

CENTRO UNIVERSITÁRIO LUSÍADA
CURSO DE BIOMEDICINA

INGRID FERREIRA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE NF- κ B PELA VIA DE SINALIZAÇÃO
TLR4/MYD88 EM MONÓCITOS NO QUADRO PÓS-COVID**

SANTOS

2023

INGRID FERREIRA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE NF- κ B PELA VIA DE SINALIZAÇÃO
TLR4/MYD88 EM MONÓCITOS NO QUADRO 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

INGRID FERREIRA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE NF- κ B PELA VIA DE SINALIZAÇÃO
TLR4/MYD88 EM MONÓCITOS NO QUADRO 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.

Aprovado em 21 de Novembro, 2023

Professor Me. Edgar Matias Bach Hi

Professor Me. Eliana Cláudia Perroud Morato Ferreira

Professora Me. Thiago De Arruda Souza

SANTOS

2023

DEDICATÓRIA

Às transformações e à coragem de provocá-las.

AGRADECIMENTOS

Como expresso por Cora Coralina, tenho comigo que a vida se faz como uma colcha de retalhos, é tecida com pedaços de cada vida que passa pela nossa, ficando maior à cada retalho, encontro, pessoa e lição. Portanto, agradeço a todos aqueles que de alguma forma estiveram e torceram comigo para a conclusão desse ciclo. Inicialmente, agradeço à minha avó, Maria Noemia, por todo o apoio e compreensão ao longo da minha vida. Deu-me suporte de todas as maneiras para que eu realizasse meu sonho e me ensinou a construir uma vida baseada na dedicação e amor. Me mostrou que conhecimento nunca é demais e que a educação é o único meio de nos libertar. Você é meu bem mais precioso.

Aos meus pais, Luciana e Ademir, os quais mesmo diante de diversas dificuldades nunca hesitaram em fazer o possível para me ver crescer e alcançar meus objetivos, sem vocês nunca chegaria aqui. Principalmente, à minha mãe, por desde sempre incentivar meu crescimento pessoal e profissional a todo custo. Obrigada por ter sido abrigo e proteção sempre que precisei. À minhas irmãs, Yasmin e Thamiris, por serem minhas melhores amigas e torcerem por mim como ninguém. Agradeço a todos meus familiares em geral, especialmente aos meus tios, Fernanda, Lilian, Urbano, Nolasco e meus primos Ananda e Cauê, por incontáveis vezes me encorajarem, por toda a preocupação comigo e por vibrarem minhas conquistas. Vocês são meu alicerce.

Agradeço ao meu companheiro e melhor amigo, Alexandre Coutinho, que chegou no meio da trajetória e ainda assim me deu suporte sólido e apoio incessante nesse período, nunca me deixou perder as esperanças. Obrigada pelo companheirismo, compreensão, cuidado, dedicação e por tanto amor. Sempre lembrarei de tudo. Aos meus amigos, Beatriz, Amanda, Vitor, Maria Eduarda, Isabella e Bruna, pelas conversas e encorajamento. Vocês tornaram esses anos mais leves. Em especial, agradeço à Mariana Barbosa, por compartilhar comigo essa paixão pela ciência e por toda nossa troca durante a graduação, sua companhia foi essencial e tornou tudo mais leve e descontraído.

Ao meu orientador, Me. Edgar Matias, por todo o incentivo transformador, ensinamentos passados e confiança criada. Ensinou-me o que é ser professor e mostrou que apesar da ciência ser uma área árdua, é possível ser conduzida com paciência e amor. Obrigada pela oportunidade de viver o mundo da pesquisa de perto e me apaixonar ainda mais. Junto a isso, agradeço aos Doutores Raquel Gritte, Marcel Cerqueira, Rui Curi e Francisco Soriano pela

possibilidade de desenvolver essa pesquisa e aprender tanto dentro do laboratório. Ainda, agradeço à cada um do grupo de pesquisa, por tornarem nossas tardes de bancadas mais amenas, com risadas, cafés e conhecimento compartilhado.

Agradeço à Anna Rafaela e todos que tive o prazer de conhecer durante minha iniciação científica, especialmente à Monize, Gigi, Mônica e Renata. Obrigada por me acolherem de coração aberto, vocês abriram minha mente em muitos aspectos e me ensinaram sobre a vida dentro e fora do laboratório. Sem dúvidas acrescentaram muito a minha vida pessoal e profissional. Estendo esse agradecimento a todos os professores que tive durante a graduação, cada um teve um impacto único na minha formação, além do conhecimento científico passaram princípios substanciais, e me mostraram que de fato a educação nasce do cuidado com as pessoas e paixão pelo que se faz.

Agradeço ao Centro Universitário Lusíada e à todas as demais instituições que tiveram papel na minha formação acadêmica – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Universidade Federal de São Paulo.

Ao final, percebemos que nunca estamos totalmente prontos, sempre haverá novos retalhos para adicionar à alma. E assim, sempre de um jeito novo tenho me descoberto dependente, feita do conjunto desses encontros. Espero ter deixado pedacinhos de mim em todos esses que passaram por essa minha fase. Encerro esse ciclo com muito orgulho e gratidão, com o coração cheio e com convicção da carreira científica que escolhi seguir, preparada para os próximos desafios.

EPÍGRAFE

“Estão preparando seu espírito e sua vontade, porque existe uma grande verdade neste planeta: seja você quem for ou o que faça, quando quer com vontade alguma coisa, é porque esse desejo nasceu na alma do Universo. É sua missão na Terra. E quando você quer alguma coisa, todo o Universo conspira para que você realize seu desejo”.

O Alquimista – Paulo Coelho

RESUMO

A COVID-19 é uma doença altamente contagiosa, primordialmente associada ao sistema respiratório, causada pelo SARS-CoV-2. Sua disseminação iniciou-se em dezembro de 2019, em Wuhan, na China e sua rápida contaminação resultou em uma crise de saúde pública mundial, manifestando-se com um espectro amplo com progressão frequente à uma desregulação imunológica em quadros de hiperinflamação. O decurso fisiopatológico da COVID-19 estabelece correlação direta com a ativação de TLRs e a consequente cascata de sinalização MyD88 dependente. Visando estabelecer um comparativo entre o cenário agudo e o pós-COVID, 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 da infecção por SARS-CoV-2. O estudo contou com *n* de 68 indivíduos distribuídos em: (I) 46 pacientes pós-COVID e (II) 22 controles. A partir da amostra sanguínea coletada, os monócitos foram isolados e submetidos à extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR para análise dos seguintes genes: TLR4, TIRAP, MYD88, BTK, IRAK4, I κ B, NF- κ B, NLRP3, IL-1 β e IL-18. A relevância estatística dos dados foi avaliada pelo teste de Mann Whitney, considerando $p < 0,05$. O presente trabalho apresentou uma diminuição da maioria dos genes cruciais para a ativação de NF- κ B pela via de sinalização TLR4/MYD88 – MYD88; BTK; IRAK4; I κ B; e, NF- κ B. Bem como a diminuição de um de seus mediadores inflamatórios transcritos – IL-18. Resultados esses, distintos aos observados nas análises de expressão de mRNA referentes aos demais produtos de tal cascata – NLRP3 e IL-1 β – uma vez que estes não mostraram diferença estatística significativa. Desse modo, expõe-se um indicativo de um possível cenário de imunossupressão ocasionado por uma reprogramação celular após a COVID-19.

Palavras-chave: síndrome pós-COVID (SPC); monócitos; inflamassoma; NF- κ B e reprogramação celular.

ABSTRACT

COVID-19 is a highly contagious disease, primarily associated with the respiratory system, caused by SARS-CoV-2. Its spread began in December 2019 in Wuhan, China and its rapid contamination has resulted in a global public health crisis, manifesting itself with a broad spectrum with frequent progression to immune dysregulation in hyperinflammatory conditions. The pathophysiological course of COVID-19 establishes a direct correlation with the activation of TLRs and the consequent MyD88-dependent signaling cascade. In order to establish a comparison between the acute and post-COVID scenarios, the study was conducted in the Baixada Santista region - SP, including individuals treated at the Santa Casa de Santos and Hospital Municipal Guilherme Álvaro hospitals due to complications from SARS-CoV-2 infection. The study included 68 individuals distributed into: (I) 46 post-COVID patients and (II) 22 controls. From the blood sample collected, monocytes were isolated and subjected to RNA extraction, cDNA synthesis and qPCR for analysis of the following genes: TLR4, TIRAP, MYD88, BTK, IRAK4, I κ B, NF- κ B, NLRP3, IL-1 β and IL-18. The statistical significance of the data was assessed using the Mann Whitney test, considering $p < 0.05$. The present study showed a decrease in most of the genes crucial for the activation of NF- κ B via the TLR4/MYD88 signaling pathway - MYD88; BTK; IRAK4; I κ B; and NF- κ B. As well as a decrease in one of its transcribed inflammatory mediators - IL-18. These results are different to those observed in the mRNA expression analyses for the other products of this cascade - NLRP3 and IL-1 β - since they showed no statistically significant difference. This is indicative of a possible immunosuppression scenario caused by cell reprogramming after COVID-19.

Keywords: post-COVID syndrome; monocytes; inflammasome; NF- κ B and cell reprogramming.

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. Via de sinalização TLR4 dependente de MyD88	26
Figura 6. Estrutura base do inflamassoma NLRP3 e domínios de seus componentes.	27
Figura 7. Formação do inflamassoma NLRP3 pela via de sinalização TLR4/MyD88	28
Figura 8. Fluxograma metodológico	33
Figura 9. Fluxograma de seleção dos pacientes (n= 68)	35
Figura 10. Expressão de mRNA de TLR4 e MYD88	40
Figura 11. Expressão de mRNA de TIRAP e BTK.....	41
Figura 12. Expressão de mRNA de IRAK 4 e IκB.....	41
Figura 13. Expressão de mRNA de NF-κB	41
Figura 14. Expressão de mRNA dos produtos da via – IL-1β, IL-18 e NLRP3	42
Figura 15. Panorama geral da expressão de mRNA da via TLR4/MyD88	43

ABREVIATURAS E SIGLAS

ADPr	ADP-Ribose
ADRP	ADP-Ribose Fosfatase
API	Proteína ativadora 1
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a</i>
BTK	Enzima Bruton Tirosina Quinase
CAPS	Caspase
CARD	Domínio de Recrutamento de Caspase
CCL	Ligante de quimiocina (C-C)
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMP	Progenitor Mielóide Comum
COVID-19	Coronavirus <i>disease</i> 2019
CREB	Proteína de ligação responsiva ao AMPc
CT	<i>Threshold cycle</i>
CXCL	Ligante de quimiocina (C-X-C)
DAMPs	Padrões Moleculares Relacionados ao Dano
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ECA-2	Enzima Conversora da Angiotensina 2
ECMO	Oxigenação por Membrana Extracorpórea
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ERGIC	Compartimento Intermediário Retículo Endoplasmático-Golgi
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
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	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
HR	<i>Heptapeptide Repeat</i>
IFN	Interferon
IKK	I κ B quinase
IL	Interleucina
IRAK	Quinase Associada ao Receptor de IL-1
IκB	Inibidor de κ B
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
MAPKS	Proteína Quinases ativadas por mitógenos
Max	Máximo
MERS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória do Médio Oriente
Min	Mínimo
miRNAs	MicroRNAs
MØ	Monócitos <i>naive</i>

MYD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response 88</i>
NACHT	Domínio de Oligomerização e Ligação de Nucleotídeo
NEMO	<i>IKK gamma</i>
NF-κB	Fator de Nuclear <i>kappa</i> B
NLRP3	Receptor <i>NOD-like</i> contendo domínio PYD N-terminal
Nsps	Proteínas Não Estruturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORFs	Fases Abertas de Leitura
PAMPs	Padrão Molecular Associado ao Patógeno
PBS	Tampão Fosfato Salino
PGK1	<i>Phosphoglycerate Kinase 1</i>
Pró-IL	Pró-Interleucina
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PYD	Domínio Pirimidina N-terminal
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RBD	<i>Receptor Binding Domain</i>
RBM	<i>Receptor Binding Motif</i>
RdRP	RNA polimerase dependente de RNA
RHD	Domínios homólogos a Rel
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTC	Complexo Replicação-Transcrição
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-Cov-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SD	Desvio Padrão
SMF	Sistema de Fagocitose Mononuclear
SP	São Paulo
SPC	Síndrome pós-COVID
STx5A	<i>Syntaxin</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor-β-activated kinase 1</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF	Fator de Crescimento Transformador
TIRAP	Adaptador do Tipo MyD88
TLR	Receptores Toll-like
TMPRSS2	<i>Host Type II Transmembrane Serine Protease 2</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAF6	Fator 6 associado ao Receptor TNF
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. SARS-COV-2 e a COVID-19	13
1.2. Monócitos e Seus Perfis Funcionais	22
1.3. Interconexão entre a Via de Sinalização TLR4/MyD88 e Inflamação	24
1.4. Do Agudo ao Crônico: Desenvolvimento da Síndrome Pós-COVID	29
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Seleção dos Pacientes	34
3.2. Seleção do Grupo Controle	34
3.3. Prontuários Médicos	35
3.4. Separação de Monócitos	36
3.5. Extração de RNA	36
3.6. Síntese de cDNA dos Monócitos	37
3.5. qPCR	38
3.6. Gene Constitutivo	39
3.7. Análise Estatística	39
4. RESULTADOS	40
4.1. Panorama Geral da Expressão da Via TLR4/MyD88	43
5. DISCUSSÃO	44
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO	58
Anexo A - Parecer consubstanciado do CEP: Centro Universitário Lusíada	58
Anexo B – Parecer consubstanciado do CEP: Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Santos	59
Anexo C– Parecer consubstanciado do CEP: Hospital Guilherme Álvaro	60
Anexo D - Termo de Consentimento livre e esclarecido	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. SARS-COV-2 e a COVID-19

Em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou estado pandêmico devido à disseminação do vírus denominado Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-Cov-2) (Sohrabi; 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 coronavíruses não eram ao todo desconhecidas. Nos anos de 2002 e 2012, a sociedade foi alvo de dois relevantes vírus da família *Coronaviridae*, sendo eles o Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV) e o Coronavírus da Síndrome Respiratória do Médio Oriente (MERS-CoV), 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 *Nidoviridales*, 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).

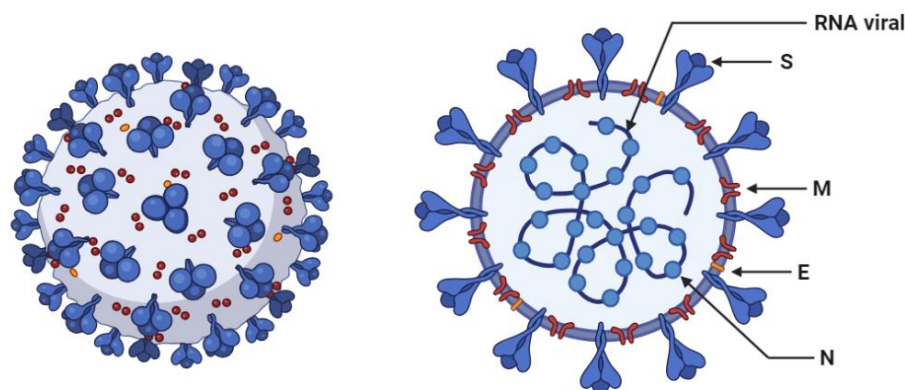


Figura 1. Estrutura do SARS-CoV-2. O RNA viral é complexado com a proteína N para formar um envelope helicoidal dentro da membrana viral; S, proteína Spike; M, proteína M; E, proteína de envelope; N, proteína de nucleocapsídeo. Adaptado de (Weiss; Leibowitz, 2011).

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 conseqüentemente 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 na proliferação celular (Kadam; Sukhramani; Bishnoi; Pable *et al.*, 2021). A nsp3, por sua vez, é uma proteína de múltiplos domínios, sendo um dos quais o ADP-ribose fosfatase (ADRP) que apresenta um sítio de ligação ADP-ribose (ADPr) responsável pela interação com vias de resposta imunológica, como a via de sinalização do fator nuclear *kappa B* (NF- 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 traducionais do hospedeiro (Kadam; Sukhramani; Bishnoi; Pable *et al.*, 2021).

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

Após a infecção, o período de incubação média é de 4 a 5 dias, tendo início dos sintomas no intervalo de 6 a 9 dias, de modo que 97,5% dos doentes sintomáticos desenvolvem sintomas no prazo médio de 11,5 dias (Tay; Poh; Rénia; MacAry *et al.*, 2020). A carga viral, quando mensurada em indivíduos acometidos pela COVID-19, foi correlacionada com um pior prognóstico do quadro clínico, visto que em pacientes mais graves a quantificação foi mais elevada e de maior (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 apara 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 Cathepsina B e L são de suma importância para o proceder da infecção, uma vez que, em pH ácido, assumem sua forma ativa e realizam a fusão com a membrana endossomal, permitindo a liberação do genoma de RNA viral (**Figura 2 - Etapa 1**) (Li; Jia; Tian; Wu *et al.*, 2022; Zhang; Xiang; Huo; Zhou *et al.*, 2021).

Como o genoma do SARS-CoV-2 consiste em uma molécula de RNA de polaridade positiva, o mesmo pode ser imediatamente transcrito pela maquinaria celular, produzindo os polipeptídeos pp1a e pp1ab, pelas fases abertas de leitura ORF-1a e ORF-1b (**Figura 2 - Etapa 2**). Tais polipeptídeos passam por um processo de clivagem proteolítica originando as proteínas não estruturais (nsps) (**Figura 2 - Etapa 3**) (Kadam; Sukhramani; Bishnoi; Pable *et al.*, 2021; Karki; Kanneganti, 2022; Li; Jia; Tian; Wu *et al.*, 2022; Malone; Urakova; Snijder; Campbell, 2022; V'Kovski; Kratzel; Steiner; Stalder *et al.*, 2021; Wu; O'Kane; Peng; Bi *et al.*, 2020; Yan; Zheng; Zeng; He *et al.*, 2022). Para a garantia da amplificação viral, é de suma importância a formação do Complexo Replicação-Transcrição (RTC), estabelecido principalmente pela nsp 12 em conjunto com as nsps 7 e 8, constituintes do domínio RdRP (RNA polimerase dependente de RNA), o qual atua de modo a replicar o material genômico viral formando novas moléculas de RNA de sentido positivo (**Figura 2 - Etapa 4**) (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 mRNA de caráter subgenômico, codificantes de proteínas acessórias e estruturais (**Figura 2 - Etapa 5**), os quais são traduzidos na membrana do retículo endoplasmático rugoso (**Figura 2 - Etapa 6**) e em seguida encaminhadas ao ERGIC. Em seguida os vírions maduros são montados (**Figura 2 - Etapa 7**) e liberados por brotamento em vesículas pelo complexo Golgiense (**Figura 2 - Etapa 8**), e ao migrar para a membrana celular é liberado por exocitose (**Figura 2- Etapa 9**), iniciando uma nova fase de infecção no organismo (**Figura 2 - Etapa 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; Yan; Zheng; Zeng; He *et al.*, 2022).

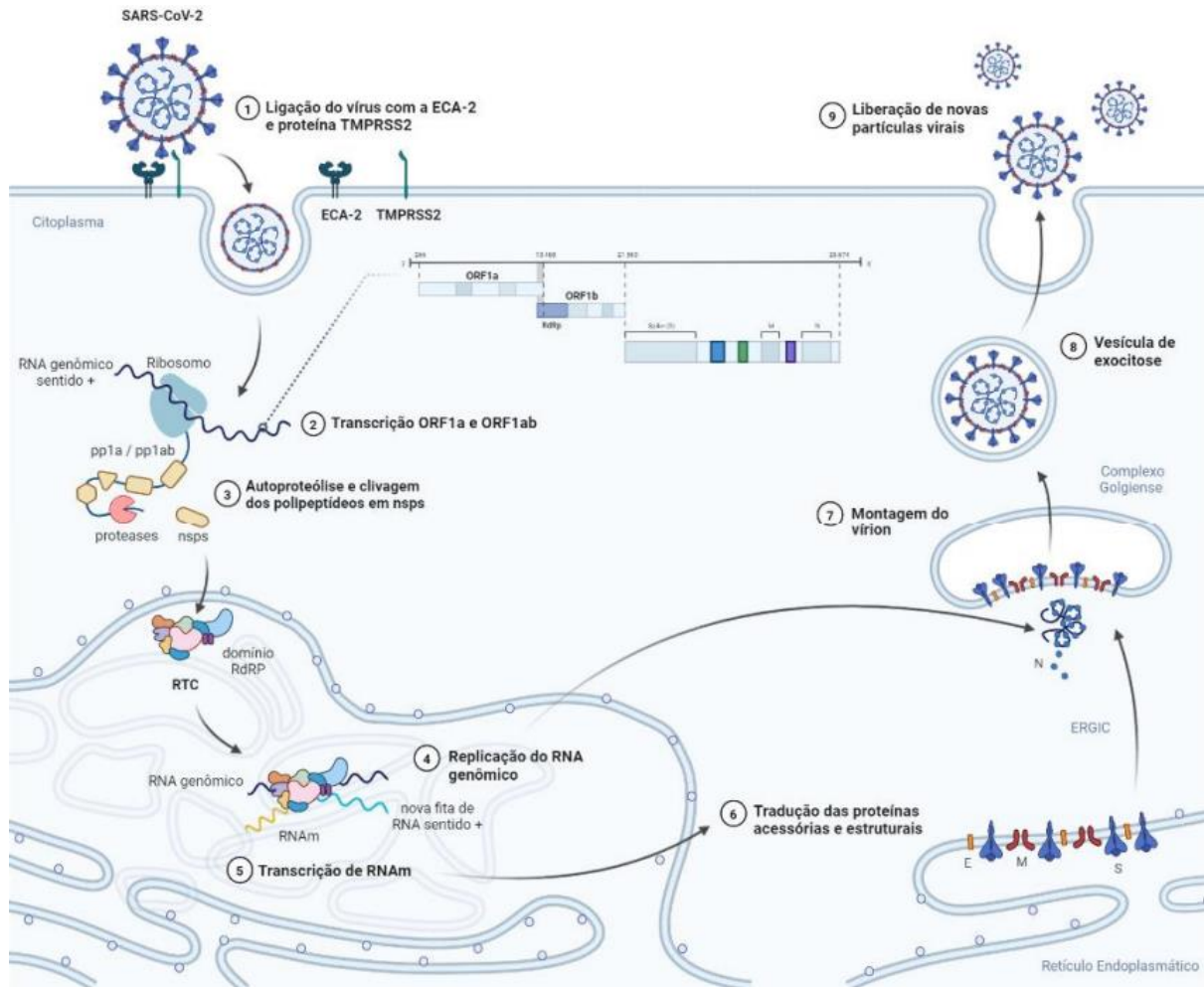


Figura 2. Mecanismo de infecção e replicação do SARS-Cov-2. 1 - Proteína S (Spike) do SARS-Cov-2 interage com receptor ECA-2 da célula hospedeira, ocorrendo ação da protease TMPRSS2 para que ocorra a fusão, endocitose e desnudamento do vírus; 2 - As fases abertas de leitura ORF1a e ORF1b do RNA viral 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 (nsps); 4 - O domínio RdRP do complexo RTC replica o RNA genômico; 5 - Os RNAs subgenômicos são transcritos pelo RTC em mRNA codificante de proteínas estruturais e não estruturais; 6 - mRNA virais são traduzidos no retículo endoplasmático; 7 - As proteínas estruturais recém sintetizadas seguem para o ERGIC, juntamente com o novo nucleocapsídeo (formado pelo RNA genômico e proteína N), para a montagem do vírion; 8 - Uma nova molécula viral é formada numa vesícula de exocitose; 9 - Exocitose e liberação de novos vírus. Adaptado de (Karki; Kanneganti, 2022; Tucker; Lee; Glausinger, 2022).

A presença de partículas virais caracteriza-se ao sistema imunológico como moléculas PAMPs (Padrão Molecular Associado ao Patógeno), as mesmas, são ativadoras da imunidade inata por meio da ligação com receptores Toll-like (TLRs). Assim como rege o tropismo do SARS-CoV-2 pelo parênquima pulmonar, são ativados TLRs, que desencadeiam uma série de eventos intracelulares importantes para os processos fisiopatológicos condizentes à infecção viral (Tay; 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, cefaleias, 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- 1β , IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , CXCL10, CCL2, CCL3 e CCL4. Assim também, observa-se uma infiltração de caráter mononuclear no espaço intersticial por meio da liberação de determinados sinais quimiotáticos (**Figura 3 - C**) (Gustine; 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 consequente formação de edema alveolar (**Figura 3 - D**) e processos fibróticos (**Figura 3 - E**). Elevados índices sistêmicos de tais citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no foco infeccioso são usualmente denominados como tempestade de citocinas (**Figura 3 - F**) (Attiq; Yao; Afzal; Khan, 2021).

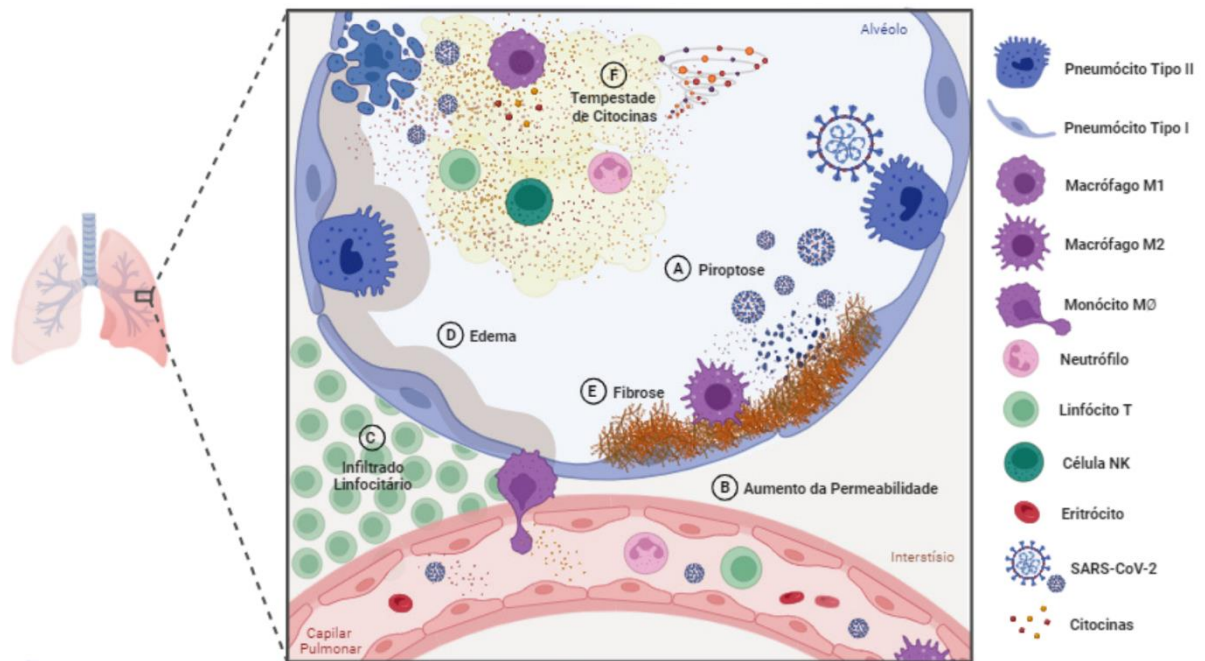


Figura 3. Mecanismo da hiperinflamação causada pela infecção da COVID-19. A. Piroptose da célula hospedeira devido a exocitose de novas partículas virais; B. Aumento da permeabilidade vascular do capilar pulmonar, favorecendo o edema e a quimiotaxia dos leucócitos; C. Infiltrado Linfocitário no interstício; D. Edema do tipo exsudato; E. Fibrose como mecanismo de reparo tecidual; F. Tempestade de Citocinas – liberação exacerbada de mediadores pró-inflamatórios; 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 pró 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 bronco alveolar, 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 linfoide, vascular e de cunho nervoso central (Bryce; Grimes; Pujadas; Ahuja *et al.*, 2021) de infectados indicaram efeito direto da COVID-19 sobre tais sistemas (Bryce; Grimes; Pujadas; Ahuja *et al.*, 2021; 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).

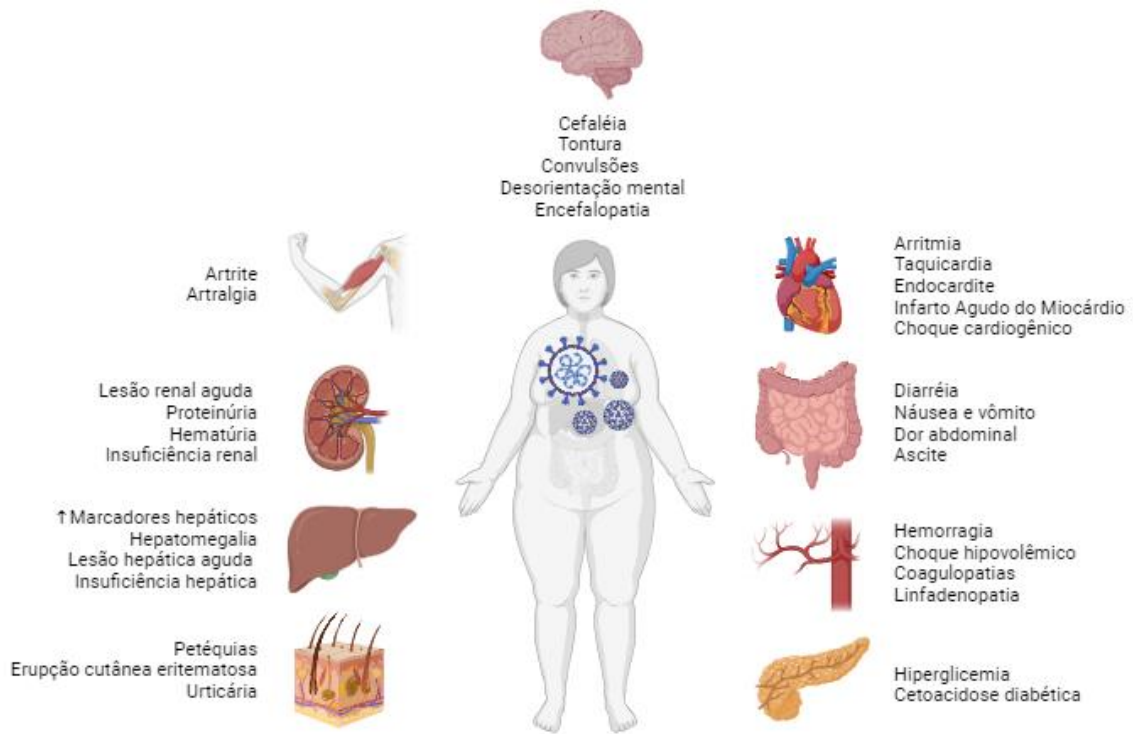


Figura 4. Manifestações extrapulmonares da infecção por SARS-CoV-2. Sintomatologia da COVID-19 nos principais sistemas extrapulmonares como sistema nervoso, muscular, cardíaco, renal, gastrointestinal, hepático, vascular, tegumentar e pancreático. Adaptado de (Attiq; Yao; Afzal; Khan, 2021; Gupta; Madhavan;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

1.2. Monócitos e Seus Perfis Funcionais

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

Definidos como células sanguíneas circulantes, os monócitos constituem aproximadamente 10% dos leucócitos periféricos (Guilliams; Mildner; Yona, 2018). Tais células, quando parte da circulação sanguínea, categorizam-se como monócitos *naive* ($M\emptyset$), os quais apresentam uma meia-vida curta de aproximadamente 9 horas (Zago; Falcão; Pasquini, 2013). Podem ainda ser distinguidos em três diferentes ordens, sendo essas pautadas na expressão dos marcadores de membrana CD14 e CD16. A fenotipagem do tipo clássica é caracterizada pela expressão $CD14^+ CD16^- / CD14^{high} CD16^-$, os quais ditam a prevalência dos monócitos humanos (85-90%). As demais quantificações (10-15%) dividem-se nas subclassificações: $CD14^+ CD16^+ / CD14^{high} CD16^+$ – fenótipo intermediário; $CD14^{dim} CD16^+ / CD14^+ CD16^{++}$ – fenótipo não clássico (Alexander; Varvara; Nikita; Veronika *et al.*, 2019; Knoll; Schultze; Schulte-Schrepping, 2021).

Sabe-se que a caracterização da função monocitária é decorrente da heterogeneidade de tais células, as quais apresentam uma significativa plasticidade fenotípica diferenciando-se, de acordo com as demandas do microambiente e com a regência de imunomediadores (Alexander; Varvara; Nikita; Veronika *et al.*, 2019; Guermonprez; Helft, 2019; Juhas; Ryba-Stanisławowska; Szargiej; Myśliwska, 2015). No decurso de um processo inflamatório, direcionam-se aos tecidos por um processo intitulado diapedese. Diferenciam-se então por estímulos dependentes em células dendríticas, as quais atuam na apresentação de antígenos e ativação de células T *naive* (Guilliams; Ginhoux; Jakubzick; Naik *et al.*, 2014), e em macrófagos (ESPINOZA; EMMADY, 2023).

Em cada tecido, para além dos macrófagos derivados de monócitos circulantes, encontram-se macrófagos residentes, que se desenvolvem durante a fase embrionária derivando-se do saco vitelino e do fígado fetal, antes do estabelecimento da hematopoese definitiva. Os macrófagos originados a partir do embrião perduram o potencial de auto renovação, ou conforme necessário, são repopulados pelos monócitos clássicos, os quais possuem uma reprogramação

da expressão gênica que lhes permite migrar para os tecidos mesmo quando em homeostasia (Guilliams; Mildner; Yona, 2018).

De acordo com o sistema em que se localizam, desempenham funções específicas conforme as diferentes demandas teciduais e sendo assim, dispõem-se de nomenclaturas distintas. Tendo como exemplo células da micróglia no tecido nervoso, células de Kupffer à nível hepático, osteoclastos em tecidos ósseos, células de Langerhans na derme e macrófagos alveolares no parênquima pulmonar (Bleriot; Chakarov; Ginhoux, 2020; Zago; Falcão; Pasquini, 2013). Seu percentual de sobrevivência como células já diferenciadas extravascularmente pode variar em meses ou anos (Zago; Falcão; Pasquini, 2013).

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

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

No decurso da inflamação o perfil funcional M1 surge em resposta à diferentes vias de estímulo, dentre as quais, destacam-se as ativações por mediadores químicos pró-inflamatórios

como IFN, TNF- α e PAMPs como moléculas de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e a proteína Spike (S) do SARS-CoV-2. Em decorrência a cada estímulo, diferentes cascatas de sinalização intracelular serão sucedidas, dispondo-se de adaptadores específicos para a ativação de diferentes fatores de transcrição do genoma celular. Contexto esse, que repercute em um aumento da expressão de genes codificadores de citocinas, quimiocinas, marcadores de superfície e outros reguladores do processo inflamatório (Alexander; Varvara; Nikita; Veronika *et al.*, 2019; Gharavi; Hanjani; Movahed; Doroudian, 2022; Lawrence; Natoli, 2011; Locati; Mantovani; Sica, 2013; Mantovani; Sica; Sozzani; Allavena *et al.*, 2004; Martinez; Gordon, 2014; Viola; Munari; Sánchez-Rodríguez; Scolaro *et al.*, 2019).

1.3. Interconexão entre a Via de Sinalização TLR4/MyD88 e Inflamação

Fundamentando-se no papel desempenhado por monócitos e macrófagos em um contexto de rompimento ao equilíbrio homeostático, têm-se sua crucial atuação como regente do processo inflamatório (Mussbacher; Derler; Basílio; Schmid, 2023). Posto a notória importância dos PRRs na resposta imunológica, ressalta-se os receptores do tipo Toll (TLRs) (Chen; Xu, 2022), o quais conceituam-se como glicoproteínas transmembranares do tipo 1 (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019; Mantovani; Oliviero; Varchetta; Renieri *et al.*, 2023).

Caracterizados em células humanas, são descritos 10 subtipos de TLRs (TLR1-10), os quais podem estar diferentemente localizados na bicamada lipídica (TLR1, 2, 4, 5, 6 e 10) ou como constituintes da membrana endossomal (TLR3, 7, 8 e 9) (Bode; Ehling; Häussinger, 2012; Mantovani; Oliviero; Varchetta; Renieri *et al.*, 2023). Dentre o grupo heterogêneo de TLRs, enfatiza-se o papel de TLR4 na ativação de NF- κ B e na decorrente transcrição de moléculas e mediadores essenciais no quadro inflamatório e a consequente polarização do fenótipo M1 de macrófagos (Liu; Zhang; Joo; Sun, 2017; Lu; Yeh; Ohashi, 2008).

Em resposta à ligantes padrões como DAMPS e PAMPs, o TLR4 desencadeia duas cascatas de sinalização intracelular: (I) via dependente de MyD88 (*Myeloid Differentiation Primary Response 88*), reguladora da ativação de NF- κ B e MAPKs (Proteína Quinases ativadas por mitógenos); e (II) via dependente de TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), relacionada com a produção de Interferons do tipo I (IFN-1) (Ciesielska; Matyjek; Kwiatkowska, 2021; Strober; Murray; Kitani; Watanabe, 2006).

Com exceção do TLR3, tem-se a proteína MyD88 como adaptadora universal, a qual atua de modo a recrutar a família de quinases IRAK (Quinase Associada ao Receptor de IL-1) (O'Neill, 2008). No que se refere a cascata derivada de TLR4, a via a ser decorrida requer um segundo adaptador – TIRAP (Adaptador do Tipo MyD88) – para interfacear a interação MyD88 e TLR4 (Kuzmich; Sivak; Chubarev; Porozov *et al.*, 2017; O'Neill, 2008; O'Neill; Bowie, 2007). Nessa correlação, a enzima Bruton Tirosina Quinase (BTK) responsabiliza-se pela ativação de TIRAP por meio de reações de fosforilação (Gray; Dunne; Brikos; Jefferies *et al.*, 2006; Kenny; O'Neill, 2008; O'Neill, 2008; Piao; Song; Chen; Wahl *et al.*, 2008).

O desencadear de tais eventos recruta então as quinases da família IRAK, destacando-se a quinase IRAK4. A autofosforilação de tal molécula promove o estabelecimento do complexo Mydssomo (Bernard; O'Neill, 2013; O'Neill; Bowie, 2007), estrutura responsável pelo recrutamento e ativação de TRAF6 (fator 6 associado ao receptor TNF). A propagação de tal transdução de sinal, segue com a atuação de TAK1 (*transforming growthfactor- β -activated kinase 1*) (Ciesielska; Matyjek; Kwiatkowska, 2021; Kawai; Akira, 2007; Lu; Yeh; Ohashi, 2008) na ativação do complexo IKK (I κ B quinase), complexo esse, estruturado pela junção de IKK α , IKK β e NEMO (IKK γ). A porção catalítica IKK β atua de modo a fosforilar o inibidor de κ B (I κ B), possibilitando translocação do NF- κ B para o compartimento nuclear, permitindo assim sua atuação como um mediador transcricional (Kawai; Akira, 2007; Lu; Yeh; Ohashi, 2008). Além disso, TAK1 pode atuar na ativação de MAP quinases (MAPK), relacionada com diferentes fatores transcricionais em demais vias, como AP-1 (proteína ativadora 1) e CREB (proteína de ligação responsiva ao AMPc) (Ciesielska; Matyjek; Kwiatkowska, 2021; Płóciennikowska; Hromada-Judycka; Borzęcka; Kwiatkowska, 2015).

A transcrição gênica mediada por NF- κ B é de suma importância, uma vez que se estabelece como um eixo primordial na produção de produtos de caráter inflamatório. As proteínas NF- κ B referem-se à um conjunto de subunidades – RelA, c-Rel, RelB, p105, p50, p100 e p52 – as quais, por seus domínios homólogos à Rel (RHD), ligam-se às sequências discretas de DNA conhecidas como sítios κ B presentes em regiões promotoras e potenciadoras (Mantovani; Oliviero; Varchetta; Renieri *et al.*, 2023; Newton; Dixit, 2012). Na sinalização por TLR4, os heterodímeros mais comumente formados são entre RelA e p50 (Karin; Greten, 2005).

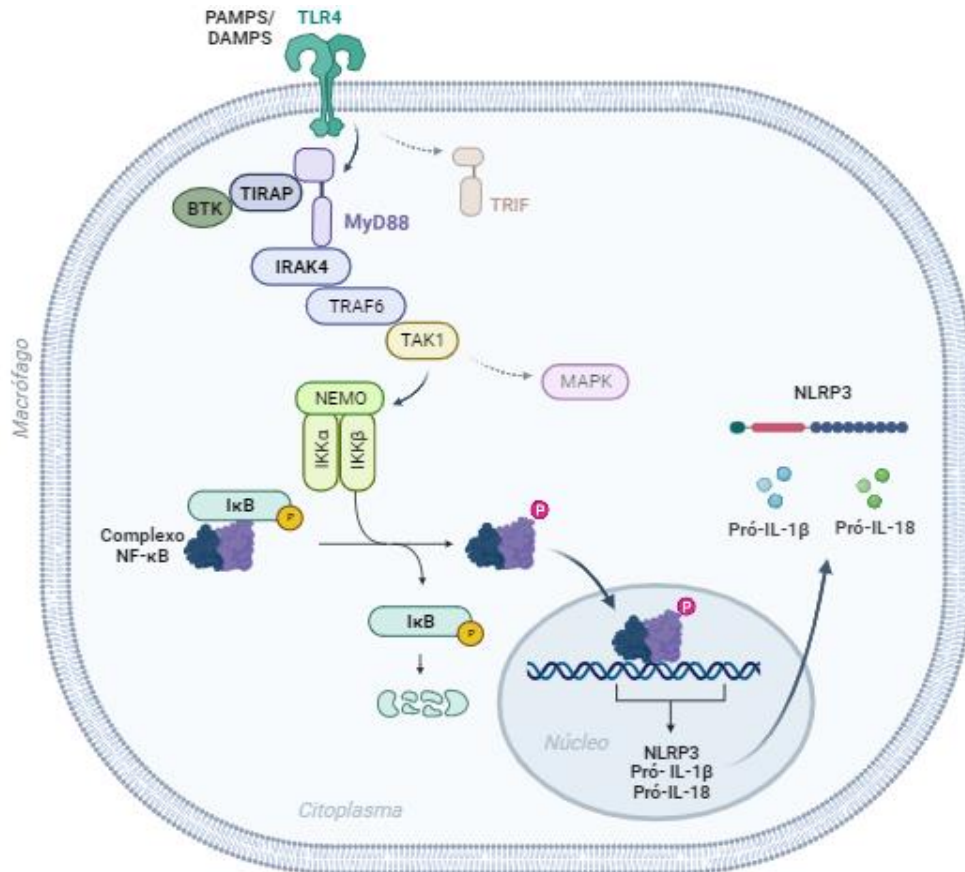


Figura 5. Via de sinalização TLR4 dependente de MyD88. Ativação do Fator Nuclear κ B (NF- κ B) pela cascata de sinalização intracelular TLR4/MYD88 e a conseguinte transcrição de produtos de caráter pró-inflamatório – NLRP3 e as formas imaturas das interleucinas IL-1 β e IL-18. Adaptado de (Kuzmich; Sivak; Chubarev; Porozov *et al.*, 2017).

De tal modo, repercutem uma série de transcritos gênicos referentes às citocinas, quimiocinas, mediadores de inflamação, proteases e inibidores de apoptose (Karin; Greten, 2005). Diante disso, tem-se o fundamental papel da ativação de NF- κ B no fenótipo M1 de macrófagos, destacando sua importância na resposta de formação do inflamassoma NLRP3 (Awad; Assrawi; Jumeau; Georgin-Lavialle *et al.*, 2017). Como um de seus mecanismos pró-inflamatórios, o inflamassoma compreende um complexo multimérico de proteínas circunscrito no citosol que resulta na maturação e secreção de mediadores inflamatórios, contribuindo para a intensificação da resposta imune frente à riscos proeminentes ao organismo (Newton; Dixit, 2012; Paik; Kim; Silwal; Sasakawa *et al.*, 2021; Pandey; Shen; Feng; Man, 2021; Wang; Yu; Chang; Zhang *et al.*, 2023).

A disposição elementar de tal complexo, é constituída pelo sensor NLRP3 (receptor *NOD-like* contendo domínio PYD N-terminal 3), pela molécula adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) e por sua proteína efetora Pró-Caspase-1, tal qual ilustra a **Figura 6** (Chen; Xu, 2022; McKee; Coll, 2020).

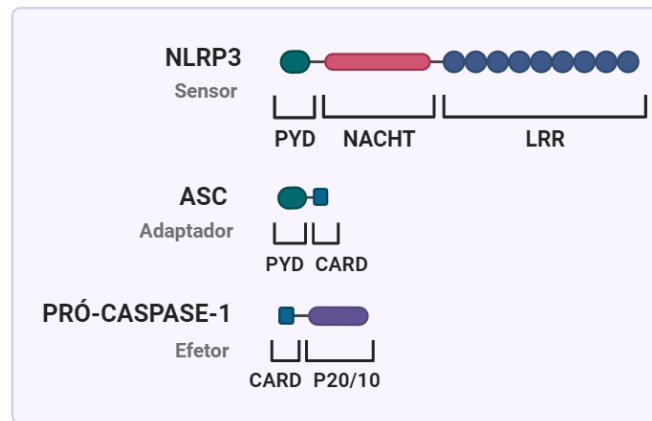


Figura 6. Estrutura base do inflamassoma NLRP3 e domínios de seus componentes. Sensor NLRP3: PYD (domínio pirimidina N-terminal), NACHT (Domínio de Oligomerização e Ligação de Nucleotídeo); Adaptador ASC: PYD e CARD (Domínio de Recrutamento de Caspase) e; Efetor Pró-Caspase-1: CARD e P20/10. Adaptado de (Chen; Xu, 2022).

Para a formação do inflamassoma NLRP3 se faz necessário um processo de duas etapas, conceituadas fases de preparação e ativação, conhecidas como Sinais 1 e 2, respectivamente (Chen; Xu, 2022; Paik; Kim; Silwal; Sasakawa *et al.*, 2021). O sinal 1 é resultante do reconhecimento de moléculas padrões, dentre os quais ressalta a via de sinalização TLR4/MYD88 (Paik; Kim; Silwal; Sasakawa *et al.*, 2021). Em consequência a esse reconhecimento, há a ativação transcricional de NLRP3, pró-IL-1 β e pró-IL-18 por meio da via de sinalização do Fator Nuclear *kappa* B (NF- κ B) (Guo; Callaway; Ting, 2015; Liu; Zhang; Joo; Sun, 2017).

A fase de ativação, por sua vez, ocorre em resposta ao reconhecimento de diversos agonistas de NLRP3 como ATP extracelular, ácidos nucleicos e patógenos fúngicos, bacterianos ou virais. Estímulos esses, que desencadeiam uma ampla gama de eventos intracelulares, sejam esses desequilíbrios à homeostase intracelular como o fluxo de íons ou alterações metabólicas como disfunções mitocondriais, liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e desestabilização lisossomal (Chen; Xu, 2022; Guo; Callaway; Ting, 2015; McKee; Coll, 2020; Paik; Kim; Silwal; Sasakawa *et al.*, 2021).

Decorrente a esses mecanismos intracelulares, tem-se a formação do complexo do inflamassoma NLRP3, o qual resulta na autoproteólise da molécula pró-Caspase-1 (Chen; Ye; He; Ouyang, 2021; Guo; Callaway; Ting, 2015; Wang; Yu; Chang; Zhang *et al.*, 2023). Então ativada, a Caspase-1 atua clivando as formas imaturas pró-IL-1 β e pró-IL-18, convertendo-as em suas formas ativas – IL-1 β e IL-18 (**Figura 7**) (Chen; Ye; He; Ouyang, 2021; Wang; Yu; Chang; Zhang *et al.*, 2023).

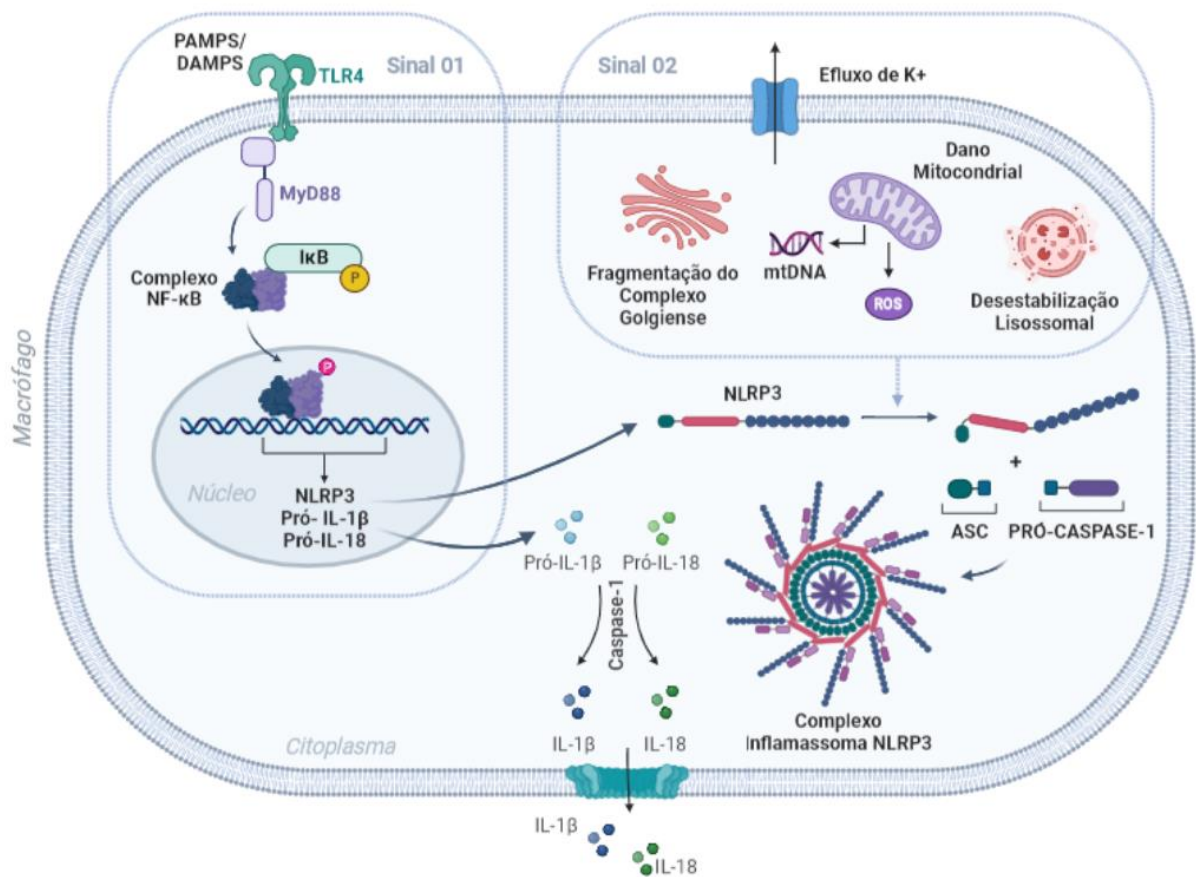


Figura 7. Formação do inflamassoma NLRP3 pela via de sinalização TLR4/MyD88. Formação do inflamassoma NLRP3 em decorrência aos sinais de preparação e ativação – 1 e 2, respectivamente. O complexo proteico formado por NLRP3, ASC e Pró-Caspase-1 resulta na ativação da Caspase-1 e a consequente clivagem das formas precursoras de IL-1 β e IL-18. Adaptado de (Paik; Kim; Silwal; Sasakawa *et al.*, 2021; Wang; Yu; Chang; Zhang *et al.*, 2023)

A sinalização da via TLR4/MYD88 e seus produtos auxiliam na defesa imunológica frente a processos inflamatórios, porém a exacerbação de tal mecanismo tende a manifestação de efeitos nocivos como evidenciado em quadros de hiperinflamação (Molteni; Bosi; Rossetti, 2018). E, portanto, para a efetividade de tal resposta imune, faz-se necessário um controle fisiológico de tal cascata de sinalização em prol de um equilíbrio desses efeitos (Kaushik; Bhandari; Kuhad, 2021).

Portanto, quando em uma resposta imune disfuncional, como na COVID-19, a ativação de NF- κ B mediada por TLR4 pode apresentar-se desregulada. O desequilíbrio em tal via relaciona-se diretamente com a patogênese e o cenário fisiopatológico da hiperinflamação e da tempestade de citocinas apresentado na infecção por SARS-CoV-2 (Kaushik; Bhandari; Kuhad, 2021; Kuzmich; Sivak; Chubarev; Porozov *et al.*, 2017; Mabrey; Morrell; Wurfel, 2021; Sohn; Lee; Kim; Cheon *et al.*, 2020). Corroborando para tal contexto, estudos recentes demonstraram que na COVID-19, a proteína S do vírus é responsável pela estimulação de TLR4 e sua

consequente via de transdução de sinal, iniciando e potencializando a resposta imune inata (Kaushik; Bhandari; Kuhad, 2021; Mabrey; Morrell; Wurfel, 2021; Williams; Gilmore, 2020). Tais evidências possivelmente justificam assim a sintomatologia das formas mais graves da infecção e embasam as eventuais sequelas observadas na Síndrome Pós-COVID (Batiha; Al-Kuraishy; Al-Gareeb; Welson, 2022; Gustine; Jones, 2021).

1.4. Do Agudo ao Crônico: Desenvolvimento da Síndrome Pós-COVID

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

Quando comparadas clinicamente, os quadros de Sepsis e COVID-19 assemelham-se em sua fisiopatologia, tendo em vista que ambas as sintomatologias correlacionam-se fisiológica e imunologicamente. A equivalência em tais manifestações enfatiza sintomas como insuficiência respiratória, coagulopatias, 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 Sepsis (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 ativação de NF- κ B em monócitos pela via de sinalização intracelular TLR4/MYD88 dependente 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 do presente estudo foi a avaliação da ativação de NF- κ B por meio da sinalização TLR4 dependente de MyD88 em monócitos de pacientes no período aproximado de 2 anos após serem hospitalizados devido a COVID-19. Além disso, verificar se há reprogramação celular após a alta hospitalar, contribuindo para a caracterização da Síndrome pós-COVID.

3. MATERIAL E MÉTODOS

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

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

Figura 8.

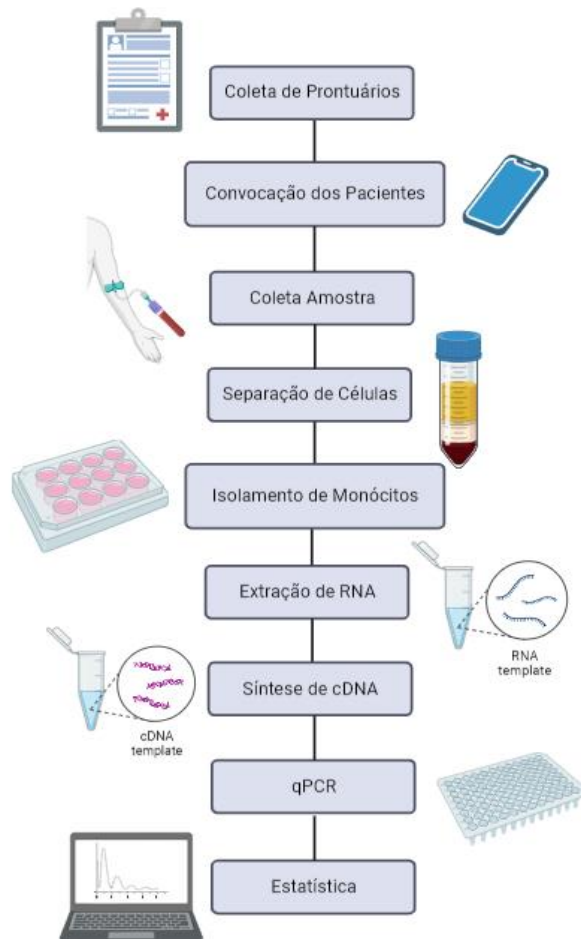


Figura 8. Fluxograma metodológico. Sequência dos protocolos estabelecidos para a realização do presente trabalho.

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

O estudo contou com n de 68 indivíduos, distribuídos em um grupo controle ($n= 22$) e um grupo de análise ($n= 46$), tal como é esquematizado na **Figura 9**. 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).

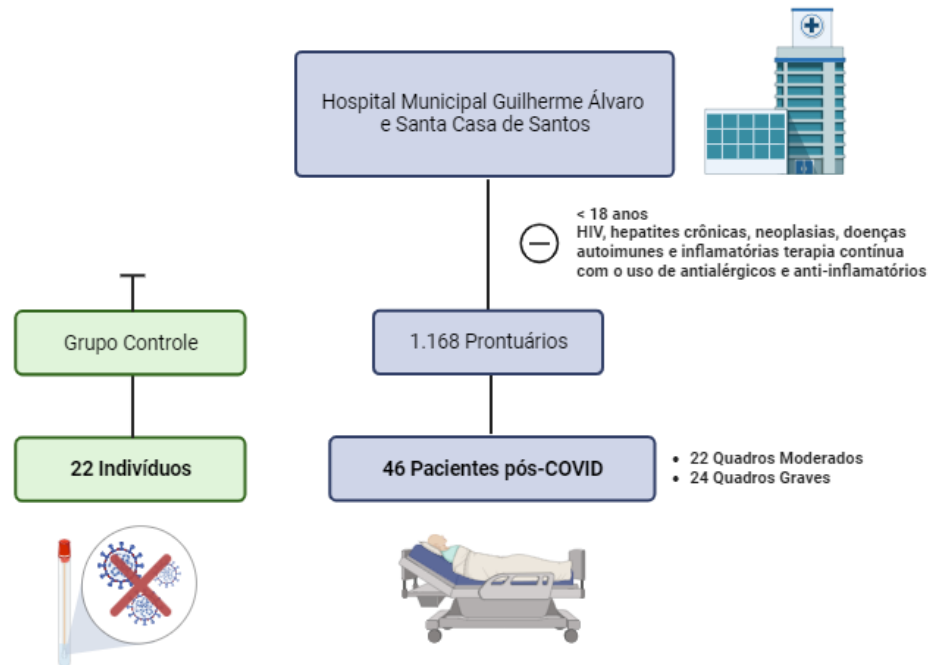


Figura 9. Fluxograma de seleção dos pacientes (n= 68). Ao grupo pós-COVID foram atribuídos 46 pacientes e ao grupo controle, foram selecionados 22 indivíduos. Ambos os grupos foram estabelecidos pautando-se nos critérios de inclusão e exclusão mencionados.

3.3. Prontuários Médicos

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

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 *eppendorf* 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 *eppendorf* e, para cada 0,1 mL de amostra na fase aquosa foram adicionados 0,05

mL de etanol 100%. Por diante, iniciou-se o uso de colunas para a separação de RNA, assim foram adicionados 150 µL de amostra sobre a coluna sendo realizada uma centrifugação rápida. Tal procedimento foi repetido até que todo o volume da amostra fosse passado pela coluna.

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

As amostras foram submetidas ao tratamento de 1 µg de RNA com 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 parte 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.

3.5. qPCR

As sequências dos *primers* utilizados para as análises de expressão de mRNA estipuladas para o estudo foram obtidas de acordo com padronizações anteriores do grupo de pesquisa (Gritte; Souza-Siqueira; Borges da Silva; Dos Santos de Oliveira *et al.*, 2022) para os genes TLR4, NF- κ B, NLRP3, IL-1 β e IL-18. As demais sequências de primers do estudo – MYD88, TIRAP, BTK, IRAK4 e I κ B – foram retiradas dos trabalhos de (Gomes da Silva; Lima; Silva; Rushansky *et al.*, 2021; Koziczak-Holbro; Joyce; Glück; Kinzel *et al.*, 2007; Lu; Chen; Wang; Qing *et al.*, 2022). Os genes avaliados e seus respectivos primers são apresentados na tabela abaixo (**Tabela 2**).

Gene	Forward sequence	Reverse Sequence
TLR4	AGAAACTGCTCGGTCAGACG	GGATTTCACACCTCCACGCA
MYD88	AGCGACTGATCCCCATCAAG	GGTGTAGTCGCAGACAGTGA
TIRAP	CCA GCC TTT CAC AGG AGA AG	ATA TTC GGG ATC TGG GGA AG
BTK	CCAATGGCTGCCTCCTGAACTAC	TCGGTGAAGGAACTGCTTTGACTC
IRAK4	CCTGGATGTCCTGGAAGCTTG	CAACACGCAGTAGGCAGAGA
IκB	CTGCATGTCTGTGCGGAGAAG	GAGTCAGGCCATCATAGTTTCG
NF-κB	TTGGGAAGGCCTGAACAAATG	AGGTATGGGCCATCTGCTGT
NLRP3	GGCAACACTCTCGGAGACAA	TGTGACGTGAGGTTGCAGTT
IL-1β	CCTGAGCTCGCCAGTGAAAT	TGTCCATGGCCACAACAACCT
IL-18	TGCAGTCTACACAGCTTCGG	GTTTGTTCGCAGAGGAAGCG

Tabela 2. Genes alvos e seus respectivos primers. TLR - Receptores Toll-like; MYD88 - *Myeloid Differentiation Primary Response 88*; TIRAP - Adaptador do tipo MyD88; BTK - Bruton Tirosina Quinase; IRAK - Quinase Associada ao Receptor de IL-1; I κ B - Inibidor de κ B; NF- κ B - Fator Nuclear *kappa* B; NLRP3 - Receptor NOD-like contendo domínio PYD N-terminal 3; IL - Interleucina.

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

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

Para os resultados, foram realizados o cálculo de $2^{\Delta\Delta CT}$. Todos os protocolos empregados em testes com monócitos e macrófagos foram validados por estudos anteriores do grupo (Gritte; Souza-Siqueira; Borges da Silva; Dos Santos de Oliveira *et al.*, 2022).

3.6. Gene Constitutivo

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

De acordo com estudos anteriores do grupo, foram selecionados quatro genes referências mais bem caracterizados em suas expressões, sendo eles: GAPDH, HPRT1, PGK1 e STX5A (Gritte; Souza-Siqueira; Masi; Germano *et al.*, 2020) (**Tabela 3**).

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

Tabela 3. Genes constitutivos e seus respectivos primers. GAPDH- Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase; HPRT1- Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1; PGK1- Phosphoglycerate Kinase 1; STx5A- Syntaxin 5.

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

3.7. Análise Estatística

Os dados aqui apresentados dizem respeito aos parâmetros de média e desvio padrão. Para comparação de médias, os dados serão 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

A sinalização intracelular dependente de MyD88 em resposta à ativação de TLR4 apresenta correlação direta com a hiperinflamação como mecanismo fisiopatológico da COVID-19. O presente estudo avaliou a expressão dos genes responsáveis pela ativação do NF- κ B pela via de sinalização TLR4/MyD88 no cenário pós-COVID, incluindo TLR4, MYD88, TIRAP, BTK, IRAK4, I κ B, NF- κ B, e os produtos de tal via, IL-1 β , IL-18 e NLRP3. Dentre os tais, seis desses apresentaram uma diminuição estatística significativa em relação ao grupo controle.

As análises de mRNA de TLR4 não evidenciaram diferença estatística significativa entre as quantificações do grupo controle e do grupo pós-COVID, expondo valores de $p > 0,05$. Em relação ao comparativo entre os grupos em estudo para as avaliações de expressão gênica de MYD88, foi exposta uma significativa diminuição no grupo pós-COVID ($p < 0,0001$) para com o exposto pelo grupo controle (**Figura 10**).

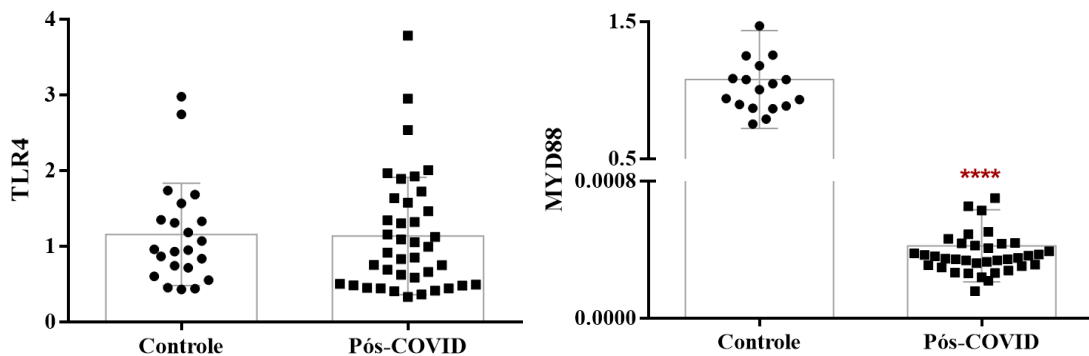


Figura 10. Expressão de mRNA de TLR4 e MYD88. (****) $p < 0,0001$ vs Controle.

Quanto às análises de mRNA relativas à proteína TIRAP, não foram observados valores discrepantes dos pacientes em estudo em comparação ao controle, apresentando um $p > 0,05$. Em contrapartida, a avaliação da expressão gênica de BTK demonstrou variação estatística com valores significativamente reduzidos ($p < 0,0001$) (**Figura 11**).

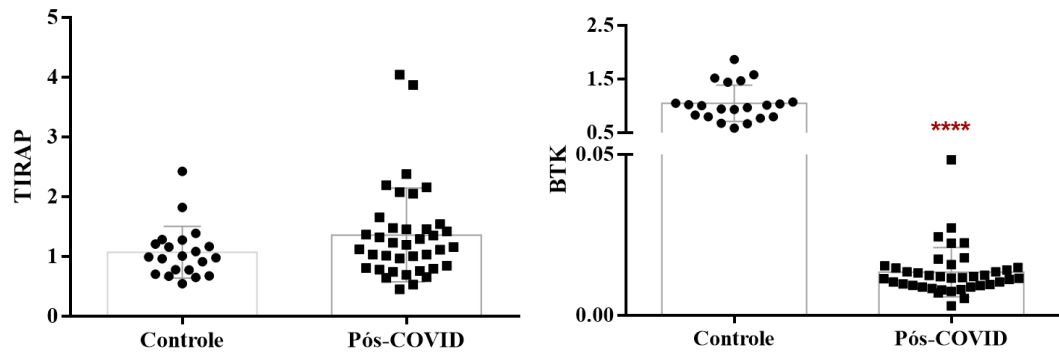


Figura 11. Expressão de mRNA de TIRAP e BTK. (****) $p < 0,0001$ vs Controle.

Como exposto na **Figura 12**, às análises de mRNA relativas às proteínas IRAK4 e $I\kappa B$ apresentaram valores reduzidos em indivíduos no quadro pós-COVID com significância de $p < 0,05$ e $p < 0,0001$, respectivamente.

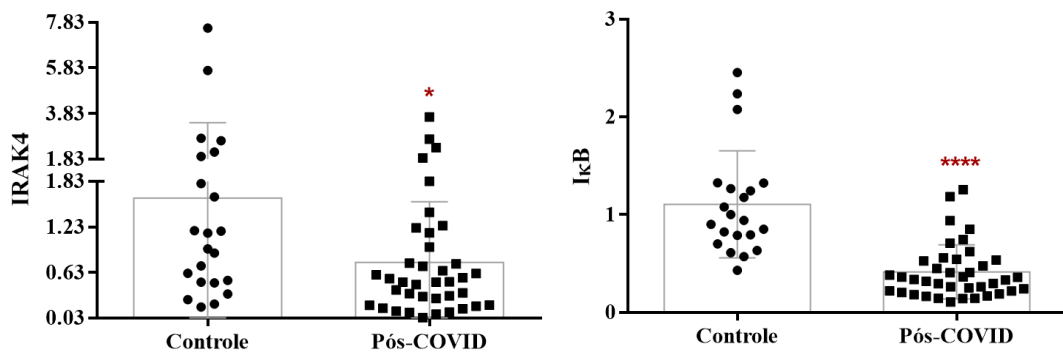


Figura 12. Expressão de mRNA de IRAK 4 e $I\kappa B$. (*) $p < 0,05$; (****) $p < 0,0001$ vs Controle.

De mesmo modo, os valores quantificados na análise de mRNA de NF- κB revelaram-se estatisticamente significantes, com expressões diminuídas na correlação entre os grupos pós-COVID e controle ($p < 0,0001$) (**Figura 13**).

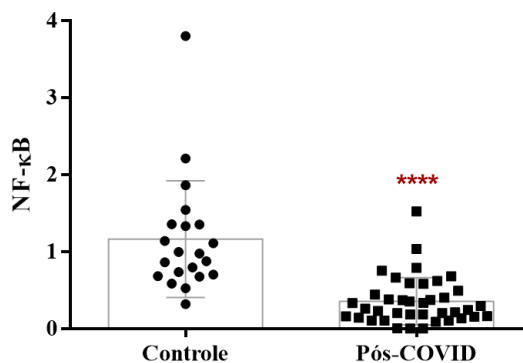


Figura 13. Expressão de mRNA de NF- κB . (****) $p < 0,0001$ vs Controle.

A **Figura 14** por sua vez, expõem os resultados concernentes aos produtos da cascata de ativação de NF- κB pela via TLR4/MYD88 – IL-1 β , IL-18 e NLRP3. A interleucina IL-1 β

juntamente com a proteína NLRP3, não apresentaram relevância estatística nas avaliações realizadas, evidenciando um valor de $p > 0,05$. Entretanto, a expressão de mRNA da IL-18 do grupo pós-COVID demonstrou-se reduzida quando comparada com o grupo controle ($p < 0,05$).

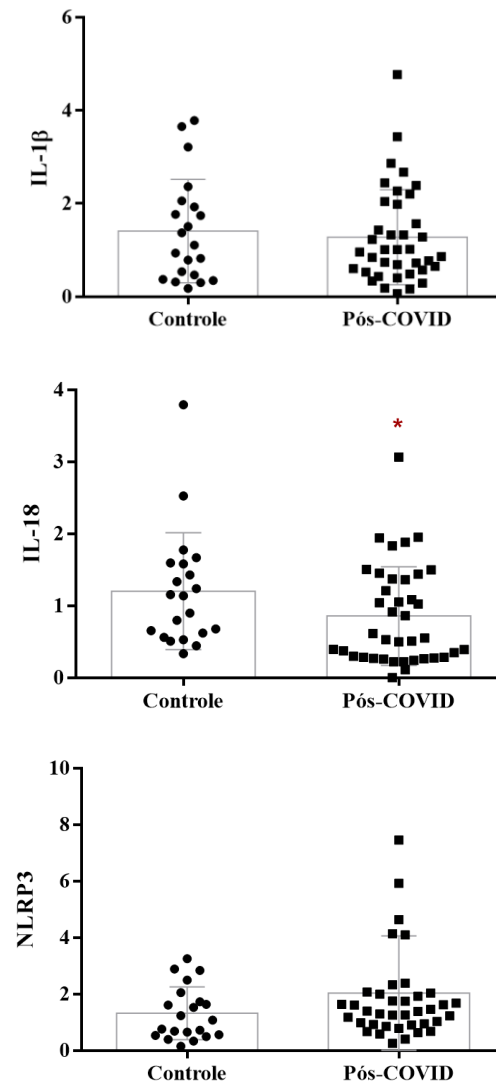


Figura 14. Expressão de mRNA dos produtos da via – IL-1 β , IL-18 e NLRP3. (*) $p < 0,05$ vs Controle.

4.1. Panorama Geral da Expressão da Via TLR4/MyD88

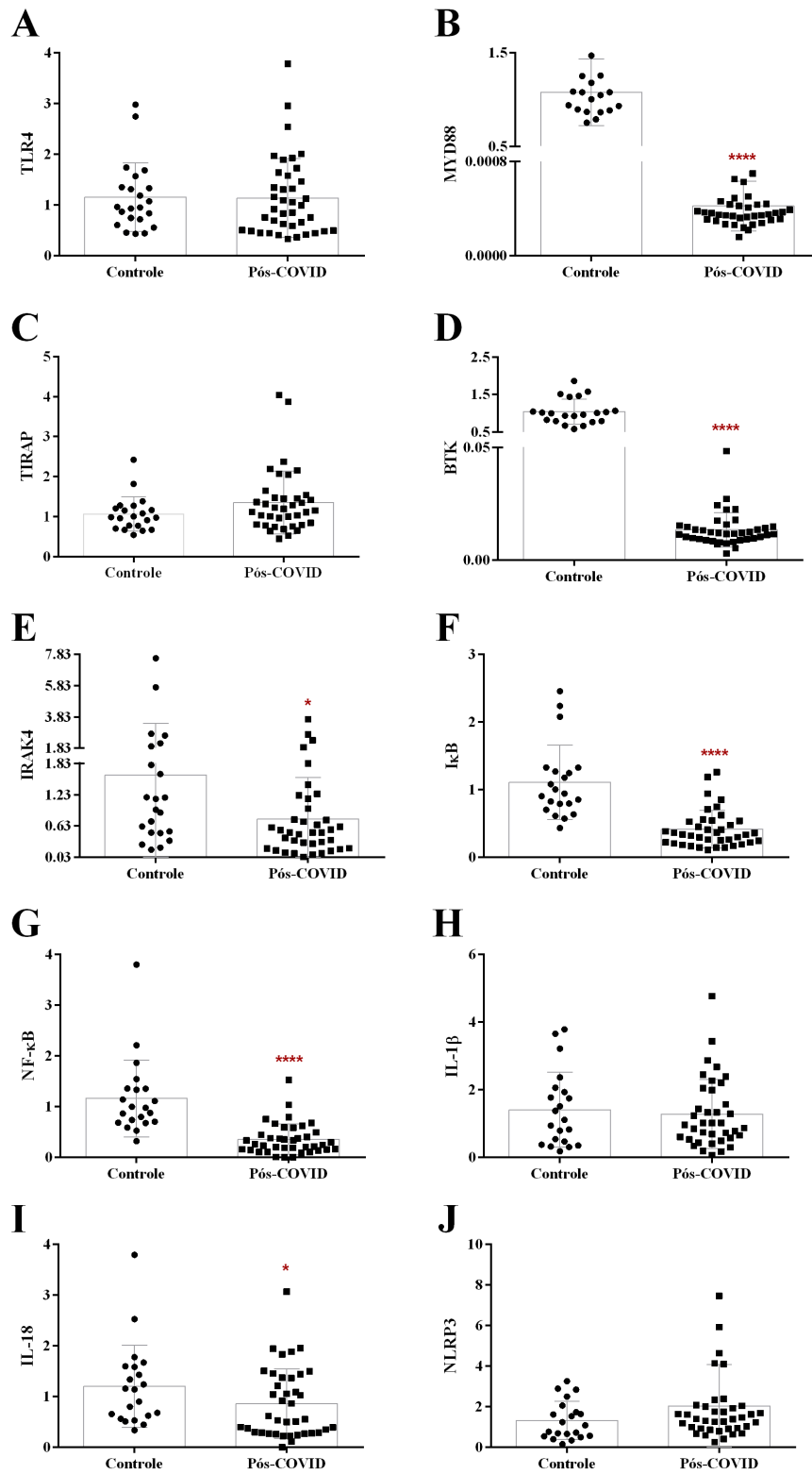


Figura 15. Panorama geral da expressão de mRNA da via TLR4/MyD88. A- TLR4; B- MYD88; C- TIRAP; D- BTK; E- IRAK4; F- IκB; G- NF-κB; H- IL-1β; I- IL-18 e J- NLRP3. (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001, (****) p<0,0001 vs Controle.

5. DISCUSSÃO

Posto o primordial papel de monócitos e macrófagos no desenvolvimento do quadro inflamatório, a transcrição gênica mediada por NF- κ B em tais células, é de suma importância. Por meio da produção de produtos de caráter inflamatório, estabelece um eixo primordial na resposta imunológica mediada pelo fenótipo clássico de macrófagos (M1) (Karin; Greten, 2005; Mussbacher; Derler; Basílio; Schmid, 2023). Assim sendo, destaca-se sua crucial correlação com a via de sinalização TLR4/MYD88, a formação do inflamassoma NLRP3 e a consequente liberação das formas maduras de interleucinas (Awad; Assrawi; Jumeau; Georgin-Lavialle *et al.*, 2017).

As análises de Min Zheng *et al.* pelo método de *Nanostring nCounter* refletiram um significativo aumento na expressão de receptores Toll-like em pacientes no quadro agudo da infecção por SARS-CoV-2, dando destaque, dentre eles, o TLR4. Como sua correlação com MyD88 é evidente e comprovada, os valores para com a avaliação de tal molécula adaptadora por contagem de RNA absoluto, sua expressão mostrou-se de mesmo modo aumentados e relacionados com a progressão da gravidade da doença (Zheng; Karki; Williams; Yang *et al.*, 2021)

Avaliando o perfil de expressão gênica de TLR4 e MyD88 na COVID-19 por meio da metodologia *nCounter Human Immunology gene expression assay*, Kyung Mok Sohn *et al.* também demonstraram aumentos expressivos nos valores obtidos referentes a essas moléculas. Dados estes, que permitem o estabelecimento de uma intrínseca correlação de tais genes à regulação das respostas imunes frente à infecção (Sohn; Lee; Kim; Cheon *et al.*, 2020).

Contrariamente a tais resultados observados nos quadros agudos da infecção, o presente estudo não evidenciou significância estatística para a quantificação de mRNA de TLR4, propondo assim uma normalização de tal expressão no período pós-COVID. Diferentemente à tal normalização, as análises de mRNA de MYD88, apresentaram-se substancialmente reduzidas em comparação ao grupo controle, indicando alteração no padrão transcricional de tal gene.

Atuando como um segundo adaptador essencial para a transdução de sinal da cascata em questão, a molécula TIRAP, nos estudos realizados por Kyung Mok Sohn *et al.*, mostrou conexão intrínseca com a infecção por SARS-CoV-2. Por meio do método de *nCounter Human Immunology gene expression assay*, foi observado uma regulação positiva na expressão de TIRAP em pacientes com COVID-19 agudo (Sohn; Lee; Kim; Cheon *et al.*, 2020). Os resultados aqui apresentados, no entanto, não demonstraram diferenças estatísticas na

correlação pós-COVID/controle, inferindo a normalização de sua expressão.

A fim de averiguar a atividade da enzima BTK em monócitos de pacientes com COVID-19, Mark Roschewski *et al.* avaliaram a intensidade de fluorescência média emitida em decorrência da fosforilação da molécula por citometria de fluxo, pela qual verificou-se valores aumentados em relação a indivíduos saudáveis (Roschewski; Lionakis; Sharman; Roswarski *et al.*, 2020). Hipotetizou-se, portanto, a conexão intrínseca de BTK com respostas imunes disfuncionais e exacerbadas. Tendo em vista o papel enzimático de tal quinase na cascata de sinalização TLR4/MYD88, nossas análises expuseram valores consideravelmente reduzidos em monócitos do grupo pós-COVID.

A Quinase 4 associada ao receptor de Interleucina-1 – IRAK4 – é um componente indispensável na sinalização de rotas de resposta imune inata e de inflamação (Cushing; Winkler; Jelinsky; Lee *et al.*, 2017). Tendo como embasamento os estudos realizados por Capucine Picard *et al.*, que a deficiência de IRAK4 em humanos acarreta na suscetibilidade a infecções e em defeitos na capacidade de detecção ligantes à TLR e de IL-1 (Picard; Puel; Bonnet; Ku *et al.*, 2003). A expressão de mRNA de IRAK4 quantificado pelo presente estudo, mostrou-se diminuída nos pacientes no período de 1 a 2 anos após infecção por SARS-CoV-2, conotando uma resposta imune desregulada.

Em células não estimuladas, os dímeros NF- κ B residem no citoplasma ligado às proteínas I κ B, as quais caracterizam-se como inibidores canônicos, uma vez que controlam a atividade transcricional de tal fator. Após incitado pela transdução de sinal decorrente à ligantes de TLR4, são fosforilados permitindo a translocação de NF- κ B para o núcleo (Mulero; Bigas; Espinosa, 2013). As análises de qPCR realizadas em nossa pesquisa apresentaram valores reduzidos de I κ B para o grupo pós-COVID em relação ao grupo controle.

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

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

Sendo um dos principais mediadores das reações imune inatas, a IL-1 β é estritamente correlacionada com atividade do inflamassoma NLRP3, uma vez que por meio deste, a pró-IL-1 β é clivada e assim maturada para sua atuação (Bent; Moll; Grabbe; Bros, 2018). Shahanshah Khan, 2021 procedeu seus estudos com a estimulação de células mononucleares sanguíneas com a subunidade S2 presente no SARS-CoV-2. Os resultados de RT-PCR e *ELISA* evidenciaram um expressivo aumento de IL-1 β (Khan; Shafiei; Longoria; Schoggins *et al.*, 2021). Análises feitas pelo método *Human Cytokine Standard 27-Plex* avaliaram as concentrações iniciais de IL-1 β no plasma de pacientes internados devido a COVID-19, as quais apresentaram-se elevadas em comparação com indivíduos saudáveis (Huang; Wang; Li; Ren *et al.*, 2020).

No que se refere ao período após a infecção, Jiram Torres-Ruiz, 2021 demonstrou pela técnica de *Miliplex* que em indivíduos com síndrome pós-COVID, a IL-1 β apresentava-se aumentada mesmo ao terceiro mês após a infecção (Torres-Ruiz; Lomelín-Gascón; Lira-Luna; Pérez-Fragoso *et al.*, 2021). Enquanto nossos resultados não apresentaram diferença estatística significativa entre o grupo pós-COVID e o grupo controle, inferindo assim uma normalização dos níveis transcricionais de IL-1 β .

Bem como a IL-1 β , a IL-18 também se conceitua como produto da ativação transcricional por NF- κ B e a formação do inflamassoma NLRP3 (Bent; Moll; Grabbe; Bros, 2018). Dosagens realizadas por *ELISA* em pacientes acometidos pela infecção por SARS-CoV-2, expuseram aumento estatístico significativo quando correlacionadas aos valores apresentados pelo grupo controle (El Kazafy; Fouad; Said; Assal *et al.*, 2022). Pela mesma metodologia, os achados descritos por Tamara S. Rodrigues *et al.*, também mostraram-se aumentados em paciente no quadro de COVID-19 aguda, sugerindo assim uma maior ativação de tal inflamassoma (Rodrigues; de Sá; Ishimoto; Becerra *et al.*, 2021). No estudo por nós realizado, entretanto, foi observado valores de variância reduzidos entre os grupos pós-COVID e controle.

Haja vista que a molécula NLRP3 faz parte da estrutura central do inflamassoma canônico NLRP3, análises por imunohistoquímica e microscopia multifotônica demonstraram

que pacientes na fase aguda da COVID-19 apresentavam maiores quantificações da proteína em questão (Rodrigues; de Sá; Ishimoto; Becerra *et al.*, 2021). Entretanto, as análises de quantificação de mRNA realizadas no presente estudo, propõem uma normalização do conteúdo transcricional de NLRP3, apresentando valores similares ao grupo controle.

Diferentemente do contexto pós-sepse estudado e elucidado por Gritte, Souza-Siqueira *et al.* que apresentava um aumento na expressão de genes relacionados com a ativação do inflamassoma NLRP3 em monócitos – TLR4, NF- κ B, NLRP3, IL-1 β e IL-18 (Gritte; Souza-Siqueira; Borges da Silva; Dos Santos de Oliveira *et al.*, 2022), o pós-COVID expôs diminuição na maioria dos genes que atuam na sinalização TLR4/MYD88, a consequente ativação de NF- κ B e a transcrição de seus produtos.

O decurso do processo inflamatório e o mal prognóstico do quadro infeccioso, observado na COVID-19 apresenta correlação direta com a ativação desregulada de TLRs e a consequente cascata de sinalização MyD88 dependente, caracterizando um aumento da expressão de TLR4, MyD88 e TRIF no cenário aguda da infecção (Liu; Yang; Yu; Lian *et al.*, 2022; Zheng; Karki; Williams; Yang *et al.*, 2021). Visando estabelecer um comparativo entre o cenário agudo e o pós-COVID, o presente trabalho apresentou uma diminuição da maioria dos genes cruciais para a ativação de NF- κ B pela via de sinalização TLR4/MYD88 – MyD88; BTK; IRAK4; I κ B; e, NF- κ B. Bem como a diminuição de um de seus mediadores inflamatórios transcritos – IL-18. Resultados esses, distintos aos observados nas análises de expressão de mRNA referentes aos demais produtos de tal cascata – NLRP3 e IL-1 β – uma vez que estes não mostraram diferença estatística significativa.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo o que foi evidenciado nos quadros agudos da COVID-19 e, pautando-se nas hipóteses previamente levantadas por estudos anteriores do grupo sobre o perfil de monócitos na Síndrome Pós-Sepse, inferimos que a Síndrome Pós-COVID se assemelharia em tais aspectos de reprogramação celular e as análises propostas resultariam em maiores expressões de genes referentes a uma das vias cruciais a resposta imunológica pró-inflamatória de tais células.

Entretanto, segundo os resultados aqui expostos, a SPC qualificou-se por uma diminuição de expressão gênica de pontos essenciais na cascata de ativação de NF- κ B, inferindo assim um provável quadro de imunossupressão causado por uma reprogramação celular de monócitos circulantes em indivíduos dentre o período aproximado de 2 anos após infecção por SARS-CoV-2. Ainda assim, são poucos os estudos acerca da avaliação de expressão dos genes propostos em monócitos tanto no contexto agudo quanto posterior à infecção, dificultando o estabelecimento de comparativos diretos e concretos com os achados do estudo.

A evidência de uma reprogramação celular de monócitos circulantes quanto à aspectos inflamatórios atribui substancialmente na caracterização e melhor elucidação de uma das vertentes da Síndrome Pós-COVID. Ainda com as limitações e impasses encontrados para a realização do estudo, dentre eles a dificuldade de contato com os pacientes e a renúncia na adesão para participação, destaca-se o grande valor dos achados aqui apresentados para a sociedade como um todo. Ressalta-se ainda, a necessidade de pesquisas posteriores para um conhecimento mais amplo e concreto acerca da COVID-longa e seus efeitos na qualidade de vida dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular.*(C. Reali et al., Trad.). : Rio de Janeiro: Elsevier.(Obra original publicada em 2007) 2019.
- ALEXANDER, N. O.; VARVARA, A. O.; NIKITA, G. N.; VERONIKA, A. M. *et al.* Monocyte differentiation and macrophage polarization. **Monocyte differentiation and macrophage polarization**, 3, p. 10, 2019.
- ALKAZMI, L.; AL-KURAI SHY, H. M.; AL-GAREEB, A. I.; ALEXIOU, A. *et al.* The potential role of scavenger receptor B type I (SR-BI) in SARS-CoV-2 infection. 11, n. 4, p. e786, 2023.
- 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.
- AWAD, F.; ASSRAWI, E.; JUMEAU, C.; GEORGIN-LAVIALLE, S. *et al.* Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation. **PLoS One**, 12, n. 4, p. e0175336, 2017.
- BALLERING, A. V.; VAN ZON, S. K. R.; OLDE HARTMAN, T. C.; ROSMALEN, J. G. M. Persistence of somatic symptoms after COVID-19 in the Netherlands: an observational cohort study. **Lancet**, 400, n. 10350, p. 452-461, Aug 6 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. **Respir Med**, 176, p. 106239, Jan 2021.
- BATIHA, G. E.; AL-KURAI SHY, H. M.; AL-GAREEB, A. I.; WELSON, N. N. Pathophysiology of Post-COVID syndromes: a new perspective. **Virol J**, 19, n. 1, p. 158, Oct 9 2022.
- BENT, R.; MOLL, L.; GRABBE, S.; BROS, M. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? **Int J Mol Sci**, 19, n. 8, Jul 24 2018.
- BERNARD, N. J.; O'NEILL, L. A. Mal, more than a bridge to MyD88. **IUBMB Life**, 65, n. 9, p. 777-786, Sep 2013.
- 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.
- BLERIOT, C.; CHAKAROV, S.; GINHOUX, F. Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function. **Immunity**, 52, n. 6, p. 957-970, Jun 16 2020.
- BODE, J. G.; EHLTING, C.; HÄUSSINGER, D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38(MAPK)-STAT3 axis. **Cell Signal**, 24, n. 6, p. 1185-1194, Jun 2012.

BREITINGER, U.; FARAG, N. S.; STICHT, H.; BREITINGER, H. G. Viroporins: Structure, function, and their role in the life cycle of SARS-CoV-2. **Int J Biochem Cell Biol**, 145, p. 106185, Apr 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.

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.

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

CHEN, C.; XU, P. Activation and Pharmacological Regulation of Inflammasomes. **Biomolecules**, 12, n. 7, Jul 20 2022.

CHEN, M. Y.; YE, X. J.; HE, X. H.; OUYANG, D. Y. The Signaling Pathways Regulating NLRP3 Inflammasome Activation. **Inflammation**, 44, n. 4, p. 1229-1245, Aug 2021.

CIESIELSKA, A.; MATYJEK, M.; KWIATKOWSKA, K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cell Mol Life Sci**, 78, n. 4, p. 1233-1261, Feb 2021.

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.

CUSHING, L.; WINKLER, A.; JELINSKY, S. A.; LEE, K. *et al.* IRAK4 kinase activity controls Toll-like receptor-induced inflammation through the transcription factor IRF5 in primary human monocytes. **J Biol Chem**, 292, n. 45, p. 18689-18698, Nov 10 2017.

DAVIS, H. E.; MCCORKELL, L.; VOGEL, J. M.; TOPOL, E. J. Author Correction: Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. **Nat Rev Microbiol**, 21, n. 6, p. 408, Jun 2023.

EL KAZAFY, S. A.; FOUAD, Y. M.; SAID, A. F.; ASSAL, H. H. *et al.* Correlations between Cytokine Levels, Liver Function Markers, and Neuropilin-1 Expression in Patients with COVID-19. **Vaccines (Basel)**, 10, n. 10, Sep 29 2022.

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

GHARAVI, A. T.; HANJANI, N. A.; MOVAHED, E.; DOROUDIAN, M. The role of macrophage subtypes and exosomes in immunomodulation. **Cellular & Molecular Biology Letters**, 27, n. 1, p. 83, 2022/10/03 2022.

- GOMES DA SILVA, I. I. F.; LIMA, C. A. D.; SILVA, J. E. A.; RUSHANSKY, E. *et al.* Is there an Inflammation Role for MYD88 in Rheumatoid Arthritis? **Inflammation**, 44, n. 3, p. 1014-1022, 2021/06/01 2021.
- GORBALENYA, A. E.; BAKER, S. C.; BARIC, R. S.; DE GROOT, R. J. *et al.* The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, 5, n. 4, p. 536-544, 2020/04/01 2020.
- GRAY, P.; DUNNE, A.; BRIKOS, C.; JEFFERIES, C. A. *et al.* MyD88 adapter-like (Mal) is phosphorylated by Bruton's tyrosine kinase during TLR2 and TLR4 signal transduction. **J Biol Chem**, 281, n. 15, p. 10489-10495, Apr 14 2006.
- GRITTE, R.; SOUZA-SIQUEIRA, T.; MASI, L.; GERMANO, J. *et al.* **Reference Genes for Quantitative qPCR Analyses in Monocytes of Septic Patients.** 2020.
- GRITTE, R. B.; SOUZA-SIQUEIRA, T.; BORGES DA SILVA, E.; DOS SANTOS DE OLIVEIRA, L. C. *et al.* Evidence for Monocyte Reprogramming in a Long-Term Postsepsis Study. **Crit Care Explor**, 4, n. 8, p. e0734, Aug 2022.
- GUAN, W.-j.; NI, Z.-y.; HU, Y.; LIANG, W.-h. *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. 382, n. 18, p. 1708-1720, 2020.
- GUERMONPREZ, P.; HELFT, J. Inflammasome activation: a monocyte lineage privilege. **Nat Immunol**, 20, n. 4, p. 383-385, Apr 2019.
- GUILLIAMS, M.; GINHOUX, F.; JAKUBZICK, C.; NAIK, S. H. *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. **Nat Rev Immunol**, 14, n. 8, p. 571-578, Aug 2014.
- GUILLIAMS, M.; MILDNER, A.; YONA, S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. **Immunity**, 49, n. 4, p. 595-613, Oct 16 2018.
- GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nat Med**, 21, n. 7, p. 677-687, Jul 2015.
- GUPTA, A.; MADHAVAN, M. V.; SEHGAL, K.; NAIR, N. *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nat Med**, 26, n. 7, p. 1017-1032, Jul 2020.
- GUSTINE, J. N.; JONES, D. Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. **Am J Pathol**, 191, n. 1, p. 4-17, Jan 2021.
- 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.
- HUANG, C.; WANG, Y.; LI, X.; REN, L. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, 395, n. 10223, p. 497-506, Feb 15 2020.
- JUHAS, U.; RYBA-STANISŁAWOWSKA, M.; SZARGIEJ, P.; MYŚLIWSKA, J. Different pathways of macrophage activation and polarization. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, 69, p. 496-502, Apr 22 2015.

- KADAM, S. B.; SUKHRAMANI, G. S.; BISHNOI, P.; PABLE, A. A. *et al.* SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. **J Basic Microbiol**, 61, n. 3, p. 180-202, Mar 2021.
- KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**, 5, n. 10, p. 749-759, 2005/10/01 2005.
- KARKI, R.; KANNEGANTI, T. D. Innate immunity, cytokine storm, and inflammatory cell death in COVID-19. **J Transl Med**, 20, n. 1, p. 542, Nov 22 2022.
- KAUSHIK, D.; BHANDARI, R.; KUHAD, A. TLR4 as a therapeutic target for respiratory and neurological complications of SARS-CoV-2. **Expert Opin Ther Targets**, 25, n. 6, p. 491-508, Jun 2021.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. **Trends Mol Med**, 13, n. 11, p. 460-469, Nov 2007.
- KENNY, E. F.; O'NEILL, L. A. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. **Cytokine**, 43, n. 3, p. 342-349, Sep 2008.
- KHAN, S.; SHAFIEI, M. S.; LONGORIA, C.; SCHOGGINS, J. W. *et al.* SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF- κ B pathway. **Elife**, 10, Dec 6 2021.
- KNOLL, R.; SCHULTZE, J. L.; SCHULTE-SCHREPPING, J. Monocytes and Macrophages in COVID-19. **Front Immunol**, 12, p. 720109, 2021.
- KOZICZAK-HOLBRO, M.; JOYCE, C.; GLÜCK, A.; KINZEL, B. *et al.* IRAK-4 kinase activity is required for interleukin-1 (IL-1) receptor- and toll-like receptor 7-mediated signaling and gene expression. **J Biol Chem**, 282, n. 18, p. 13552-13560, May 4 2007.
- KUZMICH, N. N.; SIVAK, K. V.; CHUBAREV, V. N.; POROZOV, Y. B. *et al.* TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. **Vaccines (Basel)**, 5, n. 4, Oct 4 2017.
- LAMBRECHT, B. N. Alveolar macrophage in the driver's seat. **Immunity**, 24, n. 4, p. 366-368, Apr 2006.
- LAWRENCE, T.; NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nat Rev Immunol**, 11, n. 11, p. 750-761, Oct 25 2011.
- LI, J.; JIA, H.; TIAN, M.; WU, N. *et al.* SARS-CoV-2 and Emerging Variants: Unmasking Structure, Function, Infection, and Immune Escape Mechanisms. **Front Cell Infect Microbiol**, 12, p. 869832, 2022.
- LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D.; SUN, S. C. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduct Target Ther**, 2, p. 17023-, 2017.

LIU, Z. M.; YANG, M. H.; YU, K.; LIAN, Z. X. *et al.* Toll-like receptor (TLRs) agonists and antagonists for COVID-19 treatments. **Front Pharmacol**, 13, p. 989664, 2022.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, 25, n. 4, p. 402-408, 2001/12/01/2001.

LOCATI, M.; MANTOVANI, A.; SICA, A. **Advances in Immunology**. Elsevier Inc, 2013. 272 p.

LU, X.; CHEN, X.; WANG, X.; QING, J. *et al.* Construction of lncRNA and mRNA co-expression network associated with nasopharyngeal carcinoma progression. 12, 2022-July-26 2022. Original Research.

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

MABREY, F. L.; MORRELL, E. D.; WURFEL, M. M. TLRs in COVID-19: How they drive immunopathology and the rationale for modulation. **Innate Immun**, 27, n. 7-8, p. 503-513, Oct 2021.

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

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

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, 25, n. 12, p. 677-686, Dec 2004.

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

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

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

MOLTENI, M.; BOSI, A.; ROSSETTI, C. Natural Products with Toll-Like Receptor 4 Antagonist Activity. **Int J Inflamm**, 2018, p. 2859135, 2018.

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.

MULERO, M. C.; BIGAS, A.; ESPINOSA, L. I κ B α beyond the NF- κ B dogma. **Oncotarget**, 4, n. 10, p. 1550-1551, Oct 2013.

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

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 4, n. 3, Mar 1 2012.

O'NEILL, L. A. When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction. **Immunity**, 29, n. 1, p. 12-20, Jul 18 2008.

O'NEILL, L. A. J.; BOWIE, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, 7, n. 5, p. 353-364, 2007/05/01 2007.

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

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

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

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

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, 29, n. 9, p. e45, May 1 2001.

PIAO, W.; SONG, C.; CHEN, H.; WAHL, L. M. *et al.* Tyrosine phosphorylation of MyD88 adapter-like (Mal) is critical for signal transduction and blocked in endotoxin tolerance. **J Biol Chem**, 283, n. 6, p. 3109-3119, Feb 8 2008.

PICARD, C.; PUEL, A.; BONNET, M.; KU, C. L. *et al.* Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. **Science**, 299, n. 5615, p. 2076-2079, Mar 28 2003.

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

PLÓCIENNIKOWSKA, A.; HROMADA-JUDYCKA, A.; BORZECKA, K.; KWIATKOWSKA, K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cell Mol Life Sci**, 72, n. 3, p. 557-581, Feb 2015.

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.

RODRIGUES, T. S.; DE SÁ, K. S. G.; ISHIMOTO, A. Y.; BECERRA, A. *et al.* Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. **J Exp Med**, 218, n. 3, Mar 1 2021.

ROSCHEWSKI, M.; LIONAKIS, M. S.; SHARMAN, J. P.; ROSWARSKI, J. *et al.* Inhibition of Bruton tyrosine kinase in patients with severe COVID-19. **Sci Immunol**, 5, n. 48, Jun 5 2020.

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, Mar 22 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, Feb 23 2016.

SOHN, K. M.; LEE, S. G.; KIM, H. J.; CHEON, S. *et al.* COVID-19 Patients Upregulate Toll-like Receptor 4-mediated Inflammatory Signaling That Mimics Bacterial Sepsis. **J Korean Med Sci**, 35, n. 38, p. e343, Sep 28 2020.

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

SONG, C. Y.; XU, J.; HE, J. Q.; LU, Y. Q. Immune dysfunction following COVID-19, especially in severe patients. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 15838, Sep 28 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.

STROBER, W.; MURRAY, P. J.; KITANI, A.; WATANABE, T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. **Nat Rev Immunol**, 6, n. 1, p. 9-20, Jan 2006.

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 Immunol**, 18, n. 1, p. 43, Oct 3 2017.

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

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.

TORRES-RUIZ, J.; LOMELÍN-GASCÓN, J.; LIRA-LUNA, J.; PÉREZ-FRAGOSO, A. *et al.* FANSY POSTCOV: A composite clinical immunological predictive index for post-COVID-19 syndrome unveils distinctive features in a cohort study of mild to critical patients. **Clin Transl Med**, 11, n. 11, p. e623, Nov 2021.

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

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

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

VIOLA, A.; MUNARI, F.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, R.; SCOLARO, T. *et al.* The Metabolic Signature of Macrophage Responses. **Front Immunol**, 10, p. 1462, 2019.

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

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

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

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

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

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

YONG, S. J.; LIU, S. Proposed subtypes of post-COVID-19 syndrome (or long-COVID) and their respective potential therapies. **Rev Med Virol**, 32, n. 4, p. e2315, Jul 2022.

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

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

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. **Nat Commun**, 13, n. 1, p. 4399, Aug 5 2022.

ZHENG, M.; KARKI, R.; WILLIAMS, E. P.; YANG, D. *et al.* TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. **Nature Immunology**, 22, n. 7, p. 829-838, 2021/07/01 2021.

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

ANEXO

Anexo A - Parecer consubstanciado do CEP: Centro Universitário Lusíada



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**Título da Pesquisa:** FATORES PREDITIVOS DA OCORRÊNCIA DE SÍNDROME PÓS-COVID**Pesquisador:** Edgar Matias Bach Hi**Área Temática:****Versão:** 1**CAAE:** 51925221.5.0000.5436**Instituição Proponente:** Fundação Lusíada / Centro Universitário Lusíada - UNILUS**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 5.012.568**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

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

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

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTOS, 01 de Outubro de 2021

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

Endereço: Rua Batista Pereira, nº 265, sala 28	CEP: 11.015-100
Bairro: Macuco	
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
ALVARO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Edgar Matias Bach Hi

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51925221.5.3001.5448

Instituição Proponente: Hospital Guilherme Alvaro - Santos - SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.075.908

Recomendações:

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTOS, 03 de Novembro de 2021

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

Endereço: Rua Oswaldo Cruz nº 197

Bairro: Boqueirão

CEP: 11.045-904

UF: SP

Município: SANTOS

Telefone: (13)3202-1306

Fax: (13)3202-1306

E-mail: hga-cep@saude.sp.gov.br

Anexo D - Termo de Consentimento livre e esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

Algumas coisas poderão ocorrer durante esta consulta (riscos):

- Dor ou incômodo no local da coleta de sangue

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

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

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

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

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

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

Santos, de _____ de 2023.

**Identificação do Participante:**

Nome: _____

RG: _____ CPF: _____

Telefone: _____

Endereço: _____

Assinatura: _____ Data: ____/____/____

Declaração do pesquisador:

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

Nome do pesquisador: Marcel Cerqueira César Machado

Assinatura:

Data: 09/09/2022

Rubrica do participante_____
Rubrica do pesquisador