionais, caracterizando assim os perfis de polarização de tais células – IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IL-12p35; CXCL10, CXCL11, NF- κ B e HMGB1 para o perfil M1 e CCL14, CCL22, PPAR γ , SRB1, TGF- β e CASP12 para o perfil M2. A relevância estatística dos dados foi avaliada usando o teste não paramétrico de Mann Whitney, considerando estatisticamente significante $p < 0.05$. Diferentemente do contexto pós-sepse que apresentava uma polarização de monócitos tendenciada ao perfil M1, o pós-COVID expôs diminuição na maioria dos genes que caracterizam os perfis M1 e M2. No entanto, duas exceções foram pontuadas, IL-1 α e CASP12, as quais apresentaram-se aumentadas em relação ao controle. Tais resultados inferem uma possível imunossupressão causada por uma reprogramação celular no que diz respeito a polarização de monócitos após o quadro de COVID-19.

Palavras-chaves: síndrome pós-covid (SPC); monócitos; M1/ M2; reprogramação celular. .

ABSTRACT

COVID-19 is an infectious disease primarily of the respiratory tract, triggered by the SARS-CoV-2 virus, characterized by hyperinflammation linked to a deregulated immune response, as occurs in sepsis. Previous studies by the group have shown that sepsis induces a reprogramming of monocytes that lasts even 3 years after discharge from hospital. The correlation between COVID-19 and sepsis raises the hypothesis of a similarity in the post-hospitalization state in relation to the characterization of the monocyte profile. With the aim of evaluating the transcriptional pattern of monocyte polarization profiles and verifying possible cellular reprogramming after hospital discharge, the study was carried out in the Baixada Santista region - SP, including individuals treated at the Santa Casa de Santos and Guilherme Álvaro Municipal hospitals due to complications from COVID-19. The study included 68 individuals distributed into: (I) 46 post-COVID patients and (II) 22 controls. From the blood sample collected, monocytes were isolated and subjected to qPCR for the analysis of transcriptional patterns, thus characterizing the polarization profiles of such cells - IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IL-12p35; CXCL10, CXCL11, NF- κ B and HMGB1 for the M1 profile and CCL14, CCL22, PPAR γ , SRB1, TGF- β and CASP12 for the M2 profile. The statistical relevance of the data was assessed using the Mann-Whitney non-parametric test, considering $p < 0.05$ to be statistically significant. Unlike the post-sepsis context, which showed a polarization of monocytes biased towards the M1 profile, the post-COVID context showed a decrease in most of the genes that characterize the M1 and M2 profiles. However, two exceptions were noted, IL-1 α and CASP12, which were increased compared to the control. These results infer a possible immunosuppression caused by cellular reprogramming in terms of monocyte polarization after COVID-19.

Keywords: post-covid syndrome; monocytes; M1/ M2; cell reprogramming.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do SARS-CoV-2.....	15
Figura 2. Mecanismo de infecção e replicação do SARS-CoV-2.	19
Figura 3. Mecanismo da hiperinflamação causada pela infecção da COVID-19.....	21
Figura 4. Manifestações extrapulmonares da infecção por SARS-CoV-2.	22
Figura 5. Comparativo entre os fenótipos funcionais M1 e M2 de monócitos..	27
Figura 6. Fluxograma metodológico.	31
Figura 7. Esquematização do n amostral (n= 68).	33
Figura 8. Expressão de mRNA de IL-1 α	38
Figura 9. Expressão de mRNA de IL-1 β e il-10.....	38
Figura 10. Expressão de mRNA de IL-12p35..	39
Figura 11. Expressão de mRNA de CXCL10 e CXCL11.	39
Figura 12. Expressão de mRNA de NF- κ B e HMGB1.	40
Figura 13. Expressão de mRNA dos genes do perfil M1..	41
Figura 14. Expressão de mRNA de TGF- β e SR-B1.....	42
Figura 15. Expressão de mRNA de PPAR- γ	42
Figura 16. Expressão de mRNA de CASP12.	43
Figura 17. Expressão de mRNA de CCL14 e CCL22.....	43
Figura 18. Expressão de mRNA dos genes do perfil M2.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características do perfil pró-inflamatório – M1.	25
Tabela 2. Características do perfil anti-inflamatório – M2.	26
Tabela 3. Características dos pacientes do grupo pós-COVID (n: 46), Santos, 2022-2023.....	33
Tabela 4. Genes alvos e seus respectivos primers.	36
Tabela 5. Genes constitutivos e seus respectivos primers.	37

ABREVIATURAS E SIGLAS

ADPr	ADP-Ribose
ADRP	ADP-Ribose Fosfatase
CASP	Caspase
CBA	<i>Citometric Beads Array</i>
CCL	<i>Chemokine (C–C Motif) Ligand.</i>
CD	<i>Cluster Differentiation</i>
CEP	Comitê De Ética Em Pesquisa
CMP	Progenitor Mielóide Comum
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
CT	<i>Threshold Cycle</i>
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand.</i>
DAMPs	Padrões Moleculares Relacionados Ao Dano
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ECA-2	Enzima Conversora Da Angiotensina 2
ECMO	Oxigenação Por Membrana Extracorpórea
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ERGIC	Compartimento Intermediário Retículo Endoplasmático-Golgi
FMO	Falência Múltipla De Órgãos
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
G-CSF	Fator Estimulador De Colônias De Granulócitos
GM-CSF	Fator Estimulador De Colônias De Granulócitos e Macrófagos
HIV	Vírus Da Imunodeficiência Humana
HMGB1	<i>High Mobility Group Box 1</i>
HPRT1	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>
HR	<i>Heptapeptide Repeat</i>
IC	Imunocomplexos
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL-1R	Receptor De Interleucina-1
LPS	Lipopolissacarídeo Bacteriano
Max	Máximo
MERS-CoV	Coronavírus Da Síndrome Respiratória Do Médio Oriente
MHCII	Complexo De Histocompatibilidade Classe II
Min	Mínimo
miRNAs	MicroRNAs
MØ	Monócitos <i>Naive</i>
NF-κB	Fator De Nuclear <i>Kappa B</i>
Nsps	Proteínas Não Estruturais
OMS	Organização Mundial Da Saúde

ORFs	Fases Abertas De Leitura
PAMPs	Padrão Molecular Associado Ao Patógeno
PBS	Tampão Fosfato Salino
PGK1	<i>Phosphoglycerate Kinase 1</i>
PPAR-γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gama</i>
Pró-IL	Pró-Interleucina
PRRs	Receptores De Reconhecimento De Padrões
qPCR	Reação Em Cadeia Da Polimerase Quantitativa
RBD	<i>Receptor Binding Domain</i>
RBM	<i>Receptor Binding Motif</i>
RdRP	RNA Polimerase dependente de RNA
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTC	Complexo Replicação-Transcrição
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV	Coronavírus Da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV-2	Coronavírus Da Síndrome Respiratória Aguda Grave-2
SD	Desvio Padrão
SMF	Sistema De Fagocitose Mononuclear
SP	São Paulo
SPC	Síndrome Pós-Covid
SR-B1	<i>Scavenger Receptor Class B Type 1</i>
STAT	<i>Signal Transducer And Activator Of Transcription</i>
STx5A	<i>Syntaxin 5.</i>
TCLE	Termo De Consentimento Livre E Esclarecido
TGF	Fator De Crescimento Transformador
TLR	Receptores <i>Toll-Like</i>
TMPRSS2	<i>Host Type Ii Transmembrane Serine Protease 2</i>
TNF	Fator De Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. SARS-CoV-2 E A COVID-19	14
1.2. MONÓCITOS E SEUS PERFIS FUNCIONAIS	22
1.3. DO AGUDO AO CRÔNICO: DESENVOLVIMENTO DA SÍNDROME PÓS-COVID	28
2. OBJETIVOS	30
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3. METODOLOGIA	31
3.1. SELEÇÃO DOS PACIENTES	32
3.2. SELEÇÃO DO GRUPO CONTROLE	32
3.3. PRONTUÁRIOS MÉDICOS	33
3.4. SEPARAÇÃO DE MONÓCITOS	34
3.5. EXTRAÇÃO DE RNA	34
3.6 SÍNTESE DE cDNA DOS MONÓCITOS	35
3.7. qPCR	35
3.8. GENE CONSTITUTIVO	37
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4. RESULTADOS	38
4.1. EXPRESSÃO DE MRNA DO PERFIL PRÓ-INFLAMATÓRIO (M1)	38
4.1.1. PANORAMA GERAL DO PERFIL PRÓ-INFLAMATÓRIO (M1)	41
4.2. EXPRESSÃO DE MRNA DO PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO (M2)	42
4.2.1. PANORAMA GERAL DO PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO (M2)	44
5. DISCUSSÃO	45
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
7. REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. SARS-CoV-2 E A 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 *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. 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; ZHU *et al.*, 2020).

No Brasil foram registrados, até abril de 2023, 1.157.748 óbitos dentre 46,7 milhões de casos de COVID-19 (PAULO, 2023). 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 coronavíroses 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), respectivamente (HU *et al.*, 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 *et al.*, 2021). No final de novembro de 2019 foram contabilizados 2.294 casos, dentre os quais 858 repercutiram em óbito (SOUZA *et al.*, 2021).

Com o aumento de quadros de infecções similares à síndrome respiratória causada pelos Coronavírus anteriormente descritos e, com particularidades preocupantes quando 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 *et al.*, 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 *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, é classificado como um vírus pertencente a sistemática de ordem *Nidoviridales*, sendo essa enquadrada na família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae*, gênero *Betacoronavirinae* e subgênero *Sarbecovirus* (RAVI *et al.*, 2022). 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 coronaviroses (RAVI *et al.*, 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 *et al.*, 2021; RAVI *et al.*, 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 (KADAM *et al.*, 2021; RAVI *et al.*, 2022). 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 *et al.*, 2022).

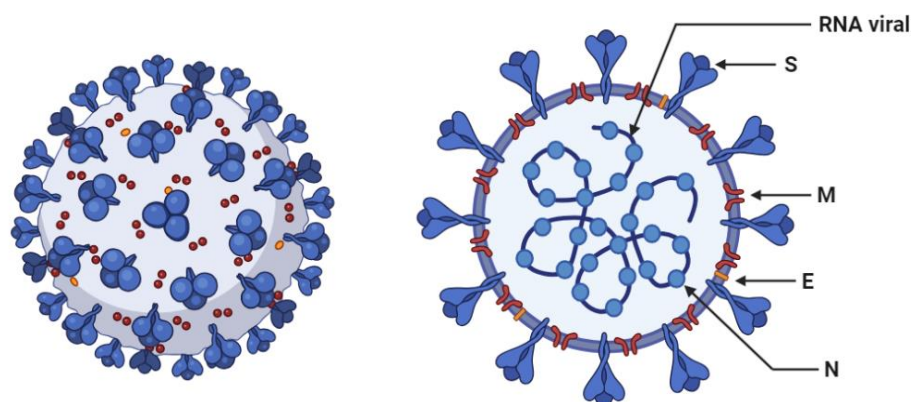


Figura 1. Estrutura do SARS-CoV-2. O RNA viral é complexado com a proteína N para formar um envelope helicoidal dentro da membrana viral; S - proteína Spike; M - proteína M; E - proteína de envelope; N - proteína de nucleocapsídeo. Adaptado de (WEISS *et al.*, 2011).

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 (TLR2) (BARNETT *et al.*, 2023) e na oligomerização de moléculas de viroporinas, as quais exercem a função de condução de íons para a liberação viral da célula (KADAM *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2022; MANDALA *et al.*, 2020; ZHANG *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 *et al.*, 2021; LI *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 *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 *et al.*, 2022; RAVI *et al.*, 2022).

Para além de tais proteínas estruturais mencionadas, os mecanismos patogênicos virais contam com a ação de proteínas não estruturais, categorizadas como nsps (proteínas não estruturais). Dentre as 16 nsps de funcionalidade viral, destacam-se as de correlação fisiopatológica nsp1, nsp2 e nsp3 (LI *et al.*, 2022; RAVI *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2021).

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 uma disfunção na morfologia mitocondrial e na proliferação celular (KADAM *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- κ B) (LI *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 *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 tosem ou espirram (BARNETT *et al.*, 2023; LI *et al.*, 2022; MANDALA *et al.*, 2020; TAY *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 *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 *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 *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 *et al.*, 2022; ZHANG *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 protease 2*), cliva e apara a porção S2 expondo assim o peptídeo de fusão e inserindo-o na membrana da célula hospedeira. Em sequência, a estrutura HR (*Heptapeptide Repeat*) 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 *et al.*, 2022; ZHANG *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 *et al.*, 2021; KARKI *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022; MALONE *et al.*, 2022; V'KOVSKI *et al.*, 2021; YAN *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**) (KADAM *et al.*, 2021; KARKI *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022; MALONE *et al.*, 2022; V'KOVSKI *et al.*, 2021; YAN *et al.*, 2022).

O RTC se responsabiliza pela transcrição de mRNA 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 1**) (KADAM *et al.*, 2021; KARKI *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022; MALONE *et al.*, 2022; V'KOVSKI *et al.*, 2021; YAN *et al.*, 2022).

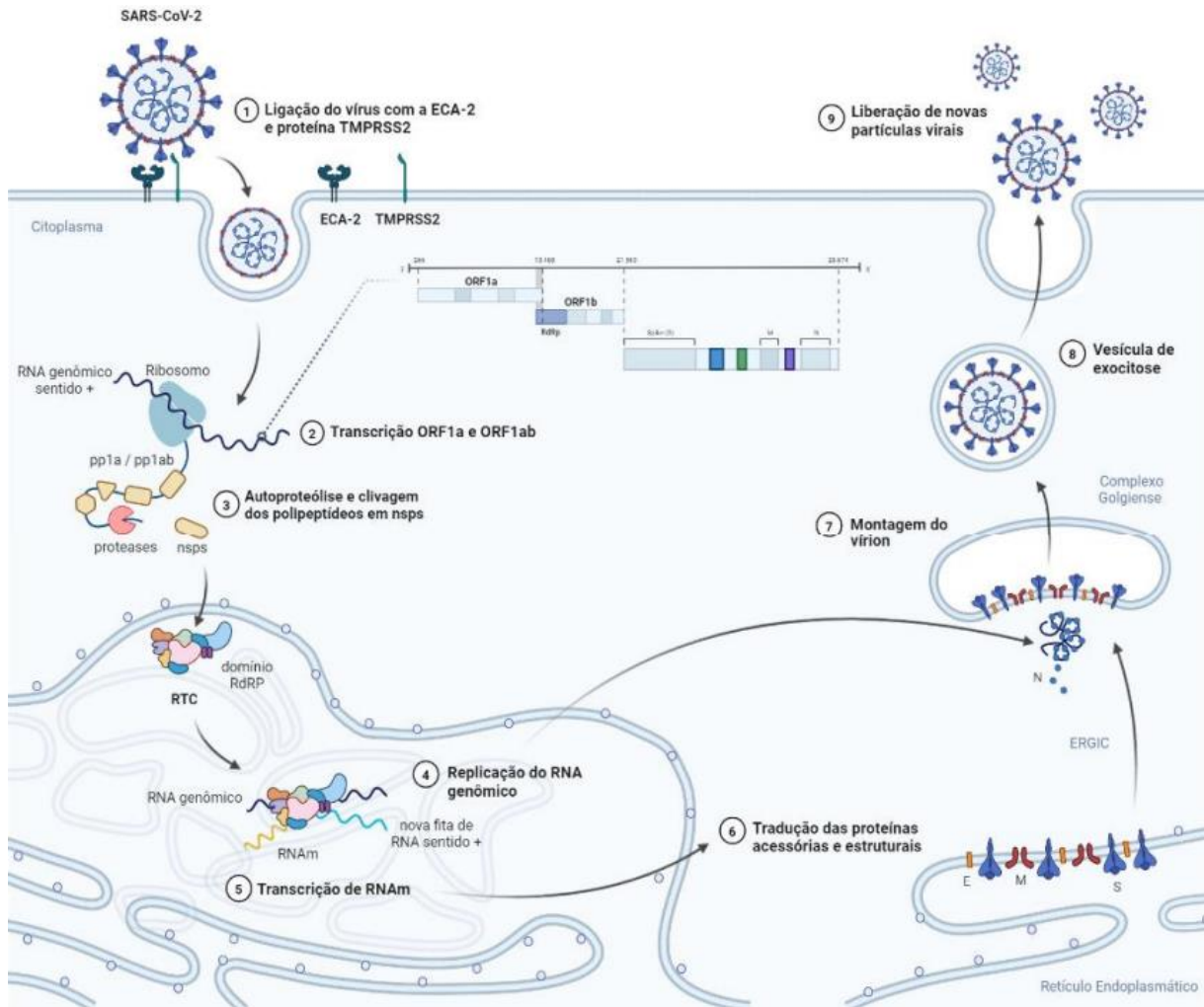


Figura 2. Mecanismo de infecção e replicação do SARS-Cov-2. 1 - Proteína S (Spike) do SARS-Cov-2 interage com receptor ECA-2 da célula hospedeira, ocorrendo ação da protease TMPRSS2 para que ocorra a fusão, endocitose e desnudamento do vírus; 2 - As fases abertas de leitura ORF1a e ORF1b do RNA viral 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 - mRNA 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 et al., 2022; TUCKER et al., 2022).

A presença de partículas virais caracteriza-se ao sistema imunológico como moléculas PAMPs (Padrão Molecular Associado ao Patógeno), as mesmas, 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 *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 *et al.*, 2021; SALEPCI *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 (**Figura 3**), está diretamente correlacionada com a severidade e o mal prognóstico do quadro clínico, tanto à efeitos locais quanto sistêmicos (TAY *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 *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- 1β , IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , CXCL10, CCL2, CCL3 e CCL4. Assim também, observa-se uma infiltração de caráter mononuclear no espaço intersticial por meio da liberação de determinados sinais quimiotáticos, (**Figura 3 - C**) (GUSTINE *et al.*, 2021).

Para além disso, eventuais sintomas pulmonares associam-se ao característico dano estrutural acarretado pela lise dos pneumócitos infectados, a qual promove um exsudato proteico e a conseqüente formação de edema alveolar (**Figura 3 - D**) e processos fibróticos (**Figura 3 - E**). Elevados índices sistêmicos de tais citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no foco infeccioso são usualmente denominados como tempestade de citocinas (**Figura 3 - F**) (ATTIQ *et al.*, 2021).

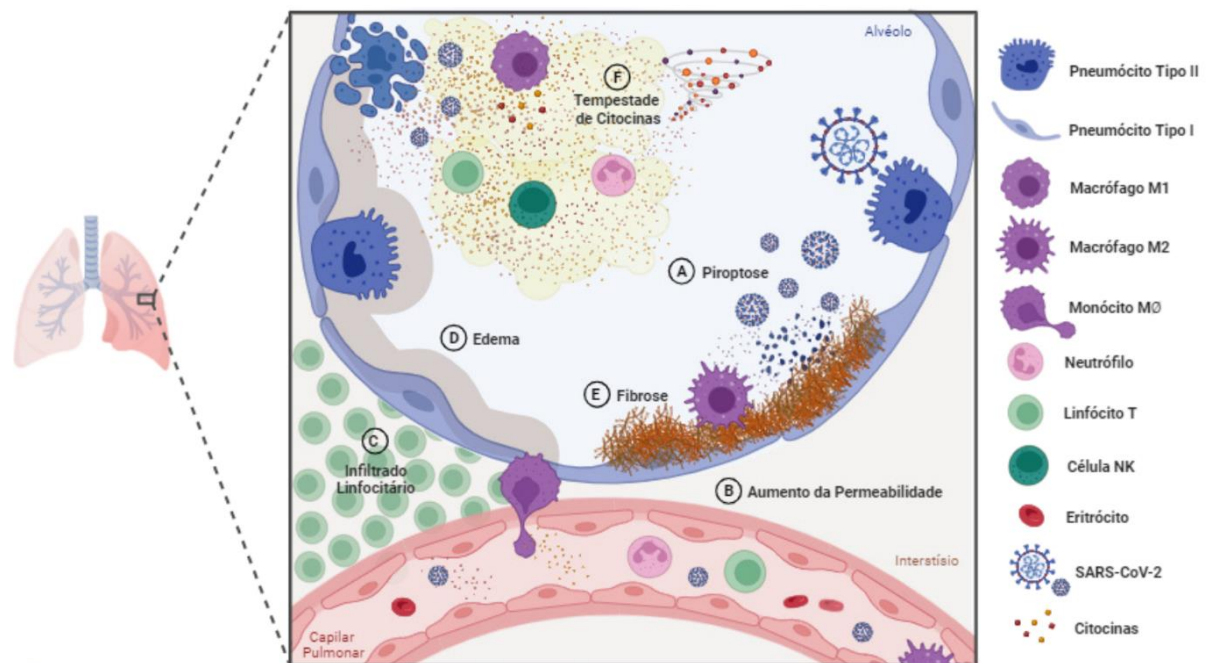


Figura 3. Mecanismo da hiperinflamação causada pela infecção da COVID-19. A. Piroptose da célula hospedeira devido a exocitose de novas partículas virais; B. Aumento da permeabilidade vascular do capilar pulmonar, favorecendo o edema e a quimiotaxia dos leucócitos; C. Infiltrado Linfocitário no interstício;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

Tal quadro imunomolecular atua de modo a recrutar leucócitos para o sítio da inflamação em um mecanismo de *feedback* positivo, destacando-se monócitos, que polarizam-se em subtipos clássicos - macrófagos M1 - e/ou subtipos alternativos de caráter pro fibrótico - macrófago M2 (GUSTINE *et al.*, 2021; PROMPETCHARA *et al.*, 2020; SAGHAZADEH *et al.*, 2020; YUKI *et al.*, 2020). Um aspecto complementar ao quadro é causado por linfócitos de função citotóxica, subtipos CD4+ e CD8+, os quais liberam IL-6 e IL-8 de forma significativa, sendo essas, responsáveis pelo aumento da proliferação celular e intensificação do recrutamento de novas células leucocitárias ao foco infeccioso, respectivamente (YUKI *et al.*, 2020).

Tais 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 *et al.*, 2008; GUSTINE *et al.*, 2021; PROMPETCHARA *et al.*, 2020).

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) (HU *et al.*, 2021).

À vista das divergências levantadas 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 *et al.*, 2020), assim como hemato linfóide, vascular e de cunho nervoso central (BRYCE *et al.*, 2021) de infectados indicaram efeito direto da COVID-19 sobre tais sistemas (BRYCE *et al.*, 2021; MONTEIL *et al.*, 2020). A **Figura 4** explicita a sintomatologia extrapulmonar da infecção por SARS-CoV-2 representando os principais órgãos afetados (ATTIQ *et al.*, 2021; GUPTA *et al.*, 2020).

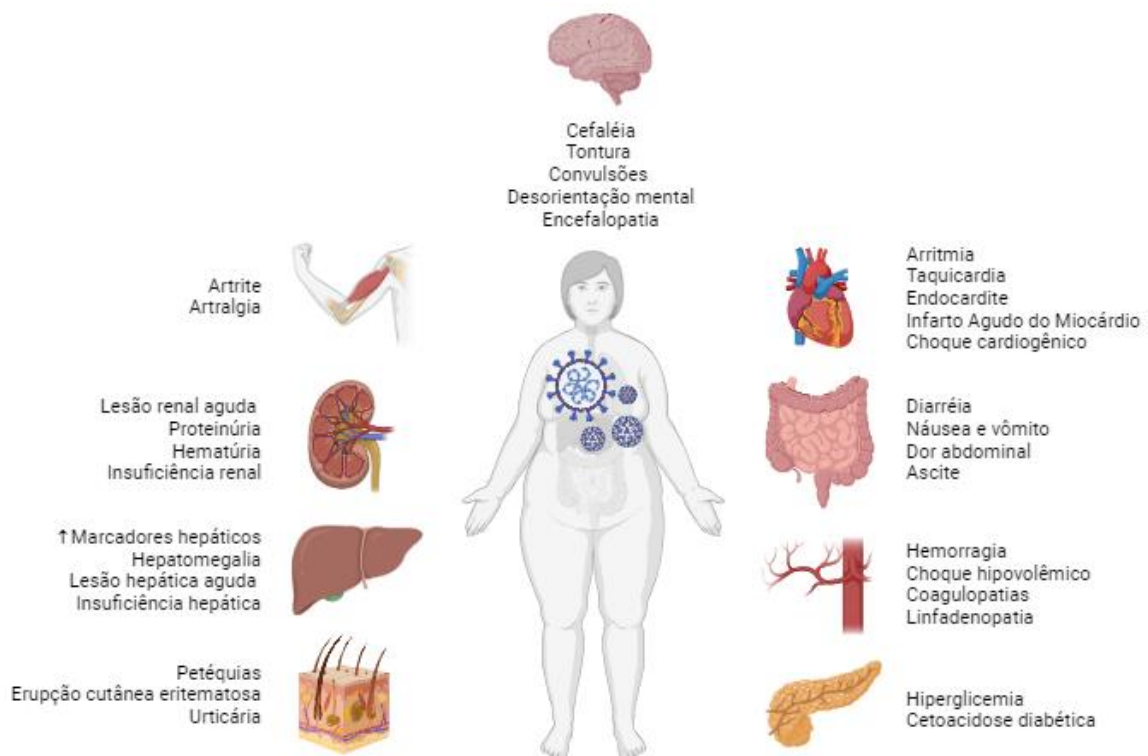


Figura 4. Manifestações Extrapulmonares da infecção por SARS-CoV-2. Sintomatologia da COVID-19 nos principais sistemas extrapulmonares como sistema nervoso, muscular, cardíaco, renal, gastrointestinal, hepático, vascular, tegumentar e pancreático. Adaptado de: (ATTIQ *et al.*, 2021; GUPTA *et al.*, 2020).

1.2. MONÓCITOS E SEUS PERFIS FUNCIONAIS

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 *et al.*, 2021). Acendem-se da linhagem mielóide por um progenitor em comum (CMP) em conjunto com eritrócitos, plaquetas e leucócitos granulares (GUILLIAMS *et al.*, 2018).

Definidos como células sanguíneas circulantes, os monócitos constituem aproximadamente 10% dos leucócitos periféricos (GUILLIAMS *et al.*, 2018). Tais células, quando parte da

circulação sanguínea, categorizam-se como monócitos *naive* (MØ), os quais apresentam uma meia-vida curta de aproximadamente 9 horas (ZAGO *et al.*, 2013). Podem ainda ser distinguidos em três diferentes ordens, sendo essas pautadas na expressão dos marcadores de membrana CD14 e CD16. A fenotipagem do tipo clássica é caracterizada pela expressão CD14⁺ CD16⁻/CD14^{high} CD16⁻, os quais ditam a prevalência dos monócitos humanos (85-90%). As demais quantificações (10-15%) dividem-se nas subclassificações: CD14⁺ CD16⁺ /CD14^{high} CD16⁺ – fenótipo intermediário; CD14^{dim} CD16⁺/CD14⁺ CD16⁺⁺ – fenótipo não clássico (ALEXANDER *et al.*, 2019; KNOLL *et al.*, 2021).

Sabe-se que 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 *et al.*, 2019; GUERMONPREZ *et al.*, 2019; JUHAS *et al.*, 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 *et al.*, 2014), e em macrófagos (ESPINOZA *et al.*, 2023).

Em cada tecido, para além dos macrófagos derivados de monócitos circulantes, encontram-se macrófagos residentes, que desenvolvem-se durante a fase embrionária derivando-se do saco vitelino e do fígado fetal, antes do estabelecimento da hematopoese definitiva. Os macrófagos originados a partir do embrião perduram o potencial de auto renovação, ou conforme necessário, são repopulados pelos monócitos clássicos, os quais possuem uma reprogramação da expressão gênica que lhes permite migrar para os tecidos mesmo quando em homeostasia (GUILLIAMS *et al.*, 2018).

De acordo com o sistema em que se localizam, desempenham funções específicas conforme as diferentes demandas teciduais e sendo assim, dispõem-se de nomenclaturas distintas. Tendo como exemplo células da micróglia no tecido nervoso, células de Kupffer à nível hepático, osteoclastos em tecidos ósseos, células de Langerhans na derme e macrófagos alveolares no parênquima pulmonar (GUERMONPREZ *et al.*, 2019; ZAGO *et al.*, 2013). Seu percentual de sobrevivência como células já diferenciadas extravascularmente pode variar em meses ou anos (ZAGO *et al.*, 2013).

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 fenotipo 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 recetor fagocítico CD11b (KNOLL *et al.*, 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 *et al.*, 2021; JUHAS *et al.*, 2015; KNOLL *et al.*, 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 *et al.*, 2014; JUHAS *et al.*, 2015; LAWRENCE *et al.*, 2011; WEBER *et al.*, 2020).

O perfil M1 surge em resposta à diferentes vias de estímulo, dentre as quais, destacam-se as induções por mediadores químicos pró-inflamatórios como interferons (IFN) e fator de necrose tumoral (TNF); PAMPs como moléculas de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e a proteína Spike (S) e; DAMPs como HMGB1 (*High Mobility Group box 1*), ATP e proteínas de choque térmico (HSP). A polarização clássica de monócitos expressa um amplo espectro de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias – TNF, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-23, IL-27 e CXCL9, CXCL10, CXCL11, respectivamente – como relacionado na **Tabela 1** (ALEXANDER *et al.*, 2019; GHARAVI *et al.*, 2022; GORDON, 2003; LAWRENCE *et al.*, 2011; MANTOVANI *et al.*, 2004; MARTINEZ *et al.*, 2014; PORTA *et al.*, 2015; VIOLA *et al.*, 2019).

Polarização	Estímulos	Mediadores Inflamatórios
M1	IFN; TNF; PAMPs (ex. LPS, proteína S) e DAMPs (ex. HMGB-1, ATP e HSP)	TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IL-23, IL-27, CXCL9, CXCL10 e CXCL11

Tabela 1. Características do Perfil Pró-Inflamatório – M1. Fenótipo M1, seus estímulos e os consequentes mediadores inflamatórios secretados. IFN - Interferons; TNF - Fator de Necrose Tumoral; PAMPs - Moléculas padrões associadas à patógenos; LPS - Lipopolissacarídeo; DAMPs - Moléculas padrões associadas à dano endógeno; HMGB1- High mobility group box 1; ATP - Adenosina trifosfato; HSP - Proteína de choque térmico; IL - Interleucina; CXCL - Chemokine (C-X-C motif) ligand.

Em decorrência a cada estímulo, diferentes cascatas de sinalização intracelular serão sucedidas, dispondo-se de adaptadores específicos para a ativação de diferentes fatores de transcrição do genoma celular, como a sinalização de IFNs e TLRs; ativação de NF- κ B e STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-1*); e, um programa transcricional de mediadores pró-inflamatório (PORTA *et al.*, 2015).

Além da produção significativa de intermediadores inflamatórios, a polarização pela via clássica é tipificada pelo aumento da sua atividade de apresentação de antígeno por meio da indução da expressão do gene CIITA, codificante de moléculas MHC de classe II (MHCII) (GORDON, 2003; LAWRENCE *et al.*, 2011). Ademais, atua assiduamente no controle de patógenos, na supressão tumoral e na resposta Th1 de linfócitos (PORTA *et al.*, 2015; VIOLA *et al.*, 2019).

Em contraponto à incitação do processo inflamatório e, em vista da manutenção da homeostasia, macrófagos do perfil M2 atuam de modo a conter e reparar os efeitos da inflamação. Tal polarização provém de estímulos pertencentes à via alternativa de ativação macrocitária como moléculas anti-inflamatórias como IL-4, IL-13, IL-10, DAMPS resultantes de apoptose celular, imunocomplexos (IC) e glicocorticóides (ALEXANDER *et al.*, 2019; GHARAVI *et al.*, 2022; GORDON, 2003; LAWRENCE *et al.*, 2011; LOCATI *et al.*, 2013; MANTOVANI *et al.*, 2004; MARTINEZ *et al.*, 2014; PORTA *et al.*, 2015; VIOLA *et al.*, 2019).

O padrão transcricional característico da polarização alternativa M2 consiste na expressão de altos níveis de receptores SR-B1 (*scavenger receptor type B1*) e PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gama*); enzimas imuno regulatórias como CASP12 (Caspase 12); moléculas anti-inflamatórias como TGF, IL-1R tipo II, IL-1Ra; e, as quimiocinas CCL14, CCL17, CCL18 e CCL22 (ALEXANDER *et al.*, 2019; MANTOVANI *et al.*, 2004; PORTA *et*

al., 2015), como representado na **Tabela 2**. Sua atribuição funcional correlaciona-se diretamente com a ativação de fatores transcricionais por intermédio de auxiliares e fatores de transcrição próprios a cada cascata de sinalização intracelular, dentre eles STAT6 e STAT3 (ALEXANDER *et al.*, 2019; GHARAVI *et al.*, 2022; GORDON, 2003; LAWRENCE *et al.*, 2011; LOCATI *et al.*, 2013; MANTOVANI *et al.*, 2004; MARTINEZ *et al.*, 2014; PORTA *et al.*, 2015; VIOLA *et al.*, 2019). Portam-se de uma grande capacidade imuno regulatória, sendo crucial na contenção do perfil M1 e na regeneração de tecidos pós-inflamados (ALEXANDER *et al.*, 2019; LAWRENCE *et al.*, 2011; PORTA *et al.*, 2015).

Polarização	Estímulo	Mediadores Inflamatórios
M2	IL-4, IL-13, IL-10, DAMPs, Imunocomplexos e Glicocorticoides	TGF- β , CCL14, CCL17, CCL18 e CCL22

Tabela 2. Características do Perfil Anti-Inflamatório – M2. Fenótipo M2, seus estímulos e os consequentes mediadores inflamatórios secretados. IL - Interleucinas; DAMPs - Moléculas padrões associadas à dano; TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta; CCL - Chemokine (C-C motif) ligand.

Para além das alterações de expressão gênica correlacionadas com ambos os perfis de macrófagos, as polarizações contam com diferentes padrões metabólicos relacionados com suas atividades funcionais, envolvendo o biometabolismo de ferro, aminoácidos, glicose e lipídios (ABBAS *et al.*, 2019; BISWAS *et al.*, 2012; GALVÁN-PEÑA *et al.*, 2014; PORTA *et al.*, 2015). A **Figura 5**, ilustra de modo comparativo as diferenças que conceituam os fenótipos clássicos e alternativos de monócitos.

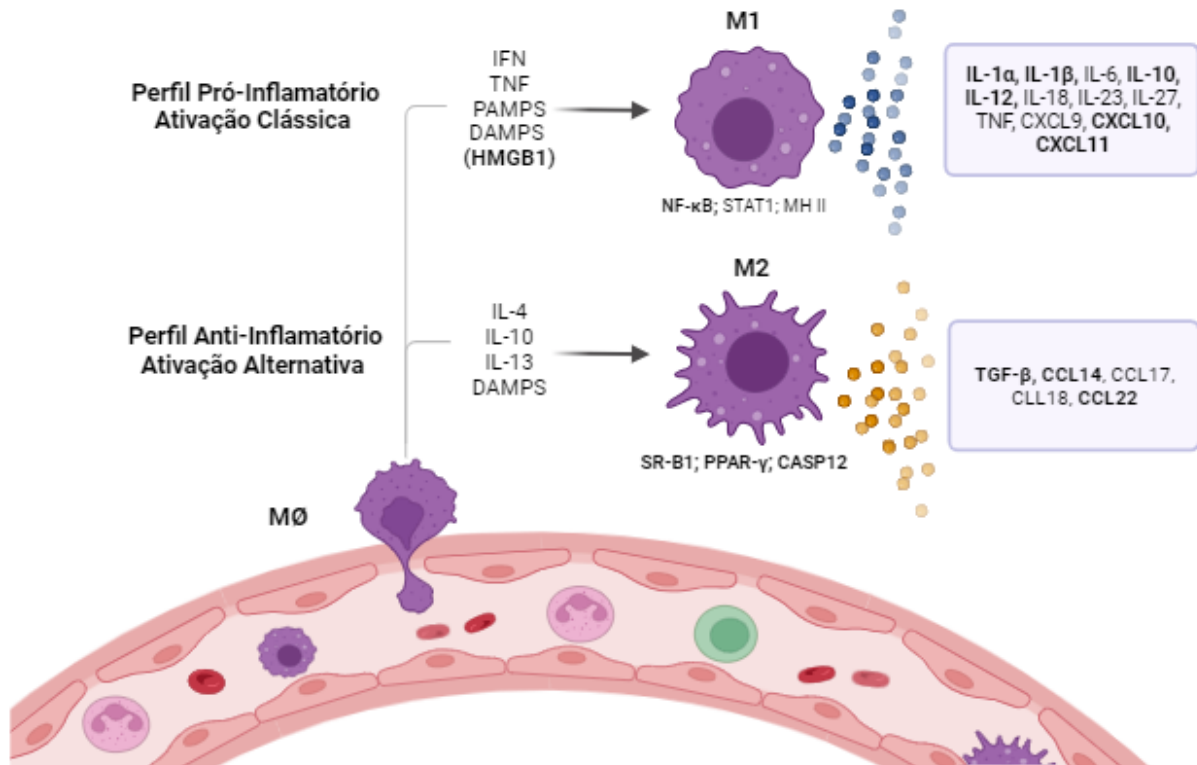


Figura 5. Comparativo entre os Fenótipos Funcionais M1 e M2 de Monócitos. Principais diferenças que conceituam as polarizações Pró-Inflamatória (M1) e Anti-Inflamatória (M2), incluindo estímulos, moléculas características e mediadores inflamatórios liberados. IFN - Interferons; TNF - Fator de Necrose Tumoral; PAMPs - Moléculas padrões associadas à patógenos; DAMPs - Moléculas padrões associadas à dano endógeno; HMGB1 - High mobility group box 1; NF-κB - Fator Nuclear Kappa B; STAT1 - Signal Transducer and Activator of Transcription-1; MHCII - MHC de classe II; IL - Interleucina; CXCL - Chemokine (C-X-C motif) ligand.; SR-B1 - scavenger receptor type B1; PPAR-γ - peroxisome proliferator-activated receptor gama; CASP12 - Caspase 12; TGF-β - Fator de transformação do crescimento beta; CCL - Chemokine (C-C motif) ligand.

Apesar da classificação simplificada em polarizações M1 e M2 e, considerando a acentuada complexidade do microambiente e a proeminente plasticidade de tais células, se faz necessário conjecturar que as ativações ocorrem de forma dinâmica e principalmente de modo tecido-específico. Sucedendo assim um amplo espectro de perfis funcionais, ainda não elucidados por completo, sendo necessário maiores estudos acerca dos demais subpadrões fenotípicos (GHARAVI *et al.*, 2022; VIOLA *et al.*, 2019).

Salienta-se que as vias de estímulo atuantes sob os monócitos recrutados ao foco inflamatório não somente são controladas pelos mecanismos supracitados, mas também por microRNAs (miRNAs), RNAs potenciadores, enzimas epigenéticas (MARTINEZ *et al.*, 2014) e exossomos (GHARAVI *et al.*, 2022). Posto isso, tem-se que o conjunto de marcadores de superfície, sinalizadores de cascata, alterações transcricionais e produtos secretados descrevem o papel dos macrófagos no contexto fisiológico e fisiopatológico (LAWRENCE *et al.*, 2011).

1.3. DO AGUDO AO CRÔNICO: DESENVOLVIMENTO DA SÍNDROME PÓS-COVID

O acompanhamento clínico dos pacientes acometidos pela COVID-19 evidenciou que, uma parcela destes indivíduos, apresentavam disfunções persistentes por ao menos dois meses no período subsequente ao quadro agudo da infecção por SARS-CoV-2. Tal condição foi caracterizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em outubro de 2021 como “COVID-longa” (OMS, 2021). Conceituada então por manifestações sintomáticas constantes e subsequentes ao quadro infeccioso e não podendo estas ser explicadas por diagnóstico alternativo, a COVID-longa tem apresentado intrínseca relação com a qualidade de vida de tais indivíduos (KOHN *et al.*, 2022; SHERIF *et al.*, 2023).

Pautado em estudos epidemiológicos, estima-se que, em parâmetros mundiais, pelo menos 65 milhões de indivíduos são acometidos pela COVID-longa, também referida como Síndrome pós-COVID (SPC) (BALLERING *et al.*, 2022). Em virtude da exponencial prevalência de tal quadro, a SPC é considerada um problema de saúde pública tanto no cenário nacional quanto mundial, visto que dificulta a reintegração dos indivíduos em suas atividades diárias (YONG *et al.*, 2022).

Os sintomas observados não diferem quanto à forma da doença experienciada pelos indivíduos, acometendo desde os pacientes que foram hospitalizados com quadros mais graves de COVID-19 aos acometidos por formas brandas e assintomatólogicas. Diferem-se, portanto, quanto à variáveis de duração, natureza da infecção aguda e características próprias a cada organismo (EL-SABER BATIHA *et al.*, 2022).

Mais comumente reportado como sintoma da COVID-longa, a fadiga é prevalente em 17 a 72% nos pacientes. Outra sintomatologia frequente é a de cunho respiratório, incluindo dores torácicas (22%), dispnéia (10-40%) e intolerância à exercícios físicos (10-40%) (EL-SABER BATIHA *et al.*, 2022). Assim como, é observado déficit cognitivo, queda de cabelo, sintomas gastrointestinais, cefaleias, perturbações de sono, artralguas e dentre outros. Manifestações em diferentes graus de severidade também são evidenciadas no cenário pós-COVID como doenças vasculares; trombóticas; cerebrovasculares; diabetes de tipo II; encefalomielite miálgica, conhecida também como síndrome da fadiga crônica; e, disautonomia (DAVIS *et al.*, 2023; SHERIF *et al.*, 2023).

Inúmeras causas foram elencadas na tentativa de esclarecer e melhor elucidar a COVID-longa. Quanto à patogênese da infecção, sugere-se a formação de reservatórios persistentes de SARS-CoV-2; desregulação imunológica apresentando ou não a reativação de patógenos subjacentes; desregulação de microbiota; autoimunidade e ativação de respostas imunes por mimetismo molecular; coagulação sanguínea microvascular com disfunção endotelial; e, sinalização disfuncional no tronco cerebral e/ou nervos (DAVIS *et al.*, 2023; KOHN *et al.*, 2022).

Outra hipótese para a ocorrência da Síndrome pós-COVID é embasada em um mecanismo de contrabalanço da resposta anti-inflamatória frente à hiperinflamação observada na fisiopatologia da fase aguda da infecção por SARS-CoV-2. Mecanismo este que repercute a um quadro de imunossupressão, visando atingir a homeostase frente aos efeitos nocivos causados pela exacerbação da atividade pró-inflamatória (EL-SABER BATIHA *et al.*, 2022).

Quando comparadas clinicamente, os quadros de Sepsis e COVID-19 assemelham-se em sua fisiopatologia, tendo em vista que ambas as sintomatologias correlacionam-se fisiológica e imunologicamente. A equivalência em tais manifestações enfatiza sintomas como insuficiência respiratória, coagulopatia, alta produção de citocinas e a latente evolução à choque séptico ou FMO (VERAS *et al.*, 2020).

Propõem-se que a similaridade de tais quadros advém de uma resposta imune desregulada e disfuncional, desencadeando uma produção exacerbada de mediadores imunológicos e um conseqüente quadro de tempestade de citocinas (SONG *et al.*, 2020). Devido a esses fatores ou parte deles, muitos pacientes com COVID-19 grave apresentam sintomas que se enquadram no Terceiro Consenso Internacional para Sepsis (SINGER *et al.*, 2016).

Haja vista as inúmeras manifestações clínicas apresentadas por indivíduos que foram acometidos pela COVID-19, torna-se necessário e de suma relevância que tais aspectos sejam estudados e elucidados para que seja mais bem estabelecida e caracterizada a SPC. E, dentre as alterações expressas como decorrência da infecção pelo vírus SARS-CoV-2, a polarização de monócitos expõe-se como um parâmetro importante a ser estudado por conta do estabelecimento de uma disfunção imunológica mesmo após a recuperação da doença, o que coloca em pauta a vida de inúmeros pacientes acometidos pela Síndrome pós-COVID.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo avaliar os perfis de polarização de monócitos – M1 e M2 – em pacientes no período aproximado de 2 anos após serem hospitalizados devido a COVID-19, por meio da expressão dos diferentes mediadores inflamatórios característicos destes dois perfis.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivando contribuir para a caracterização e elucidação da Síndrome Pós-COVID, o presente trabalho visou verificar se há reprogramação celular após a alta hospitalar.

3. METODOLOGIA

A proposta do presente estudo foi submetida e aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição proponente (**Anexo A**) e pelos Hospitais em que foram coletados os prontuários (CAAE 51925221.5.0000.5436, 51925221.5.3001.5448 e 51925221.5.3002.0139) (**Anexos B e C**). No que tange aos pacientes selecionados, à todos foi concedido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) com explicações sobre a pesquisa (**Anexo D**).

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

Figura 6.

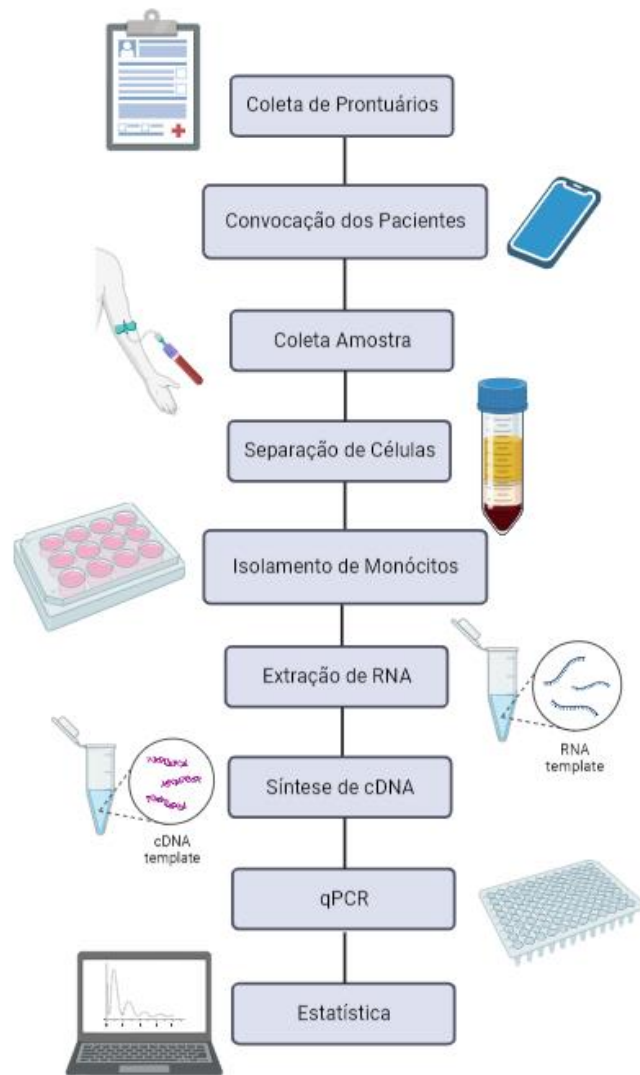


Figura 6. Fluxograma Metodológico. Sequência dos protocolos estabelecidos para a realização do presente trabalho.

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 maioridade 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 de 68 indivíduos, distribuídos em um grupo controle ($n= 22$) e um grupo de análise ($n= 46$), tal como é esquematizado na **Figura 7**. 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

Pautando-se nos mesmos critérios de seleção mencionados, 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).

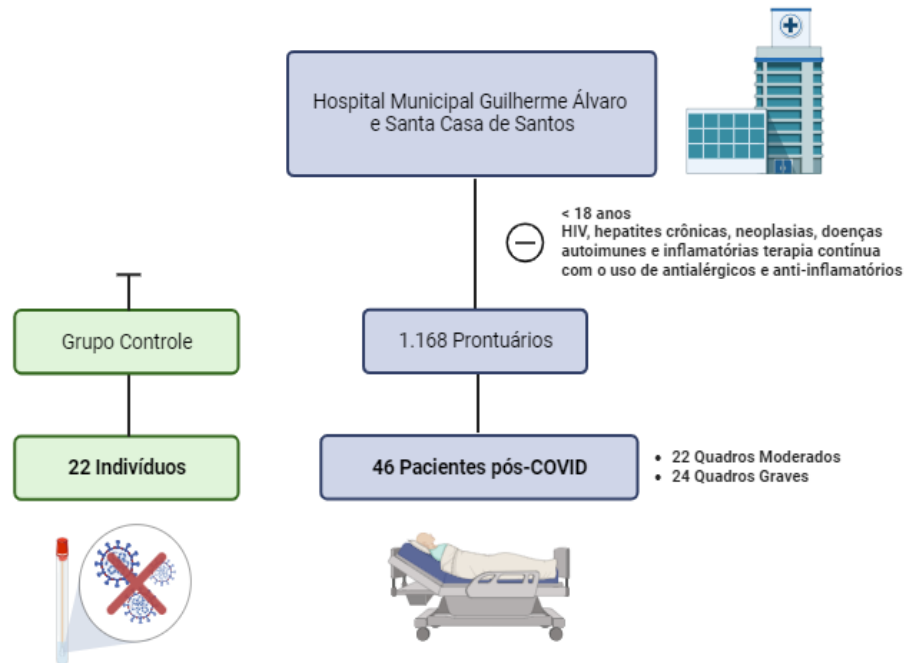


Figura 7. Fluxograma da seleção dos pacientes (n= 68). Ao grupo pós-COVID foram atribuídos 46 pacientes e ao grupo controle, foram selecionados 22 indivíduos. Ambos os grupos foram estabelecidos pautando-se nos critérios de inclusão e exclusão mencionados.

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; desenvolvimento de insuficiência respiratória e necessidade de intubação. Tais informações são apresentadas na tabela abaixo: (**Tabela 3**).

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

Tabela 3. Caracterização dos pacientes do grupo pós-COVID (n: 46), Santos, 2022-2023. SD: Desvio Padrão; min: Valor Mínimo; max: Valor Máximo.

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 *Trizol*® (*Invitrogen*) e o *kit PureLink RNA Mini Kit*® (*Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA*). O RNA total foi extraído 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 eppendorf 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 1 μL 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 como caracterização dos perfis de polarização de monócitos – M1 e M2 – e seus respectivos primers são apresentados na tabela abaixo: (Tabela 4).

Gene	Forward sequence	Reverse Sequence
M1		
IL-1 α	TCGCCAGTGAAATGATGGCT	TGGAAGGAGCACTTCATCTGTT
IL-1 β	CCTGAGCTCGCCAGTGAAAT	TGTCCATGGCCACAACAAC
IL-10	AAGACCCAGACATCAAGGCG	AATCGATGACAGCGCCGTAG
IL-12p35	GATGGCCCTGTGCCCTTAGTA	TCAAGGGAGGATTTTTGTGG
CXCL10	CCACGTGTTGAGATCATTGGC	TTCTTGATGGCCTTCGATTC
CXCL11	CCTGGGGTAAAAGCAGTGAA	TGGGATTTAGGCATCGTTGT
NF-kB	TTGGGAAGGCCTGAACAAATG	AGGTATGGGCCATCTGCTGT
HMGB1	CGGACAAGGCCCGTTATGAA	CCTCTTGGGTGCATTGGGAT
M2		
TGF- β	CCAGCGACTCGCCAGAGTGG	GGCCGGTAGTGAACCCGTTGA
SR-B1	GTGTGGGTGAGATCATGTGG	GTTCCACTTGTCCACGAGGT
PPAR γ	TTCAGAAATGCCTTGCAGTG	CCAACAGCTTCTCCTTCTCG
CASP12	TCCAATGTGAGTGTGCCTGT	GTTTTGGTCCACTCCACCGA
CCL14	CCATTCCCTTCTTCCTCCTC	GACGCGGGATCTTGTAGGTA
CCL22	ATTACGTCCGTTACCGTCTG	TAGGCTCTTCATTGGCTCAG

Tabela 4. Genes alvos e seus respectivos primers. IL - Interleucina; CXCL - Chemokine (C-C motif) ligand; NF-kB - Fator Nuclear Kappa B; HMGB1 - High mobility group box 1; TGF- β - Transforming Growth Factor Beta; SR-B1 - Scavenger Receptor Class B type 1; PPAR- γ - Proliferadores de Peroxissoma tipo Gama; CASP12 - Caspase 12; CCL - Chemokine (C-C motif) ligand

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 StepOne Plus (*Thermo Fisher Scientific*) e os resultados, analisados utilizando o software, StepOne Software v2.3 (*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 et al., 2022 - nº Processo FAPESP 2017/13715-9).

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 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 et al. 2020) (**Tabela 5**).

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

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

Como normalização das análises de expressão de mRNA, utilizamos a média geométrica dos genes propostos – GAPDH, HPRT1, PGK1 e STX5A.

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

4.1. EXPRESSÃO DE MRNA DO PERFIL PRÓ-INFLAMATÓRIO (M1)

O perfil funcional M1 é caracterizado por atuar de maneira corroborativa ao processo inflamatório. O presente trabalho avaliou os níveis de expressão gênica de marcadores do fenótipo pró-inflamatório, incluindo interleucinas, quimiocinas e intermediários de vias cruciais para a formação do cenário de inflamação. A expressão de mRNA dos genes que refletem a polarização M1 apresentou relevância estatística em seis dos oito genes estudados.

A análise de mRNA de IL-1 α evidenciou-se significativamente aumentada quando comparada aos índices de expressão do grupo controle, o qual foi tomado como parâmetro de normalidade ($p < 0,0001$) (**Figura 08**).

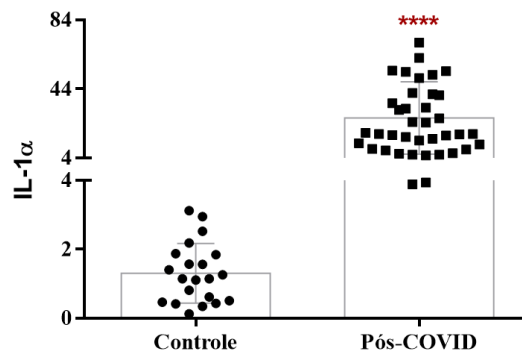


Figura 8. Expressão de mRNA de IL-1 α . (****) $p < 0,0001$ vs Controle.

Em divergência a tais resultados, a expressão de mRNA de IL-1 β não apresentou variâncias estatísticas significantes para a afirmação de divergência entre o grupo pós-COVID e o grupo controle ($p > 0,05$). De modo contrário, os índices transcricionais de IL-10 foram representativos para os testes estatísticos aplicados e demonstram significância de $p < 0,05$ (**Figura 09**).

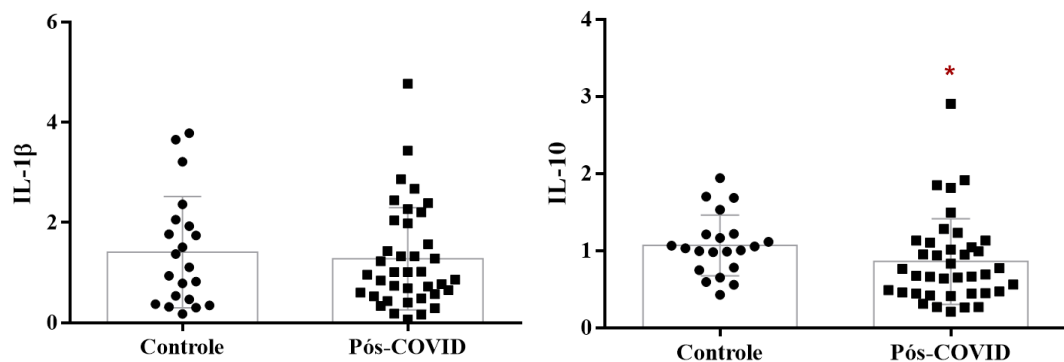


Figura 9. Expressão de mRNA de IL-1 β e IL-10. (*) $p < 0,05$ vs Controle.

Por sua vez, as análises de mRNA de IL-12p35 demonstraram valores divergentes entre o grupo controle e o grupo pós-COVID ($p < 0,001$), sendo essas, expressivamente mais baixas. **(Figura 10).**

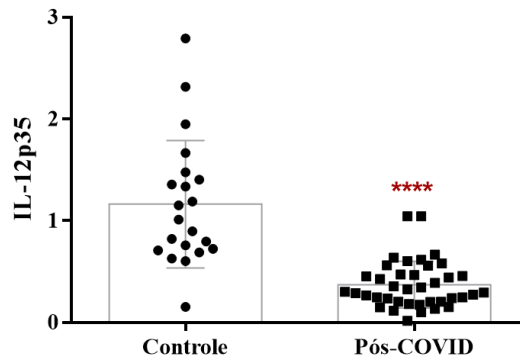


Figura 10. Expressão de mRNA de IL-12p35. (****) $p < 0,0001$ vs Controle.

Referente às quimiocinas estudadas, os resultados obtidos para a análise de expressão de mRNA de CXCL10 não apresentaram diferença estatística entre o grupo controle e o grupo de pacientes em questão ($p > 0,05$). Diferentemente do que foi observado para CXCL11, a qual foi demonstrado níveis diminuídos de expressão de mRNA nos pacientes do grupo pós-COVID ($p < 0,001$) quando em comparação ao grupo controle **(Figura 11).**

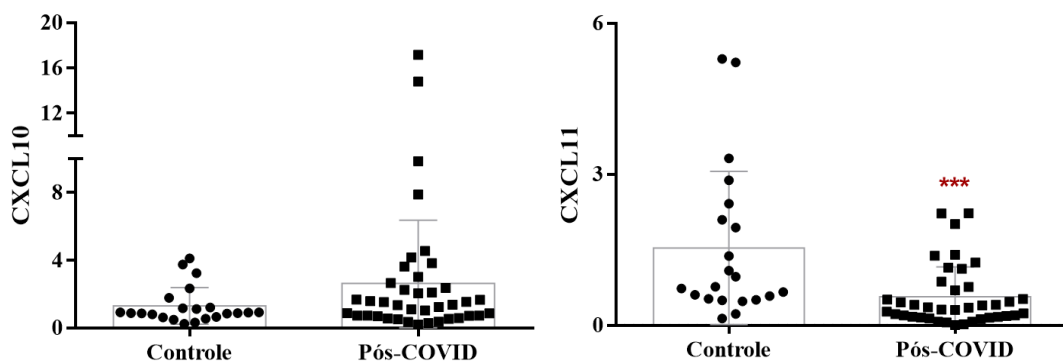


Figura 11. Expressão de mRNA de CXCL10 e CXCL11. (***) $p < 0,001$ vs Controle.

Outros genes avaliados foram àqueles relacionados com vias inflamatórias intracelulares como NF- κ B e HMGB1. A expressão de mRNA de NF- κ B foi significativamente menor no grupo pós-COVID do que os valores apresentados pelo grupo controle ($p < 0,0001$). De igual modo, quanto à HMGB1, os índices de expressão gênica foram diminuídos no comparativo pós-COVID/controle com significância de $p < 0,0001$ **(Figura 12).**

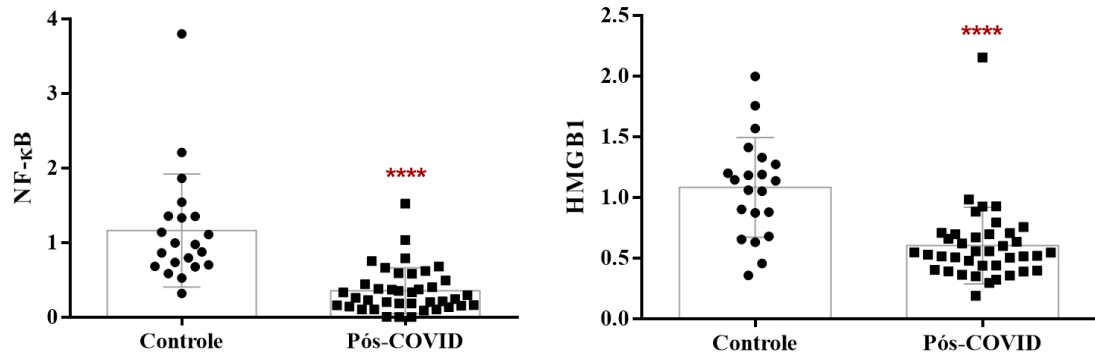


Figura 12. Expressão de mRNA de NF-κB e HMGB1. (****) $p < 0,0001$ vs Controle.

4.1.1. PANORAMA GERAL DO PERFIL PRÓ-INFLAMATÓRIO (M1)

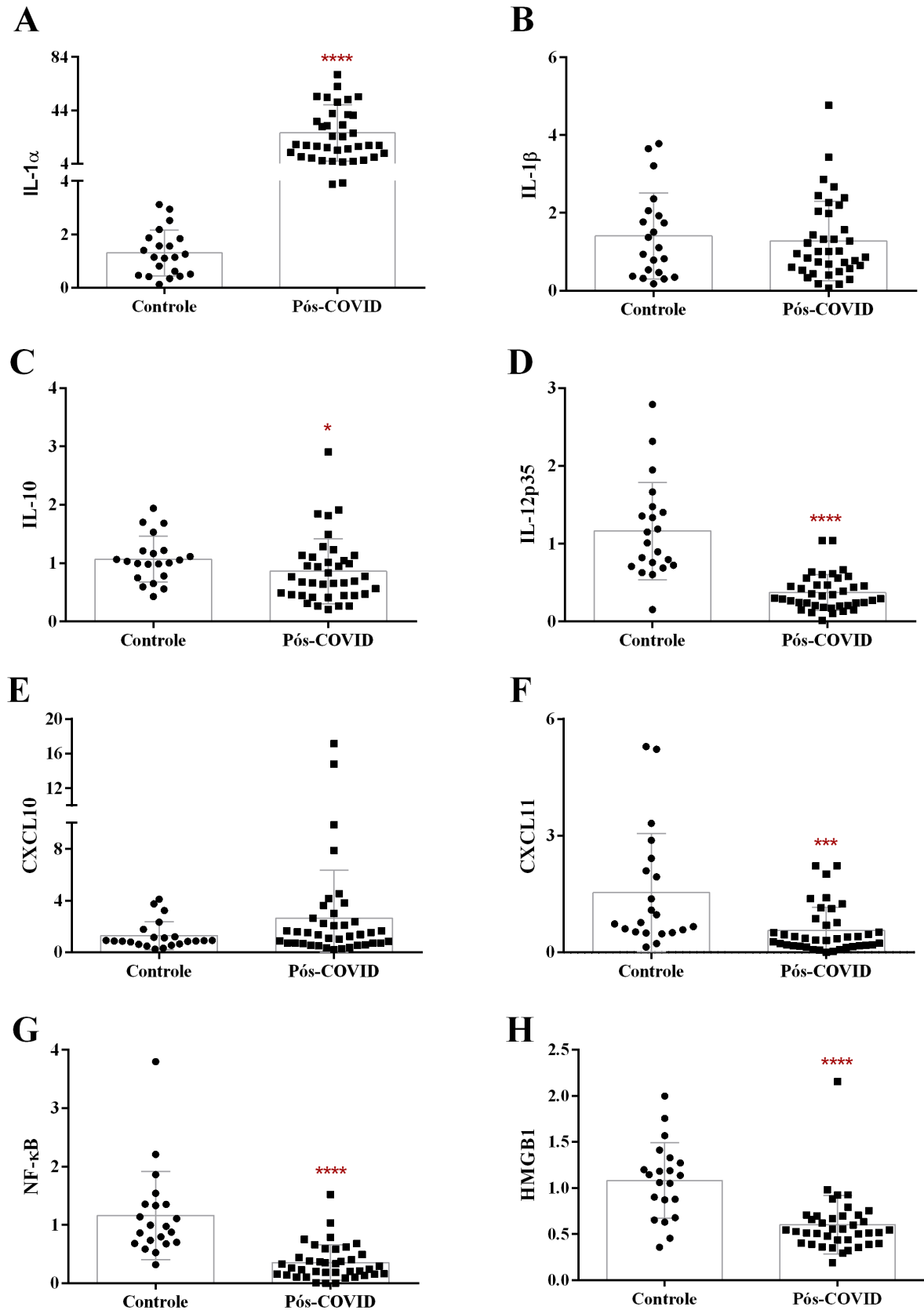


Figura 13. Expressão de mRNA dos genes do perfil M1. A- IL-1 α ; B- IL-1 β ; C- IL-10; D- IL-12p35; E- CXCL10; F- CXCL11; G- NF- κ B. e H- HMGB1. (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$ vs Controle.

4.2. EXPRESSÃO DE MRNA DO PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO (M2)

Atuando de forma a manter a homeostasia, conter o processo inflamatório e reparar os danos teciduais acarretados pela promoção da inflamação, o fenótipo M2 é caracterizado por seu perfil funcional anti-inflamatório. Para analisar a tendência de polarização anti-inflamatória em monócitos foi avaliada a expressão de mRNA de marcadores que refletem tal fenótipo.

A análise dos índices de expressão gênica de TGF- β não apresentaram valores estatisticamente significativos para uma comparação entre os grupos em estudo ($p > 0,05$). Todavia, a expressão de mRNA de SR-B1 evidenciou diferença estatística com valores expressivamente mais baixos do grupo pós-COVID quando em contraste com o grupo controle ($p < 0,001$) (**Figura 14**).

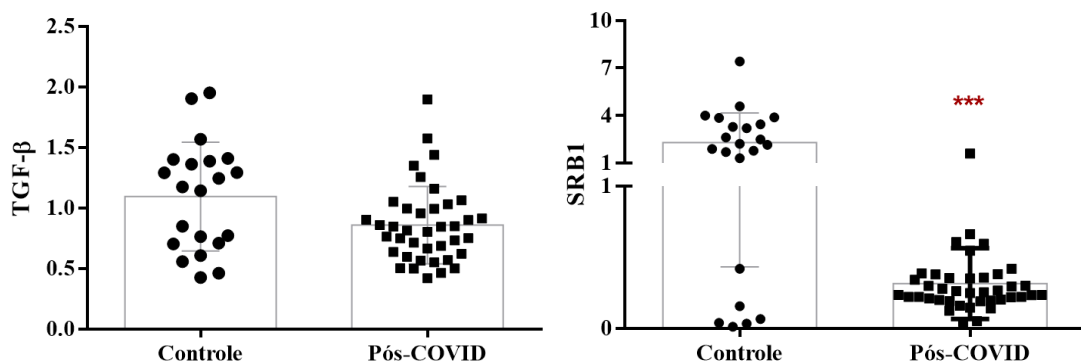


Figura 14. Expressão de mRNA de TGF- β e SR-B1. (***) $p < 0,001$ vs Controle.

Quanto às análises de expressão de mRNA de PPAR- γ , as estatísticas expuseram uma diminuição dos valores do grupo pós-COVID para com o grupo controle ($p < 0,05$) (**Figura 15**).

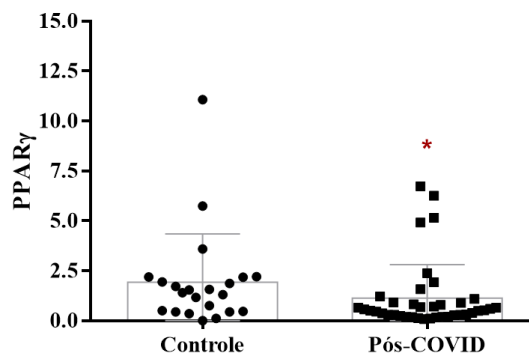


Figura 15. Expressão de mRNA de PPAR- γ . (*) $p < 0,05$ vs Controle.

Diferenciando-se do padrão de diminuição de expressão até então encontrado, a avaliação dos níveis transcricionais de CASP12 apresentou um aumento significativo nos valores obtidos do grupo pós-COVID ($p < 0,001$) quando em comparação com o grupo controle (**Figura 16**).

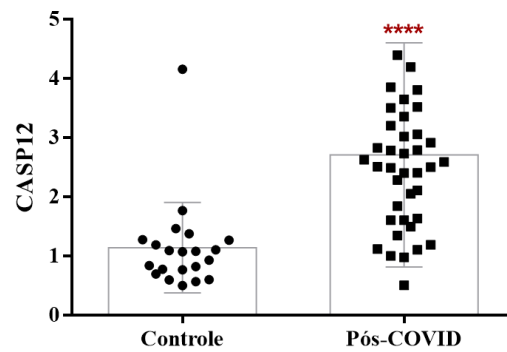


Figura 16. Expressão de mRNA de CASP12. (***) $p < 0,0001$ vs Controle.

Sobre as quimiocinas CCL14 e CCL22 foi evidenciado diferença estatística significativa. As expressões de mRNA de CCL14 dos pacientes pós-COVID apresentaram-se com valores diminuídos em relação ao controle ($p < 0,05$). Do mesmo modo, as análises de mRNA de CCL22 demonstraram diminuição estatisticamente significativa na correlação pós-COVID/controle ($p < 0,01$) (**Figura 17**).

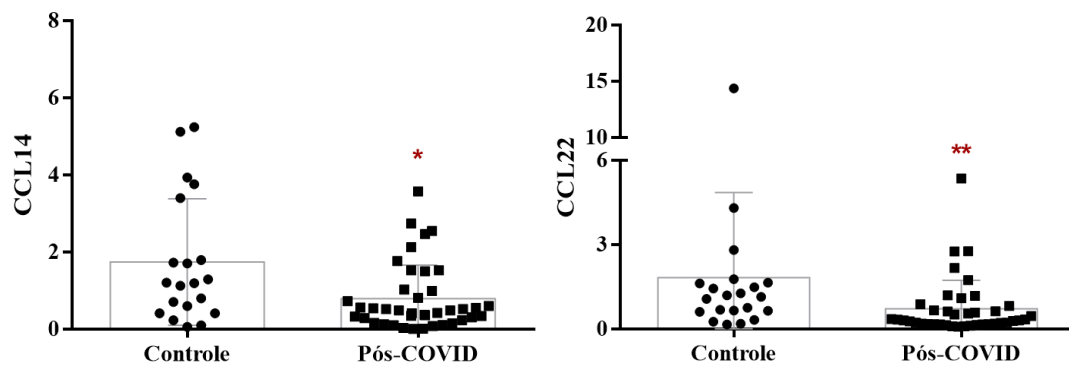


Figura 17. Expressão de mRNA de CCL14 e CCL22. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ vs Controle.

4.2.1. PANORAMA GERAL DO PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO (M2)

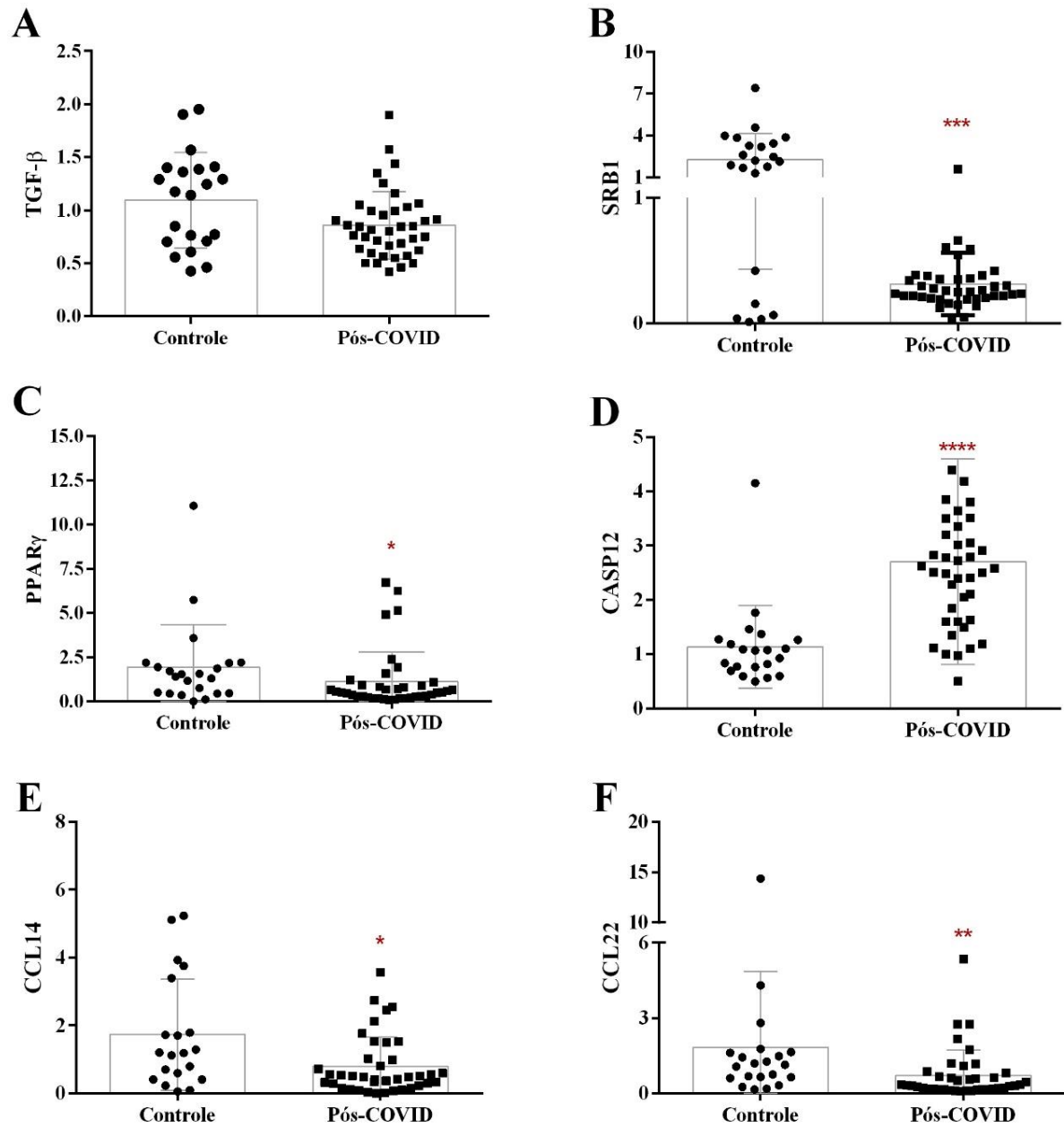


Figura 18. Expressão de mRNA dos genes do perfil M2. A- CCL14; B- CCL22; C- PPAR- γ ; D- SRB1; E- TGF- β ; F- CASP12. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; (****) $p < 0,0001$ vs Controle.

5. DISCUSSÃO

Sabe-se que a caracterização da função monocitária é decorrente da significativa plasticidade fenotípica de tais células, as quais diferenciam-se de acordo com as demandas do microambiente e com a regência de imunomediadores (ALEXANDER *et al.*, 2019; GUERMONPREZ *et al.*, 2019; JUHAS *et al.*, 2015). Entretanto, quando em sua forma não polarizada – monócitos MØ – a expressão de mRNA de marcadores de polarização em tais células é basal (JUHAS *et al.*, 2015).

Quando em fase estacionária, os níveis de expressão de IL-1 α são relativamente baixos, diferentemente de um cenário de exposição à patógenos ou estímulos estressores, nos quais é observado um significativo aumento de sua expressão em necessidade de iniciar uma resposta inflamatória (CHIU *et al.*, 2021). Torres-Ruiz (TORRES-RUIZ *et al.*, 2021) demonstraram que os valores plasmáticos de IL-1 α não apresentam diferenças estatísticas significativas entre os grupos (I) pacientes diagnosticados com Síndrome pós-COVID e (II) indivíduos não acometidos pela Síndrome pós-COVID, ambos os grupos, sendo avaliados após 3 meses da infecção (TORRES-RUIZ *et al.*, 2021).

Estudos realizados por (COLARUSSO *et al.*, 2021) envolvendo pacientes de 1 a 3 meses pós-COVID e os níveis plasmáticos de IL-1 α , também não encontraram diferença estatística quando comparados ao controle. Entretanto, quando avaliado apenas os indivíduos com sequelas pulmonares, foi observado que os valores de IL-1 α foram maiores em pacientes pós-COVID com alterações semelhantes à fibrose do que em indivíduos saudáveis (COLARUSSO *et al.*, 2021). Assemelhando-se a tal achado, as análises de expressão de mRNA de IL-1 α demonstradas pelo presente estudo evidenciaram valores significativamente mais altos quando em contraste ao grupo controle. Ressalta-se que os pacientes avaliados se enquadram no intervalo de 1 a 2 anos após a alta hospitalar devido a COVID-19, o que induz a hipótese de que este aumento transcricional de IL-1 α seja uma das facetas da COVID longa.

Sendo um dos principais mediadores das reações imune inatas, a IL-1 β é estritamente correlacionada com atividade do inflamassoma NLRP3, uma vez que por meio deste, a pró-IL-1 β é clivada e assim maturada para sua atuação (BENT *et al.*, 2018). Khan (KHAN *et al.*, 2021) procedeu seus estudos com a estimulação de células mononucleares sanguíneas com a subunidade S2 presente no SARS-CoV-2. Os resultados de qPCR e ELISA evidenciaram um expressivo aumento de IL-1 β (KHAN *et al.*, 2021). Análises plasmáticas avaliaram as

concentrações iniciais de IL-1 β em pacientes internados devido a COVID-19, as quais apresentaram-se elevadas em comparação com indivíduos saudáveis (HUANG *et al.*, 2020).

No que se refere ao período após a infecção, Jiram Torres-Ruiz, 2021 demonstrou que em indivíduos com síndrome pós-COVID, as concentrações plasmáticas de IL-1 β apresentava-se aumentadas mesmo ao terceiro mês após a infecção (TORRES-RUIZ *et al.*, 2021). Enquanto nossos resultados não apresentaram diferença estatística significativa entre o grupo pós-COVID e o grupo controle, inferindo assim uma normalização dos níveis de expressão gênica de IL-1 β .

Durante o período agudo da infecção por SARS-CoV-2, estudos pautados na metodologia de sequenciamento de RNA mostraram um aumento significativo na expressão de IL-10 e CXCL10 evidenciando uma regulação positiva de tais genes (XIONG *et al.*, 2020). De mesmo modo Bianca Maria Rotoli, 2021 demonstrou que ao incubar células comercializadas de macrófagos humanos com a proteína Spike, a quantificação por *ELISA* das citocinas produzidas, resultou em um significativo aumento de IL-10 e CXCL10 assim como outras citocinas e quimiocinas (ROTOLI *et al.*, 2021).

Análises por CBA (Cytometric Beads Array) em pacientes 3 meses após a COVID-19 apresentou aumento de IL-10 naqueles que não queixavam-se de sequelas e uma diminuição dos níveis de IL-10 nos pacientes com sequelas da infecção, sugerindo assim uma assinatura molecular de resposta anti-inflamatória reduzida (QUEIROZ *et al.*, 2022). Outras análises quanto ao período pós-COVID pelo método Olink proteomic platform evidenciaram uma regulação positiva para a proteína CXCL10 em plasma (ZHAO *et al.*, 2022). Contrastando com os resultados obtidos por este estudo, as análises de IL-10 e CXCL10 não apresentaram variâncias estatisticamente significantes nas comparações entre os pacientes pós-COVID e controle, sugerindo assim uma normalização de tais expressões gênicas.

Da mesma forma, em nossas análises não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ao comparar as análises de expressão de mRNA de IL-12p35 entre o grupo em estudo e o grupo controle. Assim como pontuado por Jiram Torres-Ruiz *et al.* ao estudar as subunidades IL-12p40 e IL-12p70, as quais não foram demonstradas diferenças estatísticas em indivíduos 3 meses de pós-COVID (TORRES-RUIZ *et al.*, 2021).

Atuando na quimiotaxia de leucócitos para o sítio inflamatório, a quimiocina CXCL11 foi vinculada à COVID-19. Apresentando-se com expressões de mRNA significativamente aumentada em pacientes acometidos pela COVID-19 quando em comparação com pacientes

controle (SOHN *et al.*, 2020). No que se refere ao comportamento de tal quimiocina na COVID longa, estudos realizados por *Olink proteomic platform* demonstraram elevados níveis de CXCL11 no plasma de indivíduos do grupo pós-COVID (ZHAO *et al.*, 2022). No presente estudo, entretanto, os valores alcançados apresentam uma diminuição na expressão de mRNA de CXCL11 do grupo pós-COVID em relação ao controle. Tal achado contribui para a caracterização da COVID longa, demonstrando uma possível resposta quimiotática deficitária.

Na determinação de um perfil corroborativo para o processo inflamatório, o fator de transcrição NF- κ B, é de essencial importância pois atua de modo a ativar a transcrição de genes primordiais para a imunidade inata e a resposta inflamatória (WILLIAMS *et al.*, 2020). Salma Kazafy *et al.* avaliaram a expressão gênica das subunidades de NF- κ B – p50 e p65 – pela metodologia de qPCR em pacientes acometidos pela COVID-19, demonstrando que tais subunidades apresentavam-se em maiores expressões no comparativo ao grupo controle (EL KAZAFY *et al.*, 2022). Outro estudo demonstrou que os índices de NF- κ B eram diretamente estimulados em macrófagos pela COVID-19, índices tais que foram intrinsecamente associados à exacerbação do processo inflamatório e ao desenvolvimento de várias complicações (ALKAZMI *et al.*, 2023).

Os resultados aqui apresentados, no entanto, expuseram valores significativamente menores em comparação com a expressão de mRNA de NF- κ B pelo grupo controle, indicando assim uma possível desordem nas vias promotoras de inflamação.

A HMGB1 é uma proteína nuclear multifuncional secretada em resposta a vias de sinalização inflamatórias em casos de lesão tecidual por células imunes no cenário inflamatório induzido por infecções (LU *et al.*, 2013). Na COVID-19, assim como outros marcadores pró-inflamatórios, a HMGB1 apresenta níveis séricos significativamente elevados em quadros graves, uma vez que é ativada pela infecção viral e atua como um violento imunomediador desencadeando hiperinflamação o desenvolvimento de tempestade de citocinas (ALKAZMI *et al.*, 2023; CHEN *et al.*, 2020). Contrapondo-se a tais valores, as expressões de HMGB1 obtidas em nossas análises mostraram-se evidentemente diminuídas no período de 1 a 2 anos após a infecção por SARS-CoV-2.

Segundo ŚLOTWIŃSKI *et al.*, a redução de expressão de genes codificadores de HMGB1, dentre uma série de outros genes importantes no contexto inflamatório, pode ser um indicador de distúrbios da imunidade inata. Pode, no entanto, ser consequente do

comprometimento da maturação celular ou mesmo proveniente da ação imunossupressora de células envolvidas em respostas inflamatórias (SŁOTWIŃSKA *et al.*, 2015). Mediante ao exposto, nota-se expressivas alterações na maioria dos genes que caracterizam o perfil M1, sendo majoritariamente, diminuições na expressão gênica. O mesmo se reflete no tocante ao fenótipo M2.

Condizendo com sua atuação de reparo e regeneração tecidual pós dano, a secreção de TGF- β por macrófagos anti-inflamatórios correlaciona-se diretamente com os quadros de COVID-19 e com as sequelas pulmonares e fibróticas observadas no período subsequente. Estudos realizados por qPCR demonstram que pacientes de 3-6 meses pós-COVID com radiografias pulmonares anormais apresentaram considerável aumento transcricional de TGF- β (ALI *et al.*, 2022). Por outra perspectiva, nossos dados não expressaram índices de variância estatisticamente significativos na comparação pós-COVID/controle, tal qual foi evidenciado por Lavinia Flaskamp, 2022 ao quantificar TGF- β de pacientes em 6 meses no período pós-COVID por metodologia *ELISA* (FLASKAMP *et al.*, 2022).

Caracterizando-se como uma proteína de superfície celular altamente expressa em monócitos, macrófagos e outras células imunes, o SR-B1 desempenha um importante papel como PRR intermediando o processo de fagocitose (ALKAZMI *et al.*, 2023). Guo *et al.* demonstraram que o SR-B1 pode prevenir a morte induzida por septicemia e endotoxina inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias a partir de macrófagos M1 (GUO *et al.*, 2009). No presente estudo, a expressão de mRNA de SR-B1 mostrou-se diminuída na correlação dos grupos pós-COVID e controle, indicando assim uma deficiência de suas contribuições para o equilíbrio do processo inflamatório.

Em 2020, foi elucidado por Suelen Silva Gomes, 2020 por meio de *Western Blot* que a ativação de macrófagos pelo vírus SARS-CoV-2 desencadeia diretamente uma regulação positiva para os fatores de transcrição relacionados à lipogênese – PPAR γ e SREBP-1 – os quais envolvem a síntese de triacilglicerol na infecção viral (DIAS *et al.*, 2020). De modo contrário, o cenário pós-COVID caracterizou-se em nossas análises por uma redução dos níveis de expressão de mRNA de PPAR γ .

Contrapondo-se ao padrão apresentado, em nossos estudos a Caspase-12 apresentou-se demasiadamente expressa no grupo em análise. Como parte do equilíbrio entre os processos pró e anti-inflamatório, a CASP12 atua impedindo a formação do complexo IKK e a

consequente ativação de NF- κ B (ALTABLE *et al.*, 2021). Dito isso, os dados encontrados corroboram com a diminuição do potencial pró-inflamatório.

As quimiocinas estabelecidas por Jaguin *et al.* (JAGUIN *et al.*, 2013) que exemplificam o perfil funcional M2 – CCL14 e CCL22 – atuam de modo a sinalizar e assim propiciar a quimiotaxia de leucócitos ao local de inflamação (ABBAS *et al.*, 2019). Estudos no decorrer agudo da infecção por SARS-CoV-2 quantificaram por *ELISA* maiores índices séricos de marcadores inflamatórios, dentre eles, CCL22 (TUFA *et al.*, 2022). A caracterização de tais marcadores na COVID longa nas análises de qPCR do presente estudo, evidenciou diminuição na expressão gênica para ambas as quimiocinas em questão.

Diferentemente do contexto pós-sepse estudado e elucidado por Gritte, Souza-Siqueira *et al.* que apresentava uma polarização de monócitos tendenciada ao perfil M1 (GRITTE, 2022), o pós-COVID expôs diminuição na maioria dos genes que caracterizam ambos os perfis de monócitos – M1 e M2. Asma Boumaza *et al.*, explicitou que o betacoronavírus SARS-CoV-2 induz uma imunoparalisia para benefício da progressão da infecção (BOUMAZA *et al.*, 2021). Segundo a óptica geral dos resultados do presente trabalho, instiga-se a hipótese de uma imunossupressão na COVID longa. Sequela essa, desencadeada por uma reprogramação celular consequente à infecção viral.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo o que foi evidenciado nos quadros agudos da COVID-19 e, pautando-se nas hipóteses previamente levantadas por estudos anteriores do grupo sobre o perfil de monócitos na Síndrome Pós-Sepse, conjecturamos que a Síndrome Pós-COVID se assemelharia em tais aspectos de reprogramação celular e as análises propostas resultariam em maiores expressões de marcadores referentes aos perfis funcionais de tais células. Entretanto, segundo os resultados aqui expostos, a SPC qualificou-se por uma diminuição de expressão gênica de marcadores essenciais em quesitos tanto pró-inflamatório quanto anti-inflamatório, inferindo assim uma produção basal deficitária em relação aos genes analisados.

A evidência de uma reprogramação celular de monócitos circulantes atribui suma importância na caracterização e melhor elucidação de uma das facetas da Síndrome Pós-COVID. Apesar das limitações e dificuldades encontradas para a realização do estudo como o contato com os pacientes e o altruísmo destes a participarem da pesquisa em favor da ciência, destaca-se o grande valor dos achados aqui apresentados para a sociedade como um todo. Ressalta-se ainda, a necessidade de pesquisas posteriores para um conhecimento mais amplo e concreto acerca de quaisquer impasses imunológicos que possam vir a ser atrelados a tal condição.

7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular.*(C. Reali et al., Trad.). : Rio de Janeiro: Elsevier.(Obra original publicada em 2007) 2019.
- ALEXANDER, N. O.; VARVARA, A. O.; NIKITA, G. N.; VERONIKA, A. M.; ANDREY, V. G.; ELENA, B. R.; DONGWEI, Z.; DIMITRY, A. C. Monocyte differentiation and macrophage polarization. **Monocyte differentiation and macrophage polarization**, 3, p. 10, 2019. 10.20517/2574-1209.2019.04
- ALI, M.; ABDULLAH, F.; NAVEED, A.; AHMED, S. M.; KHAN, A. A.; HASAN, A. Role of circulatory miRNA-21 and associated signaling pathways in the pathogenesis of pulmonary fibrosis among individuals recovered after COVID-19 infection. 34, p. 201093, Dec 2022. 10.1016/j.humgen.2022.201093
- ALKAZMI, L.; AL-KURAI SHY, H. M.; AL-GAREEB, A. I.; ALEXIOU, A.; PAPADAKIS, M.; SAAD, H. M.; BATIHA, G. E. The potential role of scavenger receptor B type I (SR-BI) in SARS-CoV-2 infection. **Immun Inflamm Dis**, 11, n. 4, p. e786, Apr 2023. 10.1002/iid3.786
- ALTABLE, M.; DE LA SERNA, J. M. Protection against COVID-19 in African population: Immunology, genetics, and malaria clues for therapeutic targets. **Virus Res**, 299, p. 198347, Jul 2 2021. 10.1016/j.virusres.2021.198347
- ATTIQ, A.; YAO, L. J.; AFZAL, S.; KHAN, M. A. The triumvirate of NF- κ B, inflammation and cytokine storm in COVID-19. **Int Immunopharmacol**, 101, n. Pt B, p. 108255, Dec 2021. 10.1016/j.intimp.2021.108255
- BALLERING, A. V.; VAN ZON, S. K.; OLDE HARTMAN, T. C.; ROSMALEN, J. G. Persistence of somatic symptoms after COVID-19 in the Netherlands: an observational cohort study. **The Lancet**, 400, n. 10350, p. 452-461, 2022.
- BARNETT, K. C.; XIE, Y.; ASAKURA, T.; SONG, D.; LIANG, K.; TAFT-BENZ, S. A.; GUO, H.; YANG, S.; OKUDA, K.; GILMORE, R. C.; LOOME, J. F.; OGUIN III, T. H.; SEMPOWSKI, G. D.; RANDELL, S. H.; HEISE, M. T.; LEI, Y. L.; BOUCHER, R. C.; TING, J. P. 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. 10.1016/j.chom.2022.12.005
- BENT, R.; MOLL, L.; GRABBE, S.; BROS, M. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? **Int J Mol Sci**, 19, n. 8, Jul 24 2018. 10.3390/ijms19082155
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Orchestration of metabolism by macrophages. **Cell metabolism**, 15, n. 4, p. 432-437, 2012.

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. 10.3343/alm.2021.41.6.540

BOUMAZA, A.; GAY, L.; MEZOUAR, S.; BESTION, E.; DIALLO, A. B.; MICHEL, M.; DESNUES, B.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B.; HALFON, P.; VITTE, J.; OLIVE, D.; MEGE, J. L. Monocytes and Macrophages, Targets of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: The Clue for Coronavirus Disease 2019 Immunoparalysis. **J Infect Dis**, 224, n. 3, p. 395-406, Aug 2 2021. 10.1093/infdis/jiab044

BRYCE, C.; GRIMES, Z.; PUJADAS, E.; AHUJA, S.; BEASLEY, M. B.; ALBRECHT, R.; HERNANDEZ, T.; STOCK, A.; ZHAO, Z.; ALRASHEED, M. R.; CHEN, J.; LI, L.; WANG, D.; CORBEN, A.; HAINES, G. K., 3rd; WESTRA, W. H.; UMPHLETT, M.; GORDON, R. E.; REIDY, J.; PETERSEN, B.; SALEM, F.; FIEL, M. I.; EL JAMAL, S. M.; TSANKOVA, N. M.; HOULDSWORTH, J.; MUSSA, Z.; VEREMIS, B.; SORDILLO, E.; GITMAN, M. R.; NOWAK, M.; BRODY, R.; HARPAZ, N.; MERAD, M.; GNJATIC, S.; LIU, W. C.; SCHOTSAERT, M.; MIORIN, L.; AYDILLO GOMEZ, T. A.; RAMOS-LOPEZ, I.; GARCIA-SASTRE, A.; DONNELLY, R.; SEIGLER, P.; KEYS, C.; CAMERON, J.; MOULTRIE, I.; WASHINGTON, K. L.; TREATMAN, J.; SEBRA, R.; JHANG, J.; FIRPO, A.; LEDNICKY, J.; PANIZ-MONDOLFI, A.; CORDON-CARDO, C.; FOWKES, M. E. Pathophysiology of SARS-CoV-2: the Mount Sinai COVID-19 autopsy experience. **Mod Pathol**, 34, n. 8, p. 1456-1467, Aug 2021. 10.1038/s41379-021-00793-y

CAMERON, M. J.; BERMEJO-MARTIN, J. F.; DANESH, A.; MULLER, M. P.; KELVIN, D. J. Human immunopathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS). **Virus Res**, 133, n. 1, p. 13-19, Apr 2008. 10.1016/j.virusres.2007.02.014

CHEN, L.; LONG, X.; XU, Q.; TAN, J.; WANG, G.; CAO, Y.; WEI, J.; LUO, H.; ZHU, H.; HUANG, L.; MENG, F.; HUANG, L.; WANG, N.; ZHOU, X.; ZHAO, L.; CHEN, X.; MAO, Z.; CHEN, C.; LI, Z.; SUN, Z.; ZHAO, J.; WANG, D.; HUANG, G.; WANG, W.; ZHOU, J. Elevated serum levels of S100A8/A9 and HMGB1 at hospital admission are correlated with inferior clinical outcomes in COVID-19 patients. **Cell Mol Immunol**, 17, n. 9, p. 992-994, Sep 2020. 10.1038/s41423-020-0492-x

CHIU, J. W.; BINTE HANAFI, Z.; CHEW, L. C. Y.; MEI, Y.; LIU, H. IL-1 α Processing, Signaling and Its Role in Cancer Progression. **Cells**, 10, n. 1, Jan 7 2021. 10.3390/cells10010092

COLARUSSO, C.; MAGLIO, A.; TERLIZZI, M.; VITALE, C.; MOLINO, A.; PINTO, A.; VATRELLA, A.; SORRENTINO, R. Post-COVID-19 Patients Who Develop Lung Fibrotic-like Changes Have Lower Circulating Levels of IFN- β but Higher Levels of IL-1 α and TGF- β . **Biomedicines**, 9, n. 12, Dec 17 2021. 10.3390/biomedicines9121931

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.

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.

DIAS, S. S. G.; SOARES, V. C.; FERREIRA, A. C.; SACRAMENTO, C. Q.; FINTELMAN-RODRIGUES, N.; TEMEROZO, J. R.; TEIXEIRA, L.; NUNES DA SILVA, M. A.; BARRETO, E.; MATTOS, M. Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. **PLoS pathogens**, 16, n. 12, p. e1009127, 2020.

EL-SABER BATIHA, G.; AL-GAREEB, A. I.; SAAD, H. M.; AL-KURAI SHY, H. M. COVID-19 and corticosteroids: a narrative review. **Inflammopharmacology**, 30, n. 4, p. 1189-1205, 2022.

EL KAZAFY, S. A.; FOUAD, Y. M.; SAID, A. F.; ASSAL, H. H.; ALI, T. M.; AHMED, A. E.; ELES AWY, B. H.; AHMED, O. M. Correlations between Cytokine Levels, Liver Function Markers, and Neuropilin-1 Expression in Patients with COVID-19. **Vaccines (Basel)**, 10, n. 10, Sep 29 2022. 10.3390/vaccines10101636

ESPINOZA, V.; EMMADY, P. Histology, Monocytes. **StatPearls Publishing**, 2023 2023.

FLASKAMP, L.; ROUBAL, C.; UDDIN, S.; SOTZNY, F.; KEDOR, C.; BAUER, S.; SCHEIBENBOGEN, C.; SEIFERT, M. Serum of Post-COVID-19 Syndrome Patients with or without ME/CFS Differentially Affects Endothelial Cell Function In Vitro. **Cells**, 11, n. 15, Aug 2 2022. 10.3390/cells11152376

GALVÁN-PEÑA, S.; O'NEILL, L. A. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. **Frontiers in immunology**, 5, p. 420, 2014.

GHARAVI, A. T.; HANJANI, N. A.; MOVAHED, E.; DOROUDI AN, M. The role of macrophage subtypes and exosomes in immunomodulation. **Cellular & Molecular Biology Letters**, 27, n. 1, p. 83, 2022/10/03 2022. 10.1186/s11658-022-00384-y

GORBALENYA, A. E.; BAKER, S. C.; BARIC, R. S.; DE GROOT, R. J.; DROSTEN, C.; GULYAEVA, A. A.; HAAGMANS, B. L.; LAUBER, C.; LEONTOVICH, A. M.; NEUMAN, B. W.; PENZAR, D.; PERLMAN, S.; POON, L. L. M.; SAMBORSKIY, D. V.; SIDOROV, I. A.; SOLA, I.; ZIEBUHR, J.; CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF, V. 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. 10.1038/s41564-020-0695-z

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, 3, n. 1, p. 23-35, 2003/01/01 2003. 10.1038/nri978

GRITTE, R. B. **Reference Genes for Quantitative qPCR Analyses in Monocytes of Septic Patients**. 2022. -, Universidade de Sao Paulo.

GUAN, W.-j.; NI, Z.-y.; HU, Y.; LIANG, W.-h.; OU, C.-q.; HE, J.-x.; LIU, L.; SHAN, H.; LEI, C.-l.; HUI, D. S. C.; DU, B.; LI, L.-j.; ZENG, G.; YUEN, K.-Y.; CHEN, R.-c.; TANG, C.-l.; WANG, T.; CHEN, P.-y.; XIANG, J.; LI, S.-y.; WANG, J.-l.; LIANG, Z.-j.; PENG, Y.-x.; WEI, L.; LIU, Y.; HU, Y.-h.; PENG, P.; WANG, J.-m.; LIU, J.-y.; CHEN, Z.; LI, G.; ZHENG, Z.-j.; QIU, S.-q.; LUO, J.; YE, C.-j.; ZHU, S.-y.; ZHONG, N.-s. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *382*, n. 18, p. 1708-1720, 2020. 10.1056/NEJMoa2002032

GUERMONPREZ, P.; HELFT, J. Inflammasome activation: a monocyte lineage privilege. **Nat Immunol**, 20, n. 4, p. 383-385, Apr 2019. 10.1038/s41590-019-0348-7

GUILLIAMS, M.; GINHOUX, F.; JAKUBZICK, C.; NAIK, S. H.; ONAI, N.; SCHRAML, B. U.; SEGURA, E.; TUSSIWAND, R.; YONA, S. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. **Nat Rev Immunol**, 14, n. 8, p. 571-578, Aug 2014. 10.1038/nri3712

GUILLIAMS, M.; MILDNER, A.; YONA, S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. **Immunity**, 49, n. 4, p. 595-613, Oct 16 2018. 10.1016/j.immuni.2018.10.005

GUO, L.; SONG, Z.; LI, M.; WU, Q.; WANG, D.; FENG, H.; BERNARD, P.; DAUGHERTY, A.; HUANG, B.; LI, X. A. Scavenger Receptor BI Protects against Septic Death through Its Role in Modulating Inflammatory Response. **J Biol Chem**, 284, n. 30, p. 19826-19834, Jul 24 2009. 10.1074/jbc.M109.020933

GUPTA, A.; MADHAVAN, M. V.; SEHGAL, K.; NAIR, N.; MAHAJAN, S.; SEHRAWAT, T. S.; BIKDELI, B.; AHLUWALIA, N.; AUSIELLO, J. C.; WAN, E. Y.; FREEDBERG, D. E.; KIRTANE, A. J.; PARIKH, S. A.; MAURER, M. S.; NORDVIG, A. S.; ACCILI, D.; BATHON, J. M.; MOHAN, S.; BAUER, K. A.; LEON, M. B.; KRUMHOLZ, H. M.; URIEL, N.; MEHRA, M. R.; ELKIND, M. S. V.; STONE, G. W.; SCHWARTZ, A.; HO, D. D.; BILEZIKIAN, J. P.; LANDRY, D. W. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nature Medicine**, 26, n. 7, p. 1017-1032, 2020/07/01 2020. 10.1038/s41591-020-0968-3

GUSTINE, J. N.; JONES, D. Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. **Am J Pathol**, 191, n. 1, p. 4-17, Jan 2021. 10.1016/j.ajpath.2020.08.009

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. 10.1038/s41579-020-00459-7

HUANG, C.; WANG, Y.; LI, X.; REN, L.; ZHAO, J.; HU, Y.; ZHANG, L.; FAN, G.; XU, J.; GU, X.; CHENG, Z.; YU, T.; XIA, J.; WEI, Y.; WU, W.; XIE, X.; YIN, W.; LI, H.; LIU, M.; XIAO, Y.; GAO, H.; GUO, L.; XIE, J.; WANG, G.; JIANG, R.; GAO, Z.; JIN, Q.; WANG, J.; CAO, B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, 395, n. 10223, p. 497-506, Feb 15 2020. 10.1016/s0140-6736(20)30183-5

JAGUIN, M.; HOULBERT, N.; FARDEL, O.; LECUREUR, V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated

macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. **Cellular immunology**, 281, n. 1, p. 51-61, 2013/01// 2013. 10.1016/j.cellimm.2013.01.010

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. 10.5604/17322693.1150133

KADAM, S. B.; SUKHRAMANI, G. S.; BISHNOI, P.; PABLE, A. A.; BARVKAR, V. T. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. **J Basic Microbiol**, 61, n. 3, p. 180-202, Mar 2021. 10.1002/jobm.202000537

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. 10.1186/s12967-022-03767-z

KHAN, S.; SHAFIEI, M. S.; LONGORIA, C.; SCHOGGINS, J. W.; SAVANI, R. C.; ZAKI, H. SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF- κ B pathway. **Elife**, 10, Dec 6 2021. 10.7554/eLife.68563

KNOLL, R.; SCHULTZE, J. L.; SCHULTE-SCHREPPING, J. Monocytes and Macrophages in COVID-19. **Front Immunol**, 12, p. 720109, 2021. 10.3389/fimmu.2021.720109

KOHN, L.; DAUVRIN, M.; DETOLLENAERE, J.; PRIMUS-DE JONG, C.; MAERTENS DE NOORDHOUT, C.; CASTANARES-ZAPATERO, D.; CLEEMPUT, I.; VAN DEN HEEDE, K. Long COVID and return to work: a qualitative study. **Occupational Medicine**, p. kqac119, 2022.

LAMBRECHT, B. N. Alveolar macrophage in the driver's seat. **Immunity**, 24, n. 4, p. 366-368, Apr 2006. 10.1016/j.immuni.2006.03.008

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. 10.1038/nri3088

LI, J.; JIA, H.; TIAN, M.; WU, N.; YANG, X.; QI, J.; REN, W.; LI, F.; BIAN, H. SARS-CoV-2 and Emerging Variants: Unmasking Structure, Function, Infection, and Immune Escape Mechanisms. **Front Cell Infect Microbiol**, 12, p. 869832, 2022. 10.3389/fcimb.2022.869832

LOCATI, M.; MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. **Advances in immunology**, 120, p. 163-184, 2013.

LU, B.; WANG, H.; ANDERSSON, U.; TRACEY, K. J. Regulation of HMGB1 release by inflammasomes. **Protein Cell**, 4, n. 3, p. 163-167, Mar 2013. 10.1007/s13238-012-2118-2

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. 10.1038/s41580-021-00432-z

MANDALA, V. S.; MCKAY, M. J.; SHCHERBAKOV, A. A.; DREGNI, A. J.; KOLOCOURIS, A.; HONG, M. 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. 10.1038/s41594-020-00536-8

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, 25, n. 12, p. 677-686, Dec 2004. 10.1016/j.it.2004.09.015

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Rep**, 6, p. 13, 2014. 10.12703/p6-13

MONTEIL, V.; KWON, H.; PRADO, P.; HAGELKRÜYS, A.; WIMMER, R. A.; STAHL, M.; LEOPOLDI, A.; GARRETA, E.; HURTADO DEL POZO, C.; PROSPER, F.; ROMERO, J. P.; WIRNSBERGER, G.; ZHANG, H.; SLUTSKY, A. S.; CONDER, R.; MONTSERRAT, N.; MIRAZIMI, A.; PENNINGER, J. M. 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. 10.1016/j.cell.2020.04.004

OMS, O. M. d. S. **OMS emite definição clínica oficial da condição pós-COVID-19**. 2021. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/150668-oms-emite-defini%C3%A7%C3%A3o-cl%C3%ADnica-oficial-da-condi%C3%A7%C3%A3o-p%C3%B3s-covid-19>.

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

PORTA, C.; RIBOLDI, E.; IPPOLITO, A.; SICA, A. Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. **Semin Immunol**, 27, n. 4, p. 237-248, Aug 2015. 10.1016/j.smim.2015.10.003

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. 10.12932/ap-200220-0772

QUEIROZ, M. A. F.; NEVES, P. F. M. d.; LIMA, S. S.; LOPES, J. d. C.; TORRES, M. K. d. S.; VALLINOTO, I. M. V. C.; BICHARA, C. D. A.; SANTOS, E. F. d.; DE BRITO, M. T. F. M.; DA SILVA, A. L. S. Cytokine profiles associated with acute COVID-19 and long COVID-19 syndrome. **Frontiers in cellular infection microbiology**, 12, p. 922422, 2022.

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. 10.1016/j.ijmmb.2022.02.005

ROTOLO, B. M.; BARILLI, A.; VISIGALLI, R.; FERRARI, F.; DALL'ASTA, V. Endothelial Cell Activation by SARS-CoV-2 Spike S1 Protein: A Crosstalk between Endothelium and Innate Immune Cells. **Biomedicines**, 9, n. 9, Sep 14 2021. 10.3390/biomedicines9091220

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. 10.1080/1744666x.2020.1750954

SALEPCI, E.; TURK, B.; OZCAN, S. N.; BEKTAS, M. E.; AYBAL, A.; DOKMETAS, I.; TURGUT, S. Symptomatology of COVID-19 from the otorhinolaryngology perspective: a survey of 223 SARS-CoV-2 RNA-positive patients. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, 278, p. 525-535, 2021.

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

SHERIF, Z. A.; GOMEZ, C. R.; CONNORS, T. J.; HENRICH, T. J.; REEVES, W. B. Pathogenic mechanisms of post-acute sequelae of SARS-CoV-2 infection (PASC). **Elife**, 12, p. e86002, 2023.

SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C. S.; SEYMOUR, C. W.; SHANKAR-HARI, M.; ANNANE, D.; BAUER, M.; BELLOMO, R.; BERNARD, G. R.; CHICHE, J.-D.; COOPERSMITH, C. M. J. J. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SŁOTWIŃSKA, S. M.; SŁOTWIŃSKI, R. J. C. E. J. o. I. Host response, obesity, and oral health. 40, n. 2, p. 201-205, 2015.

SOHN, K. M.; LEE, S. G.; KIM, H. J.; CHEON, S.; JEONG, H.; LEE, J.; KIM, I. S.; SILWAL, P.; KIM, Y. J.; PAIK, S.; CHUNG, C.; PARK, C.; KIM, Y. S.; JO, E. K. COVID-19 Patients Upregulate Toll-like Receptor 4-mediated Inflammatory Signaling That Mimics Bacterial Sepsis. **J Korean Med Sci**, 35, n. 38, p. e343, Sep 28 2020. 10.3346/jkms.2020.35.e343

SOHRABI, C.; ALSAFI, Z.; O'NEILL, N.; KHAN, M.; KERWAN, A.; AL-JABIR, A.; IOSIFIDIS, C.; AGHA, R. World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel coronavirus (COVID-19). **International journal of surgery**, 76, p. 71-76, 2020.

SONG, C.-Y.; XU, J.; HE, J.-Q.; LU, Y.-Q. COVID-19 early warning score: a multi-parameter screening tool to identify highly suspected patients. **MedRxiv**, p. 2020.2003.2005.20031906, 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. 10.34119/bjhrv4n1-120

TAY, M. Z.; POH, C. M.; RÉNIA, L.; MACARY, P. A.; NG, L. F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nat Rev Immunol**, 20, n. 6, p. 363-374, Jun 2020. 10.1038/s41577-020-0311-8

TORRES-RUIZ, J.; LOMELÍN-GASCÓN, J.; LIRA-LUNA, J.; PÉREZ-FRAGOSO, A.; TAPIA-CONYER, R.; NUÑEZ-AGUIRRE, M.; ALCALÁ-CARMONA, B.; ABSALÓN-AGUILAR, A.; MARAVILLAS-MONTERO, J. L.; MEJÍA-DOMÍNGUEZ, N. R.; NUÑEZ-ÁLVAREZ, C.; LLORENTE, L.; ROMERO-RAMÍREZ, S.; SOSA-HERNÁNDEZ, V. A.; CERVANTES-DÍAZ, R.; JUÁREZ-VEGA, G.; MEZA-SÁNCHEZ, D.; RULL-GABAYET, M.; MARTÍNEZ-JUÁREZ, L. A.; MORALES-JUÁREZ, L.; LÓPEZ-LÓPEZ, L. N.; NEGRETE-TRUJILLO, J. A.; FALCÓN-LEZAMA, J. A.; VALDEZ-VÁZQUEZ, R. R.; GALLARDO-RINCÓN, H.; GÓMEZ-MARTÍN, D. FANSY POSTCOV: A composite clinical immunological predictive index for post-COVID-19 syndrome unveils distinctive features in a cohort study of mild to critical patients. **Clin Transl Med**, 11, n. 11, p. e623, Nov 2021. 10.1002/ctm2.623

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

TUFA, A.; GEBREMARIAM, T. H.; MANYAZEWAL, T.; GETINET, T.; WEBB, D. L.; HELLSTRÖM, P. M.; GENET, S. Inflammatory mediators profile in patients hospitalized with COVID-19: A comparative study. **Front Immunol**, 13, p. 964179, 2022. 10.3389/fimmu.2022.964179

UMAKANTHAN, S.; SAHU, P.; RANADE, A. V.; BUKELO, M. M.; RAO, J. S.; ABRAHAO-MACHADO, L. F.; DAHAL, S.; KUMAR, H.; KV, D. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Postgrad Med J**, 96, n. 1142, p. 753-758, Dec 2020. 10.1136/postgradmedj-2020-138234

V'KOVSKI, P.; KRATZEL, A.; STEINER, S.; STALDER, H.; THIEL, V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nat Rev Microbiol**, 19, n. 3, p. 155-170, Mar 2021. 10.1038/s41579-020-00468-6

VERAS, F. P.; PONTELLI, M. C.; SILVA, C. M.; TOLLER-KAWAHISA, J. E.; DE LIMA, M.; NASCIMENTO, D. C.; SCHNEIDER, A. H.; CAETITÉ, D.; TAVARES, L. A.; PAIVA, I. M. SARS-CoV-2–triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. **Journal of Experimental Medicine**, 217, n. 12, p. e20201129, 2020.

VIOLA, A.; MUNARI, F.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, R.; SCOLARO, T.; CASTEGNA, A. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. **Front Immunol**, 10, p. 1462, 2019. 10.3389/fimmu.2019.01462

WEBER, A. N. R.; BITTNER, Z. A.; SHANKAR, S.; LIU, X.; CHANG, T. H.; JIN, T.; TAPIA-ABELLÁN, A. Recent insights into the regulatory networks of NLRP3 inflammasome activation. **J Cell Sci**, 133, n. 23, Dec 3 2020. 10.1242/jcs.248344

WEISS, S. R.; LEIBOWITZ, J. L. Coronavirus pathogenesis. **Advances in virus research**, 81, p. 85-164, 2011.

WILLIAMS, L. M.; GILMORE, T. D. Looking Down on NF- κ B. **Mol Cell Biol**, 40, n. 15, Jul 14 2020. 10.1128/mcb.00104-20

XIONG, Y.; LIU, Y.; CAO, L.; WANG, D.; GUO, M.; JIANG, A.; GUO, D.; HU, W.; YANG, J.; TANG, Z.; WU, H.; LIN, Y.; ZHANG, M.; ZHANG, Q.; SHI, M.; LIU, Y.; ZHOU, Y.; LAN, K.; CHEN, Y. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. **Emerg Microbes Infect**, 9, n. 1, p. 761-770, Dec 2020. 10.1080/22221751.2020.1747363

YAN, W.; ZHENG, Y.; ZENG, X.; HE, B.; CHENG, W. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. **Signal Transduct Target Ther**, 7, n. 1, p. 26, Jan 27 2022. 10.1038/s41392-022-00884-5

YONG, S. J.; LIU, S. Proposed subtypes of post-COVID-19 syndrome (or long-COVID) and their respective potential therapies. **Reviews in medical virology**, 32, n. 4, p. e2315, 2022.

YUKI, K.; FUJIOGI, M.; KOUTSOGIANNAKI, S. COVID-19 pathophysiology: A review. **Clin Immunol**, 215, p. 108427, Jun 2020. 10.1016/j.clim.2020.108427

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de hematologia**. 2013. 65-67 p.

ZHANG, Q.; XIANG, R.; HUO, S.; ZHOU, Y.; JIANG, S.; WANG, Q.; YU, F. 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. 10.1038/s41392-021-00653-w

ZHAO, J.; SCHANK, M.; WANG, L.; DANG, X.; CAO, D.; KHANAL, S.; NGUYEN, L. N. T.; ZHANG, Y.; WU, X. Y.; ADKINS, J. L.; PELTON, B. J.; ZHANG, J.; NING, S.; GAZZAR, M. E.; MOORMAN, J. P.; YAO, Z. Q. Plasma biomarkers for systemic inflammation in COVID-19 survivors. **Proteomics Clin Appl**, 16, n. 5, p. e2200031, Sep 2022. 10.1002/prca.202200031

ZHU, N.; ZHANG, D.; WANG, W.; LI, X.; YANG, B.; SONG, J.; ZHAO, X.; HUANG, B.; SHI, W.; LU, R.; NIU, P.; ZHAN, F.; MA, X.; WANG, D.; XU, W.; WU, G.; GAO, G. F.; TAN, W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med**, 382, n. 8, p. 727-733, Feb 20 2020. 10.1056/NEJMoa2001017

ANEXOS

Anexo A - Parecer consubstanciado do CEP: Centro Universitário Lusíada



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



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 Lusiada, 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