

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**PERFIL DE MICROVESÍCULAS CIRCULANTES COMO FATOR
PROGNÓSTICO NA COVID-19 GRAVE**

por

Laura Peixoto de Magalhães

Belo Horizonte

2022

DISSERTAÇÃO MCS-IRR L.P.PEIXOTO 2022

LAURA PEIXOTO DE MAGALHÃES

**PERFIL DE MICROVESÍCULAS CIRCULANTES
COMO FATOR PROGNÓSTICO NA COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências – área de concentração Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientação: Dra. Andréa Teixeira de Carvalho

Belo Horizonte
2022

O presente trabalho foi realizado com apoio de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) - Código de Financiamento 001.

M189p Magalhães, Laura Peixoto.
2022

Perfil de Microvesículas Circulantes como Fator Prognóstico na COVID-19 Grave / Laura Peixoto de Magalhães. - Belo Horizonte, 2022.

90 f. : il. color.

Orientadora: Andréa Teixeira de Carvalho.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências da Saúde), Belo Horizonte, 2022.

Bibliografia: f. 75-80.

1. SARS-CoV-2. 2. Micropartículas Derivadas de Células. 3. Citometria de fluxo/métodos. I. Título.

CDD 616.2

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica:
Segemar Oliveira Magalhães – CRB/6 1975 FIOCRUZ. Instituto René Rachou.
Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener

LAURA PEIXOTO DE MAGALHÃES

**PERFIL DE MICROVESÍCULAS CIRCULANTES
COMO FATOR PROGNÓSTICO NA COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências – área de concentração Doenças Infecto-Parasitárias.

Banca examinadora:

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho (IRR/FIOCRUZ MINAS) Presidente

Dr. Daniel Moreira de Avelar (IRR/ FIOCRUZ MINAS) Titular

Prof. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari (UFMG) Titular

Dra. Maria Fernanda Alves do Nascimento (IRR/ FIOCRUZ MINAS) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 31/08/2022.

EPIGRAFE

*“O olho vê, a lembrança revê, e a imaginação transvê.
É preciso transver o mundo.”*

Manoel de Barros

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Marcelo e Vanessa, meus grandes incentivadores e apoiadores, além de serem meu maior exemplo; e ao meu amado marido Flávio, companheiro, amigo e confidente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus e à espiritualidade por todas as bênçãos e oportunidades concedidas, por me protegerem diariamente e por guiarem as minhas escolhas.

Agradeço infinitamente aos meus pais, Marcelo e Vanessa: sem eles eu certamente não teria chegado até aqui. Agradeço por, desde os meus primeiros passos, me incentivarem, me apoiarem incondicionalmente e me ensinarem a confiar, sempre. Agradeço por serem meu exemplo e minha base. Agradeço pelo amor e carinho. Eu os amo muito!

Agradeço ao meu amado e querido marido, Flávio, um grande companheiro de vida! Agradeço por ser abrigo, ouvido e colo quando necessário, agradeço pela torcida constante pelos meus planos e agradeço por todo o amor e cuidado diários. Agradeço também aos meus avós, pessoas que amo muito, fundamentais e sempre presentes em toda a minha vida. Agradeço ainda ao meu irmão, aos meus tios e aos familiares e amigos que estiveram e permaneceram ao meu lado durante toda a trajetória.

Minha eterna gratidão à minha orientadora, Dra. Andréa Teixeira de Carvalho, por toda a confiança, ensinamentos, paciência, ajuda e incentivos ao longo dessa trajetória profissional, mas também na minha vida pessoal. Você é uma grande inspiração. Agradeço também ao Dr. Olindo Assis Martins Filho, pela oportunidade e auxílio, e aos demais colegas do Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores (GIPB), em especial, à querida Lorena Junia, pelas enormes contribuições. Agradeço ao Instituto René Rachou – Fiocruz Minas pela acolhida e a todos os professores das disciplinas cursadas ao longo da pós-graduação pelos aprendizados. À Biblioteca do IRR, em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrando o rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Por fim, agradeço aos pacientes e seus familiares, bem como a toda a equipe de saúde e pesquisa do Hospital Risoleta Tolentino Neves, por permitirem o desenvolvimento desse estudo.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

Introdução: A COVID-19 é uma doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2 e responsável pela morbidade e mortalidade de milhões de pessoas em todo o mundo desde 2019. A sua rápida disseminação e o seu potencial de gravidade tornaram fundamental a busca por ferramentas prognósticas laboratoriais complementares. **Objetivo:** caracterizar o perfil de microvesículas (MVs) circulantes como fator prognóstico na COVID-19. **Método:** foram incluídos 39 pacientes com COVID-19, com idade entre 30 e 85 anos, de ambos os sexos, e avaliados em 3 tempos (admissão, após 7 dias e após 14 a 21 dias). Foram também incluídos 32 indivíduos no grupo controle saudável. As análises fenotípicas das MVs foram realizadas por citometria de fluxo. **Resultados:** observou-se aumento significativo de MVs totais no grupo COVID-19 em relação ao grupo controle em todos os tempos analisados, principalmente pelo aumento de MVs derivadas de neutrófilos e de células endoteliais. Além disso, houve redução significativa das MVs derivadas de monócitos, de linfócitos T e de plaquetas no grupo COVID-19 em relação ao grupo controle no tempo 0. Dentre os pacientes COVID-19, houve aumento significativo das MVs totais, das derivadas de neutrófilos e eritrócitos no grupo óbito em relação ao grupo alta. Análise discriminante univariada obteve 88% de acurácia ao diferenciar pacientes COVID-19 de indivíduos saudáveis pelo uso de MVs totais, neutrofílicas, monocitárias e linfocitárias, bem como 77% de acurácia ao discriminar pacientes COVID-19 quanto ao desfecho com base em MVs totais e neutrofílicas. Por fim, árvore classificatória construída após análise multivariada demonstrou 28% de chance de óbito em pacientes com elevação de MVs derivadas de neutrófilos e de monócitos. **Conclusão:** os achados sugerem que MVs podem desempenhar papel importante como biomarcadores para a avaliação prognóstica em pacientes com COVID-19.

Palavras chave: Micropartículas Derivadas de Células. Citometria de fluxo. COVID-19. Biomarcadores. Prognóstico.

ABSTRACT

Introduction: COVID-19 is an infectious disease caused by SARS-CoV-2 virus and responsible for morbidity and mortality of millions of people around the world since 2019. Its rapid spread and potential for severity have made the search for complementary laboratory prognostic tools a key issue. **Objectives:** to characterize the profile of circulating microvesicles (MVs) as a prognostic factor in COVID-19. **Methods:** 39 patients with COVID-19 of both sexes aged between 30 and 85 years were included and evaluated at 3 times (admission, 7 days and 14 to 21 days after). Thirty-two individuals were also included to compose a health control group. **Results:** there was a significant increase in total MVs in COVID-19 group compared to health controls, mainly related to the increase in MVs derived from neutrophils and endothelial cells. Moreover, there was a significant decrease in MVs derived from monocytes, T lymphocytes and platelets in COVID-19 group compared to health controls at admission. Among patients with COVID-19, there was a significant increase in total MVs and MVs derived from neutrophils and erythrocytes in death group compared to discharge group. Discriminant univariate analysis achieved 88% of accuracy when differentiating COVID-19 patients from healthy individuals by using total, neutrophilic, monocytic, and lymphocytic MVs, as well as 77% of accuracy when discriminating COVID-19 patients according to the clinical outcome based on total and neutrophilic MVs. Finally, classification tree decision built after multivariate analysis demonstrated 28% of chance to death in patients with increase of MVs derived from neutrophils and monocytes. **Conclusion:** the findings suggest that MVs can perform an important role as biomarkers to prognostic evaluation in COVID-19 patients.

Keywords: Cell-Derived Microparticles. Flow Cytometry. COVID-19. Biomarker. Prognosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do SARS-CoV-2.....	22
Figura 2 – Patogênese da COVID-19.....	24
Figura 3 – Principais Manifestações Clínicas da COVID-19.....	26
Figura 4 – Vesículas Extracelulares.....	32
Figura 5 – Sumário executivo da população de estudo e dos métodos de análise.....	44
Figura 6 – Estratégia de análise de MVs por citometria de fluxo.....	45
Figura 7 – Gráficos tipo histogramas representativos da análise de microvesículas por citometria de fluxo.....	46
Figura 8 – Contagem Absoluta de MVs de pacientes COVID-19 no T0 em comparação ao grupo controle saudável.....	52
Figura 9 – Contagem Absoluta de MVs de Pacientes COVID-19 no T0 de acordo com o desfecho clínico.....	53
Figura 10 – Cinética das MVs em Pacientes COVID-19 de Acordo com o Tempo do Início dos Sintomas no Momento da Inclusão no Estudo.....	55
Figura 11 – Desempenho da Contagem Absoluta de MVs para Classificar Pacientes COVID-19 no T0 versus Controle Saudável.....	58
Figura 12 – Desempenho da Contagem Absoluta de MVs para Classificar Pacientes COVID-19 no T0 de Acordo com o Desfecho Clínico.....	60
Figura 13 – Análise Discriminante da Contagem Absoluta de MVs para Classificar Pacientes COVID-19 no T0.....	62
Figura 14 – Análise Multivariada da Contagem Absoluta de MVs para Classificação de Pacientes COVID-19.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Breve descrição das principais variantes do Sars-CoV-2.....	22
Quadro 2 – Principais biomarcadores da COVID-19 utilizados na prática atual.....	28
Quadro 3 – Relação entre tempo de infecção e biomarcadores.....	28
Quadro 4 – Comparação entre os subtipos de vesículas extracelulares.....	32
Quadro 5 – Marcadores celulares para identificação da origem das microvesículas.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas e clínicas do grupo COVID-19.....	49
Tabela 2 – Perfil hematológico da Série Vermelha e Contagem de Plaquetas do hemograma dos pacientes do grupo COVID-19, categorizados segundo desfecho clínico.....	50
Tabela 3 – Perfil hematológico da Série Branca do hemograma dos pacientes do Grupo COVID-19, categorizados segundo desfecho clínico.....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AUC: area under curve.

CAAE: Certificado de Apreciação de Apresentação Ética.

CD: *Cluster of Differentiation.*

CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

COVID-19: Doença do Coronavírus 2019.

DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina.

ECA2: Enzima Conversora de Angiotensina 2.

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio.

IFN-I: interferon-I.

IL: interleucina.

IOT: intubação orotraqueal.

LR: *Likelihood ratio.*

MERS-CoV: Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio.

MVs: microvesículas.

NETs: Redes Extracelulares de Neutrófilos.

NSP: Proteínas Não Estruturais.

OMS: Organização Mundial de Saúde.

PAV: Pneumonia Associada à Ventilação.

PCR: Proteína C Reativa.

PLP: Plasma Livre de Plaquetas.

PPP: Plasma Pobre em Plaquetas.

PRNT: Teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise.

Proteína E: Proteína do Envelope.

Proteína M: Proteína de Membrana.

Proteína N: Proteína do Nucleocapsídeo.

Proteína S: Proteína Spike.

ROC: *Receiver Operating Characteristics Curve.*

RNA: Ácido Ribonucleico.

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction.*

SARS-CoV: Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave.

SARS-CoV-2: Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave.

SRAA: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.

SDRA: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo.

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TEV: tromboembolismo venoso.

TMPRSS2: Protease Transmembrana Serina 2.

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa.

VCAM-1: *Vascular Cell Adhesion Protein 1.*

VEs: Vesículas Extracelulares.

VILI: Injúria Pulmonar Induzida pela Ventilação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 COVID-19.....	21
2.1.1 Etiologia.....	21
2.1.2 Patogênese.....	22
2.1.3 Manifestações clínicas.....	24
2.1.4 Biomarcadores.....	27
2.1.5 Diagnóstico.....	29
2.1.6 Tratamento e prevenção.....	30
2.2 Microvesículas.....	31
2.2.1 Conceitos e propriedades biológicas.....	31
2.2.2 Funções das microvesículas.....	33
2.2.3 Microvesículas em estados patológicos.....	35
2.2.4 Análise de microvesículas.....	37
3 OBJETIVOS.....	39
4 POPULAÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Aspectos éticos.....	42
4.2 Participantes e recrutamento.....	42
4.3 Cálculo amostral.....	42
4.4 Obtenção e processamento de amostras.....	43
4.4.1 Coleta e obtenção do plasma pobre em plaquetas.....	43
4.4.2 Purificação e imunofenotipagem de microvesículas.....	44
4.5 Análises estatísticas.....	46
4.6 Pesquisa bibliográfica.....	47
5 RESULTADOS.....	48
5.1 Perfil demográfico dos pacientes do grupo COVID-19.....	49
5.2 Perfil hematológico dos pacientes do grupo COVID-19.....	50
5.3 Perfil panorâmico de microvesículas em pacientes do grupo COVID-19 e do grupo controle.....	51
5.4 Perfil de microvesículas plasmáticas categorizados de acordo com o desfecho clínico.....	52

5.5 Perfil cinético de microvesículas em pacientes do grupo COVID-19 de acordo com o tempo de sintomas, desde a inclusão no estudo.....	54
5.6 Análise de desempenho das contagens absolutas de MVs para classificar pacientes COVID-19 no T0 em comparação ao grupo controle saudável.....	56
5.7 Análise de desempenho das contagens absolutas de MVs para classificarem pacientes COVID-19 no T0 de acordo com o desfecho clínico.....	59
5.8 Análise discriminante univariada de MVs para classificar pacientes COVID no T0.....	61
5.9 Análise discriminante multivariada de MVs para classificar pacientes COVID, segundo desfecho clínico no T0.....	62
6 DISCUSSÃO.....	65
7 CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXOS.....	81
Anexo I - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	82
Anexo II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido A.....	87
Anexo III - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido B.....	89

1 Introdução e Justificativa

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19) é causada pelo Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2), isolado pela primeira vez em dezembro de 2019 em Wuhan/China, e foi declarada pandemia pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 11 de março de 2020. Desde então, mais de 580 milhões de casos foram relatados em todo o mundo, com um número de óbitos superior a 6,4 milhões de pessoas, segundo dados recentes da OMS (WHO Coronavirus Dashboard, agosto/2022). A sua rápida disseminação e o seu potencial de morbidade e de mortalidade, principalmente em grupos de risco, tornaram o combate ao SARS-CoV-2 um grande desafio para a ciência e para a medicina (HAJJAR et al., 2021).

Sabe-se que processos imunológicos, inflamatórios e trombóticos complexos são fatores patogênicos centrais na COVID-19, e que seus efeitos ultrapassam o sistema respiratório e a tornam uma doença sistêmica associada à disfunção orgânica múltipla (SAMPRATHI et al., 2021). Sabe-se ainda que a doença apresenta uma heterogeneidade de sintomas e de fatores que influenciam o seu curso, o que dificulta sua estratificação e a predição do seu prognóstico (PAPADOPOULOU et al., 2022). Informações clínicas, apesar de fundamentais, nem sempre são suficientes para estabelecer formas precoces de atuação que contribuam para melhores desfechos. Assim, o uso de biomarcadores torna-se essencial, uma vez que podem fornecer informações adicionais com impacto significativo no cuidado dos pacientes acometidos pela doença (SAMPRATHI et al., 2021).

Durante a pandemia, biomarcadores relacionados a sistemas e órgãos acometidos pelo SARS-CoV-2 vem sendo utilizados para o diagnóstico e para a identificação de casos graves que evoluem com lesões orgânicas (SAMPRATHI et al., 2021). No entanto, a identificação de marcadores precoces que auxiliem na predição do prognóstico dos pacientes acometidos pela COVID-19 também é de extrema importância, tendo em vista a possibilidade de antecipar e planejar melhores estratégias terapêuticas a curto e a longo prazo.

Nesse contexto, entra em pauta as microvesículas (MVs), vesículas nanométricas liberadas da membrana de células que sofreram ativação, injúria ou apoptose. Tratam-se de mediadores importantes que desempenham papel fundamental na comunicação intercelular, no sistema imunológico, na inflamação e na homeostasia, tanto em estados fisiológicos quanto patológicos (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). Na sepse, por exemplo, foram associadas a disfunção microvascular e orgânica, além de distúrbios da coagulação (SOUZA et al., 2015). Já na Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), contribuem para a injúria pulmonar por meio do estímulo à cascata de citocinas (MAHIDA et al., 2020). Assim, aventou-se a

possibilidade de que a quantificação de MVs na circulação sistêmica possa ser utilizada como ferramenta preditora de gravidade e prognóstico em doenças associadas com resposta inflamatória exacerbada, como ocorre na COVID-19.

Diante do exposto, o projeto tem um diferencial inovador importante por identificar novas ferramentas de fácil aplicabilidade na rotina e que são capazes de auxiliar no acompanhamento clínico dos pacientes e na tomada de decisões, tanto relacionadas ao tratamento quanto ao acompanhamento a longo prazo. A partir da identificação dos biomarcadores de prognóstico, eles poderão ser empregados para seguimento dos pacientes, o que potencialmente implicará no aumento significativo dos desfechos favoráveis, bem como no uso eficaz dos recursos disponíveis.

A principal hipótese do estudo é que haverá aumento das MVs circulantes em pacientes com COVID-19 em comparação a pacientes saudáveis, principalmente daquelas derivadas de células imunes, como neutrófilos, e de plaquetas. Espera-se também que esse aumento seja relacionado à gravidade e ao desfecho clínico dos pacientes, sendo maior em pacientes potencialmente mais graves.

2 Referencial Teórico

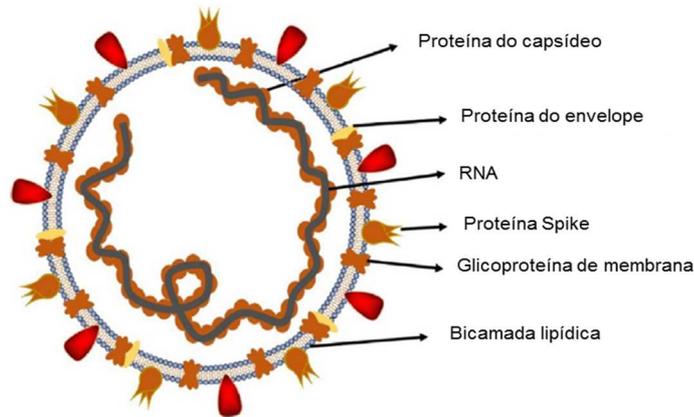
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 COVID-19

2.1.1 Etiologia: características do SARS-CoV-2 e suas variantes

Os coronavírus são pertencentes à ordem dos Nidovirus, família *Coronaviridae*, e seus gêneros incluem os alpha (α), beta (β), gamma (γ) e delta (δ) coronavírus. Possuem tamanho pequeno, entre 65 e 125 nm, e contêm uma cadeia simples de RNA como material genético (SHEREEN et al., 2020). Os coronavírus mais comuns na prática clínica são 229E, OC43, NL63 e HKU1, responsáveis por sintomas de resfriado comum em indivíduos imunocompetentes (WIERSINGA et al., 2020). Além do SARS-CoV-2, são conhecidos outros dois coronavírus capazes de desencadear síndromes respiratórias agudas graves em humanos: o SARS-CoV, descoberto em 2002 na China, que acometeu mais de 8.000 pessoas, e o MERS-CoV, descoberto em 2012 no Oriente Médio, que infectou mais de 2.400 indivíduos (SHEREEN et al., 2020).

O SARS-CoV-2 é um betacoronavírus envelopado que possui uma cadeia simples de RNA senso positiva como material genético. Conforme ilustrado na Figura 1, ele apresenta em sua composição algumas proteínas estruturais e não estruturais fundamentais para seu ciclo de vida (SHEREEN et al., 2020). Dentre as proteínas estruturais, a primeira, presente em sua superfície externa e responsável pelo aspecto de “coroa”, é a glicoproteína Spike (proteína S), fundamental para a entrada do vírus na célula hospedeira, a partir da ligação ao seu receptor Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2). A subunidade S1 determina o tropismo celular e auxilia na ligação do vírus à célula alvo, enquanto a subunidade S2 ajuda na fusão às células hospedeiras (FAROOQI et al., 2021). Além disso, a entrada do vírus na célula depende ainda da ação de proteases celulares, principalmente a protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2), que cliva a proteína S e ativa o mecanismo de fusão e endocitose (WIERSINGA et al., 2020). Além da proteína S, outras proteínas estruturais também são codificadas, como a proteína de membrana (proteína M), importante para moldar os vírus; a proteína do envelope (proteína E), que participa da montagem e liberação viral; e a proteína do nucleocapsídeo (proteína N), que protege o genoma viral. Em relação às proteínas não estruturais (NSP), NSP3 e NSP5, por exemplo, estão relacionadas à formação do complexo de transcrição e replicação viral e ao bloqueio da resposta imune inata (FAROOQI et al., 2021).

Figura 1: estrutura do SARS-CoV-2

Fonte: adaptado de SHEREEN MA, 2020.

Desde seu surgimento em 2019, foram identificadas algumas variantes do SARS-CoV-2, sendo as de maior relevância brevemente descritas no Quadro 1.

Quadro 1 – Breve descrição das principais variantes do Sars-CoV-2

Variante	Local/data	Principais características
Alpha (B.1.1.7)	Reino Unido 2º semestre/2020	Aumento em torno de 50% da transmissibilidade; maior potencial de gravidade; apresentou dominância global até o surgimento da variante delta.
Beta (B.1.351)	África do Sul 2º semestre/2020	Aumento em torno de 50% da transmissibilidade; não apresentou dominância global.
Gamma (P.1)	Japão/Brasil Dezembro/2020	Não apresentou dominância global, mas foi prevalente no Brasil.
Delta (B.1.617.2)	Índia Dezembro/2020	Foi a mais prevalente no mundo até a emergência da variante Ômicron; mais transmissível e associada a casos mais graves.
Ômicron (B.1.1.529)	África do Sul Novembro/2021	Mais de 30 mutações na proteína S; aumento da transmissibilidade; menor virulência; baixa susceptibilidade a anticorpos neutralizantes.

Fonte: adaptado de MCINTOSH et al., 2022.

2.1.2 Patogênese

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre, principalmente, por meio do contato com partículas liberadas no espirro, secreção ou saliva contaminadas, seja ele direto ou por meio de fômites. Após a entrada no organismo, o vírus se liga às células alvo que possuem o receptor ACE2 e a protease TMPRSS2, inicialmente na via aérea (WIERSINGA et al., 2020). Após a infecção

do hospedeiro, iniciam-se mecanismos patogênicos que envolvem tanto a ação viral quanto a atuação do sistema imunológico.

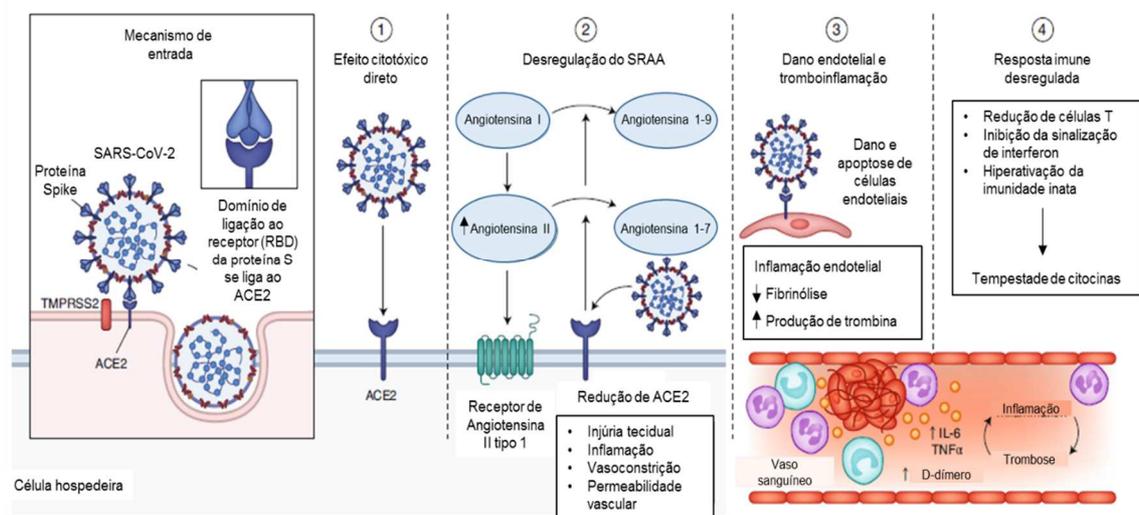
Em relação à sua patogênese, o SARS-CoV-2 expressa proteínas capazes de bloquear a produção de interferon-I (IFN-I), fator responsável por impedir a replicação viral e potencializar os mecanismos efetores antivirais. Isso prejudica a resposta antiviral e facilita a rápida replicação viral, bem como ocasiona extensos efeitos citopáticos virais diretos nos estágios iniciais da infecção. Posteriormente, inicia-se uma resposta imune desregulada e persistente, a partir da liberação de moléculas de sinalização pelas células infectadas e recrutamento de células inflamatórias. Observa-se então infiltrado inflamatório intenso no leito pulmonar, com presença de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, e inicia-se a produção de grandes quantidades de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, culminando em um estado de hiperinflamação e “tempestade de citocinas” – principalmente interleucina (IL)-1, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) – o que causa danos sistêmicos associados aos casos graves de COVID (HENRY et al., 2020 e CARFORA et al., 2021).

O estado de hiperinflamação e a ação direta do SARS-CoV-2 sobre células endoteliais, que também possuem o receptor ACE2, resultam em disfunção endotelial, gerando um estado pró-trombótico com ativação da via extrínseca da coagulação, a partir da exposição de fator tecidual pelas células endoteliais, e da via intrínseca, por meio da ativação do fator XII por moléculas bioativas liberadas por polimorfonucleares. A hiperinflamação promove também a redução de anticoagulantes naturais, como a antitrombina III e a proteína C (CARFORA et al., 2021), bem como a ativação plaquetária, o que além de contribuir para a coagulação, também se relaciona à liberação de moléculas pró-inflamatórias. Outro mecanismo que contribui para o estado de hipercoagulabilidade na COVID-19 é a ativação do complemento, que potencializa a ativação da cascata de coagulação e a ativação plaquetária (CARFORA et al., 2021). A hipercoagulabilidade pode ser ainda potencializada pela hipoxemia, hipertermia e hipovolemia (HENRY et al., 2020).

Existe ainda um outro mecanismo envolvido na patogênese do SARS-CoV-2, relacionado ao seu receptor celular ACE2. No sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), a enzima conversora de angiotensina (ECA) converte angiotensina 1 em angiotensina 2, sendo esta responsável por efeitos pró-inflamatórios, pró-oxidativos e vasoconstritores. Já a ECA2, converte a angiotensina I em angiotensina 1-7, cujas ações incluem efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e vasodilatadores. A ligação do SARS-CoV-2 à ECA2, por sua vez, reduz sua disponibilidade no SRAA, resultando em maiores níveis de angiotensina 2 circulantes (HENRY et al., 2020).

Em suma, conforme ilustrado na Figura 2, as lesões multiorgânicas desencadeadas pela infecção por SARS-CoV-2 possuem como mecanismos chaves (1) a toxicidade viral direta às células que possuem receptores para sua entrada; (2) a desregulação da resposta imune, com hiperativação e secreção de citocinas pró-inflamatórias; (3) os danos às células endoteliais, com consequente hipercoagulabilidade, tromboinflamação e disfunção microvascular; e (4) a desregulação do sistema renina angiotensina aldosterona, com redução da ACE2 e, conseqüentemente, aumento da angiotensina 2 (GUPTA, et al., 2020).

Figura 2: patogênese da COVID-19.



Fonte: adaptado de GUPTA et al., 2020.

2.1.3 Manifestações clínicas

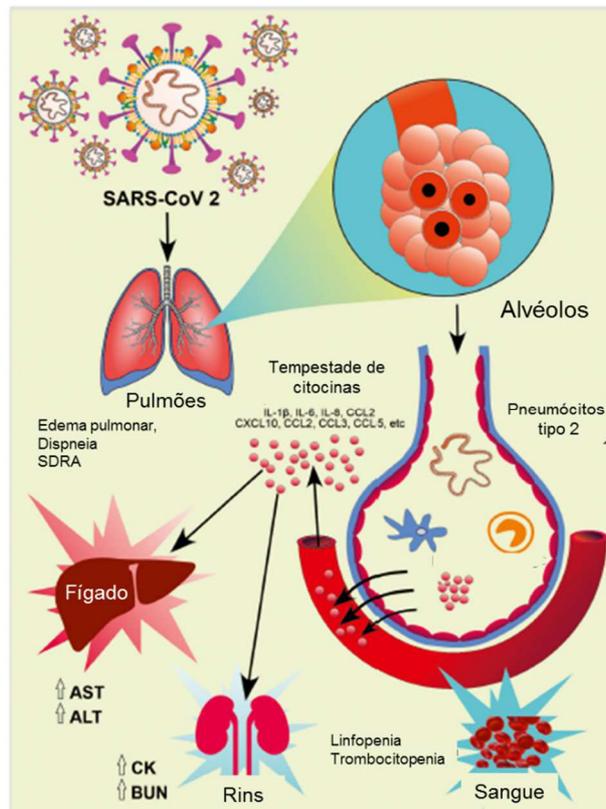
A COVID-19 pode apresentar estádios clínicos distintos. Inicialmente, tem-se o período de incubação, em que o paciente permanece assintomático por cerca de 5 dias e o vírus se liga aos receptores das células ciliadas da cavidade nasal. Posteriormente, o vírus se propaga para as células das vias aéreas superiores e o paciente desenvolve sintomas gripais leves, como febre, tosse, rinorreia, odinofagia, anosmia, disgeusia e cefaleia (SAMUDRALA et al., 2020). Considerando-se pessoas não vacinadas, aproximadamente 80% dos casos se restringem a esses dois estágios iniciais, porém, os 20% restantes progridem para o estágio final, caracterizado por acometimento do trato respiratório inferior (ZAHNAN et al., 2021). Alguns fatores favorecem a progressão para o estágio tardio da doença, principalmente relacionados ao indivíduo. A presença de comorbidades que cursam com estados inflamatórios e disfunção endotelial de base, como diabetes, hipertensão, obesidade e tabagismo, é um dos grandes fatores de risco. Além disso, doenças pulmonares preexistentes, como doença pulmonar obstrutiva crônica, asma e pneumopatias intersticiais

também são fatores de risco, bem como doenças imunossupressoras e neoplasias (SAMUDRALA et al., 2020).

Nos casos de evolução para estádios de maior gravidade, a resposta inflamatória contínua no tecido pulmonar resulta em espessamento da membrana alvéolo-capilar, aumento da permeabilidade vascular, edema, formação de membrana hialina e de microtrombos (WIERSINGA et al., 2020). As manifestações respiratórias incluem o desenvolvimento de pneumonia simples, a evolução para pneumonia grave e o surgimento da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (VELASCO et al., 2021).

Além das manifestações respiratórias, há acometimento importante de outros órgãos secundário à resposta inflamatória sistêmica. Com relação às manifestações hematológicas, tem-se a linfopenia como um dos achados mais característicos, resultado dos efeitos virais citopáticos diretos em associação ao aumento da apoptose de células T em função do ambiente imune desregulado e da inibição da proliferação linfocitária pelo ácido lático (HENRY et al., 2020). Além da linfopenia, outros achados incluem trombocitopenia, aumento do tempo de protrombina e elevação do dímero-D e do fibrinogênio, relacionados ao estado pró-trombótico, bem como elevação de marcadores inflamatórios {IL-6, proteína-C-reativa (PCR), ferritina, lactato desidrogenase} e leucocitose (GUPTA et al., 2020). Já em relação às manifestações cardiovasculares, pode haver isquemia/infarto miocárdico, miocardite pela injúria viral direta e por infiltrado inflamatório, arritmias; entre outras. A injúria renal aguda, por sua vez, é muito característica nos casos graves de COVID-19 e é precipitada por diversos mecanismos, como lesão viral direta, lesão endotelial, formação de microtrombos nos capilares glomerulares, hipovolemia, vasoconstrição renal secundária a hipóxia, formação de imunocomplexos e nefrotoxicidade medicamentosa (GUPTA et al., 2020). Com relação às principais manifestações gastrointestinais, têm-se náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal e anorexia. Existem ainda possíveis manifestações endócrinas, como hiperglicemia secundária a danos às células beta pancreáticas; dermatológicas, como rash cutâneo e urticária; e neurológicas, como encefalopatia e Guillain-Barré (GUPTA et al., 2020). Os casos mais graves podem apresentar instabilidade hemodinâmica, necessidade de aminas vasoativas e de suporte ventilatório invasivo.

Figura 3: principais manifestações clínicas da COVID-19.



Fonte: adaptado de SAMUDRALA et al., 2020

Além das principais manifestações clínicas características da fase aguda da doença, existe também a possibilidade de desenvolvimento da chamada “Condição Pós-COVI-19”. Trata-se de quadro caracterizado por sintomas persistentes há pelo menos dois meses e não justificados por outra razão, que atinge milhões de pessoas em todo o mundo, com prevalência estimada entre 3 e 11,7%. Sua patogênese ainda não é completamente elucidada, sendo as principais hipóteses relacionadas à persistência oculta do vírus, à persistência da desregulação imune, ao desenvolvimento de anticorpos anti-ACE2 e às alterações virais neurológicas (CASTANARES-ZAPATERO D et al., 2022).

A COVID longa apresenta espectro clínico heterogêneo e, dentre os principais achados, pode-se mencionar dispnéia e fibrose pulmonar, relacionadas aos danos pulmonares intensos provocados pela infecção e pela suplementação de oxigênio; fadiga crônica de causa multifatorial, incluindo hipometabolismo cerebral, disfunção mitocondrial muscular, fatores psicológicos e ambientes; insuficiência cardíaca e arritmias, em função da injúria miocárdica; e anosmia, secundária à persistência da inflamação no neuroepitélio olfatório (CASTANARES-ZAPATERO D et al., 2022). Além disso, um importante e prevalente sintoma dentre pacientes com essa condição é a dor crônica, como mialgia, artralgia e cefaleia,

provavelmente associada à hiperativação simpática e a desregulação de atividade neural, bem como a fatores psicológicos e ambientais (SHANTHANNA H et al., 2022).

2.1.4 Biomarcadores na COVID-19

Biomarcadores são definidos como substâncias orgânicas mensuráveis objetivamente, utilizadas como indicadores de processo biológico ou patológico ou de resposta a intervenções terapêuticas. Na COVID-19, os biomarcadores podem ser usados, por exemplo, para suspeição precoce da doença, para confirmação e classificação da gravidade, para guiar tratamentos e para prever prognóstico (SAMPRATHI et al., 2021).

O conhecimento detalhado sobre a patogênese da infecção pelo SARS-CoV-2 permite a identificação de biomarcadores potenciais. Considerando a COVID-19 uma doença multissistêmica, torna-se ainda mais necessário o desenvolvimento de ferramentas que auxiliem no diagnóstico da infecção e de suas complicações potenciais. No decorrer da pandemia, alguns parâmetros baseados nas principais alterações desencadeadas pelo vírus em órgãos/sistemas específicos foram utilizados, na prática clínica, conforme descrito abaixo e sumarizado no Quadro 2.

- Hematológicos:
 - Linfócitos: encontram-se normais ou discretamente reduzidos nas fases iniciais e apresentam redução importante após 7 a 14 dias, coincidindo com o período inflamatório exacerbado. Linfopenia é diretamente relacionada à gravidade e mortalidade (SAMPRATHI M, 2021).
 - Neutrófilos: pacientes admitidos na terapia intensiva em geral apresentam neutrofilia, que está relacionada à maior gravidade, devido à excessiva geração de NETs, o que contribui para lesão endotelial e hipercoagulação (CHEN CH, 2022).
 - Plaquetas: tanto trombocitopenia quanto trombocitose foram observadas.
- Inflamatórios:
 - PCR: proteína de fase aguda não específica, induzida pela IL-6 no fígado, biomarcador sensível de inflamação, infecção e dano tecidual (CHEN CH, 2022).
 - Pró-calcitonina: glicoproteína precursora da calcitonina, sintetizada e liberada pelas células parafoliculares da tireoide, se eleva em 4 horas após início de infecção ou injúria aguda e retorna aos valores normais após 2-3 dias. Mais relacionada a infecções bacterianas, mas encontra-se relacionada também à gravidade da COVID-19 (CHEN CH, 2022).
 - Ferritina: proteína de fase aguda (CHEN CH, 2022).

- Citocinas: IL-6 está muito aumentada, encontra-se associada a maior gravidade e auxilia na monitorização à resposta terapêutica.
- Coagulação:
 - Tempo de Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial ativada: normal ou discretamente elevados.
 - Dímero D: produto de degradação da fibrina solúvel. Encontra-se elevado, possui valor prognóstico.

Quadro 2 – Principais biomarcadores da COVID-19 utilizados na prática atual

Órgão/sistema envolvido	Principais biomarcadores
Hematológico	Linfócitos, neutrófilos, plaquetas
Inflamatório	IL-6, TNF α , proteína C reativa, pró-calcitonina, ferritina
Coagulação	Dímero-D, fibrinogênio, tempo de tromboplastina parcial ativado, tempo de protrombina
Cardiológico	Troponina, peptídeo natriurético atrial
Respiratório	Pressões arteriais de oxigênio e gás carbônico
Hepático	Bilirrubina, transaminases, albumina
Renal	Creatinina, eletrólitos

Fonte: adaptado de SAMPRATHI et al., 2021

A variação temporal dos biomarcadores ao longo da infecção é importante para avaliar a progressão e a resposta à doença (SAMPRATHI et al., 2021). Considerando-se a fase inicial assintomática, seguida por fase aguda grave e fase de recuperação, pode-se dividir os marcadores de acordo com cada estágio, conforme o Quadro 3.

Quadro 3 – Relação entre tempo de infecção e biomarcadores

Tempo	Principais biomarcadores
Primeiros 7 dias: fase inicial oligossintomática	Linfopenia discreta
Entre 7 e 14 dias: casos moderados a graves	Linfopenia importante, neutrofilia e trombocitopenia Elevação de PCR, pró-calcitonina, ferritina, IL-6 Elevação de dímero-D Elevação dos marcadores de lesão orgânica: troponina, bilirrubina, transaminases, creatinina, desidrogenase láctica
A partir de 14 dias: fase de recuperação	Persistência das alterações desenvolvidas até o 14º dia indica pior prognóstico

Fonte: adaptado de CHEN et al., 2022 e SAMPRATHI et al., 2021

Abordando especificamente biomarcadores para avaliação prognóstica, alguns dos mencionados no Quadro 3 estão comprovadamente associados a piores desfechos, como

linfopenia, neutrofilia e trombocitopenia, além de níveis elevados de PCR e ferritina. Além desses parâmetros bioquímicos e hematológicos, outras alterações também podem indicar maior possibilidade de evolução para doença grave. Alterações nas populações celulares imunes, por exemplo, incluem elevação das frequências de monócitos imaturos, megacariócitos e células B e redução das frequências de células dendríticas e de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. A carga viral também atua como marcador de gravidade, sendo identificadas concentrações maiores no plasma de pacientes mais graves (PAPADOPOULOU et al., 2022).

2.1.5 Diagnóstico

O principal método diagnóstico utilizado mundialmente para a COVID-19 é o teste molecular conhecido como reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR), e o SARS-CoV-2 expressa várias moléculas-alvo que podem ser identificadas por essa técnica, como genes codificadores de proteínas estruturais (ZAHAN et al., 2022). As amostras analisadas são provenientes do trato respiratório e as taxas maiores de positividade ocorrem, em ordem decrescente, no lavado broncoalveolar, escarro, swab nasal e swab faríngeo (WIERSINGA et al., 2020). Um método alternativo ao RT-PCR que também utiliza amostras do trato respiratório é o teste rápido para detecção de antígenos virais, como proteínas. Comparativamente, essa técnica apresenta uma sensibilidade inferior, mas considerando-se sua rapidez, baixo custo e capacidade em detectar pacientes sintomáticos com alta carga viral e transmissibilidade, além de sua elevada especificidade, ela se torna aplicável. Ambos os métodos capazes de detectar moléculas virais em secreções respiratórias devem ser realizados principalmente entre o terceiro e o sétimo dia de sintomas (ZAHAN et al., 2022).

No entanto, em função da possibilidade de falsos-negativos, achados clínicos, laboratoriais e de imagem também podem ser usados para o diagnóstico presuntivo (WIERSINGA et al., 2020). Os achados clínicos incluem os sinais e sintomas já abordados previamente, bem como os achados laboratoriais, que caracteristicamente incluem linfopenia, elevação de PCR, trombocitopenia, aumento de dímero-D, entre outros. Já com relação à imagem, o método mais utilizado na COVID-19 é a tomografia computadorizada de tórax e seus principais achados na fase aguda da doença incluem opacidades em vidro fosco de distribuição predominantemente periférica e bilateral, pavimentação em mosaico e consolidações (ZAHAN et al., 2022).

Amostras sanguíneas, por sua vez, não são utilizadas para diagnóstico de infecções agudas por SARS-CoV-2, sendo seu uso importante para a determinação da soroprevalência e da vacinação na população (LAI et al., 2020). No entanto, apesar de verificarem a presença de anticorpos, os métodos sorológicos convencionais não avaliam necessariamente a resposta imune do indivíduo, uma vez que nem todos os anticorpos circulantes são neutralizantes

(WIERSINGA et al., 2020). Os anticorpos com maior capacidade neutralizante na COVID-19 normalmente se ligam à proteína S, principalmente à subunidade S1. O teste de neutralização por redução de placas de lise (PRNT) é considerado o teste padrão-ouro para a detecção e quantificação dos anticorpos neutralizantes, apresentando boa correlação com a imunidade protetora dos indivíduos. No entanto, além de despende grande quantidade de tempo para sua execução, o PRNT pode ser realizado somente em laboratórios de biossegurança nível 3. Alternativamente, ensaios de anticorpos pseudo-neutralizantes e testes de neutralização de proteínas virais foram desenvolvidos para substituí-lo quando necessário, por serem mais seguros e mais rápidos, além de apresentarem boa correlação com os resultados do teste padrão-ouro (ONG et al., 2021).

2.1.6 Tratamento e prevenção

Não há, até o momento, um tratamento comprovadamente curativo para a infecção pelo SARS-CoV-2. O manejo dos pacientes envolve o suporte clínico geral e algumas medidas associadas à redução da mortalidade em grupos específicos.

A primeira medida geral inclui a prevenção de tromboembolismo venoso (TEV), tendo em vista o potencial trombogênico associado à infecção. Indica-se a profilaxia com heparina a todos os pacientes internados e aos pacientes ambulatoriais de alto risco (KIM et al., 2022). Além disso, podem ser avaliados tratamentos empíricos para influenza e para pneumonia bacteriana associada (KIM et al., 2022).

No que tange os tratamentos específicos, a principal medida que vem sendo adotada durante a pandemia e que é comprovadamente eficaz na redução da mortalidade é o uso de dexametasona em pacientes com suporte de oxigênio durante 10 dias ou até a alta hospitalar. Outras opções incluem o uso de anticorpos monoclonais, como tocilizumab (inibidor da IL-6), o que deve ser avaliado caso a caso (KIM et al., 2022). Estudo publicado no *New England Journal of Medicine* (NEJM) em fevereiro de 2022, conduzido por Hammond e colaboradores, avaliou o uso de Nirmatrelvir, um inibidor de protease M do SARS-CoV-2 – enzima essencial para a replicação viral – como tratamento precoce em indivíduos de alto risco. Identificou-se que esse tratamento reduziu em 89% o risco de progressão para formas graves, sem eventos adversos graves (HAMMOND et al., 2022).

Como forma de prevenção, além das medidas educativas, como uso de máscaras, higiene das mãos e distanciamento social, em 2021, foram aprovadas e aplicadas as primeiras vacinas para COVID-19. Atualmente, após vacinação de grande parte da população brasileira e mundial, observa-se redução significativa da morbimortalidade associada à infecção (KIM et al., 2022).

2.2 Microvesículas

2.2.1 Conceitos e propriedades biológicas

As vesículas extracelulares (VEs) são vesículas envoltas por membranas liberadas por muitos organismos, desde os procariotos até seres humanos. Sua importância encontra-se na sua capacidade de transferir informações a outras células, por meio de categorias de biomoléculas distintas, incluindo proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e açúcares, dentre outros (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). Elas foram descritas pela primeira vez como partículas pró-coagulantes derivadas de plaquetas, em 1946, por Chargaff e West. Como descrito na Figura 4, atualmente, são descritos três subgrupos principais de vesículas extracelulares:

a) **Corpos apoptóticos:** liberados por brotamento durante os estágios finais de apoptose celular. Possuem diâmetro maior, de 1 a 4 micrômetros, expressam fosfatidilserina em sua superfície e representam um remanescente rico em DNA e histonas (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015).

b) **Microvesículas (MVs):** vesículas de diferentes diâmetros, que variam de 100 a 1.000 nanômetros (nm), liberadas por brotamento da membrana celular. Possuem fosfolipídeos e antígenos específicos da célula de origem em sua membrana – assim, as moléculas presentes na membrana das MVs podem servir como epítomos, identificados de acordo com os *cluster of differentiation* (CD) (MAUSE et al., 2010).

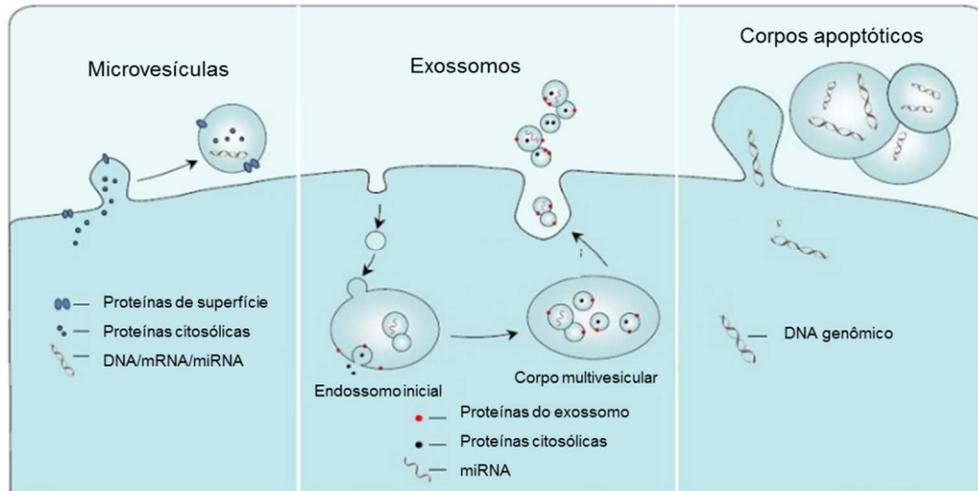
c) **Exossomos:** vesículas intraluminais pequenas, com diâmetro inferior a 100 nanômetros, contidas nos corpos multivesiculares e secretadas a partir da fusão destes com a membrana plasmática (MAUSE et al., 2010).

O Quadro 4 abaixo apresenta os principais aspectos relacionados às vesículas extracelulares.

Quadro 4 – Comparação entre os subtipos de vesículas extracelulares

Tipo	Corpo apoptótico	Microvesícula	Exossomo
Tamanho	Até 4.000 nm	100 a 1.000 nm	50 a 100 nm
Origem	Fragmentos celulares	Membrana plasmática	Corpos multivesiculares
Liberação	Apoptose terminal	Ativação celular e apoptose inicial	Constitutiva e/ou ativação celular
Capacidade de ligação à Anexina V	Alta	Alta	Baixa ou ausente
Marcadores proteicos	Histonas	Integrinas, selectinas e outros antígenos das células de origem	Proteína tetraspanina CD63

Fonte: adaptado de MAUSE et al., 2010.

Figura 4: Vesículas Extracelulares.

Fonte: adaptado de LAWSON et al., 2017.

A produção e a liberação das MVs ocorrem tanto por ativação celular secundária a estímulos – como estados pró-inflamatórios e pró-trombóticos – quanto por diferenciação celular, senescência e estados apoptóticos (MAUSE et al., 2010). Estímulos específicos conhecidos incluem substâncias estimuladoras, como endotoxinas e citocinas; lise parcial ou completa pelo sistema complemento; injúria oxidativa; e altas forças de cisalhamento (MOOBERRY et al., 2016). Sua composição não depende apenas da célula de origem, mas também do desencadeante e do microambiente de sua formação (MAUSE et al., 2010).

A reorganização da assimetria fosfolipídica da membrana celular, a partir da translocação de fosfatidilserina da superfície interna para a superfície externa da membrana, e consequente exposição do fosfolípido é um componente crítico na formação das MVs. Esse processo é

governado pela inibição de proteínas transportadoras de fosfolipídeos, como floppases e flippases, que em condições basais, preservam a assimetria fosfolipídica normal da membrana celular (MOOBERRY et al., 2016). Ativação ou injúria celular desencadeiam influxo de cálcio, um evento fundamental para inibição dessas proteínas, bem como para o remodelamento do esqueleto, por meio da ativação das calpaínas, uma família de proteases responsáveis pela degradação de proteínas do citoesqueleto, permitindo a formação e liberação das MVs na superfície celular. As MVs liberadas, a partir da ativação celular, são fenotípica e quantitativamente diferentes das MVs liberadas durante os estágios iniciais de apoptose (MAUSE et al., 2010).

A biodistribuição das MVs depende da célula parental de origem e da disponibilidade de diferentes tipos de células-alvo para internalizá-las. O nível de MVs circulantes reflete o balanço entre sua liberação e depuração e sua meia-vida depende da célula de origem e da capacidade de diferentes tipos celulares de as capturarem (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015).

Microvesículas circulantes em indivíduos saudáveis são derivadas principalmente de células sanguíneas e endoteliais (MOOBERRY et al., 2016), sendo as derivadas de plaquetas as mais abundantes, compreendendo cerca de 70% do total. No entanto, outras fontes são capazes de produzi-las e elevações em suas quantidades são marcadores de muitas doenças, incluindo autoimunes, aterosclerose, malignidades e infecções (MAUSE et al., 2010). A função das MVs depende do seu conteúdo e, conseqüentemente, da sua célula de origem (MURALIDHARAN-CHARI et al., 2019).

2.2.2 Funções das microvesículas

Um dos papéis mais conhecidos das MVs é sua atuação na hemostasia e, como já mencionado, sua primeira descrição ocorreu como “partículas pró-trombóticas”. Estima-se que a superfície externa de uma microvesícula derivada de plaqueta possua atividade pró-coagulante de 50 a 100 vezes maior *ex vivo* quando comparada à mesma área em uma plaqueta ativada (MOOBERRY et al., 2016). Por um lado, há uma importante ação pró-coagulante relacionada à presença de fosfatidilserina e de fator tecidual em sua superfície, como naquelas derivadas de plaquetas, monócitos, células endoteliais e hemácias. A presença de fosfolipídeos aniônicos, em especial a fosfatidilserina, proporciona superfície catalítica na membrana para início e manutenção do complexo de coagulação enzimático e o fator tecidual é o principal ativador da via extrínseca da cascata de coagulação (MOOBERRY et al., 2016 e YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). Além disso, MVs derivadas de hemácias e de plaquetas em experimentos *ex vivo* demonstraram capacidade de ativar a via intrínseca da cascata de coagulação de forma dependente do fator XII, bem como hemácias afoiçadas na anemia

falciforme demonstraram ativação da via intrínseca dependente do fator XI (MOOBERRY et al., 2016).

Por outro lado, existem evidências da capacidade regulatória, anticoagulante e fibrinolítica de alguns subtipos de MVs. Demonstrou-se a capacidade de MVs abrigarem, em suas membranas, inibidores da via do fator tecidual, além de ativarem a proteína C e a proteína S, fundamentais para a regulação da coagulação. Outro mecanismo é pela geração de plasmina, responsável pela degradação da fibrina e, conseqüentemente, dos coágulos (MOOBERRY et al., 2016 e YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). O equilíbrio entre as propriedades pró-coagulantes e anticoagulantes das MVs depende da célula de origem e do contexto e estímulo em que foram produzidas.

As microvesículas atuam também como veículos na sinalização e troca de informações intercelulares, tanto nas proximidades das células de origem quanto à distância, tendo em vista sua capacidade de percorrer distâncias pelos fluidos corporais (MURALIDHARAN-CHARI et al., 2019). Existem dois mecanismos principais pelos quais essa comunicação ocorre. O primeiro mecanismo é o fato de que MVs podem agir como sinalizadores circulantes, afetando as propriedades e as respostas celulares por ativação de receptores na célula-alvo via apresentação de moléculas bioativas associadas à sua membrana. Como exemplo, MVs derivadas de plaquetas podem atuar na propagação da resposta imune adaptativa por carregarem altas concentrações de CD40L. Além disso, em sítios distantes da ativação plaquetária, essas MVs podem ampliar a produção de IgG antígeno-específicas. Microvesículas podem também expor enzimas em sua superfície e, conseqüentemente, induzir ativação ou liberação de mediadores (MAUSE et al., 2010). Já o segundo mecanismo consiste na possibilidade de MVs mediar a sinalização pela transferência direta de parte do seu conteúdo, como proteínas (incluindo citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento), lipídeos bioativos (como o ácido aracdônico) e RNA, resultando, potencialmente, em ativação, modificações fenotípicas e reprogramação da função celular. Essa transferência pode ocorrer por interações transitórias ou pode requerer assimilação de membrana ou incorporação definitiva das MVs à célula-alvo (MAUSE et al., 2010). Além disso, a grande concentração de moléculas bioativas e de moléculas de superfície em um pequeno e compacto espaço contribui para a relevância do sistema de comunicação baseado nas MVs.

Todas essas características das microvesículas as tornam protagonistas da comunicação, em que informações específicas entre as células podem ser rapidamente compartilhadas e processos complexos, como imunorregulação e manutenção do equilíbrio hemostático, podem ser coordenados de forma mais eficiente. Sob certas condições fisiopatológicas, as

MVs podem, assim, perpetuar e agravar danos locais e processos gerais como inflamação, trombose e disseminação metastática do câncer (MAUSE et al., 2010).

As MVs são fundamentais atores também no sistema imunológico. Na imunidade inata, por um lado, elas atuam como mensageiros parácrinos, descritas como mediadores pró-inflamatórios, induzindo ou propagando sinais inflamatórios agudos ou crônicos. Por outro lado, MVs liberadas pelas células do sistema inato também podem atuar na regulação da inflamação e, assim, seus efeitos dependerão da célula de origem, do conteúdo e das células receptoras. MVs derivadas de macrófagos e monócitos, por exemplo, são capazes de transportar interleucinas e ligantes endógenos pró-inflamatórios e podem induzir apoptose em células musculares lisas a partir da transferência de caspase-1 (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015). Já em relação à imunidade adquirida, MVs liberadas por qualquer célula podem funcionar como fonte de antígeno para as células apresentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas e linfócitos B). A captura de MVs por essas células pode resultar em sinais estimulatórios ou inibitórios, contribuir para a apresentação de antígenos e/ou ativar resposta específica de células T. Além disso, as próprias células apresentadoras de antígeno podem liberar MVs e contribuir para a apresentação antigênica. MVs liberadas por células T podem induzir uma variedade de efeitos imunes de ativação ou supressão (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015).

2.2.3 Microvesículas em estados patológicos

Em estados patológicos, como na sepse, por exemplo, a atividade das MVs tem grande importância. Sepsé é caracterizada por uma resposta sistêmica complexa a uma infecção, que pode desencadear múltiplas disfunções orgânicas secundárias principalmente a alterações microvasculares. A injúria microvascular característica da sepse ocorre a partir de mecanismos como (1) estagnação do fluxo sanguíneo por alterações nas células circulatórias, como aumento da adesão leucocitária; (2) injúria nas células endoteliais; (3) injúria nas células parenquimatosas com disfunção mitocondrial e aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs); (4) estado de hipercoagulabilidade; (5) edema intersticial exacerbando a má perfusão tecidual. A injúria microvascular induzida pela sepse aumenta a liberação de microvesículas na circulação sistêmica e estas, por meio de suas ações pró-trombóticas, pró-inflamatórias e imunossupressoras, perpetuam os danos microvasculares. Além disso, o fato de poderem atuar à distância contribui para a disfunção multiorgânica (SOUZA et al., 2015). Do ponto de vista pró-inflamatório, MVs liberadas por células endoteliais e por leucócitos, aumentam a produção de citocinas, quimiocinas e a expressão de moléculas de adesão em pacientes sépticos (SOUZA et al., 2015). Em relação ao estado pró-trombótico, MVs – principalmente derivadas de plaquetas – aumentam a exposição de fator tecidual, a ativação do sistema de

coagulação e a geração de trombina, como já discutido. Já em relação à imunossupressão, dois terços dos pacientes sépticos morrem por um aumento da susceptibilidade a infecções secundárias durante um período de imunossupressão tardio, que pode durar semanas, enquanto apenas um terço morre na primeira semana devido à intensa resposta inflamatória (SOUZA et al., 2015). Sadallah e colaboradores, ao estudarem MVs na sepse, demonstraram que aquelas derivadas de concentrados de plaquetas humanas reduziram a liberação de TNF- α e de IL-10 por macrófagos ativados por lipopolissacarídeo. Além disso, MVs atenuaram a diferenciação de monócitos em células dendríticas imaturas, e foram capazes de diminuir a capacidade fagocítica destas (SADALLAH et al., 2011). Apesar de todos esses efeitos deletérios, as microvesículas também estão implicadas em respostas benéficas e sua função varia de acordo com a célula de origem e com o estímulo para sua produção.

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), por sua vez, é uma desordem pulmonar inflamatória que ocorre por precipitantes diretos, como pneumonia infecciosa e aspiração, ou indiretos, como peritonite ou pancreatite e que apresenta taxas elevadas de mortalidade, entre 35 e 45%. A contribuição das vesículas extracelulares em sua patogênese é objeto de estudo, visando a obtenção de marcadores para diagnóstico e prognóstico, bem como de possíveis alvos terapêuticos (MAHIDA et al., 2020).

Sabe-se que a injúria endotelial geralmente é o primeiro evento patológico que desencadeia a SDRA (MAHIDA et al., 2020). Buesing et al demonstraram que as MVs de células endoteliais contribuem para a injúria pulmonar por meio do estímulo à cascata de citocinas, como IL-1 β e TNF- α , fundamentais no início e na propagação da resposta inflamatória e responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos e, conseqüente liberação de mieloperoxidase no tecido pulmonar (BUESING et al., 2011). Além das MVs derivadas de células endoteliais, as MVs provenientes de macrófagos alveolares também desempenham papel relevante nos estímulos pró-inflamatórios iniciais, além de estimularem a liberação de MVs de células epiteliais e de neutrófilos, que também contribuem para a inflamação (MAHIDA et al., 2020).

Outro evento importante na SDRA são as anormalidades relacionadas à coagulação. O fator tecidual, principal desencadeante da cascata de coagulação, encontra-se aumentado nos pulmões de pacientes com SDRA. Bastarache et al. (2009) identificaram que as microvesículas derivadas das células epiteliais alveolares são uma das principais fontes de fator tecidual na síndrome. *In vitro*, essas células aumentaram a expressão de fator tecidual em resposta a estímulos pró-inflamatórios (BASTARACHE et al., 2009).

No entanto, há uma heterogeneidade no perfil das MVs, sendo identificados também efeitos protetores (MAHIDA et al., 2020). Guervilly et al. (2011), por exemplo, demonstraram que nos estágios iniciais da SDRA, o achado de maiores níveis de MVs derivadas de leucócitos no

lavado broncoalveolar e no plasma de pacientes em ventilação mecânica está associado ao aumento da sobrevivência e ao menor tempo sob ventilação mecânica (GUERVILLY et al., 2011). Além disso, alguns subtipos de MVs derivadas de leucócitos desempenham papel anti-inflamatório (MAHIDA et al., 2020).

Por fim, considerando a aplicabilidade das MVs na COVID-19 e a disfunção endotelial e os eventos trombóticos como fatores patogênicos centrais na disfunção orgânica múltipla associada à doença, Wang e colaboradores revisaram o papel de microvesículas circulantes como fatores trombogênicos na infecção por SARS-CoV-2 e constataram que as MVs são liberadas devido à injúria celular promovida pela lesão viral direta, pela hipoxemia, pela disfunção endotelial e pela resposta inflamatória. Isso reduz a produção e aumenta o consumo de ATP, promovendo o influxo celular de cálcio, o bloqueio das flippases e floppases, a exposição da fosfatidilserina na membrana externa e, por fim, a liberação das MVs. Essas, por sua vez, além de atuarem na comunicação intercelular próxima e à distância, funcionam como sítios para ativação da cascata de coagulação (WANG et al., 2022). Considerando o papel potencial das MVs na patogênese da COVID-19, Zahran e colaboradores desenvolveram estudo para avaliar se os níveis de MVs são afetados na infecção por SARS-CoV-2, comparando pacientes com e sem neoplasia infectados pelo vírus com pacientes saudáveis. Os resultados mostraram que os níveis totais de MVs foram maiores nos indivíduos infectados pelo vírus em comparação aos indivíduos saudáveis, com aumento das MVs derivadas de plaquetas e de células endoteliais. Além disso, dentre os indivíduos infectados, o número total de MVs foi maior naqueles com neoplasia, indicando que malignidades também estão associadas ao aumento das MVs (ZAHARAN et al., 2021).

Portanto, o estudo das microvesículas em estados patológicos inflamatórios e infecciosos, como a COVID-19, mostra-se relevante e promissor. Nesse aspecto, o projeto contribuirá para a caracterização do perfil de MVs em pacientes com COVID-19 e para a identificação de possíveis biomarcadores prognósticos a serem aplicados na prática clínica.

2.2.4 Análise de microvesículas

Como abordado previamente, a importância clínica das microvesículas aumenta progressivamente, porém não existe um método padrão para sua mensuração e várias técnicas foram empregadas para sua quantificação e caracterização (DEY-HAZRA E, 2010). Fatores pré-analíticos e analíticos devem ser cuidadosamente avaliados e os métodos aplicados dependerão dos objetivos de cada pesquisa.

Os métodos mais utilizados para o isolamento das MVs incluem centrifugação, exclusão por tamanho (uso de filtros e cromatografia), imunoafinidade, precipitação polimérica e

microfluídica, sendo a centrifugação o mais utilizado (WITWER KW, 2013). Existem diferentes protocolos de centrifugação, constituídos em sua maioria por duas etapas. Já em relação aos fatores analíticos, existem diferentes métodos de detecção, como a microscopia eletrônica e a microscopia de força atômica, que são relevantes para a análise da morfologia e do tamanho, porém de uso limitado para mensurar as concentrações. O principal método para estudo e análise qualitativa e quantitativa das MVs é a citometria de fluxo (WITWER KW, 2013).

3 Objetivos

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar o perfil de microvesículas circulantes como fator prognóstico da COVID-19 grave.

Objetivos específicos

Descrever aspectos clínicos e laboratoriais da população do estudo;

Quantificar o perfil cinético de microvesículas provenientes da circulação sistêmica;

Correlacionar o perfil das microvesículas sistêmicas com parâmetros clínicos e laboratoriais;

Avaliar um painel de marcadores sistêmicos, por análises discriminantes e de desempenho, como fator prognóstico da COVID-19.

4 População, Material e Métodos

4 POPULAÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Trata-se de estudo de coorte prospectiva exploratório, observacional e descritivo, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sob o Certificado de Apreciação de Apresentação Ética (CAAE) número 30846920.7.0000.0008. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi assinado pelos pacientes participantes ou por seus responsáveis no momento da inclusão no estudo.

4.2 Participantes e recrutamento

Durante o período de setembro de 2020 a março de 2021, 39 pacientes do Hospital Risoleta Tolentino Neves/Belo Horizonte, Minas Gerais, internados por COVID-19 foram convidados a participar do estudo de forma direta ou por meio do contato com seus responsáveis. Em linhas gerais, após a assinatura do TCLE, foi autorizada a utilização de seus dados clínicos e laboratoriais, além da coleta de amostras de sangue periférico para a análise de microvesículas. Não houve qualquer tipo de alteração no tratamento em virtude do presente estudo.

O diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 foi estabelecido, principalmente, a partir da realização do RT-PCR. Em alguns casos de teste molecular não realizado ou resultado não detectado, o diagnóstico de COVID-19 foi estabelecido com base nos critérios clínicos, laboratoriais e radiológicos de cada paciente. Os critérios de inclusão foram idade entre 18 e 80 anos e internação hospitalar em enfermaria ou em terapia intensiva. Já os critérios de exclusão foram imunodeficiência primária ou secundária (como pacientes transplantados, em uso de drogas imunossupressoras ou indivíduos convivendo com o vírus HIV) e gravidez.

Para o grupo controle foram recrutados 32 voluntários, de ambos os sexos, com idade variando entre 18 a 73 anos, média de 58 anos, mediana de 59 anos com intervalo interquartil de 51-63 anos, dentre profissionais de saúde e indivíduos que foram atendidos em ambulatório hospitalar para avaliação clínica de rotina no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, São Paulo e no Instituto Mário Penna, Belo Horizonte, Minas Gerais. Durante a aplicação do TCLE foi realizado um questionário para a coleta de informações gerais desta população de estudo. Para a composição desse grupo foram seguidos os critérios de exclusão mencionados previamente.

4.3 Cálculo amostral

No início do trabalho não existiam estudos prévios que avaliaram o perfil sérico das MVs na COVID-19, para que pudessemos basear o cálculo amostral. Além disso, a grande

variabilidade na metodologia de análise das MVs também limitaria esse cálculo. Logo, foi utilizada amostra de conveniência que se define pela disponibilidade de amostras e da exequibilidade do estudo.

4.4 Obtenção e processamento de amostras

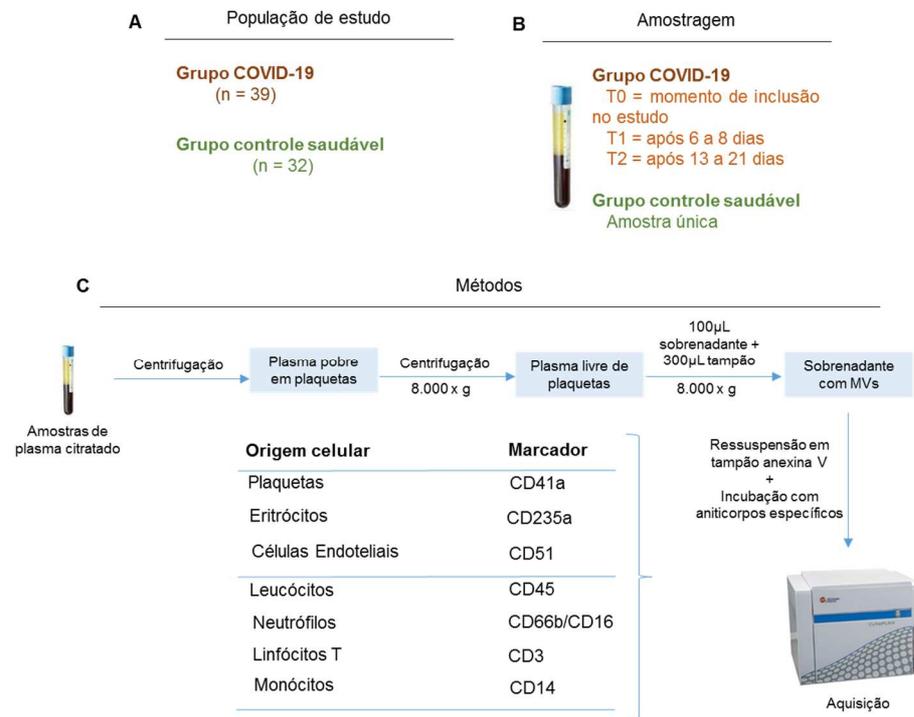
4.4.1 Coleta e obtenção do plasma pobre em plaquetas

Para a obtenção das MVs circulantes no sangue periférico dos indivíduos participantes do estudo, foi realizada a coleta por punção venosa em tubos a vácuo de 5 mL contendo citrato de sódio 3,2% (Biocon diagnósticos®), pelo corpo técnico do Hospital Risoleta Tolentino Neves, mediante autorização do setor responsável. Nos pacientes com COVID-19, sempre que possível, as amostras foram coletadas em três momentos:

- T0: logo após a admissão no estudo;
- T1: após 7 dias de internação;
- T2: após 14 a 21 dias de internação.

Após a coleta, o sangue foi centrifugado por 15 minutos a 800 x g em temperatura ambiente para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP) e, posteriormente, armazenado em freezer a -80°C no biorrepositório do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores do IRR - Fiocruz/Minas. O sumário executivo da população de estudo e os métodos empregados na análise de MVs estão apresentados na Figura 5.

Figura 5: Sumário executivo da população de estudo e dos métodos de análise



Fonte: o autor.

4.4.2 Purificação e imunofenotipagem de microvesículas

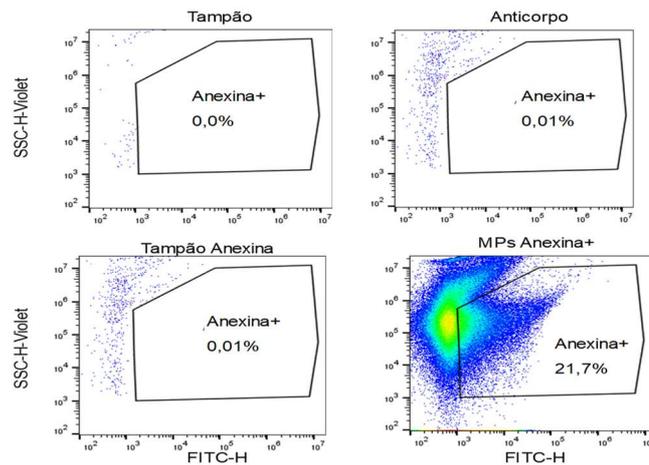
A purificação e a imunofenotipagem das MVs foram realizadas utilizando-se as amostras de PPP previamente coletadas e armazenadas em freezer a -80°C . Essas amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C e, em seguida, centrifugadas a $8.000 \times g$ para a obtenção do plasma livre de plaquetas (PLP). Após a centrifugação, $100 \mu\text{L}$ do sobrenadante foi coletado e adicionado a $300 \mu\text{L}$ de tampão citrato-heparina para cada marcação do painel. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a $8.000 \times g$, 15°C , por 90 minutos, sem desaceleração.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as MVs foram ressuspensas em tampão de ligação Anexina V (BD Biosciences, Califórnia, US) e foram incubadas com os anticorpos para a identificação de MVs derivadas de células endoteliais (CD51-PE), neutrófilos (CD66-PE e CD16-PE), linfócitos T (CD3-PE), plaquetas (CD41a-PerCP), leucócitos (CD45-APC), monócitos (CD14-PerCP) e eritrócitos (CD235a-PECy5), por 30 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Todas as amostras foram incubadas com Anexina V-FITC para a detecção das MVs (Quadro 5).

Quadro 5 – Marcadores celulares para identificação da origem das microvesículas

Fenótipo	Marcador	Clone	Concentração final
Microvesículas	Anexina V - FITC	DX2	0,50 µg/mL
Leucócitos	CD45-APC	HI30	0,20 µg/mL
Neutrófilos	CD66-PE	B1.1/CD66	0,15 µg/mL
	CD16-PE	3G8	0,20 µg/mL
Células endoteliais	CD51-PE	23C6	0,20 µg/mL
Eritrócitos	CD235a-PE-Cy5.5	GA-R2 (HIR2)	0,10 µg/ml
Linfócitos T	CD3-PE	HIT3a	0,10 µg/mL
Plaquetas	CD41a-PercP	HIP8	0,15 µg/mL
Monócitos	CD14- PercP	MEM-15	0,15 µg/mL

A quantificação das MVs circulantes foi realizada no citômetro de fluxo Cytoflex S (Beckman-Coulter, E.U.A.), após a calibração com microesferas fluorescentes de tamanhos definidos, que variam entre 100 a 900 nm. As MVs foram selecionadas por meio de gráficos bidimensionais de Anexina V-FITC *versus* granulidade (*Side Scatter* – SSC – medida por laser violeta para maior resolução da mensuração). Foram adquiridos cerca de 200.000 eventos por amostra, com, no mínimo, 50.000 eventos dentro da região específica de MVs. Também foram inseridos durante as aquisições controles da imunofenotipagem para certificação da ausência de MVs nas soluções empregadas ao longo do protocolo experimental (tampão, anticorpos e tampão Anexina V). A estratégia de análise empregada para avaliação das MVs por citometria de fluxo está apresentada na Figura 6.

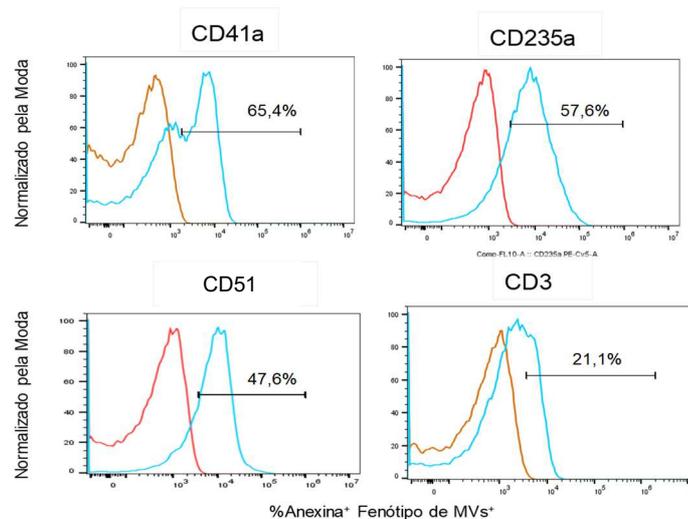
Figura 6: Estratégia de análise de MVs por citometria de fluxo.

As populações de microvesículas foram selecionadas de acordo com a positividade para o marcador Anexina V - FITC.
Fonte: o autor.

Para as análises dos dados gerados, foi utilizado o software FlowJo v.10.1.8 (Becton Dickinson), onde os gráficos bidimensionais de densidade *pseudocolor* para a seleção das MVs foram construídos considerando-se Anexina V-FITC *versus* granulidade de alta

resolução medida por laser violeta. A partir desta seleção, os marcadores fenotípicos de interesse foram avaliados pelo percentual de MVs positivas para cada população, em gráficos do tipo histograma do fenótipo de interesse *versus* o número de eventos adquiridos, permitindo-se a identificação e quantificação de cada população específica, a partir dos delimitadores de positividade, considerando-se a marcação inicial de Anexina V realizada na ausência dos anticorpos em comparação àquela realizada na presença dos anticorpos (Figura 7).

Figura 7: Histogramas representativos da análise de microvesículas por citometria de fluxo.



Foi realizado o estabelecimento dos delimitadores de positividade para cada fenótipo avaliado, a partir de amostras contendo apenas microvesículas e sem anticorpos (linhas vermelhas). As populações foram selecionadas de acordo com o perfil fenotípico e foi quantificada a frequência de cada tipo de MV (linhas azuis). A quantificação de MVs foi normalizada pela moda. Fonte: o autor.

4.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram armazenados em planilhas eletrônicas usando o programa EXCEL. Os dados foram armazenados e analisados por meio de ferramentas estatísticas apropriadas e dependendo da natureza dos dados, foram utilizadas estratégias distintas de análise, empregando-se os softwares GraphPad Prism v9.0 (San Diego, CA, EUA) e Minitab 17 (State College, PA, EUA) e a Plataforma R (Versão 2.15.3; <http://www.r-project.org>).

Em relação às características da população de estudo, as variáveis qualitativas foram expressas como frequências e porcentagens e as variáveis quantitativas foram expressas utilizando-se medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio padrão e intervalo interquartil). As análises de caracterização da população estudada foram

realizadas por meio do teste de qui-quadrado, utilizando-se como dado a frequência absoluta de cada grupo dentro da variável. Para avaliar a distribuição dos dados, foi executado o teste de Kolmogorov-Smirnoff e como os dados foram considerados não-paramétricos, a comparação entre dois grupos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Para comparação entre três grupos foi realizado o Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn, com intervalo de confiança de 95%. Para analisar a relação entre as variáveis qualitativas e quantitativas foi utilizado a correlação linear de Spearman. Para estabelecer modelos estatísticos preditivos da relação entre os biomarcadores imunológicos e os desfechos clínicos foi utilizada a análise discriminante. As análises univariadas foram conduzidas no programa VGAM da Plataforma R (Versão 2.15.3; <http://www.r-project.org>) e as análises multivariadas no software Minitab 17 (State College, Pennsylvania, USA) e na Plataforma R (Versão 2.15.3; <http://www.r-project.org>).

Para as análises de desempenho das microvesículas como biomarcadores, inicialmente foram determinadas as suas respectivas sensibilidade [(verdadeiro positivo/verdadeiro positivo + falso negativo) x 100] e especificidade [(verdadeiro negativo/verdadeiro negativo + falso positivo) x 100]. Posteriormente, foram construídas curvas ROC (*Receiver Operating Characteristics Curve* – SWETS, 1988) para melhor definição dos pontos de corte para cada MV avaliada e para avaliação da acurácia global. Por fim, foram calculadas também as razões de verossimilhança positiva (sensibilidade/1-especificidade) e negativa (1-sensibilidade/especificidade), conforme cada situação, viabilizando a análise de chance e probabilidade pós-teste. Em todos os casos, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.6 Pesquisa bibliográfica

Considerando-se a COVID-19, para a busca na base PUBMED utilizou-se como descritores os termos “SARS-CoV-2 virology”, “SARS-CoV-2 pathogenesis”, “COVID-19 pathophysiology”, “COVID-19 diagnosis”, “COVID-19 clinical manifestations”, “COVID-19 management and treatment”. Para MVs, utilizou-se os descritores “cell-derived microvesicles”, “cell-derived microparticles”, “microvesicles in thrombogenesis”, “microvesicles in COVID-19”. Os artigos selecionados são do período de 2000 a 2022 e as referências bibliográficas foram normatizadas segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), pelo sistema alfabético.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Perfil demográfico dos pacientes do grupo COVID-19

A Tabela 1 mostra informações detalhadas das características demográficas e clínicas dos integrantes do estudo. Dos 39 pacientes, 58,9% (23/39) são do sexo masculino, a média da idade é de 61,5 anos e a mediana de 62 anos. Do total, 76,9% (30/39) pacientes apresentaram carga viral detectável no RT-PCR para SARS-CoV-2. Dentre os pacientes incluídos, 34 possuíam comorbidades de risco para agravamento da COVID-19, sendo as três mais comuns hipertensão arterial (53,5%), diabetes mellitus (43,5%) e obesidade (38,4%). Todos os pacientes necessitaram de suporte de oxigênio, sendo invasivo em 79,4% (31/39) dos casos. Em relação aos desfechos, 17 (43,5%) pacientes receberam alta, 17 (43,5%) faleceram, 4 (10,2%) foram transferidos e 1 (2,5%) desistiu do estudo.

Tabela 1: Características demográficas e clínicas do grupo COVID-19

Características	Grupo COVID-19 n = 39
Idade (média/mediana em anos)	61,5 [M _d 62; σ 12,7; IIQ (69,5-56,5)]
Sexo masculino (n) %	23 (58,9%)
Comorbidades (n) %	
Hipertensão arterial	21 (53,5%)
Diabetes Mellitus	17 (43,5%)
Obesidade	15 (38,4%)
Tabagismo	8 (20,5%)
Outras	20 (51,2%)
Presentes	34 (87,1%)
Ausentes	5 (12,8%)
Resultado RT-PCR (n) %	
Detectável	30 (76,9%)
Não detectável	6 (15,3%)
Não testado	2 (5,1%)
Inconclusivo	1 (2,5%)
Suporte de oxigênio (n) %	
Não invasivo	8 (20,6%)
Ventilação mecânica	31 (79,4%)
Desfecho	
Alta	17 (43,5%)
Óbito	17 (43,5%)
Transferência	4 (10,2%)
Desistência	1 (2,5%)

M_d = mediana; σ = desvio padrão; IIQ = intervalo interquartil

5.2 Perfil hematológico dos pacientes do grupo COVID-19

As Tabelas 2 e 3 apresentam o perfil hematológico dos pacientes do grupo COVID-19 categorizados de acordo com o desfecho clínico, com base nos hemogramas realizados no laboratório do GIPB das amostras coletadas no tempo 0. A Tabela 2 apresenta o perfil da série vermelha e da contagem plaquetária nos referidos pacientes. Observa-se uma redução dos valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito no grupo COVID-19, sendo essa redução significativa no grupo óbito em relação ao grupo alta. Já a contagem de plaquetas encontra-se dentro dos valores de referência nos grupos analisados e não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos alta e óbito. A Tabela 3, por sua vez, apresenta o perfil da série branca do hemograma. Observa-se aumento dos leucócitos totais e dos granulócitos no grupo óbito, sendo esse aumento significativo em relação aos valores encontrados no grupo alta. Além disso, observa-se linfopenia no grupo alta, sendo essa redução significativa em relação aos valores normais de linfócitos encontrados no grupo óbito. Por fim, há também aumento significativo da razão granulócitos/linfócitos no grupo óbito em relação ao grupo alta.

Tabela 2– Perfil hematológico da Série Vermelha e Contagem de Plaquetas do hemograma dos pacientes do grupo COVID-19, categorizados segundo desfecho clínico

Parâmetros	Valor de referência	COVID-19 (n=39)	ALTA (n=17)	ÓBITO (n=17)	Valor de p [§]
Hemácias (x 10 ⁶ /mm ³)	3,8 - 5,8	2,97 (2,63-3,80)	3,6 (2,8-4,1)	2,7 (2,6-3,4) [#]	0,0367
Hemoglobina (g/dl)	11,0 - 16,5	8,8 (7,6-11,6)	11,2 (7,9-12,1)	8,5 (7,3-0,5) [#]	0,0231
Hematócrito (%)	35 - 50	26 (23-35)	33 (24-38)	24 (22-32) [#]	0,0367
Plaquetas (x 10 ³ /mm ³)	150 - 400	196 (143-258)	224 (170- 321)	196 (145-256)	0,6398

Os valores do Grupo COVID-19 e desfechos Alta e Óbito estão expressos em mediana e intervalo interquartil. # representa diferenças estatisticamente significativas entre o grupo Alta *versus* Óbito, § valores de p <0,05 foram considerados estatisticamente significativos e estão destacados em negrito na tabela. Fonte para os valores de referência: Dacie and Lewis – Practical Haematology. 12th Edition, 2017.

Tabela 3 – Perfil hematológico da Série Branca do hemograma dos pacientes do Grupo COVID-19, categorizados segundo desfecho clínico

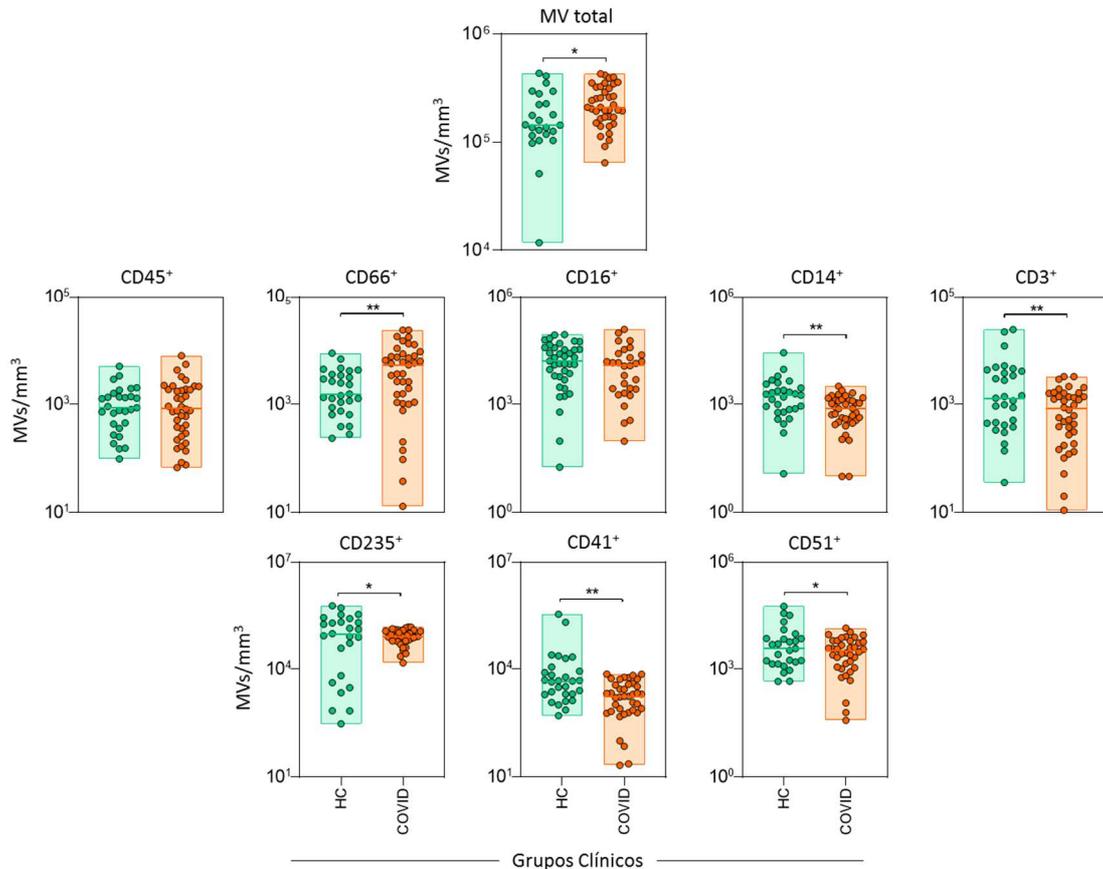
Parâmetros	Valor de referência	COVID-19	ALTA	ÓBITO	Valor de p [§]
Leucócitos (x 10 ³ /mm ³)	3,5 - 11,0	11,2 (7,5-19,3)	8,9 (6,0-11,2)	19,3 (11,5-23,0) [#]	0,0002
Granulócitos (x 10 ³ /mm ³)	1,2 - 6,8	8,9 (6,5-18,0)	6,9 (4,7-9,9)	16,4 (8,6-20,9) [#]	0,0012
Linfócitos (x 10 ³ /mm ³)	1,2 - 3,2	1,1 (1,0-1,8)	1,1 (0,9-1,2)	1,6 (1,1-1,9) [#]	0,0315
Monócitos (x 10 ³ /mm ³)	0,3 - 0,8	0,5 (0,4-0,8)	0,4 (0,3 -0,5)	0,7 (0,5-1,4) [#]	0,0070
Razão Gran/Linf	1,5 (1,1-1,8)	8,9 (4,1-14,5)	7,6 (3,9- 9,1)	11,0 (5,2-18,2) [#]	0,0457

Os valores do Grupo COVID-19 e desfechos Alta e Óbito estão expressos em mediana e intervalo interquartil. # representa diferenças estatisticamente significativas entre o grupo Alta versus Óbito, § valores de p <0,05 foram considerados estatisticamente significativos e estão destacados em negrito na tabela. Fonte para os valores de referência: Dacie and Lewis – Practical Haematology. 12th Edition, 2017.

5.3 Perfil panorâmico de microvesículas em pacientes do grupo COVID-19 e do grupo controle

A Figura 8 apresenta as contagens absolutas de microvesículas no plasma de pacientes do grupo COVID-19 no momento da inclusão no estudo (Tempo 0 – T0) e no plasma de integrantes do grupo controle. A análise dos dados demonstrou que houve aumento do número total de MVs no grupo COVID-19 comparado ao grupo controle. Quando a origem celular das MVs foi avaliada nos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, destacou-se o aumento significativo das MVs CD66⁺ (neutrófilos). Além disso, o grupo COVID-19 apresentou redução significativa das MVs CD14⁺ (monócitos), CD3⁺ (linfócitos T), CD235⁺ (eritrócitos), CD41⁺ (plaquetas) e CD51⁺ (células endoteliais) em relação ao grupo controle. Não foram observadas variações estatisticamente significativas nos níveis de MVs CD45⁺ (leucócitos) e CD16⁺ (neutrófilos) entre os dois grupos avaliados.

Figura 8: Perfil de microvesículas circulantes em pacientes COVID-19 e no grupo controle.



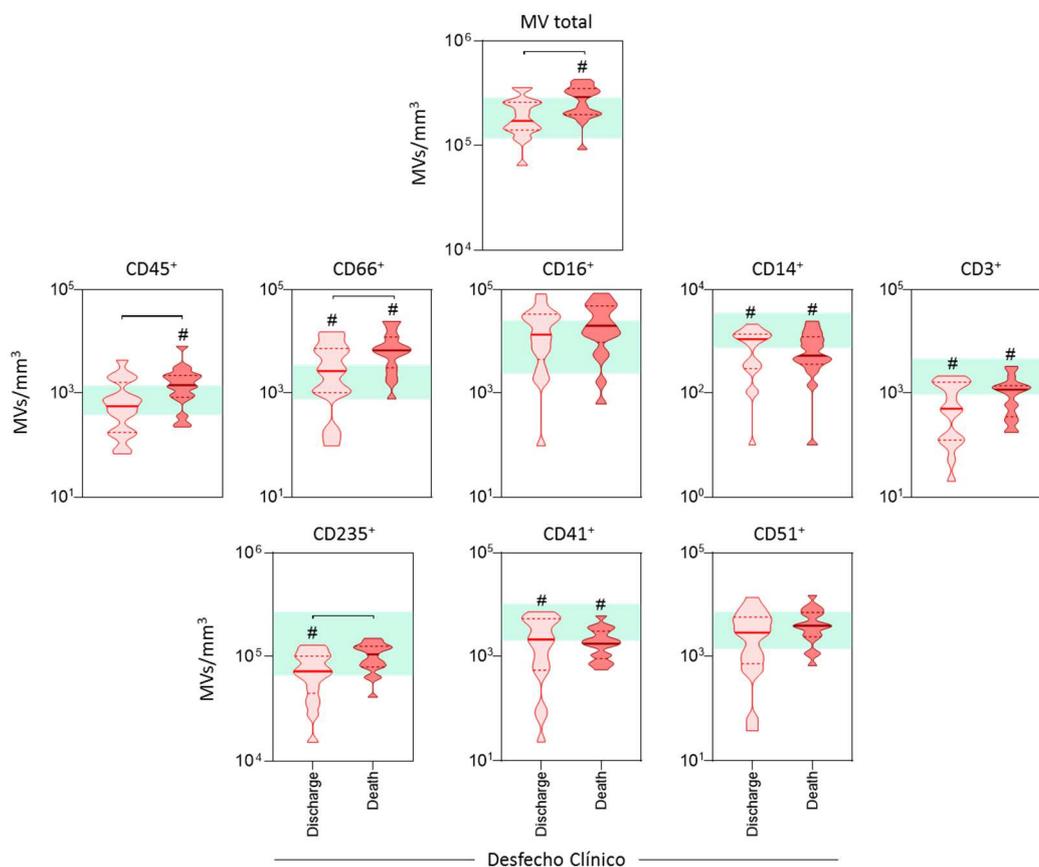
Perfil de microvesículas circulantes em pacientes com COVID-19 (grupo COVID, n=39) e indivíduos saudáveis constituindo o grupo controle do estudo (HC, n=32). Os dados estão apresentados como número absoluto de microvesículas (MVs) totais e subpopulações de MVs identificadas pelos respectivos fenótipos, derivadas de leucócitos (CD45⁺), neutrófilos (CD66⁺ ou CD16⁺), monócitos (CD14⁺), linfócitos T (CD3⁺), eritrócitos (CD235⁺), plaquetas (CD41⁺) e células endoteliais (CD51⁺) em gráficos de barras flutuantes, representando os valores máximo e mínimo encontrados, o valor da mediana em linhas, bem como os valores individuais por dispersão. Os dados significativos ($p < 0,05$) estão representados por linhas conectoras e o nível de significância por asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Fonte: o autor.

5.4 Perfil de microvesículas plasmáticas categorizados de acordo com o desfecho clínico

A Figura 9 mostra as contagens absolutas de microvesículas plasmáticas de pacientes do grupo COVID-19, no T0, categorizadas de acordo com o desfecho clínico de alta ou óbito. Além disso, a figura também apresenta as faixas de referência do grupo controle para comparação. A análise dos dados demonstrou um aumento significativo no número total de MVs no plasma de pacientes que evoluíram com óbito em relação aos pacientes que evoluíram com alta e ao grupo controle. No grupo óbito, observou-

se valores superiores de MVs CD45⁺ (leucócitos), CD3⁺ (linfócitos T) e CD66⁺ (neutrófilos) e redução de MVs CD14⁺ (monócitos) em relação ao grupo alta. Ainda no grupo óbito, observou-se valores superiores de MVs CD45⁺ (leucócitos) e de MVs CD66⁺ (neutrófilos) e redução de MVs CD14⁺ (monócitos), CD3⁺ (linfócitos T) e CD41⁺ (plaquetas) em relação ao grupo controle. Já em relação ao grupo alta, as MVs CD235⁺ (eritrócitos) encontraram-se reduzidas em comparação ao grupo controle e ao grupo óbito. As MVs CD16⁺ (neutrófilos) e CD51⁺ (células endoteliais) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos observados.

Figura 9: Perfil de microvesículas em pacientes com COVID-19 de acordo com o desfecho clínico



Perfil de microvesículas circulantes em pacientes com COVID-19, segregados por desfecho clínico como (grupo Alta, n=17) e (grupo Óbito, n=17). Os dados estão apresentados como número absoluto de microvesículas (MV) totais e subpopulações de MVs identificadas pelos respectivos fenótipos, derivadas de leucócitos (CD45⁺), neutrófilos (CD66⁺ ou CD16⁺), monócitos (CD14⁺), linfócitos T (CD3⁺), eritrócitos (CD235⁺), plaquetas (CD41⁺) e células endoteliais (CD51⁺) em gráficos de violino, representando os valores máximo e mínimo encontrados, o valor da mediana em linhas. A faixa de variação dos valores de indivíduos saudáveis (grupo Controle, n=32) está projetada atrás dos violinos como uma faixa verde claro. Os dados significativos ($p < 0,05$) estão representados por (#) na comparação entre os desfechos e o grupo controle e por linhas conectoras na comparação entre os desfechos clínicos.

5.5 Perfil cinético de microvesículas em pacientes do grupo COVID-19 de acordo com o tempo de sintomas, desde a inclusão no estudo

A Figura 10 apresenta o perfil cinético dos valores absolutos de MVs nos pacientes COVID-19, de acordo com o tempo do início dos sintomas em relação à inclusão no estudo. Os pacientes desse grupo foram divididos em 2 subgrupos, sendo o primeiro constituído por aqueles que se encontravam entre o 3º e o 13º dia após o início dos sintomas, no momento da inclusão no estudo (subgrupo precoce), e o segundo constituído pelos pacientes que se encontravam entre o 14º e o 31º dia, após o início dos sintomas (subgrupo tardio). As análises foram realizadas no momento da inclusão no estudo (Tempo 0 – T0), após 1 semana (Tempo 1 – T1) e após 2 a 3 semanas (Tempo 2 – T2).

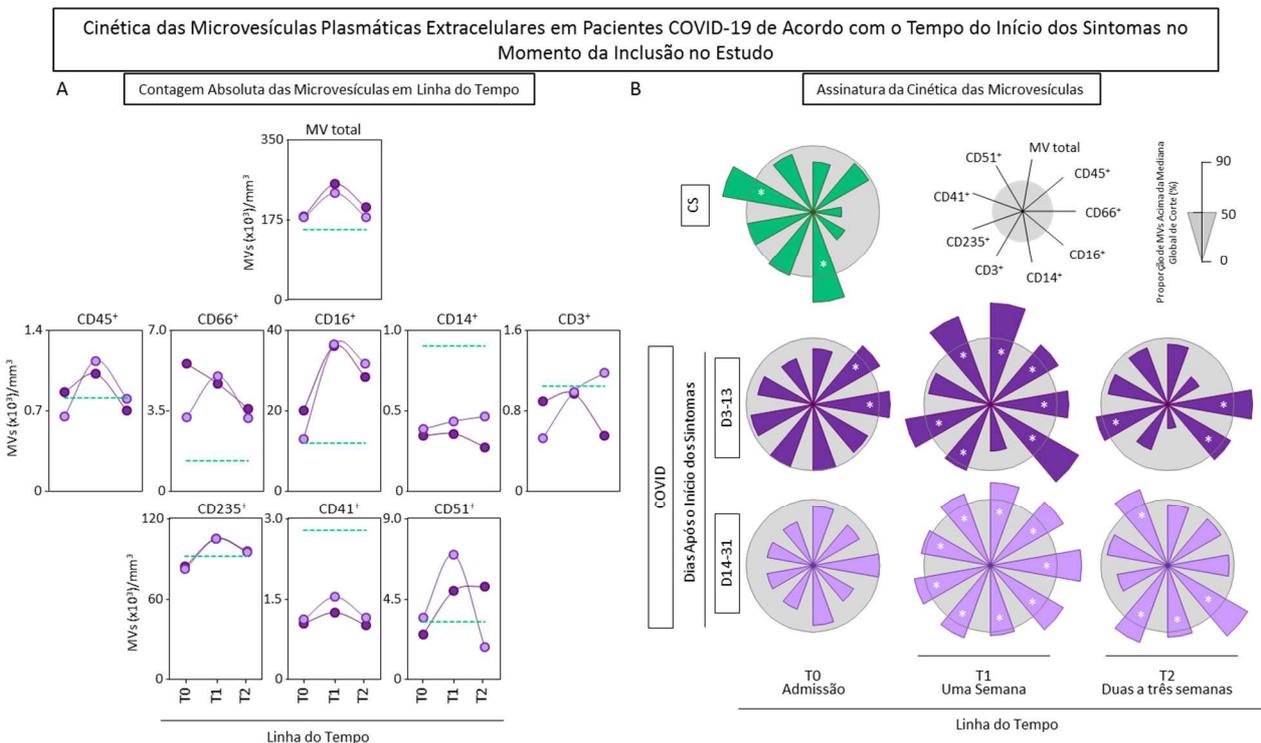
A Figura 10-A mostra os valores absolutos de MVs ao longo do tempo para cada um desses subgrupos e tem como linha de referência os valores encontrados no grupo controle. A análise dos dados demonstrou que as MVs totais, em ambos os subgrupos de pacientes COVID-19, apresentaram um aumento de T0 para T1, seguido por queda de T1 para T2, mas permaneceram superiores às do grupo controle nos três tempos de análise. Além disso, nos últimos 2 tempos, as MVs totais do subgrupo precoce encontravam-se ligeiramente superiores às do tardio. No subgrupo precoce, observou-se queda das MVs CD45⁺ (leucócitos), CD66⁺ (neutrófilos), CD14⁺ (monócitos), CD3⁺ (linfócitos T), CD41⁺ (plaquetas) e CD51⁺ (células endoteliais) ao longo do tempo, ao comparar os valores obtidos no T2 com os valores obtidos no T0. Em relação às MVs CD3⁺ (linfócitos T) observou-se, por um lado, um aumento progressivo dos níveis absolutos ao longo da cinética do subgrupo tardio – ultrapassando inclusive o valor do grupo controle – e, por outro lado, uma discreta ascensão seguida por queda acentuada dos níveis absolutos no subgrupo precoce. As MVs CD51⁺ (células endoteliais) apresentaram elevação importante no subgrupo precoce e no subgrupo tardio no T1 em comparação ao T0, mas em seguida, sofreram queda significativa no subgrupo precoce, enquanto mantiveram níveis estáveis no subgrupo tardio.

A Figura 10-B, por sua vez, apresenta a assinatura das MVs ao longo do tempo nos grupos controle e COVID-19 precoce e tardio. Observou-se nos subgrupos precoce e tardio um aumento inicial das MVs totais, seguido por queda no T2, porém, ambos mantiveram níveis superiores ao grupo controle, o que corrobora os achados da Figura 10-A. Destacou-se no subgrupo precoce valores elevados de MVs CD45⁺ (leucócitos) e de CD66⁺ (neutrófilos) no T0; manutenção de níveis elevados das MVs CD45⁺ (leucócitos) e CD66⁺ (neutrófilos) e, com exceção para as MVs CD14⁺ (monócitos),

houve aumento das MVs CD16⁺ (neutrófilos), CD3⁺ (linfócitos T), CD235⁺ (eritrócitos) e CD51⁺ (células endoteliais) no T1; manutenção de níveis elevados de CD66⁺ (neutrófilos), CD16⁺ (neutrófilos) e CD235⁺ (eritrócitos) no T2, com redução das demais MVs em comparação ao T1. No grupo tardio, por sua vez, destacou-se o aumento dos níveis de todas as MVs no T1 em relação ao T0 e o aumento dos níveis de MVs CD51⁺ (células endoteliais), CD3⁺ (linfócitos T), CD14⁺ (monócitos) e CD16⁺ (neutrófilos) no T2 em comparação ao T1. Adicionalmente, no grupo controle, observou-se valores elevados das MVs CD14⁺ (monócitos) e CD41⁺ (plaquetas).

Por fim, a Figura 10-C apresenta numericamente a proporção de pacientes dos grupos controle, COVID precoce e COVID tardio com níveis de MVs acima da mediana global de corte, considerando-se valores acima de 50% como supostos biomarcadores. No subgrupo COVID precoce, destacaram-se MVs CD45⁺ (leucócitos) e CD66⁺ (neutrófilos) no T0; MVs totais, CD45⁺ (leucócitos), CD66⁺ (neutrófilos), CD16⁺ (neutrófilos), CD3⁺ (linfócitos T), CD235⁺ (eritrócitos) e CD51⁺ (células endoteliais) no T1; CD66⁺ (neutrófilos) e CD235⁺ (eritrócitos) no T2. Já no subgrupo COVID tardio, não foram encontrados mais de 50% de pacientes com MVs acima da mediana global no T0, porém, todas as MVs apresentaram essa característica no T1; no T2, destacaram-se MVs CD16⁺ (neutrófilos), CD14⁺ (monócitos), CD3⁺ (linfócitos T) e CD51⁺ (células endoteliais). Outra informação relevante é que, no grupo controle, apenas as MVs CD14⁺ (monócitos) e CD41⁺ (plaquetas) apresentaram 50% dos pacientes com valores acima da mediana global.

Figura 10: Perfil cinético de microvesículas em pacientes do grupo COVID-19



C Proporção de Pacientes COVID e Controles Sádáveis com Níveis de Microvesículas Plasmáticas Extracelulares Acima da Mediana Global de Corte

Linha do Tempo da Cinética	Grupos	MV total	CD45 ⁺	CD66 ⁺	CD16 ⁺	CD14 ⁺	CD3 ⁺	CD235 ⁺	CD41 ⁺	CD51 ⁺		
											%	
Linha do Tempo	CS	%	38	48	21	28	69	52	50	69	46	
	T0 Na Admissão	(D3-13)	%	42	58	58	47	50	50	47	42	37
		(D14-31)	%	45	40	50	35	45	35	35	35	35
	T1 Uma Semana	(D3-13)	%	76	59	59	76	35	53	65	47	71
		(D14-31)	%	63	63	68	63	53	58	58	53	58
	T2 Duas-tres semanas	(D3-13)	%	45	27	64	55	18	36	55	45	45
(D14-31)		%	46	46	46	69	54	62	38	46	62	

* Valores acima de 50% foram destacados como supostos biomarcadores.

Perfil cinético de microvesículas em pacientes do grupo COVID-19 de acordo com o tempo de admissão no estudo e o tempo de sintomas, desde a inclusão no estudo. (A) Perfil cinético de microvesículas circulantes em pacientes com COVID-19, segregados por tempo de admissão no estudo (T0=admissão no estudo, T1=7 dias após e T2=14 a 21 dias após a admissão) em dois subgrupos, de acordo com o tempo de início de sintomas como Precoce (D3-13, n=19, linhas e círculos roxos escuros) e Tardio (D14-31, n=20, linhas e círculos roxos claros). Os dados estão apresentados como número absoluto de microvesículas (MVs) totais e subpopulações de MVs identificadas pelos respectivos fenótipos, derivadas de leucócitos (CD45⁺), neutrófilos (CD66⁺ ou CD16⁺), monócitos (CD14⁺), linfócitos T (CD3⁺), eritrócitos (CD235⁺), plaquetas (CD41⁺) e células endoteliais (CD51⁺) em gráficos de linha. As medianas dos valores encontradas para os indivíduos saudáveis (grupo Controle, n=32) estão inseridas como linhas pontilhadas verdes nos gráficos. (B) Assinatura da cinética de microvesículas em pacientes com COVID-19, segregados segundo dias após o início dos sintomas em dois subgrupos (Precoce - Dias 1 a 13, claves roxas escuras e Tardio - Dias 14 a 31, claves roxas claras). Os dados estão apresentados como proporção de microvesículas (MVs) totais e subpopulações de MVs identificadas pelos respectivos fenótipos, derivadas de leucócitos (CD45⁺), neutrófilos (CD66⁺ ou CD16⁺), monócitos (CD14⁺), linfócitos T (CD3⁺), eritrócitos (CD235⁺), plaquetas (CD41⁺) e células endoteliais (CD51⁺) em gráficos de radares, representando os valores proporcionais encontrados. As proporções de MVs dos indivíduos saudáveis (grupo Controle, n=) 32 estão apresentadas por gráfico de radar em claves verdes. As diferenças significativas entre as proporções estão assinadas por ciclos brancos dentro das respectivas claves. (C) Diagrama da linha do tempo da cinética de MVs, representando as proporções das MVs plasmáticas de pacientes do grupo COVID e indivíduos saudáveis do grupo Controle. Os parâmetros que apresentaram mediana global acima do corte de 50% foram destacados para identificar supostos biomarcadores potenciais assinalados com as respectivas cores dos grupos correspondentes no diagrama (verde=grupo controle, roxo escuro=D1-13 e roxo claro=D14-31). Fonte: o autor.

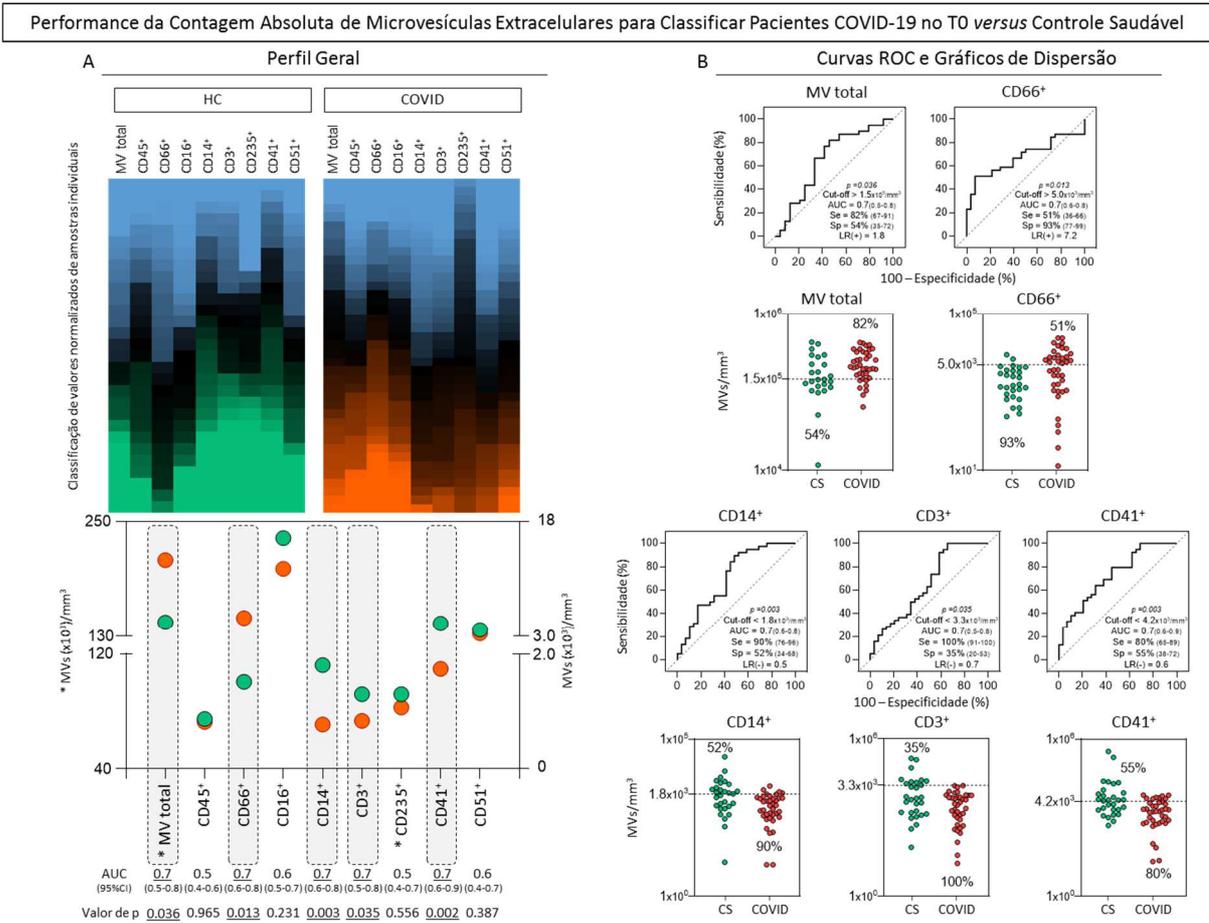
5.6 Análise de desempenho das contagens absolutas de MVs para classificar pacientes COVID-19 no T0 em comparação ao grupo controle saudável

A Figura 11-A apresenta um perfil geral das MVs, evidenciando valores superiores significativos de MVs totais e de MVs CD66⁺ (neutrófilos) em indivíduos do grupo COVID T0 comparados ao grupo controle, com valores de p de 0,036 e 0,013

respectivamente. Além disso, a análise mostra valores inferiores significativos de MVs CD14⁺ (monócitos), CD3⁺ (linfócitos T) e CD41⁺ (plaquetas) no grupo COVID comparado ao grupo controle, com valores de p de 0,003, 0,035 e 0,002, respectivamente. Essas diferenças podem ser visualizadas com clareza nos *heatmaps*.

A figura 11-B, por sua vez, apresenta curvas ROC e gráficos de dispersão referentes às MVs que apresentaram diferenças estatisticamente significativas para diferenciar os grupos COVID no T0 e controle saudável, identificadas na Figura 11-A. Os resultados das curvas ROC foram analisados utilizando-se variáveis de desempenho expressas em percentual (sensibilidade - Se e especificidade - Sp), bem como área sob a curva (AUC), indicando acurácia global. Além disso, foi calculada também a razão de verossimilhança (*Likelihood ratio* – LR). Os resultados demonstraram que todas as MVs analisadas [MVs totais, CD66⁺ (neutrófilos), CD14⁺ (monócitos), CD3⁺ (linfócitos T) e CD41⁺ (plaquetas)] apresentaram acurácia moderada (AUC= 0,7). As MVs totais, cujo ponto de corte foi $> 1,5 \times 10^5$, apresentaram desempenho moderado [Se=82% (IC 67-91); Sp=54% (IC 35-72) e LR+ = 1,8]; MVs CD66⁺ (neutrófilos), com ponto de corte $> 5 \times 10^3$, apresentaram desempenho também moderado, com destaque para a Sp de 93% (IC 77-99) e para a LR+ de 7,2; MVs CD14⁺ (monócitos), ponto de corte $< 1,8 \times 10^3$, apresentaram desempenho moderado com destaque para a Se de 90% (IC 76-96) e demonstrando LR- de 0,5; MVs CD3⁺ (linfócitos T), ponto de corte $< 3,3 \times 10^3$, apresentaram desempenho moderado com destaque importante para a Se de 100% (IC 91-100), demonstrando LR- de 0,7; MVs CD41⁺ (plaquetas), ponto de corte $< 4,2 \times 10^3$, apresentaram desempenho igualmente moderado [Se=80% (IC 65-89); Sp=55% (IC 38-72) e LR- = 0,6].

Figura 11: Perfil panorâmico do desempenho da contagem absoluta de microvesículas para classificar pacientes COVID-19 versus indivíduos saudáveis do grupo controle no T0.



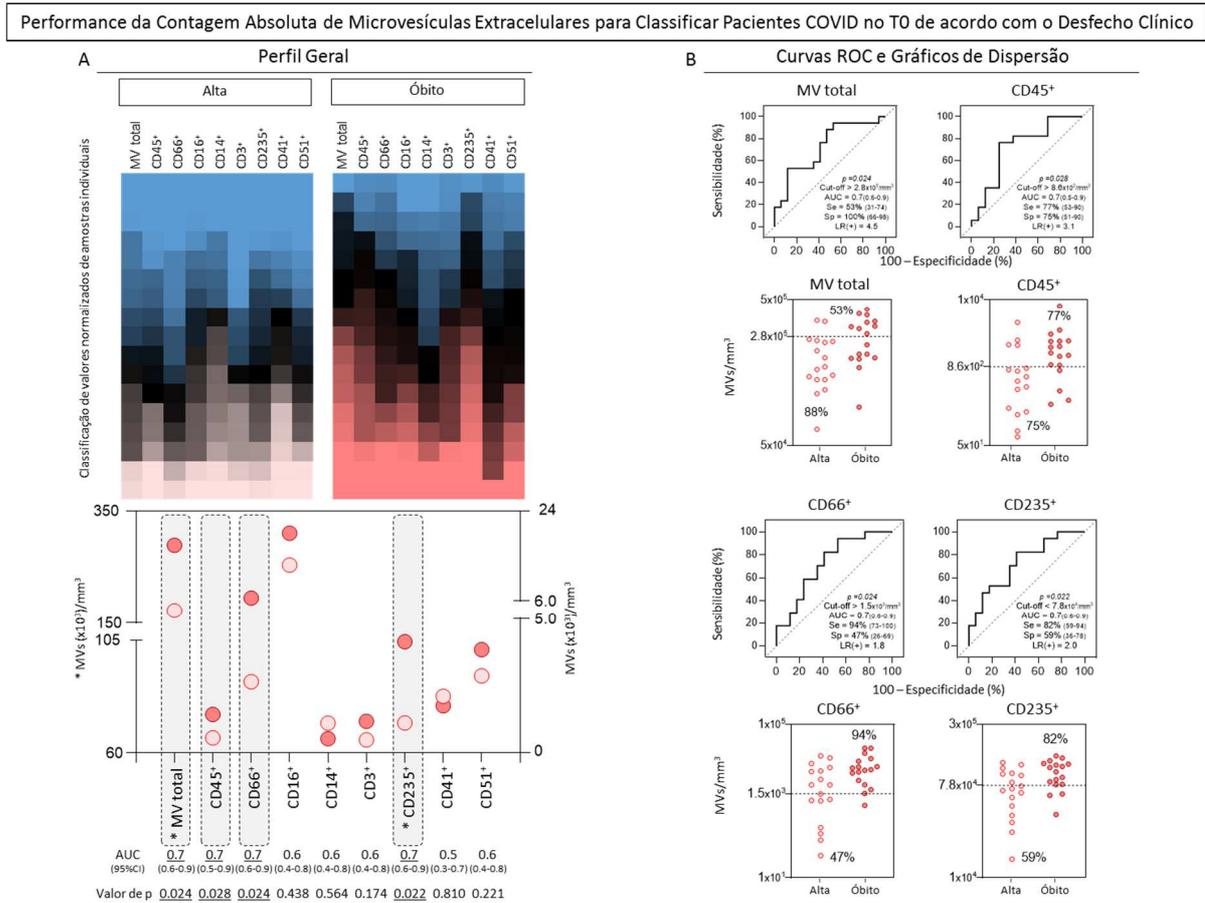
Perfil panorâmico do desempenho da contagem absoluta de microvesículas para classificar pacientes COVID-19 versus indivíduos saudáveis do grupo controle no T0. (A) Perfil geral de microvesículas (MVs) circulantes em pacientes com COVID-19 (n=39, cor verde) e indivíduos do grupo Controle (n=32, cor laranja). Os dados estão apresentados como mapas de calor com intensidades ascendentes (verde ou laranja - valores individuais maiores, preto - valores neutros e azul - valores individuais menores) e análise comparativa do número de MVs normalizadas pela mediana da população estudada para análise de MVs totais e subpopulações de MVs identificadas pelos respectivos fenótipos, derivadas de leucócitos (CD45⁺), neutrófilos (CD66⁺ ou CD16⁺), monócitos (CD14⁺), linfócitos T (CD3⁺), eritrócitos (CD235⁺), plaquetas (CD41⁺) e células endoteliais (CD51⁺). Os valores de área sob a curva (AUC), bem como os valores de p foram adicionados embaixo do gráfico e as barras cinzas pontilhadas destacam as MVs que apresentaram diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) na análise comparativa entre os grupos. (B) Curvas ROC e gráficos de dispersão considerando as MVs que apresentaram diferenças estatisticamente significativas na análise comparativa entre os grupos - MVs totais e subpopulações de MVs identificadas pelos respectivos fenótipos, derivadas de neutrófilos (CD66⁺), monócitos (CD14⁺), linfócitos T (CD3⁺) e plaquetas (CD41⁺). Dentro das curvas estão apresentados os limites de corte, áreas sob a curva (AUC), valores de sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) e razões de verossimilhança (*Likelihood ratio* - LR). Nos gráficos de dispersão, as linhas tracejadas representam os limites de corte e as proporções inseridas nos gráficos os valores de Se e Sp. Em todos os casos, valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Fonte: o autor.

5.7 Análise de desempenho das contagens absolutas de MVs para classificarem pacientes COVID-19 no T0 de acordo com o desfecho clínico

A Figura 12-A apresenta um perfil geral das MVs, evidenciando valores superiores significativos de MVs totais no grupo óbito em relação ao grupo alta, com valor de p de 0,024. Além disso, o grupo óbito também apresentou valores superiores significativos das MVs CD45⁺ (leucócitos), CD66⁺ (neutrófilos) e CD235⁺ (eritrócitos), com valores de p de 0,028, 0,024 e 0,022, respectivamente. Essas diferenças podem ser visualizadas com clareza nos *heatmaps*.

A Figura 12-B, por sua vez, apresenta curvas ROC e gráficos de dispersão referentes às MVs que apresentaram diferenças significativas para diferenciar, no T0, os grupos COVID com desfechos de alta e óbito, identificados na Figura 12-A [MVs totais, CD45⁺ (leucócitos), CD66⁺ (neutrófilos) e CD235⁺ (eritrócitos)]. Os resultados das curvas ROC foram analisados utilizando-se variáveis de desempenho expressas em percentual (sensibilidade - Se e especificidade - Sp), bem como área sob a curva (AUC) indicando acurácia global. Além disso, foi calculada também a razão de verossimilhança (*Likelihood ratio* – LR). Os resultados demonstraram que todas as MVs analisadas apresentaram acurácia moderada (AUC=0,7). As MVs totais, cujo ponto de corte foi $> 2,8 \times 10^5$, apresentaram desempenho moderado, com LR+ de 4,5; MVs CD45⁺ (leucócitos), com ponto de corte $> 8,6 \times 10^2$, apresentaram desempenho moderado [Se=77% (IC 53-90); Sp=75% (IC 51-90) e LR+ = 3,1]; MVs CD66⁺ (neutrófilos), ponto de corte $> 1,5 \times 10^3$, apresentaram desempenho moderado com destaque para a Se de 94% (IC 73-100) e LR+ = 1,8; MVs CD235⁺ (eritrócitos), ponto de corte $7,8 \times 10^4$, apresentaram desempenho também moderado [Se=82% (IC 54-94); Sp=59% (36-78) e LR+ = 2,0].

Figura 12: Perfil panorâmico do desempenho da contagem absoluta de microvesículas para classificar pacientes COVID-19 segundo desfecho clínico, Alta versus Óbito.



Perfil panorâmico do desempenho da contagem absoluta de microvesículas para classificar pacientes COVID-19 segundo desfecho clínico, Alta versus Óbito. (A) Perfil geral de microvesículas (MVs) circulantes no grupo Alta (n=17, cor rosa claro) e grupo Óbito (n=17, cor rosa escuro). Os dados estão apresentados como mapas de calor com intensidades ascendentes (rosa claro ou rosa escuro - valores individuais maiores, preto - valores neutros e azul - valores individuais menores) e análise comparativa do número de MVs normalizadas pela mediana da população estudada para análise de MVs totais e subpopulações de MVs identificadas pelos respectivos fenótipos, derivadas de leucócitos (CD45⁺), neutrófilos (CD66⁺ ou CD16⁺), monócitos (CD14⁺), linfócitos T (CD3⁺), eritrócitos (CD235⁺), plaquetas (CD41⁺) e células endoteliais (CD51⁺). Os valores de área sob a curva (AUC), bem como os valores de p foram adicionados embaixo do gráfico e as barras cinzas pontilhadas destacam as MVs que apresentaram diferenças estatisticamente significativas (p<0,05) na análise comparativa entre os grupos - MVs totais e subpopulações de MVs identificadas pelos respectivos fenótipos, derivadas de leucócitos (CD45⁺), neutrófilos (CD66⁺) e eritrócitos (CD235⁺). (B) Curvas ROC e gráficos de dispersão considerando as MVs que apresentaram diferenças estatisticamente significativas na análise comparativa - MVs totais e subpopulações de MVs identificadas pelos respectivos fenótipos, derivadas de leucócitos (CD45⁺), neutrófilos (CD66⁺) e eritrócitos (CD235⁺). Dentro das curvas estão apresentados os limites de corte, áreas sob a curva (AUC), valores de sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) e razões de verossimilhança (*Likelihood ratio* - LR). Nos gráficos de dispersão, as linhas tracejadas representam os limites de corte e as proporções inseridas nos gráficos os valores de Se e Sp. Em todos os casos, valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Fonte: o autor.

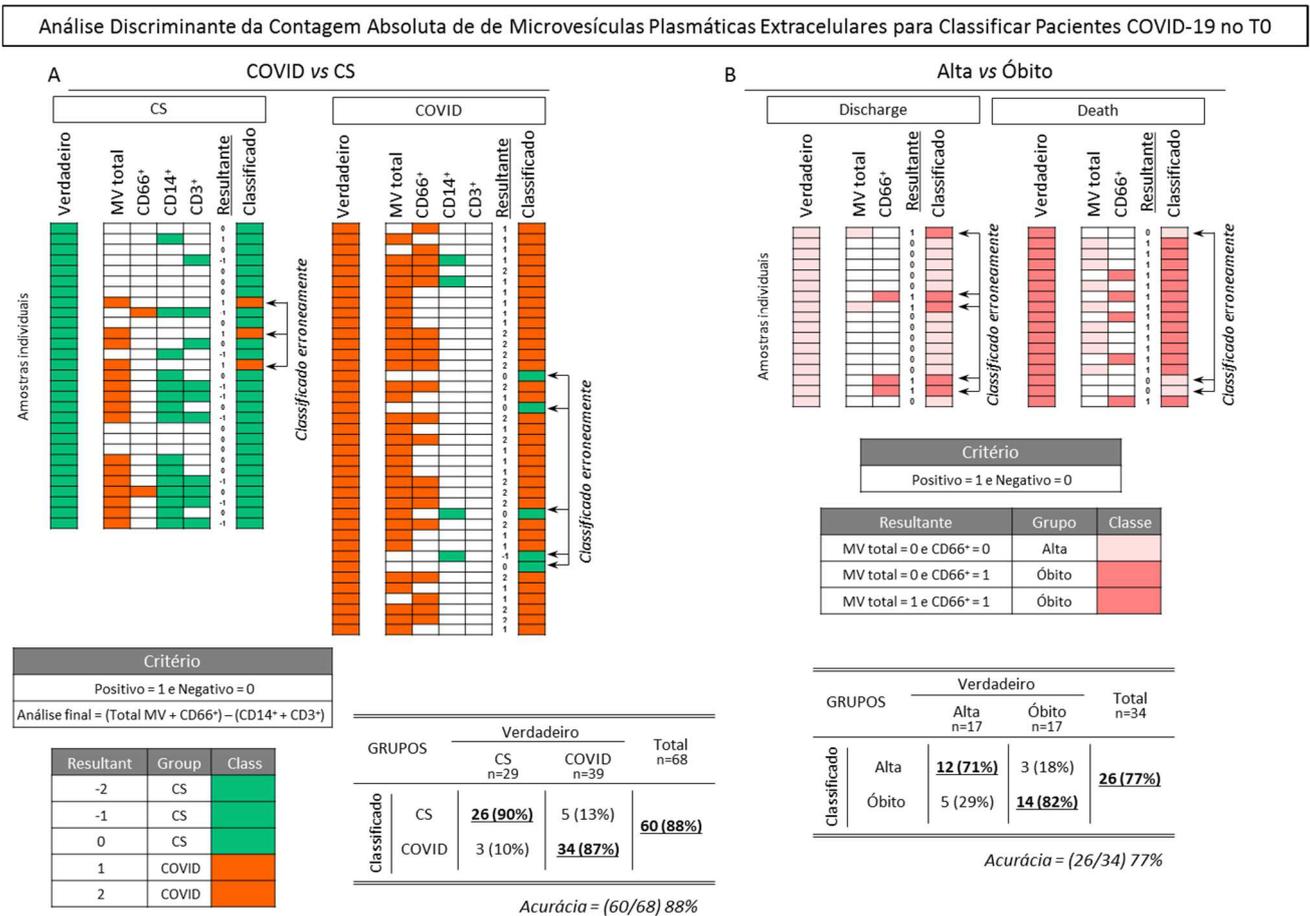
5.8 Análise discriminante univariada de MVs para classificar pacientes COVID no T0

A Figura 13 representa, de forma ilustrativa e panorâmica, a análise discriminante univariada dos resultados observados nos subgrupos COVID T0 *versus* controle e alta *versus* óbito, apresentada nas Figuras 12-A e 12-B, respectivamente.

A Figura 13-A apresenta a proposta de critério para diferenciar o grupo COVID no T0 do grupo controle. Foi desenvolvida a fórmula $[(\text{Total MV} + \text{CD66}^+) - (\text{CD14}^+ + \text{CD3}^+)]$, com base no uso das MVs identificadas e analisadas na Figura 12-A, como biomarcadores em conjunto. Nessa análise univariada, foram considerados positivos os indivíduos que pontuaram 1 ou 2 na fórmula. No grupo controle, apenas 3 pacientes (10%) foram classificados de forma incorreta como falsos positivos e, no grupo COVID, 5 pacientes (13%) foram erroneamente classificados como falsos negativos, resultando em uma acurácia de 88% para diferenciar o grupo COVID do grupo controle saudável no T0.

Já a Figura 13-B propõe a análise das MVs totais e das MVs CD66⁺ como biomarcadores em conjunto para classificação do desfecho alta ou óbito de pacientes COVID no T0. Nessa análise univariada, foram considerados positivos os indivíduos que apresentaram valores aumentados de MVs totais (ponto de corte $> 2,8 \times 10^5$) e de MVs CD66⁺ (ponto de corte $> 1,5 \times 10^3$) ou valores de MVs CD66⁺ isoladamente aumentados. Utilizando-se esse critério, dentre os indivíduos que evoluíram com alta, 5 (29%) foram erroneamente classificados como óbito e, dentre o grupo cujo desfecho foi óbito, apenas 3 (18%) foram classificados de forma incorreta como alta, demonstrando assim uma acurácia de 77% para diferenciar o grupo COVID no T0 em relação aos desfechos clínicos mencionados.

Figura 13: Análise discriminante univariada de MVs para classificar pacientes COVID versus grupo Controle, e pacientes COVID, segundo desfecho clínico.



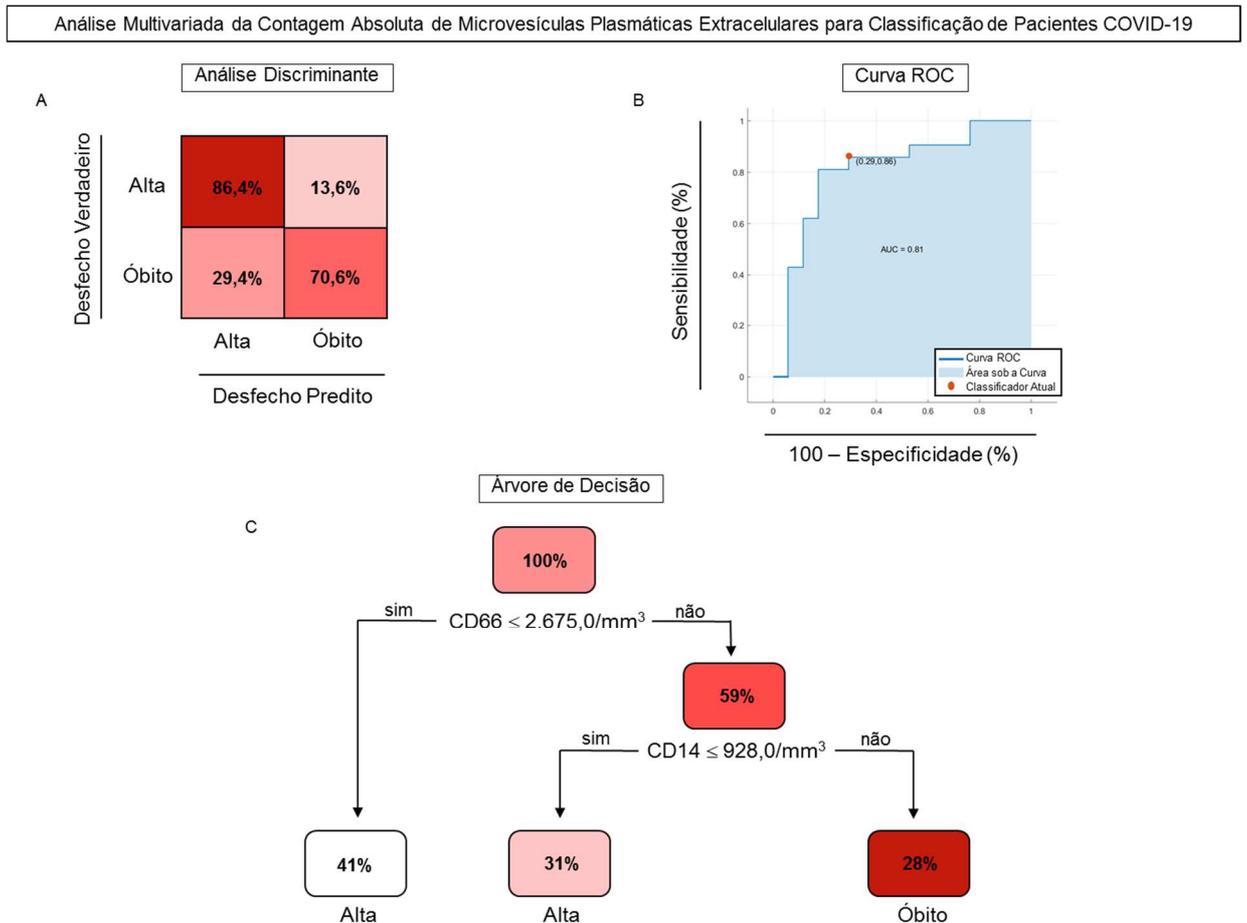
Análise discriminante univariada de MVs para classificar pacientes COVID versus grupo Controle, e pacientes COVID, segundo desfecho clínico, em Alta versus Óbito no tempo de admissão no estudo (T0). (A) Modelo classificatório proposto para discriminar pacientes COVID (n=39, laranja) de indivíduos saudáveis (n=32, verde) com resultante classificatória obtida, a partir de critério matemático definido. Estão apresentados em diagramas os valores individuais (verdadeiros e resultantes) da análise discriminante, e em tabelas, os critérios matemáticos propostos, os resultados possíveis e o desempenho final com o valor da acurácia global obtido. (B) Modelo classificatório proposto para discriminar pacientes COVID do grupo Alta (n=17, rosa claro) do grupo Óbito (n=17, rosa escuro) com resultante classificatória obtida, a partir de critério categórico definido. Estão apresentados em diagramas os valores individuais (verdadeiros e resultantes) da análise discriminante, e em tabelas, os critérios categóricos propostos, os resultados possíveis e o desempenho final com o valor da acurácia global obtido. Fonte: o autor.

5.9 Análise discriminante multivariada de MVs para classificar pacientes COVID, segundo desfecho clínico no T0

A partir das análises univariadas e da seleção dos biomarcadores CD66⁺, CD14⁺, CD235⁺ e CD51⁺ que melhor discriminaram os desfechos clínicos da COVID-19, foram estabelecidas a primeiro e o segundo componentes principais no T0 com os seguintes pesos para cada

biomarcador: 0,519 e 0,266 para CD66⁺; 0,499 e -0,459 para CD14⁺; 0,434 e 0,735 para CD235⁺; e 0,541 e -0,422 para CD51⁺. A partir da análise dos componentes principais, o segundo componente foi selecionado para composição do índice MV-COV descrito na Figura 14.

Figura 14: Modelo multivariado preditivo de classificação do desfecho clínico da COVID-19 pelo índice MV-COV.



Modelo multivariado preditivo de classificação do desfecho clínico da COVID-19 pelo índice MV-COV. (A) Quadros de desfechos verdadeiros e preditos do modelo ajustado indicam ótimo resultado para classificação do desfecho ALTA e bom resultado para o desfecho ÓBITO. A intensidade da cor de cada quadrado é proporcional à associação estatística. (B) Curva ROC do modelo multivariado preditivo de classificação do desfecho clínico da COVID-19 pelo índice MV-COV, apresentando área sob a curva de 81%, sensibilidade de 29% e especificidade de 86%. (C) Árvore classificatória do desfecho clínico da COVID-19 pelo índice MV-COV indicando a localização e a participação dos biomarcadores CD66⁺ e CD14⁺ como nó e atributo, respectivamente, e os percentuais de chance das classes ALTA e ÓBITO. Fonte: o autor.

A Figura 14 apresenta o resultado gráfico do modelo preditivo ajustado de classificação e a árvore classificatória do desfecho clínico da COVID-19 pelo índice MV-COV. A Figura 14-A mostra quadros relacionando os desfechos verdadeiros e os desfechos preditos com base no índice proposto, nos quais a intensidade da cor é proporcional à associação estatística. Os

resultados demonstraram que o índice MV-COV definiu corretamente os desfechos alta e óbito em 86,4% e 70,6% dos casos, respectivamente, indicando ótimo resultado para classificação do desfecho alta e bom resultado para o desfecho óbito. Entretanto, também foram observados os percentuais de 13,6% e 29,4% de classificações incorretas ou taxa de falso negativo dos desfechos alta e óbito, respectivamente. Já a Figura 14-B apresenta a curva ROC do modelo multivariado preditivo de classificação do desfecho clínico da COVID-19 pelo índice MV-COV. Os resultados das curvas ROC foram analisados utilizando-se variáveis de desempenho expressas em percentual (Sensibilidade-Se e Especificidade-Sp), bem como a área sob a curva (AUC) indicando acurácia global. Como resultado, foram obtidos Se=29%, Sp=86% e AUC de 81%. A Figura 14-C, por sua vez, representa a árvore classificatória do desfecho clínico da COVID-19 pelo índice MV-COV, indicando a localização e a participação dos biomarcadores CD66⁺ e CD14⁺ como nó e atributo, respectivamente, e os percentuais de chance das classes alta e óbito. Observa-se que desfechos melhores estão associados a níveis menores de MVs CD66⁺, indicando 41% de chance de óbito e, dentro o subgrupo com valores superiores a 2.675,0/mm³, valores de MVs CD14⁺ também elevados (acima de 928,0/mm³) indicam 28% de chance de óbito, enquanto valores menores ou iguais a 928,0/mm³ indicam 31% de chance de alta.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A pandemia ocasionada pela COVID-19 é considerada um grande desafio para a ciência, tendo em vista seus grandes impactos na saúde mundial e a conseqüente necessidade de desenvolvimento de métodos de diagnóstico, prevenção e prognóstico em um curto intervalo de tempo. As MVs, por sua vez, encontram-se em emergência para atuação como biomarcadores e até mesmo como possibilidades terapêuticas em processos inflamatórios e infecciosos (POCSFALVI et al., 2020). Diante disso, o presente estudo buscou avaliar o perfil das MVs em pacientes com COVID-19 internados e compará-lo a indivíduos controles saudáveis, para identificação de possíveis biomarcadores prognósticos.

Inicialmente abordando as principais características da população estudada, observou-se entre os pacientes do grupo COVID uma idade média de 61,5 anos e uma predominância discreta no sexo masculino. Esses dados vão ao encontro das características demográficas mencionadas por Raineri et al. e por Campello et al., ambos os trabalhos publicados em 2022, cujas populações de estudo também demonstraram que a distribuição etária não é uniforme entre os pacientes internados pela doença, pois tende a ser maior em faixas etárias mais avançadas, além de apresentar discreta predominância no sexo masculino. Estudo publicado por Alves et al., também em 2022, avaliou o perfil de pacientes adultos internados em terapia intensiva e também reforça a predominância em indivíduos mais velhos e do sexo masculino. Além disso, esse estudo analisou também a presença de comorbidades, presentes em 83% dos pacientes, sendo as mais comuns: hipertensão arterial, obesidade e diabetes mellitus, nessa ordem. Tais dados estão de acordo com os achados na população do presente estudo, em que mais de 85% dos pacientes apresentavam comorbidades, sendo também as mais prevalentes: hipertensão arterial, diabetes mellitus e obesidade.

Outra característica relevante na população estudada foi a necessidade ou não de ventilação mecânica invasiva e sua relação ao desfecho clínico. Dos 39 pacientes incluídos no estudo, 31 foram submetidos à intubação orotraqueal (IOT) e, desses 31 pacientes, 17 evoluíram a óbito, o que corresponde a 54,8% de óbito dentre os pacientes intubados e a 100% dos pacientes do estudo cujo desfecho clínico foi óbito. Conforme explicitado por Hajjar L em 2021, a necessidade de ventilação invasiva é guiada por critérios clínicos que indicam maior gravidade e, possivelmente, maior chance de óbito em decorrência da doença. No entanto, sabe-se que a própria ventilação mecânica pode agravar o quadro clínico dos pacientes, por exemplo, pelo desenvolvimento de Injúria Pulmonar Induzida pela Ventilação (VILI), pela predisposição à Pneumonia Associada à Ventilação (PAV) e pelas alterações hemodinâmicas relacionadas à pressão positiva intratorácica e às drogas usadas para manutenção de

sedação. Na revisão publicada por Boyd et al. (2022), os autores demonstraram taxas superiores de PAV em pacientes COVID em relação aos pacientes intubados não COVID, o que pode ser atribuído a fatores extrínsecos, como ausência de equipamentos de proteção adequados, necessidade de longos períodos de ventilação mecânica e tratamentos com imunomoduladores, e intrínsecos, como a presença de danos mais graves ao parênquima pulmonar e a desregulação imune. Dessa forma, a relação entre ventilação mecânica e desfecho clínico de óbito pode ser um fator de confusão.

Já em relação às características laboratoriais do grupo COVID-19 estudado, observou-se redução significativa dos componentes da série vermelha no grupo óbito em relação ao grupo alta. Bergamaschi et al., (2021) estudaram a presença de anemia em pacientes com COVID-19 e identificaram uma prevalência global de 61%, mas não encontraram relação entre a presença de anemia e a gravidade dos pacientes incluídos. As principais causas de anemia no contexto da COVID-19 são o ambiente inflamatório, que altera o metabolismo do ferro e inibe a eritropoiese, e a ferropenia (BERGAMASCHI et al., 2021). Sobre a série branca, observou-se aumento significativo dos seus componentes, incluindo granulócitos e linfócitos, bem como o aumento da razão granulócitos/linfócitos no referido grupo. Conforme mencionado por Garnier et al. (2022), formas graves de COVID exibiram redução da contagem de linfócitos e aumento da contagem de neutrófilos, tornando a razão neutrófilo/linfócito um indicador de gravidade da doença. Essas considerações estão, em parte, concordantes com os achados do estudo, com exceção da linfopenia, que não estava presente no grupo óbito. Uma possível explicação para essa discrepância é o fato de que os hemogramas analisados foram realizados no T0 e os pacientes incluídos apresentavam diferentes tempos desde o início dos sintomas. Em relação às plaquetas, não foram observadas alterações significativas, diferentemente do que foi pontuado em outros estudos. Wool et al. (2020), destacaram que a trombocitopenia leve a moderada estava presente em 58 a 95% dos casos de pacientes com COVID grave e poderia estar associada, dentre outros fatores, à hiperativação e posterior clearance plaquetário, à supressão medular no contexto inflamatório e ao consumo por agregação plaquetária e formação de microtrombos. Achados semelhantes foram citados em uma metanálise (MALIK et al., 2020), em que 17 estudos apresentaram trombocitopenia relacionada à gravidade dos pacientes. A análise de outros parâmetros laboratoriais, como PCR, ferritina e dímero-D, também poderia ser relevante na caracterização da casuística. No entanto, tais dados não puderam ser recuperados dos prontuários em número suficiente para que essa caracterização fosse incluída no estudo.

A análise das microvesículas, por sua vez, demonstrou aumento significativo do número total de MVs nos pacientes COVID-19 em relação ao grupo controle em todos os tempos analisados no estudo, principalmente em T0. Nossos achados corroboram o estudo de Zahran

et al. (2021), onde foram analisadas MVs circulantes em pacientes COVID-19 com e sem malignidade em comparação ao grupo controle saudável, sendo identificado aumento significativo das MVs totais nos pacientes COVID com e sem malignidade em relação ao grupo saudável. Ainda sobre as MVs totais, dado relevante identificado em nossa casuística demonstra que sua quantificação absoluta no T0 classificou o paciente COVID quanto ao desfecho clínico de alta ou óbito com uma sensibilidade de 53% e uma especificidade de 100% para valores superiores a $2,8 \times 10^5 / \text{mm}^3$.

A contagem absoluta das MVs derivadas de neutrófilos CD66⁺ mostrou-se elevada em relação ao controle em todos os tempos analisados no estudo, contribuindo para o aumento do número total de MVs. Esse dado se provou significativo para diferenciação tanto de pacientes do grupo COVID de indivíduos do grupo controle saudável quanto dos pacientes COVID em relação ao desfecho de alta e óbito, tornando as MVs CD66⁺ um dos principais biomarcadores para predição do prognóstico. Campello et al. (2022) abordaram a importância da ativação neutrofílica como mecanismo do estado pró-trombótico evidenciado em pacientes com COVID-19, a partir da liberação das redes extracelulares de neutrófilos (NETs). Trata-se de mecanismo da imunidade inata no qual neutrófilos, quando submetidos à ativação intensa e persistente, sofrem degranulação e liberam material nuclear e enzimas no meio extracelular, gerando estresse oxidativo e morte celular (CAILLON et al., 2022 e GARNIER et al., 2022). Caillon et al. (2022) destacaram a ação pró-coagulante desempenhada pelas NETs, em função de (1) ácidos nucleicos extracelulares carregados negativamente favorecerem a adesão de fatores de coagulação; e (2) favorecerem diretamente a exposição de fator tecidual. Assim, o aumento das MVs CD66⁺ sugere maior ativação neutrofílica, com provável aumento da liberação de NETs e acentuação do processo de tromboinflamação na COVID-19, o que tende a agravar os quadros clínicos e associar-se a pior prognóstico.

Além das MVs CD66⁺, as MVs derivadas de células endoteliais CD51⁺ também contribuíram para a elevação das MVs totais no T0. Campello et al. (2022), em mesmo estudo citado anteriormente, avaliaram o comportamento longitudinal de MVs em pacientes hospitalizados com COVID-19 leve a moderada. Foram encontrados níveis elevados de MVs endoteliais, identificadas por anti-CD62E, nos tempos da admissão e da alta em comparação ao grupo controle saudável, com posterior redução após 30 dias da alta. Esses achados são compatíveis com os dados encontrados em nosso estudo, uma vez que estes demonstraram elevação de MVs endoteliais no contexto mais agudo da infecção viral, com posterior tendência de queda. Os autores destacaram também o fato da lesão endotelial ser parte central da patogênese da COVID-19, contribuindo de forma importante para a tromboinflamação. Zahran et al. (2021), por sua vez, também ressaltaram o aumento das MVs derivadas de células endoteliais em pacientes com COVID-19 e a relação encontrada entre

os valores das referidas MVs e a gravidade das alterações radiográficas nas tomografias dos pacientes. Yamada (2021) demonstrou o papel emergente das MVs na patogênese de doenças respiratórias e o aumento de MVs endoteliais na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) – um dos fatores de risco para COVID-19 – e na SDRA, reiterando a relevância dessas MVs nas afecções pulmonares.

Outro marcador importante são as MVs derivadas de linfócitos T, que se apresentaram reduzidas em relação ao grupo controle nas fases agudas da infecção, com sensibilidade de 100% e especificidade de 35% para diferenciação dos grupos COVID-19 e saudável no T0 para valores inferiores a $3,3 \times 10^3/\text{mm}^3$. Esse dado corrobora a patogênese da doença relacionada à exaustão de linfócitos T (GOUBRAN et al., 2022), situação na qual a ativação persistente das células T as torna menos funcionais, com redução da capacidade de expansão clonal, de desgranulação e de liberação de citocinas (PACES et al., 2020). Goubran et al. (2022) descreveram a linfopenia como marcador de pior prognóstico e relacionado à tromboinflamação, fato também frisado por Garnier et al. (2022), conforme já exposto previamente na discussão dos dados laboratoriais.

A casuística do estudo vigente identificou também valores persistentemente baixos de MVs derivadas de monócitos no grupo COVID-19 em relação ao grupo controle, com sensibilidade de 90% e especificidade de 52% para diferenciar os dois grupos no T0 para valores inferiores a $1,8 \times 10^3/\text{mm}^3$, em análise univariada. Além disso, a análise multivariada e a árvore classificatória correlata demonstraram que as MVs derivadas de monócitos, ao serem avaliadas no subgrupo de pacientes com MV CD66⁺ (neutrófilos) aumentada, apresentaram relação entre seus valores e a gravidade, em que pacientes com níveis mais elevados de MV CD14⁺ possuem 28% de chance de óbito. Conforme mencionado no referencial teórico, monócitos estão relacionados à ação pró-coagulante das MVs, pois, quando ativados, sabidamente liberam MVs que expressam fator tecidual, contribuindo para o fenômeno da tromboinflamação, ator central na patogênese da COVID-19 (MOOBERRY et al, 2016 e YÁÑEZ-MÓ et al, 2015). Dessa forma, trata-se de achado importante e inovador do nosso estudo, uma vez que dados relacionados às MVs monocitárias e à sua cinética em pacientes COVID-19 não foram encontrados de forma consistente na literatura.

Finalizando as MVs leucocitárias, foi observado aumento dos valores absolutos de MVs CD45⁺ no grupo COVID no T0, em relação ao grupo controle, e com posterior redução no T1. Campello et al. (2022), ao avaliarem a tendência longitudinal de MVs em pacientes hospitalizados por COVID, identificaram aumento dos níveis de MVs CD45⁺ no T0 em relação ao grupo saudável, que se manteve ao longo do tempo, mesmo após 30 dias da alta hospitalar. No entanto, ao avaliarem somente as MVs CD45⁺ que expressavam fator tecidual

– fundamental na patogênese da tromboinflamação – observaram frequências elevadas na admissão, seguida de queda após 30 dias da alta. Conforme discutido pelos autores, esse achado pode indicar que a quantidade de leucócitos ativados está reduzida após 1 mês em decorrência da diminuição da resposta inflamatória patológica, porém com persistência de uma resposta inflamatória global. Além disso, os achados do estudo citado demonstraram ainda que as MVs CD45⁺ foram as únicas a apresentarem correlação com os marcadores de inflamação, ressaltando seu papel na inflamação aguda e crônica. Estudos futuros do nosso grupo também avaliarão essa relação.

Em relação às MVs derivadas de eritrócitos, nosso principal achado diz respeito à redução significativa apresentada pelo grupo alta em relação ao grupo óbito e ao grupo controle, no T0, com sensibilidade de 82% e especificidade de 59% para diferenciação entre ambos os desfechos clínicos para valores inferiores a $7,8 \times 10^4/\text{mm}^3$. Conforme abordado por Moobery et al. (2016) e por Yáñez-mó et al. (2015), MVs eritrocitárias também podem apresentar ação pró-coagulante, sendo capazes de iniciar e sustentar a geração de trombina pela via intrínseca da coagulação. Mais uma vez, é possível perceber a atuação da atividade pró-trombótica como provável contribuinte para a tromboinflamação e conseqüente pior prognóstico na COVID-19. No entanto, na literatura revisada não foram encontrados dados que analisem essa associação. Garnier et al. (2022), de forma antagônica, demonstraram níveis mais baixos de MVs eritrocitárias no grupo de pacientes COVID-19 submetidos a IOT em comparação ao grupo não intubado e ao grupo controle.

Por fim, nosso estudo identificou uma redução significativa de MVs plaquetárias no grupo COVID-19 em comparação ao grupo controle em todos os tempos analisados. Trata-se de dado conflitante com diferentes achados da literatura. Raineri et al. (2022) estudaram a associação entre MVs plaquetárias e o prognóstico de pacientes hospitalizados por COVID-19. Ao avaliarem os níveis das MVs na admissão hospitalar e após sete dias, usando os marcadores CD31 e CD41, identificaram elevação de MVs derivadas de plaquetas nos pacientes do grupo doença em comparação ao grupo controle saudável na admissão. No entanto, a análise após sete dias identificou que 57,5% dos pacientes COVID-19 apresentaram aumento e 42,5% apresentaram redução significativa dos níveis de MVs. Ao estratificarem os referidos pacientes de acordo com a gravidade clínica e relacionarem à cinética das MVs, observaram que pacientes mais graves sofreram aumento de MVs de plaquetas após sete dias, levando à hipótese de que o aumento das MVs plaquetárias está relacionado à resposta inflamatória induzida pelo vírus, mais uma vez ressaltando o papel da tromboinflamação da COVID-19. Campello et al. (2022), por sua vez, analisaram longitudinalmente MVs CD62P⁺, um marcador de plaquetas ativadas positivas para selectina-P, em pacientes COVID-19 hospitalizados. Foram identificados níveis superiores das referidas

MVs em pacientes do grupo COVID-19 em comparação ao grupo saudável no momento da admissão, com aumento após 30 dias da alta. Além disso, os autores observaram também que os níveis das MVs derivadas de plaquetas apresentaram relação com o desenvolvimento de tromboembolismo venoso e com o pior prognóstico.

Diante do exposto, foram levantadas algumas hipóteses na tentativa de elucidar possíveis razões para as discrepâncias relacionadas às MVs plaquetárias encontradas em nosso estudo em comparação à literatura. Um primeiro ponto diz respeito aos marcadores fenotípicos distintos utilizados para a busca de MVs plaquetárias, uma vez que o estudo vigente utilizou apenas CD41⁺. Além disso, não foram utilizados os mesmos protocolos de obtenção das MVs e os próprios métodos para análise de MVs podem influenciar a sua recuperação durante a centrifugação e o congelamento. Soma-se a isso os diferentes tempos de infecção dos pacientes incluídos nos estudos em relação ao início dos sintomas. Outra hipótese leva em consideração a meia vida curta plaquetária e a possibilidade de internalização de vírions e morte celular programada, conforme mencionado por Goubran et al. (2022). Por fim, as diferentes gravidades dos pacientes analisados nos estudos mencionados também podem ter influenciado, considerando a possibilidade de consumo por maior agregação plaquetária em pacientes mais graves. Zaid et al. (2020), avaliaram a atividade plaquetária em indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 e identificaram que os níveis absolutos de MVs derivadas de plaquetas CD41⁺ encontravam-se superiores ao grupo controle tanto nos pacientes graves quanto nos pacientes não graves, mas os pacientes graves apresentavam valores significativamente menores em relação aos não graves.

Conforme amplamente mencionado e discutido, a tromboinflamação apresenta papel central na patogênese da COVID-19 e as MVs podem contribuir para esse processo. Garnier et al. (2022) analisaram a relação entre MVs, morte endotelial, adesão neutrofílica e netose em pacientes COVID-19 e identificaram aumento significativo das MVs endoteliais e plaquetárias em pacientes intubados e não intubados, com destaque para os intubados. Além disso, ao incubarem células endoteliais com MVs totais dos referidos pacientes, identificaram aumento de morte endotelial em pacientes submetidos à IOT e o relacionaram à hiperexpressão de VCAM-1 e selectina-P, principalmente pelas MVs plaquetárias, com consequente aumento da adesão neutrofílica e dos níveis de netose. Assim, Garnier et al. (2022) concluíram que MVs podem contribuir para a lesão endotelial na COVID-19, fundamental no contexto de tromboinflamação. Esses achados reforçam também o que foi discutido anteriormente sobre a possível influência da ventilação mecânica no prognóstico.

Percebe-se, assim, a relevância das MVs na patogênese da COVID-19, bem como o grande campo para sua aplicação como biomarcadores prognósticos. No entanto, as possibilidades

abrangem também o uso terapêutico das MVs, conforme abordado por Pocsfalvi et al. (2020). Em seu estudo, os pesquisadores abordaram, por exemplo, o papel das MVs derivadas de células-tronco mesenquimais na imunomodulação, bem como a possibilidade de uso das MVs como veículos para transporte de drogas alvo-específicas.

Dessa forma, as microvesículas representam campo amplo, atual e promissor de pesquisa. O presente estudo, ao demonstrar que MVs totais e MVs derivadas de neutrófilos, monócitos e linfócitos T, principalmente, podem atuar como biomarcadores prognósticos potenciais na COVID-19, reforça a importância do tema e contribui para a aplicabilidade das microvesículas no monitoramento clínico-laboratorial dos pacientes.

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que microvesículas totais e aquelas derivadas de neutrófilos, monócitos e linfócitos T apresentam papel relevante na diferenciação de pacientes com COVID-19 grave de indivíduos saudáveis, bem como de pacientes com COVID-19 em relação ao desfecho clínico. Assim, as MVs podem se tornar uma ferramenta futura importante para avaliação prognóstica em pacientes com COVID-19. No entanto, estudos que incluam maior número amostral e que analisem outros biomarcadores laboratoriais relacionados à doença são fundamentais para corroborar esses achados.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. P. et al. Profile of adult patients with COVID-19 admitted to an intensive care unit. Research, **Society and Development**, v. 11, n. 5, 2022.

BASTARACHE, J. A. et al. Procoagulant alveolar microparticles in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 297, n. 6, p. 1035-1041, 2009.

BERGAMASCHI, G. et al. Anemia in patients with Covid-19: pathogenesis and clinical significance. **Clin Exp Med**, v. 21, n. 2, p. 239–246, 2021.

BOYD, S. et al. Ventilator-associated pneumonia in critically ill patients with COVID-19 infection: a narrative review. **ERJ Open Res**, v. 8, n. 3, 2022.

BUESING, K. L. et al. Endothelial microparticles induce inflammation in acute lung injury. **J Surg Res**, v. 166, n. 1, p. 32–39, 2011.

CAILLON, A. et al. Role of neutrophils, platelets, and extracellular vesicles and their interactions in COVID-19-associated thrombopathy. **J Thromb Haemost**, v. 20, n. 1, p. 17-31, 2022.

CAMPELLO, E. et al. Longitudinal Trend of Plasma Concentrations of Extracellular Vesicles in Patients Hospitalized for COVID-19. **Frontiers Cell Developmental Biology**, v. 9, n. 770463, 2022.

CANTALUPPI, V. et al. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia–reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. **Kidney international**, v. 82, n. 4, p. 412-427, 2012.

CARFORA, V. et al. Anticoagulant treatment in COVID-19: a narrative review. **J Thromb Thrombolysis**, n. 51, v. 3, p. 642-648, 2021.

CASTANARES-ZAPATERO, D. et al. Pathophysiology and mechanism of long COVID: a comprehensive review. **Ann Med**, v. 54, n. 1, p. 1473-1487, 2022.

CHEN, C. H. et al. Biomarkers during COVID-19: Mechanisms of Change and Implications for Patient Outcomes. **Diagnostics**, v. 12, n. 2, p. 1-16, 2022.

DEY-HAZRA, E. et al. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. **Vascular health and risk management**, v. 6, p. 1125–1133, 2010.

FAROOQI, T. et al. An overview of SARS-COV-2 epidemiology, mutant variants, vaccines, and management strategies. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 10, p. 1299-1312, 2021.

GARNIER, Y. et al. Plasma microparticles of intubated COVID-19 patients cause endothelial cell death, neutrophil adhesion and netosis, in a phosphatidylserine-dependent manner. **Br J Haematol**, n. 196, v. 5, p. 1159-1169, 2022.

GATTINONI, L. et al. COVID-19 pneumonia: pathophysiology and management. **Eur Respir Rev**, v. 30, n. 162, p. 1-13, 2021.

GOUBRAN, H. et al. Platelet and extracellular vesicles in COVID-19 infection and its vaccines. **Transfus Apher Sci**, v. 61, n. 3, p. 103459, 2022.

GUERVILLY, C. et al. High levels of circulating leukocyte microparticles are associated with better outcome in acute respiratory distress syndrome. **Crit Care**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2011.

GUIMARÃES-COSTA, M. H. et al. Cell-derived microvesicles in infective endocarditis: role in diagnosis and potential for risk stratification at hospital admission. **Journal of Infection**, v. 79, n. 2, p. 101-107, 2019.

GUPTA, A. et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nat Med**, n. 26, p. 1017–1032, 2020.

HAJJAR, L. A. et al. Intensive care management of patients with COVID-19: a practical approach. **Annals of Intensive Care**, v. 11, n. 1, 2021.

HAMMOND, J. et al. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 386, p. 1397-1408, 2022.

HENRY, B. M. et al. Hyperinflammation and derangement of renin-angiotensin-aldosterone system in COVID-19: A novel hypothesis for clinically suspected hypercoagulopathy and microvascular immunothrombosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 507, p. 167-173, 2020.

KIM, A. Y; GANDHI, R. T. COVID-19: Management in hospitalized adults. UpToDate. Disponível em <https://www.uptodate.com/contents/covid-19-management-in-hospitalized-adults>. Acesso em: 21/03/2022.

LACROIX, R. et al. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 10, n. 3, p. 437-446, 2012.

LAI, C. K. C; LAM, W. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 538, p. 226-230, 2021.

LAWSON, C. How do I measure extracellular vesicles in my samples?. **The Endocrinologist**, Spring 2017, n. 123. Disponível em: <https://www.endocrinology.org/endocrinologist/123-spring17/features/how-do-i-measure-extracellular-vesicles-in-my-samples/>. Acesso em: 17/08/2022.

MAHIDA, R. Y.; MATSUMOTO, S.; MATTHAY, M. A. Extracellular vesicles in ARDS: New Insights into Pathogenesis with novel clinical applications. **Annual Update in Intensive Care and Emergency**, v. 4, p. 53-65, 2020.

MALIK, P. et al. Biomarkers and outcomes of COVID-19 hospitalisations: systematic review and meta-analysis. **BMJ Evid Based Med**, v. 26, n. 3, p. 107-108, 2021.

MALLAT, Z. et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 101, n. 8, p. 841-843, 2000.

MAUSE, S. F.; WEBER, C. Microparticles: Protagonists of a Novel Communication Network for Intercellular Information Exchange. **Circ Res**, v. 107, n. 9, p.1047-1057, 2010.

MCINTOSH, K.; HIRSCH, M. S.; BLOOM, A. COVID-19: Epidemiology, virology and prevention. UpToDate, 2022. Disponível em: www.uptodate.com/contents/covid-19-epidemiology-virology-and-prevention. Acesso em: 14/03/2022.

MEZIANI, F.; TESSE, A.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. **Pharmacol Rep**, v. 60, n. 1, p. 75-84, 2008.

MOOBERRY, M. J.; KEY, N. S. Microparticle analysis in disorders of hemostasis and thrombosis. **Cytometry Part A**, v. 89, n. 2, p. 111-122, 2016.

MORTAZA, S. et al. Detrimental hemodynamic and inflammatory effects of microparticles originating from septic rats. **Crit Care Med**, v. 37, p. 2045–2050, 2009.

MURALIDHARAN-CHARI, V. et al. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. **Journal of Cell Science**, v. 123, p. 1603-1611, 2010.

ONG, D. S. Y. et al. How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. **Clin Microbiol Infect**, v. 27n. 7, p. 981-986, 2021.

PACES, J. et al. COVID-19 and the immune system. **Physiol Res**, v. 69, n. 3, p. 379-388, 2020.

PAPADOPOULOU, G. et al. Molecular and Clinical Prognostic Biomarkers of COVID-19 Severity and Persistence. **Pathogens**, v. 11, n. 3, p. 311, 2022.

POCSFALVI, G. et al. COVID-19 and Extracellular Vesicles: An Intriguing Interplay. **Kidney Blood Press Res**, v. 45, n. 5, p. 661-670, 2020.

RAHMAN, S. et al. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 14, n. 5, p. 601-621, 2021.

RAINERI, D. et al. Worse Disease Prognosis Is Associated to an Increase of Platelet-Derived Extracellular Vesicles in Hospitalized SARS-CoV-2 Patients. **Dis Markers**, v. 2022, n. 8074655, 2022.

- SADALLAH, S. et al. Microparticles (ectosomes) shed by stored human platelets downregulate macrophages and modify the development of dendritic cells. **J Immunol**, v. 186, p. 6543–6552, 2011.
- SAMPRATHI, M.; JAYASHREE, M. Biomarkers in COVID-19: An Up-To-Date Review. **Front Pediatr**, v. 8, n. 607647, 2021.
- SAMUDRALA, P. K. et al. Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. **European Journal of Pharmacology**, v. 883, n. 173375, 2020.
- SANTOSHA, A. et al. The many faces of the anti-COVID immune response. **J. Exp. Med**, v. 217, n. 6, 2020.
- SHANTHANNA, H. et al. The COVID-19 pandemic and its consequences for chronic pain: a narrative review. **Anaesthesia**, v. 77, n. 9, p. 1039-1050, 2022.
- SHEREEN, M. A. et al. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **J Adv Res**, v. 16, n. 24, p. 91-98, 2020.
- SOUZA, A. C. P.; YUEN, P. S.; STAR, R. A. Microparticles: markers and mediators of sepsis-induced microvascular dysfunction, immunosuppression, and AKI. **Kidney international**, v. 87, n. 6, p. 1100, 2015.
- SWETS, J. A. Measuring the accuracy of diagnostic systems. **Science**, n. 240, v. 4857, p. 1285-1293, 1988.
- TIMÁR, C. I. et al. Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. **Blood**, v. 121, n. 3, p. 510-518, 2013.
- VELASCO, I. T. et al. **Medicina de emergência: abordagem prática**. Cap. 56. Infecção pelo SARS-CoV-2 (COVID-19). 16^o ed, Manole, p. 770-804, 2022.
- WALKER, J. D.; MAIER, C. L.; POBER, J. S. Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4⁺ memory T cells by releasing antigenic exosomes. **J Immunol**, v. 182, p. 1548-1559, 2009.
- WALTERS, S. B. et al. Microparticles from Mycobacteria-Infected Macrophages Promote Inflammation and Cellular Migration. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 2, p. 669-677, 2013.
- WANG, C. et al. Circulating Microparticles in the Pathogenesis and Early Anticoagulation of Thrombosis in COVID-19 With Kidney Injury. **Front. Cell Dev. Biol**, v. 9, n. 784505, 2022.
- WANG, Y.; PERLMAN, S. COVID-19: Inflammatory profile. **Annual Review of Medicine**, v. 73, n. 1, p. 65-80, 2022.
- WIERSINGA, W. J. et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **Jama**, v. 324, n. 8, p. 782–793, 2020.

WITWER, K. W. et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 2, n. 1, p. 20360, 2013.

WOOL, G. D.; MILLER, J. L. The Impact of COVID-19 Disease on Platelets and Coagulation. **Pathobiology**, v. 88, n. 1, p. 15-27, 2021.

World Health Organization – WHO. Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 29/03/2022.

YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of extracellular vesicles**, v. 4, n. 1, p. 27066, 2015.

ZAHAN, M. N. et al. Diagnosis of COVID-19 in symptomatic patients: An updated review. **Vacunas**, v. 23, n. 1, p. 55-61, 2022.

ZHRAN, A. M. et al. Circulating microparticles and activated platelets as novel prognostic biomarkers in COVID-19; relation to cancer. **PLoS ONE**, v. 16, n. 2, 2021.

ZAID, Y. et al. Platelets Can Associate with SARS-Cov-2 RNA and Are Hyperactivated in COVID-19. **Circ Res**, v. 127, n. 11, p. 1404–1418, 2020.

ZIZZA, A. et al. Clinical features of COVID-19 and SARS epidemics - A literature review. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 1, 2021.

ZWICKER, J. I. et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 22, p. 6830-6840, 2009.

Anexos

Anexo I - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS, METABÓLICOS, LABORATORIAIS E CLÍNICOS DE PACIENTES COM COVID-19

Pesquisador: Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Versão: 3

CAAE: 45086721.1.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.751.423

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional longitudinal no qual pacientes com diagnóstico confirmado de COVID-19 com diferentes graus de gravidade, ou seja, internados no Centro de Terapia Intensiva (CTI) e nas enfermarias do Hospital Risoleta Tolentino Neves (HRTN) da UFMG serão avaliados.

Destes pacientes, serão coletadas amostras de aspirado traqueal coletada no momento da limpeza das vias aéreas do paciente que será feita juntamente com a rotina do setor de microbiologia. Sangue periférico será coletado em anticoagulante EDTA, Citrato, Heparina e tubo Gel, juntamente com o setor de hematologia do HRNT-UFMG. Amostras de aspirado traqueal e soro serão coletadas em diferentes tempos (D0=Admissão; D7=dia 7; D14=dia 14; D30= dia 30; D60=dia 60 e D80=dia 80) pela equipe de enfermagem ou por médico especializado com consentimento prévio dos pacientes via TCLE. Análises microbiológicas, isolamento viral, dosagem de moléculas imunes e antígenos virais bem como dosagem de anticorpos serão realizadas. O conteúdo celular do aspirado traqueal e sangue será avaliado por citometria de fluxo.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.751.423

Objetivo da Pesquisa:

Conforme as Informações Básicas da Plataforma Brasil (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1688260.pdf):

"Objetivo Primário: Este projeto tem como principal objetivo avaliar aspectos microbiológicos, imunológicos, metabólicos, laboratoriais e clínicos de pacientes com COVID-19 do hospital Risoleta Tolentino Neves.

Objetivo Secundário: Pretendemos com este estudo engajar e promover a formação de recursos humanos, como profissionais de saúde e alunos da pesquisa. Adicionalmente, pretendemos fortalecer o vínculo da pesquisa com o atendimento e assistência a saúde."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo informa no TCLE (NOVO_TCLE_COVID_Profissionais_de_saude_MAIO_2021.pdf):

"A coleta de sangue gera um leve desconforto momentâneo, mas é um procedimento rápido e será feito por profissionais especializados do hospital. Esses procedimentos são da rotina do hospital e os profissionais já estão acostumados a fazê-los. Estas coletas só serão feitas com o consentimento do participante que não está, de forma alguma, obrigado a coletar sangue em todos os tempos ou até o final do estudo. Nenhuma intervenção adicional, ou seja, não serão usados medicamentos ou qualquer outra forma de alteração adicional no cotidiano ou no tratamento do participante. Após a coleta das amostras, estas serão levadas ao laboratório para processamento e armazenadas até o uso em um freezer de baixas temperaturas (-80C) para melhor conservação. Estas amostras poderão ser utilizadas em estudos futuros para a pesquisa em COVID-19, caso você concorde. A informação obtida será de uso científico e não será divulgada para outros fins. Todos os dados referentes aos participantes são confidenciais e as amostras, assim em nenhum momento haverá liberação de identidade ou quaisquer dados que possam levar à identificação do participante. Caso concorde em participar na pesquisa, solicitamos que autorize a coleta, transporte, armazenamento, utilização e descarte as amostras para essa pesquisa, e se você permitir, em pesquisas futuras. Nesse último caso, você será novamente consultado e assinará novo TCLE para permitir o uso do material."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há impedimento ético no parecer deste Comitê, Número do Parecer: 4.732.042 (PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_4732042.pdf), emitido em 25 de Maio de 2021, e, conforme informado não houve alteração no projeto.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**



Continuação do Parecer: 4.751.423

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Carta_ao_comite_de_etica_junho_2021.pdf: "Venho por meio desta re-submeter projeto conforme parecer consubstanciado para projeto intitulado: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS, METABÓLICOS, LABORATORIAIS E CLÍNICOS DE PACIENTES COM COVID-19, coordenado por mim, que recebeu CAAE # 45086721.1.0000.5149. Conforme parecer do CONEP, fica no âmbito do CEP local decidir sobre o nosso projeto, assim aguardo a aprovação final deste comitê. Gostaria de agradecer todo o empenho deste comitê em revisar nosso projeto e permitir nossa contribuição para o enfrentamento da COVID-19 de maneira ética, integra e humana"

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprova-se o protocolo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1688260.pdf	01/06/2021 18:25:32		Aceito
Outros	Carta_ao_comite_de_etica_junho_2021.pdf	01/06/2021 18:22:49	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito
Outros	Carta_ao_comite_de_etica_maio_2021.pdf	18/05/2021 20:55:40	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	NOVO_TCLE_COVID_Profissionais_de_saude_MAIO_2021.pdf	18/05/2021 20:53:38	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	NOVO_TCLE_COVID_CTI_RES_2021.pdf	18/05/2021 20:52:38	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.751.423

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	NOVO_TCLE_COVID_CTI_MAIO_2021.pdf	18/05/2021 20:26:10	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_Projeto_CamaraDMIC.pdf	29/03/2021 20:52:49	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_PARTICIPACAO_PESQUISADOR_Flavio.pdf	19/03/2021 06:59:22	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito
Outros	TCUD_Cep_UFMG.pdf	19/03/2021 06:57:15	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito
Declaração de Pesquisadores	PARTICIPACAOPESQUISADOR_assinado_Alice.pdf	19/03/2021 06:51:41	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAOPARTICIPACAOPESQUISADOR_assinado_Silvana.pdf	19/03/2021 06:51:22	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_PARTICIPACAO_PESQUISADOR_Isabela_05_03_2021.pdf	19/03/2021 06:37:20	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAOPARTICIPACAOPESQUISADOR_assinado_Luis_Adan.pdf	19/03/2021 06:37:06	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartadeAnuenciaCamiladaMata.jpg	19/03/2021 06:26:17	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito
Declaração de Pesquisadores	IRR.pdf	19/03/2021 06:25:24	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito
Declaração de concordância	NEPE_HRTN.pdf	19/03/2021 06:24:01	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	SEI_UFMG_0594884_Termo_biorrepositorio.pdf	05/03/2021 09:16:03	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	13/01/2021 16:55:31	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito
Parecer Anterior	aprovacaocamara.pdf	13/01/2021 16:55:21	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	13/01/2021 16:55:15	Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.751.423

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 02 de Junho de 2021

Assinado por:
Críssia Carem Paiva Fontainha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Anexo II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - ENFERMARIA

Participação no Projeto “ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS, METABÓLICOS, LABORATORIAIS E CLÍNICOS DE PACIENTES COM COVID-19”

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

NOME DO PACIENTE:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO:.....CIDADE

CEP:.....

TELEFONES: DDD(.....).....

EMAIL:

Convido você a participar do estudo chamado “ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS, METABÓLICOS, LABORATORIAIS E CLÍNICOS DE PACIENTES COM COVID-19”.

Trata-se de um estudo que vai avaliar alterações no sangue de pessoas internadas no Hospital Risoleta Tolentino Neves com possível diagnóstico de COVID-19.

O objetivo desse estudo é tentar desenvolver métodos e biomarcadores para verificar a imunidade que confere proteção contra COVID-19. Pretendemos também avaliar alterações que podem indicar um curso clínico desfavorável e a necessidade de terapias mais cuidadosas.

O estudo trata apenas de coleta de informações, coleta de amostra de sangue num volume de aproximadamente 30mL, de forma a manter a rotina hospitalar do paciente. Nenhuma intervenção adicional será realizada.

Assim este estudo é importante para que se possa conhecer um pouco mais sobre efeitos da COVID-19. Isso pode ser útil para que os médicos possam ter uma informação para indicar ou não tratamentos aos seus pacientes. Os procedimentos do estudo serão coletas de informações relativas à estado geral de saúde e a coleta de sangue diária de rotina, feita nos pacientes em três tempos: no momento da admissão, sete e quatorze dias de internação, ou até o final da internação.

Não se espera que a pessoa tenha qualquer risco por participar neste estudo, uma vez que não envolve nenhuma intervenção adicional no paciente, só o que está previsto na rotina. A informação obtida será de uso científico e não será divulgada para outros fins. Todos os dados referentes aos pacientes são confidenciais. Em nenhum momento haverá liberação de identidade ou quaisquer dados que possam levar à sua identificação.

Como o resultado do estudo pode ser de seu interesse, se você quiser, pode deixar registrado além de seu próprio telefone, endereço e email, os telefones e endereços de cinco contatos seus (entre eles três parentes de primeiro grau) a fim de que você possa ser encontrado para saber os resultados, mesmo após alguns anos do término desse estudo. A sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Uma vez que você aceite participar do estudo, permanecerá com o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

Para qualquer dúvida ou esclarecimento adicional, você pode entrar em contato com os coordenadores do estudo, Dr. Olindo Assis Martins Filho ou Dra. Andréa Teixeira Carvalho pelo telefone 31 33497764, no Instituto René Rachou (FIOCRUZ/MINAS), na Av. Augusto de Lima, 1715 - Barro Preto, Belo Horizonte - MG, 30190-002 ou a Dra. Jordana Coelho dos Reis, pelo telefone 31 3409-2746, no Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, campus Pampulha - CEP:31270-901.

Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento para ler antes de assiná-lo, que os detalhes do projeto foram explicados e que mantereí uma cópia deste consentimento em meu poder.

Data

Data

Anexo III - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CTI

Participação no Projeto “ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS, METABÓLICOS, LABORATORIAIS E CLÍNICOS DE PACIENTES COM COVID-19”

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

NOME DO PACIENTE:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO:.....CIDADE

CEP:.....

TELEFONES: DDD(.....).....

EMAIL:

Convido você a participar do estudo chamado “ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS, METABÓLICOS, LABORATORIAIS E CLÍNICOS DE PACIENTES COM COVID-19”.

Trata-se de um estudo que vai avaliar alterações no sangue e na secreção respiratória, chamada de aspirado traqueal, e no sangue de pessoas internadas no centro de atendimento intensivo sob intubação com possível diagnóstico de COVID-19.

O objetivo desse estudo é tentar desenvolver métodos e biomarcadores para verificar a imunidade que confere proteção contra COVID-19. Pretendemos também avaliar alterações que podem indicar um curso clínico desfavorável e a necessidade de terapias mais cuidadosas.

O estudo trata apenas de coleta de informações, coleta de amostra de sangue e do aspirado traqueal de forma a manter a rotina hospitalar do paciente. Nenhuma intervenção adicional será realizada.

Assim este estudo é importante para que se possa conhecer um pouco mais sobre efeitos da COVID-19. Isso pode ser útil para que os médicos possam ter uma informação para indicar ou não tratamentos aos seus pacientes. Os procedimentos do estudo serão coletas de informações relativas à estado geral de saúde, a coleta de sangue diária de rotina e do aspirado traqueal durante a limpeza de intubação feita nos pacientes em três tempos: no momento da admissão, sete e quatorze dias após internação.

Não se espera que a pessoa tenha qualquer risco por participar neste estudo, uma vez que não envolve nenhuma intervenção adicional no paciente, só o que está previsto na rotina. A informação obtida será de uso científico e não será divulgada para outros fins. Todos os dados referentes aos pacientes são confidenciais. Em nenhum momento haverá liberação de identidade ou quaisquer dados que possam levar à sua identificação.

Como o resultado do estudo pode ser de seu interesse, se você quiser, pode deixar registrado além de seu próprio telefone, endereço e e-mail, os telefones e endereços de cinco contatos seus (entre eles três parentes de primeiro grau) a fim de que você possa ser encontrado para saber os resultados, mesmo após alguns anos do término desse estudo.

A sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Uma vez que você aceite participar do estudo, permanecerá com o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento.

Para qualquer dúvida ou esclarecimento adicional, você pode entrar em contato com os coordenadores do estudo, Dr. Olindo Assis Martins Filho, pelo telefone 31 33497764, no Instituto René Rachou (FIOCRUZ/MINAS), na Av. Augusto de Lima, 1715 - Barro Preto, Belo Horizonte - MG, 30190-002 ou a Dra. Jordana Coelho dos Reis, pelo telefone 31 3409-2746, no Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, campus Pampulha - CEP:31270-901.

Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento para ler antes de assiná-lo, que os detalhes do projeto foram explicados e que manterei uma cópia deste consentimento em meu poder.

Data

Data