

**CENTRO UNIVERSITÁRIO LUSÍADA - UNILUS
BIOMEDICINA**

BRUNA KANASHIRO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE HSP40, HSP70 E HSP90 EM MONÓCITOS DE
PACIENTES PÓS-COVID**

**SANTOS
2023**

BRUNA KANASHIRO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE HSP40, HSP70 E HSP90 EM MONÓCITOS DE
PACIENTES PÓS-COVID**

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

SANTOS

2023

BRUNA KANASHIRO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE HSP40, HSP70 E HSP90 EM MONÓCITOS DE
PACIENTES PÓS-COVID**

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

Data: 17/11/2023

Professor Me. Edgar Matias Bach Hi

Professora Me. Eliana Cláudia Perroud Morato Ferreira

Professor Me. Thiago de Arruda Souza

SANTOS

2023

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, com profunda gratidão, dedico este trabalho. Seu apoio e amor incondicional me sustentaram ao longo dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais ao meu orientador Edgar que, desde o primeiro ano, acompanhou de perto nossa evolução acadêmica e nos deu a oportunidade de participar nesse trabalho de pesquisa. Nos orientou com compreensão, amor e paciência. Essa jornada ao seu lado foi fundamental para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus professores e biomédicos do laboratório, que são os pilares do curso de Biomedicina, agradeço por todo o conhecimento compartilhado, pelo cuidado com o nosso futuro e por, principalmente, nos ensinar com amor. Agradeço à Prof. Amanda que cumpriu seu dever de coordenadora de forma excelente e tornou nosso último ano leve e agradável. Também deixo meus agradecimentos à Dra. Raquel, que trouxe esse projeto até nós, nos auxiliou durante sua execução e nos ensinou diversos protocolos.

Agradeço às minhas colegas de classe e de grupo de pesquisa: Beatriz, Ingrid, Manuela e Mariana. Das idas aos hospitais para coleta de prontuários à escrita do trabalho, nada disso seria possível sem vocês (nem divertido). Agradeço o companheirismo, a compreensão e o carinho que tivemos umas com as outras durante todo o andamento do trabalho. Agradeço pelas boas risadas que demos e momentos em que perdemos o fôlego durante o período de escrita. Também agradeço o restante do grupo que nos acompanhou durante essa jornada: Camille, Pedro, Luiz, Maria Fernanda e Nicolly.

Agradeço ao meu irmão, Fernando, por seu companheirismo durante nossa vida e por nossas conversas sobre a área da saúde, antes mesmo de Biomedicina ser uma opção em minha vida. Essas conversas afloraram em mim a curiosidade para buscar conhecimento nas ciências biomédicas e ditaram o meu caminho até aqui.

E, por fim, ao meu pai e minha mãe, Silvia e Fernando, que me apoiaram em todos os momentos da minha vida, me deram suporte para que esse trabalho e minha graduação fossem realizados com excelência e me encorajaram nos momentos difíceis.

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão para existir.”

Albert Einstein

RESUMO

A COVID-19 é uma doença infecciosa primordialmente do trato respiratório, desencadeada pelo vírus SARS-CoV-2, caracterizada por uma hiperinflamação atrelada a uma resposta imune desregulada, tal como ocorre na sepse. Estudos anteriores do grupo evidenciaram que a sepse induz uma reprogramação de monócitos que perdura mesmo após 3 anos da alta hospitalar. A correlação entre COVID-19 e Sepse instiga a hipótese de uma semelhança no estado posterior a tais quadros em relação à caracterização do perfil de monócitos. A pesquisa foi desenvolvida na região da Baixada Santista - SP, incluindo indivíduos atendidos nos hospitais Santa Casa de Santos e Hospital Municipal Guilherme Álvaro devido a complicações do quadro de COVID-19. O estudo contou com n de 68 indivíduos distribuídos em: (I) 22 pacientes moderados; (II) 24 graves; e, (III) 22 controles. A partir da amostra sanguínea coletada, os monócitos foram isolados e submetidos a qPCR para avaliação da expressão gênica de HSP40, HSP70 e HSP90. A relevância estatística dos dados foi avaliada usando o teste não paramétrico de Mann Whitney, considerando estatisticamente significante $p < 0.05$. A expressão de mRNA de HSP40 em monócitos pós-COVID mostrou-se aumentada quando em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$). A análise de HSP90 (grupo moderado e grave), por sua vez, mostrou-se significativamente reduzida em relação ao controle ($p < 0,05$). Em contrapartida, os valores de HSP70 não demonstraram relevância estatística comparado ao grupo controle ($p > 0,05$). Os dados apresentados pelo presente estudo contribuem para a hipótese de um quadro de imunossupressão gerada por uma reprogramação celular após casos moderados e graves da infecção. Contudo, são necessários estudos posteriores para uma melhor elucidação.

Palavras-chaves: pandemia; síndrome pós-covid (SPC); leucócitos, proteínas de choque térmico, HSP40, HSP70, HSP90.

ABSTRACT

COVID-19 is an infectious disease primarily of the respiratory tract, triggered by the SARS-CoV-2 virus, characterized by hyperinflammation linked to a deregulated immune response, as occurs in sepsis. Previous studies by the group showed that sepsis induces a reprogramming of monocytes that lasts even three years after discharge from hospital. The correlation between COVID-19 and sepsis raises the hypothesis of a similarity in the post-hospitalization state in relation to the characterization of the monocyte profile. The study was carried out in the region of Baixada Santista - SP, including individuals treated at the Santa Casa de Santos and Hospital Municipal Guilherme Álvaro hospitals due to complications from COVID-19. The study included 68 individuals distributed into: (I) 22 moderate patients; (II) 24 severe patients; and (III) 22 controls. From the blood sample collected, monocytes were isolated and subjected to qPCR to assess the gene expression of HSP40, HSP70 and HSP90. The statistical significance of the data was assessed using the Mann Whitney test method, considering $p < 0.05$. HSP40 mRNA expression in post-COVID monocytes was increased when compared to the control group ($p < 0.001$). The analysis of HSP90 (moderate and severe group), in turn, was significantly reduced compared to the control ($p < 0.05$). On the other hand, the HSP70 values were not statistically significant compared to the control group ($p > 0.05$). The data presented in this study contribute to the hypothesis of immunosuppression generated by cellular reprogramming after moderate and severe cases of infection. However, further studies are needed to better elucidate this hypothesis.

Keywords: pandemic; post-covid syndrome (PCS); leukocytes, heat shock proteins, HSP40, HSP70, HSP90.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura do SARS-CoV-2.	14
Figura 2: Mecanismo de infecção e replicação do SARS-Cov-2.....	18
Figura 3: Mecanismo da hiperinflamação causada pela infecção da COVID-19.....	20
Figura 4: Manifestações Extrapulmonares da infecção por SARS-CoV-2.....	21
Figura 5: Resposta ao choque térmico.	23
Figura 6: Função constitutiva de proteínas de choque térmico a fim de conservar a homeostase.	25
Figura 7: Fluxograma Metodológico.....	29
Figura 8: Fluxograma da seleção dos pacientes (n= 68).	31
Figura 9: Expressão de mRNA das proteínas de choque térmico 40.	36
Figura 10: Expressão de mRNA das proteínas de choque térmico 70.	36
Figura 11: Expressão de mRNA das proteínas de choque térmico 90.	37

ABREVIATURAS

ADPr	Adp-Ribose
ADRP	Adp-Ribose Fosfatase
ANOVA	Análise da Variância
CCL	Ligante de Quimiocina (C-C)
CD	Cluster Differentiation
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMP	Progenitor Mielóide Comum
COVID-19	Coronavirus <i>Disease</i> 2019
CT	Threshold Cycle
CXCL	Ligante De Quimiocina (C-X-C)
DAMPs	Padrões Moleculares Relacionados ao Dano
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ECA-2	Enzima Conversora da Angiotensina 2
ECMO	Oxigenação por Membrana Extracorpórea
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ERGIC	Compartimento Intermediário Retículo Endoplasmático-Golgi
FMO	Falência Múltipla de Órgãos
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
HR	Heptapeptide Repeat
HSE	Elemento de Choque Térmico
HSF	Fatores de Choque Térmico
HSPs	Proteínas de Choque Térmico
HSR	Resposta Ao Choque Térmico
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IκB	Inibidor de Kb
LPS	Lipopolissacarídeo Bacteriano
Max	Máximo
MERS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória do Médio Oriente
Mín	Mínimo
miRNAs	Micrornas
MØ	Monócitos <i>Naive</i>
NF-κB	Fator de Nuclear <i>Kappa</i> B
NLRP3	Receptor <i>NOD-Like</i> Contendo Domínio PYD N-Terminal
NPD	Domínio de Ligação de Nucleotídeo
Nsps	Proteínas Não Estruturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORFs	Fases Abertas de Leitura
PAMPs	Padrões Molecular Associado ao Patógeno
PBS	Tampão Fosfato Salino
PGK1	Phosphoglycerate Kinase 1

Pró-IL	Pró-Interleucina
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RBD	Receptor Binding Domain
RBM	Receptor Binding Motif
RdRP	RNA Polimerase Dependente De RNA
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTC	Complexo Replicação-Transcrição
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-Cov-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SBD	Domínio de Ligação Ao Substrato
SD	Desvio Padrão
SGT1	Supressor do Alelo G2 Do Homólogo de SKP1
SMF	Sistema de Fagocitose Mononuclear
SP	São Paulo
SPC	Síndrome Pós-Covid
STx5A	Syntaxin 5.
TCLE	Termo de Consentimento Livre E Esclarecido
TGF	Fator de Crescimento Transformador
TLR	Receptores Toll-Like
TMPRSS2	Host Type Ii Transmembrane Serine Protease 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. COVID-19	13
1.2. Proteínas de Choque Térmico (HSPs).....	21
1.3. Síndrome Pós-covid e Síndrome Pós-Sepse.....	26
2. OBJETIVOS	28
3. METODOLOGIA	29
3.1. Seleção dos Pacientes	30
3.2. Seleção do Grupo Controle.....	30
3.3. Prontuários Médicos	31
3.4. Separação de Monócitos	32
3.5. Extração de RNA	32
3.6. Síntese de cDNA dos Monócitos	33
3.7. qPCR	33
3.8. Gene Constitutivo	34
3.9. Análise Estatística	35
4. RESULTADOS	36
5. DISCUSSÃO	38
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP: CENTRO UNIVERSITÁRIO LUSÍADAS.....	47
ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP: IRMANDADE SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SANTOS.....	48
ANEXO C– PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP: HOSPITAL GUILHERME ÁLVARO.....	49

ANEXO D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 50

1. INTRODUÇÃO

1.1. COVID-19

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

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

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

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

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

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

Os vírus da família *Coronaviridae* dispõem-se de um complexo proteico operacional de grande importância para seus mecanismos de virulência haja visto que tais proteínas, em conjunto, atuam de forma a viabilizar e garantir a infecção viral da célula hospedeira (Kadam; Sukhramani; Bishnoi; Pable *et al.*, 2021; Ravi; Saxena; Panda, 2022). Em seu genoma estão contidas 14 fases abertas de leitura (ORFs), as quais codificam 27 proteínas, sendo de principal relevância em sua patogenicidade as proteínas estruturais E, N, M e S (Figura 1) (Li; Jia; Tian; Wu *et al.*, 2022).

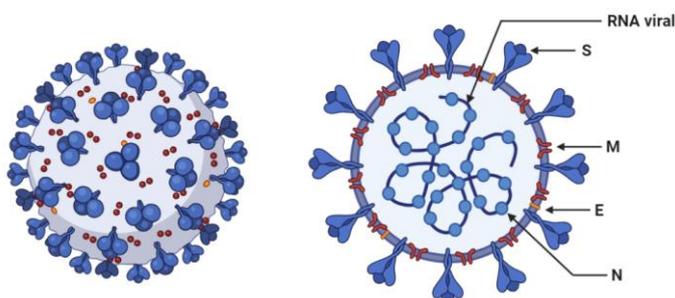


Figura 1: Estrutura do SARS-CoV-2. O RNA viral é complexado com a proteína N para formar um envelope helicoidal dentro da membrana viral; S, proteína Spike; M, proteína M; E, proteína de envelope; N, proteína de nucleocapsídeo Adaptado de (Weiss; Leibowitz, 2011).

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

de classe 2 (Barnett; Xie; Asakura; Song *et al.*, 2023; Planès; Bert; Tairi; BenMohamed *et al.*, 2022) e na oligomerização de moléculas de viroporinas, as quais exercem a função de condução de íons para a liberação viral da célula (Breitinger; Farag; Sticht; Breitinger, 2022; Kadam; Sukhramani; Bishnoi; Pable *et al.*, 2021; Li; Jia; Tian; Wu *et al.*, 2022; Mandala; McKay; Shcherbakov; Dregni *et al.*, 2020; Zhang; Nomura; Muramoto; Ekimoto *et al.*, 2022).

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

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

Para além de tais proteínas estruturais mencionadas, os mecanismos patogênicos virais contam com a ação de proteínas não estruturais, categorizadas como nsps (non-structural proteins). Dentre as 16 nsps de funcionalidade viral, destacam-se as de correlação fisiopatológica nsp1, nsp2 e nsp3 (Kadam; Sukhramani; Bishnoi; Pable *et al.*, 2021).

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

vias de resposta imunológica, como a via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Li; Jia; Tian; Wu *et al.*, 2022). Seus demais domínios correlacionam-se com processos de desubiquitinação, levando ao escape de proteólise, e com a inibição de processos tradicionais do hospedeiro (Kadam; Sukhrmani; Bishnoi; Pable *et al.*, 2021).

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

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

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

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

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

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

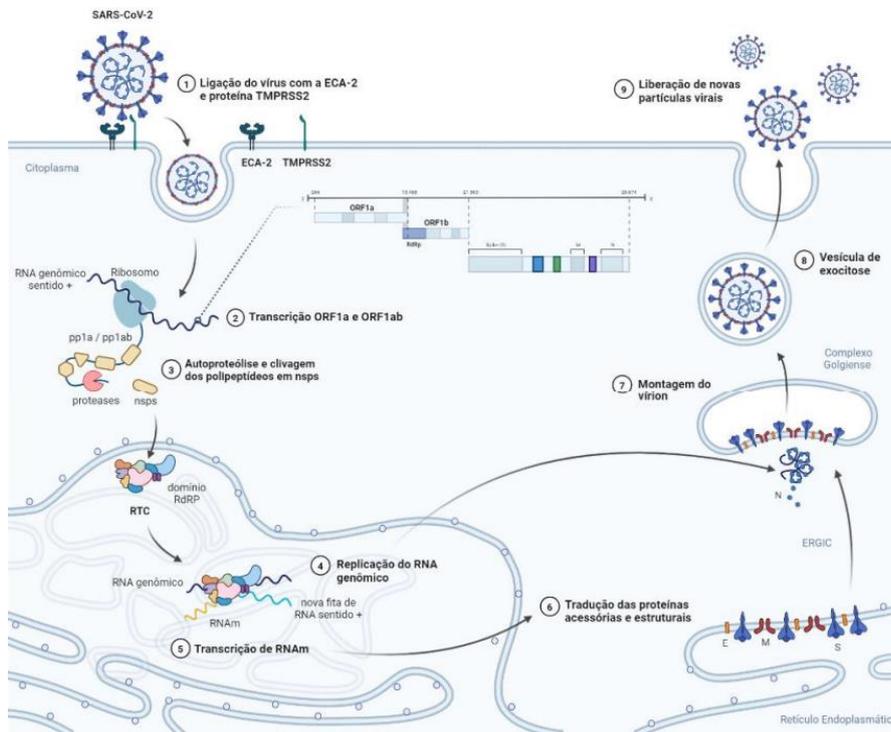


Figura 2: Mecanismo de infecção e replicação do SARS-Cov-2. 1 - Proteína S (Spike) do SARS-Cov-2 interage com receptor ECA-2 da célula hospedeira, ocorrendo ação da protease TMPRSS2 para que ocorra a fusão, endocitose e desnudamento do vírus; 2 - As fases abertas de leitura ORF1a e ORF1b do RNA viral são traduzidas pelo maquinário celular produzindo os polipeptídeos pp1a e pp1ab; 3 - Os polipeptídeos passam por um processo de clivagem proteolítica originando as proteínas não estruturais (nsp); 4 - O domínio RdRP do complexo RTC replica o RNA genômico; 5 - Os RNAs subgenômicos são transcritos pelo RTC em RNAm codificante de proteínas estruturais e não estruturais; 6 - RNAm virais são traduzidos no retículo endoplasmático; 7 - As proteínas estruturais recém sintetizadas seguem para o ERGIC, juntamente com o novo nucleocapsídeo (formado pelo RNA genômico e proteína N), para a montagem do vírion; 8 - Uma nova molécula viral é formada numa vesícula de exocitose; 9 - Exocitose e liberação de novos vírus. Adaptado de (Caillet; Stoffberg; Muleya; Shonhai *et al.*, 2022) e de “Life Cycle of Coronavirus” em BioRender.com.

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

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

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

Contrapondo os casos mais leves em que a homeostase é atingida em um curto período e sem grandes complicações, os quadros graves da infecção apresentam uma resposta inflamatória desregulada e disfuncional desencadeando assim uma exacerbação de marcadores imunológicos a nível plasmático. Essa hiperinflamação como mecanismo de resposta ao vírus (**Figura 3**), está diretamente correlacionada com a severidade e o mal prognóstico do quadro clínico, tanto à efeitos locais quanto sistêmicos (Tay; Poh; Rénia; MacAry *et al.*, 2020).

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

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

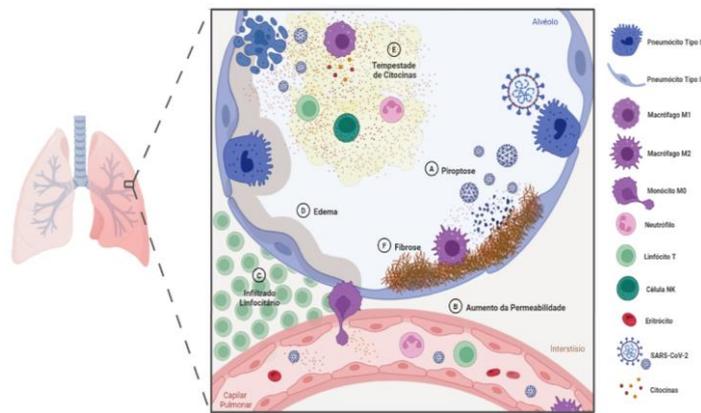


Figura 3: Mecanismo da hiperinflamação causada pela infecção da COVID-19. A. Piroptose da célula hospedeira devido a exocitose de novas partículas virais; B. Aumento da permeabilidade vascular do capilar pulmonar, favorecendo o edema e a quimiotaxia dos leucócitos; C. Infiltrado Linfocitário no interstício;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

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

Tais mediadores são responsáveis pela intensificação e extensão do dano tecidual podendo induzir o desencadeamento da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), quadros de pneumonia viral, choque séptico, falência múltipla de órgãos (FMO) e em muitos casos à morte (Cameron; Bermejo-Martin; Danesh; Muller *et al.*, 2008; Gustine; Jones, 2021; Prompetchara; Ketloy; Palaga, 2020).

Dado todos os eventos fisiopatológicos, é evidente uma diminuição na capacidade de hematose pulmonar, notada clinicamente por dispneia e diminuição da saturação de oxigênio, podendo assim levar a necessidade de intervenções médicas críticas como ventilação mecânica e oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO)(Tian; Hu; Niu; Liu *et al.*, 2020).

À vista das divergências levantadas quanto às evidências clínicas da infecção por SARS-CoV-2, foi observado uma não restrição à porção broncoalveolar, sendo demonstrado efeitos

nocivos da afecção em sistemas extrapulmonares. Exames *post-mortem* de tecido cardíaco, renal, hepático (Monteil; Kwon; Prado; Hagelkrüys *et al.*, 2020), assim como hemato linfóide, vascular e de cunho nervoso central (Bryce; Grimes; Pujadas; Ahuja *et al.*, 2021) de infectados indicaram efeito direto da COVID-19 sobre tais sistemas (Monteil; Kwon; Prado; Hagelkrüys *et al.*, 2020). A **Figura 4** explicita a sintomatologia extrapulmonar da infecção por SARS-CoV-2 representando os principais órgãos afetados (Attiq; Yao; Afzal; Khan, 2021; Gupta; Madhavan; Sehgal; Nair *et al.*, 2020).

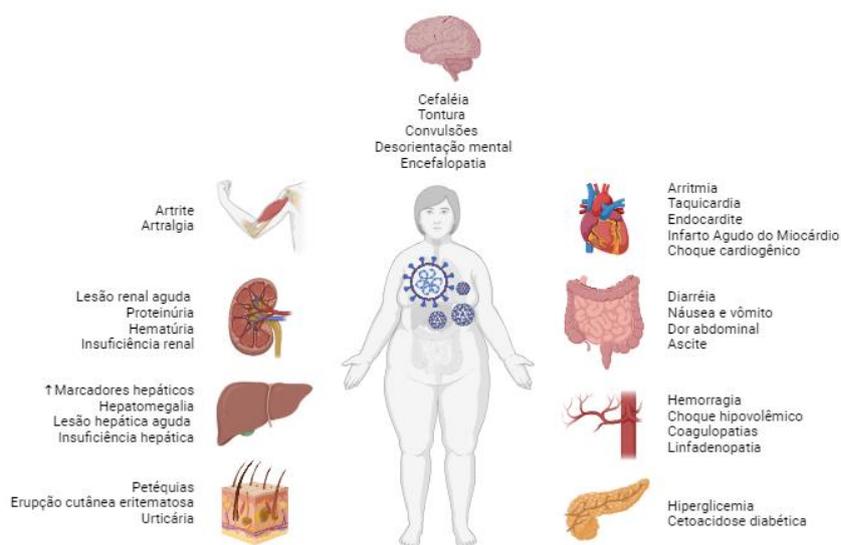


Figura 4: Manifestações Extrapulmonares da infecção por SARS-CoV-2. Sintomatologia da COVID-19 nos principais sistemas extrapulmonares como sistema nervoso, muscular, cardíaco, renal, gastrointestinal, hepático, vascular, tegumentar e pancreático. Adaptado de (Attiq; Yao; Afzal; Khan, 2021; Gupta; Madhavan;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

1.2. Proteínas de Choque Térmico (HSPs)

Caracterizando um grupo de proteínas envolvidas em diversos eixos da manutenção celular, as proteínas de choque térmico (HSPs) (Wang; Li; Yang; Zhao *et al.*, 2020) desenvolvem papel importante quando em cenário estressor intra ou extracelulares. Atuam principalmente como chaperonas moleculares e participam também da manutenção da proteostase, sobrevivência ou indução de morte celular (Zininga; Ramatsui; Shonhai, 2018).

As HSPs foram descobertas por um geneticista ao expor seus ensaios a elevadas temperaturas. Foram então nomeadas pela observação de um aumento transcricional que supostamente garantia tolerância de células e organismos à efeitos tóxicos do calor (Ritossa,

1962; Zininga; Ramatsui; Shonhai, 2018). Pesquisas posteriores constataram que tal família de proteínas compreendem a um total de 5-10% do conteúdo proteico celular e são expressas durante o ciclo celular, embriogênese, em processos de diferenciações e por estímulos de fatores de crescimento celular. Sob a influência de estressores, podem aumentar consideravelmente sua concentração intracelular dentro de poucos minutos com o intuito de suprimir ou atenuar os possíveis danos ao equilíbrio (Lubkowska; Pluta; Strońska; Lalko, 2021).

Devido a sua extrema importância, as HSPs estão presentes em todos os seres procariotos e eucariotos (Lanneau; Brunet; Frisan; Solary *et al.*, 2008). Encontram-se majoritariamente no meio intracelular dispostas no citosol ou em organelas como cloroplastos, núcleo, mitocôndrias e nos retículos endoplasmáticos (Lanneau; Brunet; Frisan; Solary *et al.*, 2008; Zininga; Ramatsui; Shonhai, 2018). Podem, entretanto, ser encontradas extracelularmente quando condicionadas por um ambiente de estresse físico, químico e/ou biológico como radiações ultravioleta, mudanças de temperatura, tratamentos medicamentosos, estresse oxidativo, inflamação, quadros de hipóxia e infecções por patógenos (Wang; Li; Yang; Zhao *et al.*, 2020; Zininga; Ramatsui; Shonhai, 2018).

Fisiologicamente, estão associadas a fatores de choque térmico (HSFs), destacando o HSF-1 (**Figura 5**). Frente ao desequilíbrio celular, acionam a resposta ao choque térmico, o qual consiste na dissociação das HSPs e a indução da regulação positiva de seus genes codificantes. O aumento de HSPs livres sinaliza aos HSFs a necessidade de ligação entre tais moléculas acarretando a diminuição transcricional das mesmas (Lubkowska; Pluta; Strońska; Lalko, 2021).

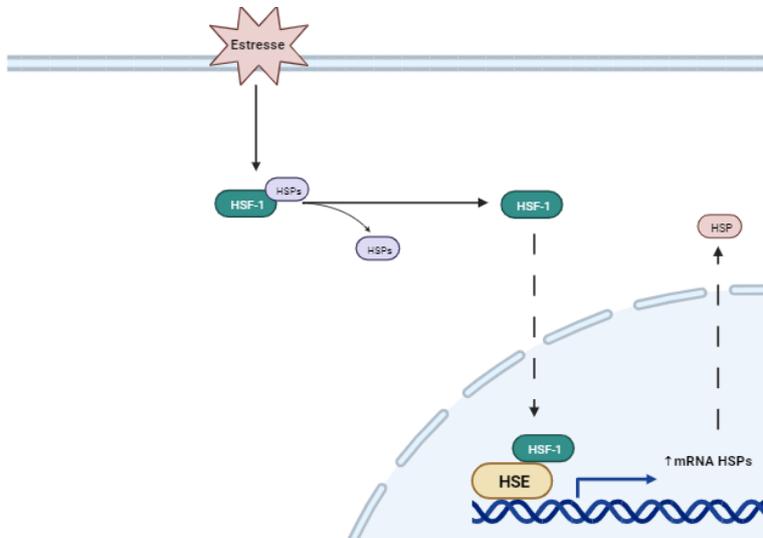


Figura 5: Resposta ao choque térmico. Ao ocorrer um estresse celular (mudança de temperatura, infecção por patógenos, radiação ultravioleta, estresse oxidativo, inflamação, hipóxia, entre outros), o fator de transcrição HSF-1 dissocia-se de HSPs que estão inativando-o e migra para o núcleo. No núcleo, o HSF-1 liga-se a elementos de choque térmico (HSE) na região promotora no DNA e dá-se início na transcrição dos genes envolvidos na resposta ao choque térmico. Consequentemente, há aumento na expressão de mRNA de HSPs, os quais são traduzidos em proteínas de choque térmico (HSPs) e irão atuar na resolução do estresse celular inicial. HSP - Heat Shock Protein; HSF-1 - Heat Shock Factor-1; HSE - Heat Shock Elements. (Makhoba; Makumire, 2022).

Como chaperonas, desempenham um papel protetivo por meio de diferentes mecanismos, permitindo a sobrevivência das células em condições as quais de outra forma seriam lesivas. Atuam no acompanhamento de moléculas e no auxílio na dobragem e redobragem de proteínas evitando sua agressão, como por exemplo. (Lanneau; Brunet; Frisan; Solary *et al.*, 2008). Apesar disso, foi demonstrado ser capaz de desempenhar funções danosas ao organismo em cenários específicos (Lubkowska; Pluta; Strońska; Lalko, 2021). Em infecções virais, desempenha papéis como dobragem da proteína do capsídeo para facilitar a entrada do vírus nas células, montagem, tradução e replicação do genoma viral (Tardif; Waris; Siddiqui, 2005), redução de resposta imune intracelular do hospedeiro ao interagir com sítios de sinalização antivirais (Fislová; Thomas; Graef; Fodor, 2010), transporte viral intracelular, importação e exportação nuclear, entre outros (Ferns; Shams; Shafi, 2006; Kostenko; Moens, 2009).

As HSPs são classificadas em sete grandes famílias de acordo com seus tamanhos moleculares – HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 e HSPs pequenas (de aproximadamente 15-30 kDa) (Zininga; Ramatsui; Shonhai, 2018). Dentre as mais estudadas, destacam-se HSP40, HSP70 e HSP90.

As HSP40s, também designadas como co-chaperonas, estabelecem a maior família de chaperonas moleculares, contendo aproximadamente 50 membros. Tal grupo de proteínas foi nomeado conforme a presença do domínio J em sua estrutura, categorizando-se em três subtipos – A, B e C – definidos pela composição específica de seus domínios (Zarouchlioti; Parfitt; Li; Gittings *et al.*, 2018).

De modo geral, atuam primordialmente, na regulação da homeostase proteica por meio da interação transiente com HSP70, justificando assim sua designação como co-chaperona. Compartilham de atividades bioquímicas fundamentais em correlação com a HSP70 como nas interações específicas à HSP70-ATP e nos estímulos da atividade da ATPase de HSP70. Mediante à tal correlação e, frente ao estresse celular, atuam de modo a ligar-se às proteínas desdobradas e/ou mal dobradas e carregam-nas ao encontro da HSP70 para sua redobragem (Kampinga; Hageman; Vos; Kubota *et al.*, 2009; Liu; Liang; Zhou, 2020; Zarouchlioti; Parfitt; Li; Gittings *et al.*, 2018).

Um importante levantamento foi proposto quanto à disparidade numérica das proteínas da família HSP40, sugerindo que múltiplas HSP40s interagem com uma única HSP70; uma vez que estas são achadas de forma mais numerosa em compartimentos celulares quando em contraste com a quantificação de HSP70. A interação essencial entre Hsp70 e Hsp40 emerge como um dos pilares cruciais para o bom funcionamento e eficácia das proteínas HSP70 (Liu; Liang; Zhou, 2020).

Em infecções virais, HSPs 40 e 70, atuam conjuntamente na modulação de diversas etapas do processo infeccioso na célula hospedeira. Wang *et al.* (2020), Batra *et al.* (2016) e Cao *et al.* (2014) demonstraram o papel direto da HSP40 na replicação do vírus Influenza e Japanese encephalitis. Outra evidência do relevante papel das HSP40s foi pontuada por Knoops *et al.* (2008), o qual mostrou a atuação no recrutamento de proteínas virais do ribossomo para a dobragem que primordialmente é realizada no citosol de células infectadas (Batra; Tripathi; Kumar; Katz *et al.*, 2016; Caillet; Stofberg; Muleya; Shonhai *et al.*, 2022; Cao; Wei; Zhao; Wang *et al.*, 2014; Knoops; Kikkert; Worm; Zevenhoven-Dobbe *et al.*, 2008; Wang; Li; Yang; Zhao *et al.*, 2020).

As HSP70s, por sua vez, são estruturalmente constituídas por dois domínios funcionais conectados entre si por um interdomínio – domínio de ligação a nucleotídeo (NBD) e um domínio de ligação ao substrato (SBD) ligados respectivamente em seus terminais N e C. A hidrólise do ATP em seu domínio N terminal é indispensável para exercer sua atividade de chaperona sob substratos que ligam-se em SBD (Liu; Liang; Zhou, 2020).

Fisiologicamente, dispõe-se de grande importância na dobragem, montagem, estabilização de complexos proteicos, degradação de proteínas e, principalmente, no transporte transmembrana dos compartimentos intracelulares (Martine; Rébé, 2019). Ao ser extravasada para o meio extracelular, desempenha função de DAMP ligando-se a receptores membranares monócitos. Por meio disso, tem-se ativação de NF- κ B e o consequente aumento da transcrição de genes pró-inflamatórios. Observa-se também uma participação direta de HSP70 na via do inflamassoma por meio da fosforilação de I κ B α (Inibidor de κ B - α) por HSP70, permitindo assim a translocação de NF- κ B ao núcleo e a interação entre NLRP3 e HSP70, a qual é desfeita quando o NLRP3 é ativado (Martine; Rébé, 2019).

Tal como HSP70, a HSP90 é uma chaperona ATP dependente que opera em diversas vias de sinalização celular e proteostase. Categorizam-se em três diferentes isoformas – Hsp90 α , Hsp90 α -A2 e Hsp90 β –, as quais estruturalmente, possuem três domínios: terminal N dependente de ATP; terminal C de dimerização e um interdomínio. Além de exercer função de forma similar a outras chaperonas, está envolvida em processos celulares como manutenção de telômeros, apoptose e progressão do ciclo celular. De modo complementar, tem-se sua imprescindível atuação na estabilização do inflamassoma NLRP3 pela formação do complexo formado entre HSP90 e SGT1 (supressor do alelo G2 do homólogo de SKP1) (Makhnevych; Houry, 2012; Wan; Song; Li; He, 2020).

Apesar de suas funções individuais, em geral, as HSPs atuam em conjunto para manter a homeostase e a sobrevivência da célula (**Figura 6**) (Batra; Tripathi; Kumar; Katz *et al.*, 2016; Wan; Song; Li; He, 2020).

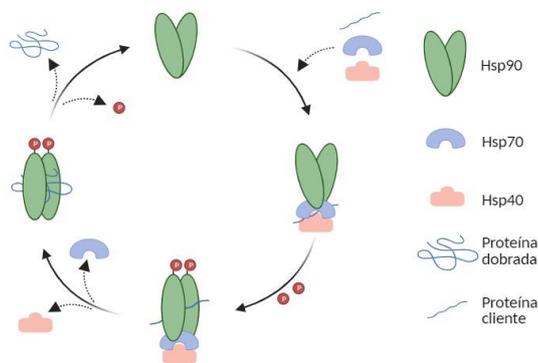


Figura 6: Função constitutiva de proteínas de choque térmico a fim de conservar a homeostase. HSP - Heat Shock Protein. Adaptado de (Wan; Song; Li; He, 2020).

1.3. Síndrome Pós-covid e Síndrome Pós-Sepse

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

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

Os sintomas observados não diferem quanto à forma da doença experienciada pelos indivíduos, acometendo desde os pacientes que foram hospitalizados com quadros mais graves de COVID-19 aos acometidos por formas brandas e assintomatológicas. Diferem-se, portanto, quanto à variáveis de duração, natureza da infecção aguda e características próprias a cada organismo (Batiha; Al-Kuraishy; Al-Gareeb; Welson, 2022).

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

Inúmeras causas foram elencadas e hipotetizadas na tentativa de esclarecer e melhor elucidar a COVID-longa. Quanto à patogênese da infecção, sugere-se a formação de reservatórios persistentes de SARS-CoV-2; desregulação imunológica apresentando ou não a

reativação de patógenos subjacentes; desregulação de microbiota; autoimunidade e ativação de respostas imunes por mimetismo molecular; coagulação sanguínea microvascular com disfunção endotelial; e, sinalização disfuncional no tronco cerebral e/ou nervos (Castanares-Zapatero; Chalon; Kohn; Dauvrin *et al.*, 2022; Davis; McCorkell; Vogel; Topol, 2023).

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

Quando comparadas clinicamente, os quadros de Seps e COVID-19 assemelham-se em sua fisiopatologia, tendo em vista que ambas as sintomatologias se correlacionam fisiológica e imunologicamente. A equivalência em tais manifestações enfatiza sintomas como insuficiência respiratória, coagulopatia, alta produção de citocinas e a latente evolução à choque séptico ou FMO (Batah; Fabro, 2021).

Propõem-se que a similaridade de tais quadros advém de uma resposta imune desregulada e disfuncional, desencadeando uma produção exacerbada de mediadores imunológicos e um conseqüente quadro de tempestade de citocinas (Song; Xu; He; Lu, 2020). Devido a esses fatores ou parte deles, muitos pacientes com COVID-19 grave apresentam sintomas que se enquadram no Terceiro Consenso Internacional para Seps (Singer; Deutschman; Seymour; Shankar-Hari *et al.*, 2016).

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

2. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho, ~~então~~, é avaliar a expressão gênica de proteínas de choque térmico - HSP40, HSP70 e HSP90 em monócitos de pacientes no período de dois anos após a hospitalização por COVID-19, bem como, verificar se há reprogramação celular, contribuindo para a caracterização da Síndrome Pós-Covid

3. METODOLOGIA

A proposta do presente estudo foi submetida e aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição proponente e pelos Hospitais em que foram coletados os prontuários (CAAE 51925221.5.0000.5436 - **Anexo 1**, 51925221.5.3001.5448 - **Anexo 2** e 51925221.5.3002.0139 - **Anexo 3**). Foi concedido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) com explicações sobre a pesquisa (**Anexo 4**) a **todos os pacientes participantes**.

A realização da pesquisa em seus aspectos práticos está denotada no fluxograma abaixo. **Figura 7.**

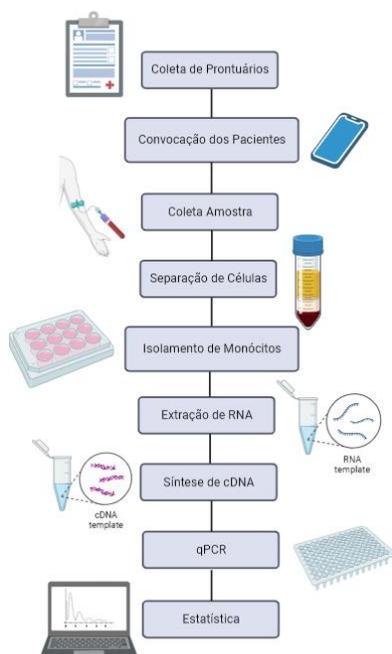


Figura 7: Fluxograma Metodológico. Sequência dos protocolos estabelecidos para a realização do presente trabalho.

3.1. Seleção dos Pacientes

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

A apuração dos pacientes foi realizada com base nos critérios de maioridade e resultado positivo para SARS-CoV-2 no teste molecular de qPCR (swab nasofaríngeo). Descartou-se indivíduos menores de 18 anos ou que foram comprovadamente diagnosticados com HIV, hepatites crônicas, neoplasias e outras doenças autoimunes e inflamatórias. Excluíram-se também indivíduos sob terapia contínua com uso de antialérgicos (anti-histamínicos/corticóides) e/ou anti-inflamatórios (não esteróides/corticóides) uma vez que o comprometimento do sistema imunológico possui influência direta nas análises realizadas e assim também na veracidade dos resultados obtidos.

O estudo contou com n de 68 indivíduos, distribuídos em um grupo controle ($n= 22$) e um grupo de análise ($n= 46$), tal como é esquematizado na **Figura 7**. Para a caracterização do grupo pós-COVID foram incluídos pacientes segundo a necessidade de hospitalização e/ou intubação, sendo assim atrelados às formas moderadas e graves da infecção.

3.2. Seleção do Grupo Controle

Os indivíduos do grupo controle ($n= 22$) foram triados e selecionados pareando-os em idade e gênero. Destaca-se que para a participação no estudo foram considerados indivíduos que nunca apresentaram resultado positivo para SARS-CoV-2 no teste molecular de qPCR (swab nasofaríngeo).

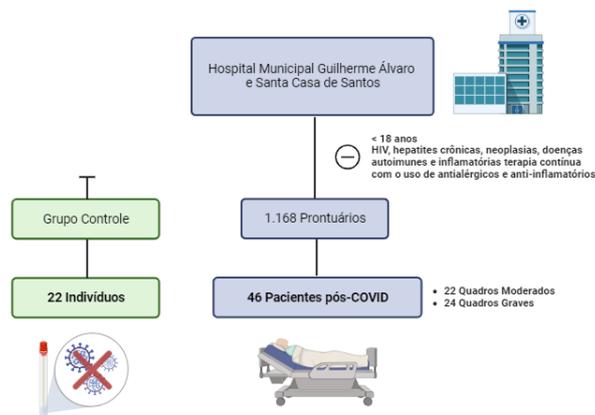


Figura 8: Fluxograma da seleção dos pacientes (n= 68). Ao grupo pós-COVID foram atribuídos 46 pacientes e ao grupo controle, foram selecionados 22 indivíduos. Ambos os grupos foram estabelecidos pautando-se nos critérios de inclusão e exclusão mencionados.

3.3. Prontuários Médicos

Com base nos prontuários médicos disponibilizados pelos hospitais, foram coletadas informações como gênero e idade dos participantes; comorbidades (diabetes, hipertensão, asma, problemas cardiovasculares, doenças pulmonares, cirurgias prévias etc.); tempo de internação; desenvolvimento de insuficiência respiratória e necessidade de intubação; e, dados sobre manifestações intestinais como vômitos e diarreia. Contudo, também foi calculado o índice de mortalidade. Tais informações são apresentadas na tabela abaixo: **(Tabela1)**.

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

Tabela 1: Características dos pacientes do grupo pós-COVID (n: 46). Santos, 2022-2023. SD: Desvio Padrão; min: Valor Mínimo; max: Valor Máximo.

3.4. Separação de Monócitos

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

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

O sedimento rendeu um número de células suficiente para ser distribuído em três poços. Portanto, para ressuspender o sedimento de mononucleares, foram adicionados 3 mL de meio de cultura RPMI no tubo MØ, homogeneizando até se dissolver. Para proporcionar o ambiente adequado, foram adicionados 2 mL de meio de cultura RPMI em cada poço.

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

3.5. Extração de RNA

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

rápida. Tal procedimento foi repetido até que todo o volume da amostra fosse passado pela coluna.

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

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

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

3.6. Síntese de cDNA dos Monócitos

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

3.7. qPCR

As sequências do *primer* utilizado para as análises de expressão de mRNA de HSP70 foram obtidas de acordo com padronizações anteriores do grupo de pesquisa (Gritte, 2022). As demais sequências de *primers* estipuladas para o estudo – HSP40 e HSP90 – foram pautadas nos trabalhos de KUMAR *et al.* (Kumar; Rawat; Khan; Dhamija *et al.*, 2011) e SZCZUKA *et*

Comentado [TS1]: Mudar forma para Author (year)

Comentado [TS2]: Idem aqui, Mudar forma para Author (year)

al. (Szczyka; Wierzbicki; Serek; Szczeńiak-Sięga *et al.*, 2021), respectivamente. Os genes avaliados e seus respectivos *primers* são apresentados na tabela abaixo: **(Tabela 2)**.

Gene	Forward sequence	Reverse Sequence
HSP40	CAGGATCCATGGTGGATTACTATGAAG	GTGGAAGAGAATGAAGTGAGG
HSP70	TGCTGGTCTTAATTGCTTGCG	TGGTTCTCTTCTAAGCGAGG
HSP90	TCTGCCTCTGGTGATGAGATGG	CGTTCACAAAGGCTGAGTTAGC

Tabela 2: Genes alvos e seus respectivos *primers*. HSP - Heat Shock Protein

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

A quantificação do mRNA foi determinada utilizando-se o kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher) utilizando o equipamento StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific) e os resultados, analisados utilizando StepOne Software v2.3 (Thermo Fisher). O valor da quantificação relativa de cada gene alvo foi expresso por meio do método comparativo de CT ($Ct = \text{threshold cycle}$; número de ciclo no qual o produto da PCR atinge o limiar de detecção) (Livak; Schmittgen, 2001).

Para os resultados, foram realizados o cálculo de $2^{\Delta\Delta CT}$. Todos os protocolos empregados em testes com monócitos e macrófagos foram validados por estudos anteriores do grupo (Gritte, 2022).

3.8. Gene Constitutivo

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

De acordo com estudos anteriores do grupo, foram selecionados quatro genes referências mais bem caracterizados em suas expressões, sendo eles: GAPDH, HPRT1, PGK1 e STX5A (Gritte, 2022) **(Tabela 3)**.

Gene	Forward Sequence	Reverse Sequence
GAPDH	TTCAACAGCGACACCCACT	TTCCTCTGTGCTCTTGCT
HPRT1	CCTGGCGTCGTGATTAGTGA	CGAGCAAGACG TTCAGTCCT
PGK1	CCACTGTGGCTTCTGGCATA	ATGAGAGCTTTGGTTCCCG
STx5A	GAACACGGATCAGGGTGCTA	ACGTTCTCGTCGATCCTCTG

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

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

3.9. Análise Estatística

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

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

4. RESULTADOS

As proteínas de choque térmico, nomeadas devido ao aumento de sua expressão após exposição a altas temperaturas, são observadas em todos os compartimentos celulares e em quase todos os organismos vivos estudados atualmente. Primordialmente, atuam na homeostase proteica da célula e, no decurso dos anos, com o avanço das pesquisas, descobriu-se que a expressão gênica de tais proteínas podem sofrer diversos estímulos como radiação, intoxicação por poluentes ambientais, infecções por agentes virais e bacterianos, nicotina, estresse celular, hipóxia, entre outros (Makhoba; Makumire, 2022; Zininga; Ramatsui; Shonhai, 2018).

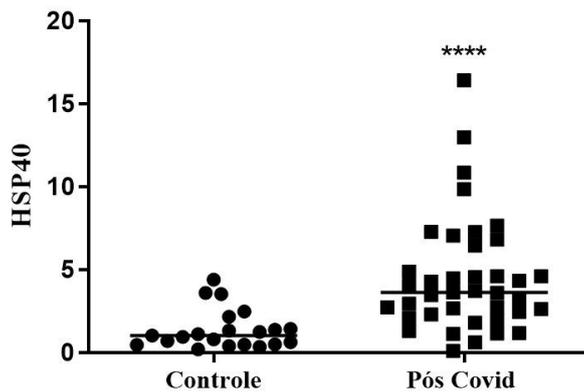


Figura 9: Expressão de mRNA das proteínas de choque térmico 40. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; e (****) $p < 0,0001$ vs Controle.

A expressão de mRNA de HSP40 mostrou-se significativamente aumentada no grupo Covid quando em comparação ao grupo controle ($p < 0,0001$). (Fig 9).

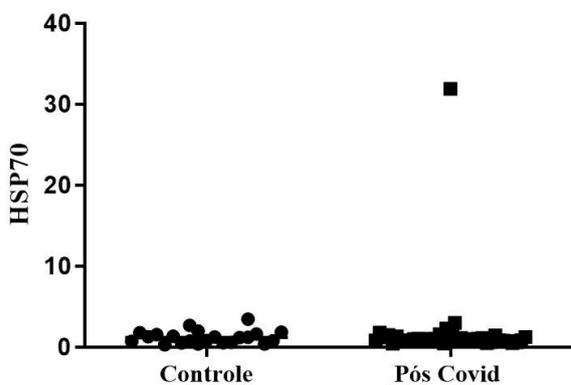


Figura 10: Expressão de mRNA das proteínas de choque térmico 70. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; e (****) $p < 0,0001$ vs Controle.

Divergindo da alteração pontuada anteriormente, os índices de expressão de mRNA de HSP70 não demonstraram alterações estatisticamente relevantes. ($p > 0,05$). (**Fig. 10**)

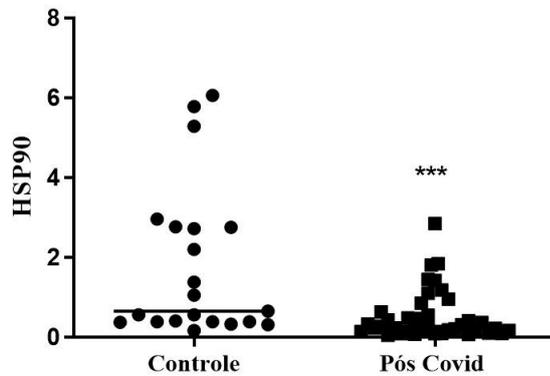


Figura 11: Expressão de mRNA das proteínas de choque térmico 90. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$; e (****) $p < 0,0001$ vs Controle.

Em contraste ao exposto, a análise de HSP90 evidenciou valores expressivamente reduzidos em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$) (**Fig. 11**).

5. DISCUSSÃO

A expressão gênica de HSPs desempenha um importante papel na regulação da resposta imune em condições de estresse agudo e crônico. Sabe-se que devido a fatores como estresse oxidativo, radiação, infecções por patógenos e outros mais, tem-se um mecanismo de resposta ao choque térmico (HSR), o qual promove um aumento transcricional de tais proteínas. Respostas deficientes nessa sinalização corroboram para um pior prognóstico e conseqüentemente à um desfecho desfavorável ao quadro infeccioso, bem como o desencadeamento de cenários graves de COVID-19 por inefetividade da resposta HSR (Heck; Ludwig; Frizzo; Rasia-Filho *et al.*, 2020).

Tem-se estabelecido que em diversas comorbidades como asma, DPOC, obesidade, diabetes, neoplasias e doenças cardiovasculares, a expressão gênica de HSPs altera-se em seus níveis transcricionais; e que, tanto o aumento quanto a redução da transcrição, podem estar relacionados ao aumento da inflamação (Caillet; Stofberg; Muleya; Shonhai *et al.*, 2022).

Kras *et al* (2022) avaliaram a presença de HSP70 intracelular, pelo método de Western Blotting, em monócitos de pacientes em quadro crítico por COVID-19 a fim de avaliar o funcionamento da resposta ao choque térmico. O resultado demonstrou uma resposta deficiente nesses pacientes, havendo menores quantidades de HSP70 em comparação ao grupo controle. Ao contrapor com os dados obtidos em nosso trabalho, é possível observar que no pós-COVID, essa resposta volta à normalidade (Borges Russo; Kowalewski; da Natividade; de Lemos Muller *et al.*, 2022).

Krenytska *et al* (2023) quantificaram HSP70 no plasma, a fim de avaliar o quadro pós-infecção por SARS-CoV-2 e sua correlação com osteoartrite, uma das sequelas clinicamente explicitadas. Foram avaliados os níveis plasmáticos em três grupos distintos, sendo (I) pós-COVID com osteoartrite; (II) pós-COVID sem osteoartrite; e, (III) grupo controle. Constatou-se então, que os índices séricos de tais proteínas não apresentaram mudanças significativas dentre os comparativos feitos entre os grupos em estudo e o grupo controle. Pautado no exposto, os resultados obtidos pelo presente estudo, mostram-se equiparados quanto aos demonstrado por Krenytska *et al* (2023), uma vez que em ambas as metodologias, a variável em estudo apresentou-se normalizada em relação ao controle (Krenytska; Strubchevska; Kozyk; Vovk *et al.*, 2023).

Estudos prévios do nosso grupo acerca da sepse revelaram que indivíduos que foram a óbitos apresentavam níveis elevados na expressão de mRNA de HSP70 se comparados com os

indivíduos que sobreviveram. No entanto, ao comparar o grupo pós-sepse e o grupo controle, observa-se que não há alterações estatísticas relevantes após 3 anos de infecção. Esse resultado assemelha-se ao resultado do presente trabalho, visto que, após 2 anos da infecção por SARS-CoV-2, não se verifica alterações estatísticas consideráveis na expressão de mRNA de HSP70 dentre os grupos controle e COVID-19.

Fundamentando-se nos resultados concernentes às HSPs 40 e 90 obtidos em nosso estudo, é possível sugerir uma reprogramação celular dos monócitos, acarretada pela infecção por SARS-Cov-2. Tendo em vista que os valores aqui apresentados, evidenciam uma variação significativa em relação ao grupo controle, mostrando-se de forma aumentada para a expressão de mRNA de HSP40 e reduzida para a análise de HSP90.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando as similaridades na fisiopatologia da sepse e da COVID-19 foi proposto uma equivalência entre os quadros posteriores de tais doenças. Constatou-se uma variação considerável na expressão de mRNA de HSP40 e HSP90 de pacientes pós-COVID quando comparados com o grupo controle.

A literatura ainda carece de estudos em relação à quantificação de tais proteínas no contexto agudo e posterior à infecção, dificultando assim o estabelecimento de comparativos diretos e concretos para com os achados do nosso estudo. Ademais, inúmeros pacientes atendidos nos hospitais que participaram de nossa pesquisa, não eram residentes da Baixada Santista, impossibilitando a adesão de um n maior de pacientes.

Em suma, fazem-se necessárias avaliações posteriores para uma melhor elucidação do contexto seguinte à COVID-19 e o conseqüente entendimento da Síndrome Pós-COVID. Nossos dados, entretanto, corroboram de maneira significativa para a hipótese de um quadro de imunomodulação gerada por uma reprogramação celular após casos moderados e graves da infecção.

REFERÊNCIAS

- ATTIQ, A.; YAO, L. J.; AFZAL, S.; KHAN, M. A. The triumvirate of NF- κ B, inflammation and cytokine storm in COVID-19. **Int Immunopharmacol**, 101, n. Pt B, p. 108255, Dec 2021.
- BALLERING, A. V.; VAN ZON, S. K.; OLDE HARTMAN, T. C.; ROSMALEN, J. G. Persistence of somatic symptoms after COVID-19 in the Netherlands: an observational cohort study. **The Lancet**, 400, n. 10350, p. 452-461, 2022.
- BARNETT, K. C.; XIE, Y.; ASAKURA, T.; SONG, D. *et al.* An epithelial-immune circuit amplifies inflammasome and IL-6 responses to SARS-CoV-2. **Cell Host Microbe**, 31, n. 2, p. 243-259.e246, Feb 8 2023.
- BATAH, S. S.; FABRO, A. T. Pulmonary pathology of ARDS in COVID-19: A pathological review for clinicians. **Respiratory medicine**, 176, p. 106239, 2021.
- BATIHA, G. E.-S.; AL-KURAI SHY, H. M.; AL-GAREEB, A. I.; WELSON, N. N. Pathophysiology of Post-COVID syndromes: a new perspective. **Virology Journal**, 19, n. 1, p. 158, 2022.
- BATRA, J.; TRIPATHI, S.; KUMAR, A.; KATZ, J. M. *et al.* Human Heat shock protein 40 (Hsp40/DnaJB1) promotes influenza A virus replication by assisting nuclear import of viral ribonucleoproteins. **Scientific Reports**, 6, n. 1, p. 19063, 2016.
- BIVONA, G.; AGNELLO, L.; CIACCIO, M. Biomarkers for Prognosis and Treatment Response in COVID-19 Patients. **Ann Lab Med**, 41, n. 6, p. 540-548, Nov 1 2021.
- BORGES RUSSO, M. K.; KOWALEWSKI, L. S.; DA NATIVIDADE, G. R.; DE LEMOS MULLER, C. H. *et al.* Elevated Extracellular HSP72 and Blunted Heat Shock Response in Severe COVID-19 Patients. **Biomolecules**, 12, n. 10, p. 1374, 2022.
- BREITINGER, U.; FARAG, N. S.; STICHT, H.; BREITINGER, H.-G. Viroporins: Structure, function, and their role in the life cycle of SARS-CoV-2. **The international journal of biochemistry cell biology**, 145, p. 106185, 2022.
- BRYCE, C.; GRIMES, Z.; PUJADAS, E.; AHUJA, S. *et al.* Pathophysiology of SARS-CoV-2: the Mount Sinai COVID-19 autopsy experience. **Mod Pathol**, 34, n. 8, p. 1456-1467, Aug 2021.
- CAILLET, C.; STOFBERG, M. L.; MULEYA, V.; SHONHAI, A. *et al.* Host cell stress response as a predictor of COVID-19 infectivity and disease progression. **Frontiers in Molecular Biosciences**, 9, p. 938099, 2022.
- CAMERON, M. J.; BERMEJO-MARTIN, J. F.; DANESH, A.; MULLER, M. P. *et al.* Human immunopathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS). **Virus Res**, 133, n. 1, p. 13-19, Apr 2008.
- CAO, M.; WEI, C.; ZHAO, L.; WANG, J. *et al.* DnaJA1/Hsp40 is co-opted by influenza A virus to enhance its viral RNA polymerase activity. **Journal of virology**, 88, n. 24, p. 14078-14089, 2014.

CASTANARES-ZAPATERO, D.; CHALON, P.; KOHN, L.; DAUVRIN, M. *et al.* Pathophysiology and mechanism of long COVID: a comprehensive review. **Annals of medicine**, 54, n. 1, p. 1473-1487, 2022.

COVID, J. dashboard by the center for systems science and engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU). **Baltimore, Maryland: John Hopkins University Coronavirus Resource Centre**, 2020.

DAVIS, H. E.; MCCORKELL, L.; VOGEL, J. M.; TOPOL, E. J. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. **Nature Reviews Microbiology**, 21, n. 3, p. 133-146, 2023.

FERNS, G.; SHAMS, S.; SHAFI, S. Heat shock protein 27: its potential role in vascular disease. **International journal of experimental pathology**, 87, n. 4, p. 253-274, 2006.

FISLOVÁ, T.; THOMAS, B.; GRAEF, K. M.; FODOR, E. Association of the influenza virus RNA polymerase subunit PB2 with the host chaperonin CCT. **Journal of virology**, 84, n. 17, p. 8691-8699, 2010.

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

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

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

GUPTA, A.; MADHAVAN, M. V.; SEHGAL, K.; NAIR, N. *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nature medicine**, 26, n. 7, p. 1017-1032, 2020.

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

HECK, T. G.; LUDWIG, M. S.; FRIZZO, M. N.; RASIA-FILHO, A. A. *et al.* Suppressed anti-inflammatory heat shock response in high-risk COVID-19 patients: lessons from basic research (inclusive bats), light on conceivable therapies. **Clinical Science**, 134, n. 15, p. 1991-2017, 2020.

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

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

KAMPINGA, H. H.; HAGEMAN, J.; VOS, M. J.; KUBOTA, H. *et al.* Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. **Cell Stress Chaperones**, 14, p. 105-111, 2009.

KNOOPS, K.; KIKKERT, M.; WORM, S. H. v. d.; ZEVENHOVEN-DOBBE, J. C. *et al.* SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. **PLoS biology**, 6, n. 9, p. e226, 2008.

KOSTENKO, S.; MOENS, U. Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. **Cellular Molecular Life Sciences**, 66, p. 3289-3307, 2009.

KRENYTSKA, D.; STRUBCHEVSKA, K.; KOZYK, M.; VOVK, T. *et al.* Circulating levels of inflammatory cytokines and angiogenesis-related growth factors in patients with osteoarthritis after COVID-19. **Frontiers in medicine**, 10, 2023.

KUMAR, M.; RAWAT, P.; KHAN, S. Z.; DHAMIJA, N. *et al.* Reciprocal regulation of human immunodeficiency virus-1 gene expression and replication by heat shock proteins 40 and 70. **Journal of molecular biology**, 410, n. 5, p. 944-958, 2011.

LANNEAU, D.; BRUNET, M.; FRISAN, E.; SOLARY, E. *et al.* Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. **Journal of cellular molecular medicine**, 12, n. 3, p. 743-761, 2008.

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

LIU, Q.; LIANG, C.; ZHOU, L. Structural and functional analysis of the Hsp70/Hsp40 chaperone system. **Protein Science**, 29, n. 2, p. 378-390, 2020.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. **Methods**, 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LUBKOWSKA, A.; PLUTA, W.; STROŃSKA, A.; LALKO, A. Role of heat shock proteins (HSP70 and HSP90) in viral infection. **International Journal of Molecular Sciences**, 22, n. 17, p. 9366, 2021.

MAKHNEVYCH, T.; HOURY, W. A. The role of Hsp90 in protein complex assembly. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, 1823, n. 3, p. 674-682, 2012.

MAKHOBBA, X. H.; MAKUMIRE, S. The capture of host cell's resources: The role of heat shock proteins and polyamines in SARS-COV-2 (COVID-19) pathway to viral infection. **Biomolecular Concepts**, 13, n. 1, p. 220-229, 2022.

MALONE, B.; URAKOVA, N.; SNIJDER, E. J.; CAMPBELL, E. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 23, n. 1, p. 21-39, 2022.

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

MARTINE, P.; RÉBÉ, C. Heat shock proteins and inflammasomes. **International journal of molecular sciences**, 20, n. 18, p. 4508, 2019.

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

ORGANIZATION, W. H. **A clinical case definition of post COVID-19 condition by a Delphi consensus, 6 October 2021.** World Health Organization. 2021.

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

PLANÈS, R.; BERT, J.-B.; TAIRI, S.; BENMOHAMED, L. *et al.* SARS-CoV-2 envelope (E) protein binds and activates TLR2 pathway: a novel molecular target for COVID-19 interventions. **J Viruses**, 14, n. 5, p. 999, 2022.

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

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

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, 18, n. 12, p. 571-573, 1962.

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

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

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

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

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

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

SONG, C.-Y.; XU, J.; HE, J.-Q.; LU, Y.-Q. Immune dysfunction following COVID-19, especially in severe patients. **Scientific reports**, 10, n. 1, p. 15838, 2020.

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

SZCZUKA, I.; WIERZBICKI, J.; SEREK, P.; SZCZEŚNIAK-SIĘGA, B. M. *et al.* Heat shock proteins HSPA1 and HSP90AA1 are upregulated in colorectal polyps and can be targeted in cancer cells by anti-inflammatory oxicams with arylpiperazine pharmacophore and benzoyl moiety substitutions at thiazine ring. **Biomolecules**, 11, n. 11, p. 1588, 2021.

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

TARDIF, K. D.; WARIS, G.; SIDDIQUI, A. Hepatitis C virus, ER stress, and oxidative stress. **Trends in microbiology**, 13, n. 4, p. 159-163, 2005.

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

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

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

V^KOVSKI, P.; KRATZEL, A.; STEINER, S.; STALDER, H. *et al.* Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, 19, n. 3, p. 155-170, 2021.

WAN, Q.; SONG, D.; LI, H.; HE, M.-I. Stress proteins: the biological functions in virus infection, present and challenges for target-based antiviral drug development. **Signal transduction targeted therapy**, 5, n. 1, p. 125, 2020.

WANG, Z.; LI, Y.; YANG, X.; ZHAO, J. *et al.* Mechanism and complex roles of HSC70 in viral infections. **Frontiers in microbiology**, 11, p. 1577, 2020.

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

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

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

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

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

ZAROUCHLIOTI, C.; PARFITT, D. A.; LI, W.; GITTINGS, L. M. *et al.* DNAJ Proteins in neurodegeneration: essential and protective factors. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 373, n. 1738, p. 20160534, 2018.

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

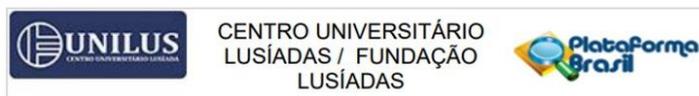
ZHANG, Z.; NOMURA, N.; MURAMOTO, Y.; EKIMOTO, T. *et al.* Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. 13, n. 1, p. 4399, 2022.

ZHENG, M.; KARKI, R.; WILLIAMS, E. P.; YANG, D. *et al.* TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. **J Nature immunology**, 22, n. 7, p. 829-838, 2021.

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

ZININGA, T.; RAMATSUI, L.; SHONHAI, A. Heat shock proteins as immunomodulators. **Molecules**, 23, n. 11, p. 2846, 2018.

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Edgar Matias Bach Hi

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51925221.5.0000.5436

Instituição Proponente: Fundação Lusíada / Centro Universitário Lusíada - UNILUS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.012.568

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

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

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTOS, 01 de Outubro de 2021

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

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

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

IRMANDADE SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SANTOS 

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Edgar Matias Bach Hi

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51925221.5.3002.0139

Instituição Proponente: IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE SANTOS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.036.959

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTOS, 14 de Outubro de 2021

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

Endereço: AV. DOUTOR CLAUDIO LUIS DA COSTA 50
Bairro: JABAQUARA **CEP:** 11.075-900
UF: SP **Município:** SANTOS
Telefone: (13)3202-0600 **E-mail:** cep@scsantos.com.br

ANEXO C- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP: HOSPITAL GUILHERME ÁLVARO

HOSPITAL GUILHERME
ÁLVARO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Edgar Matias Bach Hi

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51925221.5.3001.5448

Instituição Proponente: Hospital Guilherme Alvaro - Santos - SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.075.908

Recomendações:

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTOS, 03 de Novembro de 2021

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

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

ANEXO D - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

Algumas coisas poderão ocorrer durante esta consulta (riscos):

- Dor ou incômodo no local da coleta de sangue

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

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

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

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

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

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

Santos, de _____ de 2023.

**Identificação do Participante:**

Nome: _____

RG: _____ CPF: _____

Telefone: _____

Endereço: _____

Assinatura: _____ Data: ____/____/____

Declaração do pesquisador:

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

Nome do pesquisador: Marcel Cerqueira César Machado

Assinatura:

Data: 09/09/2022

Rubrica do participante_____
Rubrica do pesquisador