



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**BÁRBARA STOLARSKI**

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO E ESTRESSE OXIDATIVO APÓS**  
**INFECÇÃO PELA COVID-19**

**CHAPECÓ**  
**2023**

**BÁRBARA STOLARSKI**

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO E ESTRESSE OXIDATIVO APÓS  
INFECÇÃO PELA COVID-19**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Biomédicas, sob a orientação do Prof. Dr. Leandro Henrique Manfredi

CHAPECÓ  
2023

## UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

Rodovia SC 484, Km 2  
Bairro Fronteira Sul  
Chapecó-SC-Brasil  
Caixa Postal 181  
CEP: 89815-899

### Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Stolarski, Bárbara

AVALIAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO E ESTRESSE OXIDATIVO  
APÓS INFECÇÃO PELA COVID-19 / Bárbara Stolarski. --  
2023.  
52 f.:il.

Orientador: Doutor Leandro Henrique Manfredi

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da  
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biomédicas, Chapecó, SC, 2023.

1. Sistema Purinérgico. 2. Estresse oxidativo. 3.  
Síndrome pós-COVID. I. Manfredi, Leandro Henrique,  
orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III.  
Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**BÁRBARA STOLARSKI**

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA PURINÉRGICO E ESTRESSE OXIDATIVO APÓS  
INFECÇÃO PELA COVID-19**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da  
Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS para obtenção do título de Mestre em  
Ciências Biomédicas defendido em banca examinadora em 16/02/2023

Aprovado em: 16/02/2023

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente  
LEANDRO HENRIQUE MANFREDI  
Data: 10/03/2023 06:52:19-0300  
CPF: \*\*\*.018.718-\*\*  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

---

Prof<sup>ª</sup> Dr. Leandro Henrique Manfredi - UFFS  
Presidente da banca/orientador

Assinado de forma digital por  
CLODOALDO ANTÔNIO DE  
SA:71099530920  
'Dados: 2023.03.14 13:34:50 -03'00

---

Prof Dr. Clodoaldo Antônio de Sá - UNOCHAPECÓ  
Membro titular externo

---

Prof Dr. Leonardo Barbosa Leiria – UFFS  
Membro titular interno

Chapecó/SC, fevereiro de 2023

## RESUMO

O vírus SARS-CoV-2 causou uma pandemia global, onde milhares de pessoas no mundo desenvolveram a doença COVID-19. Até o momento, foram registradas mais de seis milhões de mortes pela doença, gerando um grande impacto na saúde pública. A COVID-19 pode resultar em casos assintomáticos ou leves, porém pode evoluir devido a “tempestade de citocinas” ocasionada e causar a SRAG (Síndrome Respiratória Aguda Grave) resultando diversas complicações e aumentando a mortalidade dessa doença. Estudos sugerem que os componentes do sistema purinérgico e do estresse oxidativo podem estar envolvidos na progressão dessa doença. Explorar a relação entre os sintomas pós-COVID de pacientes acometidos com COVID-19 em distintos graus de severidade com marcadores inflamatórios conhecidos do sistema purinérgico e estresse oxidativo. Trata-se de um estudo transversal, em pacientes recuperados da COVID-19 atendidos na Atenção Primária na Unidade Básica de Saúde (UBS) de Belmonte, classificados de acordo com a gravidade da doença. Os indivíduos que apresentaram testagem reagentes para COVID-19 e se recuperaram da doença foram organizados em quatro grupos amostrais: *i.* pacientes que desenvolveram a forma leve da doença (n= 15); *ii.* pacientes que desenvolveram a forma moderada da doença (n= 15); *iii.* Indivíduos do grupo controle (n= 15) que não tiveram testagem positiva e não desenvolveram síndrome gripal no último ano. Os participantes foram informados sobre os objetivos e procedimentos da pesquisa e após assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e responderam aos questionários referentes aos sintomas que persistiram após a doença. A coleta de amostra de sangue periférico e dados do prontuário eletrônico médico dos indivíduos foi realizada em 2021. As amostras de sangue foram coletadas após a decorrência de no máximo 21 dias após o início da doença e melhora geral dos sintomas. Nas análises realizadas, em linfócitos e plaquetas, a atividade da CD39 foi demonstrada através da hidrólise do ATP e ADP e da CD73 através da hidrólise do AMP. Nas análises de linfócitos foi percebido um aumento da atividade dessas enzimas no grupo leve, em comparação com o grupo controle. Na hidrólise da AMP, o grupo moderado demonstrou diminuição da atividade enzimática, não havendo diferença significativa quando comparada com o grupo controle. No entanto, houve diferença quando comparado com o grupo leve, demonstrando a diminuição da atividade da CD73. Nosso estudo demonstrou uma diminuição na hidrólise de ADP de pacientes do grupo leve em plaquetas em comparação com o grupo controle, o eADP é pró-inflamatório e pode contribuir para o estado de tromboinflamação em pacientes com COVID-19. Após a obtenção dos resultados, eles foram analisados e discutidos, avaliando se a modulação do sistema purinérgico pode implicar nos parâmetros inflamatórios e na consequente progressão da doença COVID-19. Além disso, a síndrome pós-COVID, onde os pacientes apresentam alguns sintomas como fadiga, dispneia, perda total ou parcial do olfato e paladar, dor no peito, dores musculares, tosse seca, dor de garganta, febre e dor de cabeça podem persistir, foi percebida através da aplicação de um questionário e discutidas quanto a sua implicação na qualidade de vida dos pacientes após a COVID-19.

Palavras-chave: COVID-19. Sistema Purinérgico. Estresse oxidativo, Síndrome Pós-COVID.

## ABSTRACT

The SARS-CoV-2 virus caused a global pandemic, where thousands of people in the world developed the COVID-19 disease. So far, more than six million deaths from the disease have been recorded, generating a major impact on public health. COVID-19 can result in asymptomatic or mild cases, but it can evolve due to the “cytokine storm” caused and cause SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome), resulting in several complications and increasing the mortality of this disease. Studies suggest that components of the purinergic system and oxidative stress may be involved in the progression of this disease. To explore the relationship between post-COVID symptoms of patients affected by COVID-19 in different degrees of severity with known inflammatory markers of the purinergic system and oxidative stress. This is a cross-sectional study, in patients recovered from COVID-19 treated in Primary Care at the Basic Health Unit (UBS) in Belmonte, classified according to the severity of the disease. Individuals who tested positive for COVID-19 and recovered from the disease were organized into four sample groups: i. patients who developed the mild form of the disease (n=15); ii. patients who developed the moderate form of the disease (n=15); iii. Individuals in the control group (n=15) who did not test positive and did not develop flu syndrome in the last year. The participants were informed about the objectives and procedures of the research and after signing the Free and Informed Consent Form (TCLE) and answered the questionnaires referring to the symptoms that persisted after the disease. The peripheral blood sample and data from the individuals' electronic medical records were collected in 2021. Blood samples were collected after a maximum of 21 days after the onset of the disease and general improvement in symptoms. In the analyzes carried out, in lymphocytes and platelets, the activity of CD39 was demonstrated through the hydrolysis of ATP and ADP and of CD73 through the hydrolysis of AMP. In the analysis of lymphocytes, an increase in the activity of these enzymes was noticed in the light group, in comparison with the control group. In AMP hydrolysis, the moderate group showed a decrease in enzymatic activity, with no significant difference when compared with the control group. However, there was a difference when compared with the mild group, demonstrating the decrease in CD73 activity. Our study demonstrated a decrease in ADP hydrolysis of patients in the mild platelet group compared to the control group, eADP is pro-inflammatory and may contribute to the state of thromboinflammation in patients with COVID-19. After obtaining the results, they were analyzed and discussed, assessing whether the modulation of the purinergic system may imply the inflammatory parameters and the consequent progression of the COVID-19 disease. In addition, the post-COVID syndrome, where patients experience some symptoms such as fatigue, dyspnea, total or partial loss of smell and taste, chest pain, muscle aches, dry cough, sore throat, fever and headache may persist, was perceived through the application of a questionnaire and discussed regarding its implication in the quality of life of patients after COVID-19.

**Keywords:** COVID-19. Purinergic System. Oxidative stress, Post-COVID Syndrome

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|             |                                                                                                |    |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 -  | Hidrólise de ATP, ADP e AMP em linfócitos.....                                                 | 26 |
| Figura 2 -  | Atividade da ADA em linfócitos.....                                                            | 26 |
| Figura 3 -  | Hidrólise de ATP, ADP e AMP em plaquetas.....                                                  | 27 |
| Figura 4 -  | Atividade da ADA em plaquetas.....                                                             | 27 |
| Figura 5 -  | Concentração de TBARS e PSH.....                                                               | 28 |
| Figura 6 -  | Concentração de Ácido ascórbico e Nox.....                                                     | 28 |
| Figura 7 -  | Questionário de sintomas pós-COVID.....                                                        | 29 |
| Figura 8 -  | Análise estatística exploratória que investiga o grau de correlação<br>entre as variáveis..... | 30 |
| Figura 9 -  | Painel do tipo “Heat Map”.....                                                                 | 31 |
| Figura 10 - | <i>Receiver Operating Characteristic Curve</i> .....                                           | 34 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1 - Caracterização das amostras de acordo com gênero e idade.....                                                                                        | 24 |
| TABELA 2 - Valores de logWorth das variáveis de entrada do modelo ModSP.....                                                                                    | 32 |
| TABELA 3 – Teste $\chi^2$ para validação estatística do modelo completo ModSP e os valores de ajustes AICs e BIC.....                                           | 32 |
| TABELA 4 - Testes $\chi^2$ das razões de verossimilhança indicando as variáveis que contribuem significativamente para o modelo ModSP.....                      | 32 |
| TABELA 5 - Valores que estimam para cada preditor a probabilidade de prever o desfecho categórico dos 3 grupos.....                                             | 33 |
| TABELA 6 - Avaliação uniforme de entrada independente dos preditores e os seus respectivos efeitos principais no modelo de regressão gerado.....                | 33 |
| TABELA 7 - Matriz de confusão ou de classificação de acertos dos eventos corretamente classificados e daqueles não-eventos que foram erroneamente preditos..... | 34 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                |                                               |
|----------------|-----------------------------------------------|
| ADA            | Adenosina Desaminase                          |
| ADP            | Difosfato de adenosina                        |
| AMP            | Monofosfato de adenosina                      |
| ATP            | Trifosfato de Adenosina                       |
| CAT            | Catalase                                      |
| CD39           | Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 |
| CD73           | Ecto-5'-nucleotidase                          |
| CEP            | Comitê de Ética e Pesquisa                    |
| COVID-19       | Coronavírus 2019                              |
| eADP           | ADP extracelular                              |
| eATP           | ATP extracelular                              |
| ECA2           | Enzima Conversora de Angiotensina 2           |
| ECLIA          | Eletroquimioluminescência                     |
| EDTA           | Ácido etileno diamino tetra-acético           |
| ELISA          | Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay            |
| E-NTPDase      | Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase   |
| Fiocruz        | Fundação Oswaldo Cruz                         |
| GSHPx          | Glutathione peroxidase                        |
| IgG            | Imunoglobulina G                              |
| IgM            | Imunoglobulina M                              |
| IL-10          | Interleucina 10                               |
| IL-1 $\beta$   | Interleucina 1 beta                           |
| IL-2           | Interleucina 2                                |
| IL-4           | Interleucina 4                                |
| IL-6           | Interleucina 6                                |
| IL-7           | Interleucina 7                                |
| IL-8           | Interleucina 8                                |
| INF- $\gamma$  | Interferon gama                               |
| N              | Número amostral                               |
| NoX            | NADPH oxidase                                 |
| O <sub>2</sub> | Oxigênio                                      |

|              |                                              |
|--------------|----------------------------------------------|
| OMS          | Organização Mundial da Saúde                 |
| PCR          | Reação em Cadeia da Polimerase               |
| PCR-us       | Proteína C Reativa ultrasensível             |
| Rpm          | Rotações por minuto                          |
| PSH          | Tiós proteícos                               |
| SOD          | Superóxido dismutase                         |
| SRAG         | Síndrome Respiratória Aguda Grave            |
| TBARS        | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TCLE         | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido   |
| TNF $\alpha$ | Fator de necrose tumoral alfa                |
| UBS          | Unidade Básica de Saúde                      |
| UFFS         | Universidade Federal da Fronteira Sul        |
| UTI          | Unidade de Terapia Intensiva                 |

## SUMÁRIO

|                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                          | <b>12</b> |
| 1.2 JUSTIFICATIVA.....                                                             | 18        |
| 1.3 OBJETIVOS .....                                                                | 19        |
| <b>1.3.1 Objetivo Geral.....</b>                                                   | <b>19</b> |
| <b>1.3.2 Objetivos Específicos .....</b>                                           | <b>19</b> |
| <b>2. METODOLOGIA.....</b>                                                         | <b>20</b> |
| 2.1 DESENHO DO ESTUDO .....                                                        | 20        |
| <b>2.1.1 Critérios de inclusão e exclusão .....</b>                                | <b>20</b> |
| 2.2 QUESTIONÁRIO DE SINTOMAS – COVID-19 .....                                      | 21        |
| <b>2.3.1 Processamento e separação dos componentes sanguíneos.....</b>             | <b>21</b> |
| 2.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS .....                                                | 22        |
| 2.5 ENSAIOS ENZIMÁTICOS E BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO..                    | 23        |
| 2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....                                                     | 23        |
| 2.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....                                                      | 24        |
| <b>3 RESULTADOS.....</b>                                                           | <b>24</b> |
| 3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS .....                                              | 24        |
| 3.2 PARÂMETROS DO SISTEMA PURINÉRGICOS.....                                        | 25        |
| 3.3 QUESTIONÁRIO DE SINTOMAS APÓS A COVID-19 .....                                 | 28        |
| 3.4 ANÁLISES DA CORRELAÇÃO ENTRE OS PREDITORES DOS MARCADORES<br>BIOQUÍMICOS ..... | 29        |
| <b>4. DISCUSSÃO.....</b>                                                           | <b>34</b> |
| <b>5. CONCLUSÃO .....</b>                                                          | <b>38</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                           | <b>39</b> |
| <b>ANEXO A .....</b>                                                               | <b>47</b> |
| <b>APÊNDICE A.....</b>                                                             | <b>49</b> |

**APÊNDICE B ..... 52**

## 1. INTRODUÇÃO

No final de 2019, um vírus denominado SARS-CoV-2 que causa a Coronavírus 2019 (COVID-19) foi identificado pela primeira vez na cidade chinesa de Wuhan, na província Hubei, e ocasionou um surto de pneumonia infecciosa atípica que causava uma doença grave respiratória (WU; LEUNG; LEUNG, 2020). No dia 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou estado de pandemia, devido à alta transmissibilidade do vírus e ao aumento expressivo de casos e óbitos no mundo (WHO, 2020).

Segundo dados do Painel de Emergência de Saúde da OMS até o dia 15 de janeiro de 2023, foram confirmados no mundo 661.545.258 de casos da doença, sendo que desses, 6.700.519 evoluíram à óbito. No Brasil, até data citada anteriormente, foram confirmados 36.578.865 casos de COVID-19 e 695.088 mortes (WHO, 2022). O número de casos pode ser ainda maior, considerando a subnotificação no país. A notificação dos casos é importante para que se possa compreender e acompanhar a evolução da doença, porém, devido a rápida disseminação do vírus e o baixo número de testes realizados no Brasil, a subnotificação da doença é um problema real e que precisa ser solucionado (ORELLANA et al., 2021; PRADO et al., 2020).

O vírus SARS-CoV-2 é um betacoronavírus, da linhagem viral B, envelopado, de RNA de fita simples, medindo de 120-160 nanômetros de diâmetro, com aparência de uma coroa, da qual se origina seu nome (LETKO; MARZI; MUNSTER, 2020; WOO et al., 2010). Possui uma glicoproteína denominada Spike de superfície, que medeia a entrada do vírus na célula do hospedeiro, ocorrendo a ligação desta última com a Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2), que permite a clivagem do vírus na célula-alvo, causando a infecção (BELOUZARD; CHU; WHITTAKER, 2009; LI, 2016).

Os fatores de risco que desencadeiam a forma grave da doença em indivíduos infectados com o vírus SARS-CoV-2 não são completamente compreendidos. A progressão da doença grave pode não estar relacionada exclusivamente à carga viral e ser resultante de uma resposta defeituosa na produção de interferon tipo I (HADJADJ et al., 2020).

Os sintomas variam de acordo com a gravidade da doença, podendo ocorrer casos de infecção assintomática (CHEN et al., 2020). Os sinais e sintomas leves da doença são anosmia (perda do olfato), ageusia (perda do paladar), coriza, diarreia, dor abdominal, febre, mialgia, tosse, fadiga e cefaleia. Os sinais e sintomas moderados incluem febre persistente diária ou tosse persistente, piora progressiva de outro sintoma relacionado a COVID-19 (adinamia,

prostração, hiporexia, diarreia) ou pelo menos um dos sintomas citados anteriormente e a presença de fator de risco (BRASIL, 2020).

O sinal de maior gravidade até o momento apresentado é o desenvolvimento da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) ou Síndrome Gripal que apresente: dispneia/desconforto respiratório ou pressão persistente no tórax ou saturação de O<sub>2</sub> < 95% em ar ambiente ou cianose (BRASIL, 2020). A SRAG, que se refere ao estágio mais grave de lesão pulmonar, é caracterizada por hipoxemia de início agudo, com opacidades bilaterais nas imagens de tórax não explicadas por insuficiência cardíaca congestiva. Os pacientes que apresentam a SRAG podem necessitar de ventilação mecânica invasiva e terapias de regate (FAN et al., 2017).

O diagnóstico pode ser feito por meio de investigação clínico-epidemiológica do paciente caso este apresente sintomas característicos da COVID-19 ou através do diagnóstico laboratorial, como exames de biologia molecular (RT-PCR) e cromatográfico (teste rápido de pesquisa de antígeno) entre o terceiro e sétimo dia de sintomas, imunológico (teste rápido para detecção de anticorpo IgM e/ou anticorpo IgG, teste enzimaimunoensaio - ELISA ou imunoensaio por eletroquimioluminescência – ECLIA), a partir do oitavo dia de sintoma ou através do diagnóstico de imagem (tomografia computadorizada ou raio-X) (BRASIL, 2020).

Além desses, outros exames complementares ajudam no monitoramento da doença, como hemograma completo, gasometria arterial, coagulograma, proteína C-reativa sérica, perfil metabólico completo (AST, ALT, Gama-GT, creatinina, ureia, albumina), glicemia, ferritina, desidrogenase láctica, biomarcadores cardíacos (troponina, CK-MB, Pró-BNP), vitamina D, íons (Na, K, Ca, Mg), hemoculturas e culturas de escarro, oximetria de pulso, eletrocardiograma (BRASIL, 2020).

Apesar dos esforços de medidas que previnam a transmissão da COVID-19, a incidência de casos confirmados no Brasil continua aumentando. Há limitações na compreensão da patogênese da SARS-CoV-2 em humanos que necessitam de esclarecimentos para melhor enfrentamento da doença (SOUZA et al., 2021).

Durante a infecção pelo SARS-CoV-2, o vírus desencadeia uma resposta através do sistema imunológico do hospedeiro. A descompensação dessa resposta pode gerar inúmeros prejuízos à função pulmonar e consequente agravamento da doença. Por outro lado, uma resposta imune insuficiente pode contribuir para o aumento da replicação viral e pior prognóstico (LI et al., 2020).

Após análises histopatológicas de lesões pulmonares em pacientes com a COVID-19, foram observados processos inflamatórios inespecíficos no local, edema, danos nas células e septos alveolares. Do ponto de vista patológico, a inflamação ocasionada pelo SARS-CoV-2 pode causar danos como necrose, infiltrações e hiperplasias. Esses danos indicam que a resposta inflamatória possui um papel importante na progressão da doença, principalmente nos casos de pneumonia (LI et al., 2020). Esses achados sugerem que a resposta inflamatória descontrolada tem um efeito prejudicial sobre a lesão pulmonar induzida por COVID-19, por vezes mais severa do que a patogenicidade viral. Portanto, é vital a adoção de medidas para controlar a produção e a liberação das citocinas na fase crítica da doença (LI et al., 2020).

Na infecção pela COVID-19 as partículas de vírus começam a se espalhar pelo trato respiratório e infectar as células circundantes e desencadeia a chamada “tempestade de citocinas” que promove desregulação nas respostas imunológicas (LI et al., 2020). Em pacientes infectados e que progridem para a SRAG, na fase crítica da doença, e precisam de internação na Unidade de Tratamento Intensivo (UTI), foi demonstrado um aumento de citocinas inflamatórias como IL-2, IL-7, IL-10, TNF- $\alpha$  e várias outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (GUO et al., 2020; HUANG et al., 2020a). Um estudo chinês comprovou que os níveis plasmáticos das citocinas IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  são maiores em pacientes com infecções graves quando comparados em indivíduos com infecções não graves (QIN et al., 2020).

Mesmo após a cura do COVID-19 os indivíduos podem apresentar sintomas como fadiga, má qualidade do sono e ansiedade, alguns relataram manifestações mais graves, como fibrose pulmonar, insuficiência renal, diabetes mellitus e acidente vascular cerebral. A presença de manifestações pós-COVID-19 pode estar relacionada a gravidade da doença (IQBAL et al., 2021).

Embora a caracterização do estado imunológico e inflamatório em pacientes com COVID-19 ainda não esteja totalmente esclarecida, sabe-se que hiperinflamação e a coagulopatia contribuem para a evolução para a forma grave da doença e morte em pacientes infectados (MERAD; MARTIN, 2020). A replicação do vírus no organismo, pode fazer com que as células hospedeiras sofram piroptose, promovendo a liberação de ATP para o meio extracelular. O ATP extracelular (eATP) atua como molécula sinalizadora pró-inflamatória e promove a ativação de componentes do sistema purinérgico. Este processo pode levar ao acúmulo de células imunológicas como monócitos, linfócitos T e macrófagos nos pulmões e danificar o tecido pulmonar, piorando o prognóstico do indivíduo infectado (TAY et al., 2020).

A sinalização purinérgica foi descrita em 1972 por Burnstock, e é constituída pelos nucleotídeos ATP, ADP e AMP, e nucleosídeo adenosina, dos quais se ligam aos receptores P1 e P2 para exercer sua atividade biológica. As ectoenzimas são importantes constituintes desse sistema, pois regulam os componentes purinérgicos e modulam inúmeros processos fisiológicos. A expressão da CD39 e CD73 em células do sistema imunológico permite a integração da homeostase, controle de reações inflamatórias vasculares e controle da migração de células imunes no local da lesão, o que pode ser de extrema importância para subsidiar o entendimento da evolução clínica e prognóstico da COVID-19 (ANTONIOLI et al., 2019b; BURNSTOCK, 1972; DEAGLIO; ROBSON, 2011).

O sistema purinérgico funciona como um importante sinalizador e modulador de inúmeros processos fisiológicos, através das sinalizações extracelulares, participando de processos como modulação da resposta inflamatória e imunológica, atua no mecanismo de dor, agregação plaquetária, vasodilatação, proliferação e morte celular (AGTERESCH et al., 1999; BURNSTOCK; KNIGHT, 2004). Esse processo de sinalização se inicia com a liberação de nucleotídeos e nucleosídeos para o meio extracelular através de canais de ânions, panexinas e conexinas (TARUNO, 2018). A liberação dos nucleotídeos para o meio extracelular pode ocorrer em condições críticas. Quando ocorre o vazamento maciço, pode representar lise celular devido a lesão no órgão, choque traumático ou até mesmo em algumas condições inflamatórias (YEGUTKIN, 2008).

A Adenosina trifosfato (ATP), é um nucleotídeo que participa como molécula sinalizadora do sistema purinérgico através dos purinoreceptores P2, subdivididos entre os receptores ionotrópicos da família P2X (1-7) e os metabotrópicos P2Y (1,2,4,6,11,14) (ANTONIOLI et al., 2013; BURNSTOCK; KENNEDY, 1985). Os nucleosídeos extracelulares mais importantes são a adenosina e a inosina, que se ligam aos receptores P1, subdivididos em A1, A2A, A2B e A3, todos são receptores acoplados à proteína G (ANTONIOLI et al., 2019a). Os receptores P1 e P2 são amplamente distribuídos pelo organismo e representam importantes alvos farmacológicos (ANTONIOLI et al., 2019b). O ATP exerce um efeito potencializador na migração de neutrófilos. Ainda, via receptores P2Y<sub>2</sub>, desempenha um importante papel na migração de eosinófilos que pode resultar em seu acúmulo nos pulmões durante uma inflamação alérgica (BURNSTOCK; BOEYNAEMS, 2014).

As ectoenzimas purinérgicas (ectonucleotidases) são enzimas com capacidade de regular a concentração extracelular de ATP, ADP, AMP e adenosina, através da hidrólise desses

nucleotídeos em seus respectivos nucleosídeos, sendo importantes diversos processos fisiológicos (LEAL et al., 2005).

As ectonucleotidasas participam do processo de regulação da concentração plasmática dessas moléculas. Essa regulação pode se iniciar pelas enzimas da família das NTPDases e terminar por meio da ação da enzima ecto-5'-nucleotidase (CD73) com hidrólise dos nucleotídeos (ZIMMERMANN, 1992). A ecto-5'-nucleotidase e a adenosina desaminase (ADA), promovem a hidrólise em adenosina e posteriormente em inosina, respectivamente, regulando as concentrações extracelulares e plasmáticas dessas moléculas (GODING; HOWARD, 1998)

Um dos receptores purinérgicos que atraíram a atenção dos pesquisadores recentemente para o enfrentamento da COVID-19 é o P2X7, que é ionotrópico e está presente em diversas células do sistema imunológico, como macrófagos, células dendríticas, células T e neutrófilos. Após ativado, pode aumentar a inflamação na doença e piorar o prognóstico. Assim, o uso de substâncias antagonistas do receptor P2X7 poderia contribuir para o tratamento da COVID-19, através da redução dos efeitos pró-inflamatórios do ATP (DI VIRGILIO et al., 2020; FRANCIOSI et al., 2021). Além disso, o bloqueio desse receptor pode ser uma estratégia promissora para evitar e tratar transtornos psiquiátricos e a neuroinflamação em pacientes com COVID-19 (RIBEIRO et al., 2021).

Alguns medicamentos estão sendo avaliados para uso terapêutico em pacientes com COVID-19 por meio de protocolos e ensaios clínicos randomizados, como por exemplo, o dipiridamol. Esse medicamento potencializa a sinalização dos receptores de adenosina. A perspectiva é de que a droga diminua a resposta tromboinflamatória nos indivíduos com a doença (KANTHI et al., 2020; OATES; WOOD; FITZGERALD, 1987).

No ano de 1985 foi formulado e descrito, pela primeira vez, o conceito de estresse oxidativo (SIES, 2015). A relação entre fatores oxidantes e antioxidantes no organismo, é um fator importante para manutenção da homeostase. Quando há um desequilíbrio entre esses fatores, ocorre o que chamamos de estresse oxidativo. O dano oxidativo ocorre quando um átomo ganha ou perde elétrons, forma-se então radicais livres que ficam altamente reativos. Diversos componentes do organismo ficam suscetíveis a oxidação, como por exemplo lipídeos, proteínas e DNA (LICHTENBERG; PINCHUK, 2015; YANG; CHEN; SHI, 2019).

Grande parte dos radicais livres são produtos do metabolismo celular, como o metabolismo mitocondrial e do retículo endoplasmático, na degradação lipídica e no processo de envelhecimento. As espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), são

moléculas altamente reativas e podem contribuir para a progressão de diversas patologias quando em desequilíbrio com proporção de moléculas antioxidantes (LIGUORI et al., 2018; MUHAMMAD et al., 2021; NTYONGA-PONO, 2020).

Os danos quando o organismo está em condições de estresse oxidativo são inúmeros e podem afetar o organismo de forma geral, afetando membranas celulares e DNA, ocorrendo o processo de oxidação e desnaturação proteica e induzindo a respostas inflamatórias (ZHANG; RONG; LI, 2019).

As principais enzimas antioxidantes do organismo são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GSHPx). O ácido ascórbico (vitamina C), a glutathione (GSH), vitamina A e vitamina E fazem parte da defesa antioxidante não enzimática, que neutralizam os radicais livres, protegendo o organismo dos agentes oxidantes nocivos (MARTINS et al., 2021). Porém, a produção das ERO não é totalmente prejudicial ao organismo, ela possui uma função benéfica em infecções virais, através da sinalização intracelular, necessária para erradicação dos vírus que são fagocitados por células do sistema imunológico. Entretanto, até o momento, não está comprovado o envolvimento do estresse oxidativo nas células das vias aéreas dos pacientes com COVID-19 (CHERNYAK et al., 2020; YANG et al., 2013).

A COVID-19 é uma doença infecciosa que afeta milhares de pessoas no mundo, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade, além de diversas complicações após a infecção pelo vírus SARS-CoV-2. A inflamação aguda é um problema frequente em pacientes acometidos por essa doença. Sabe-se que a sinalização purinérgica e estresse oxidativo participam diretamente na regulação do sistema imunológico, porém, há poucos estudos sobre o seu papel na modulação da fisiopatologia da COVID-19. Sendo assim, é de fundamental importância conhecer os mecanismos do sistema purinérgico e do estresse oxidativo envolvidos na COVID-19, a fim de que uma abordagem terapêutica eficaz no sentido de prevenir a própria infecção ou reduzir a sua evolução.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

O vírus SARS-CoV-2 causou uma pandemia global e milhares de pessoas no mundo desenvolveram a doença COVID-19. Até o momento, foram registradas mais de seis milhões de mortes pela doença, gerando um grande impacto na saúde pública. A COVID-19 pode resultar em casos assintomáticos ou leves, porém pode evoluir devido a “tempestade de citocinas” ocasionada e causar a SRAG resultando diversas complicações e aumentando a mortalidade dessa doença.

A alta concentração de adenosina durante a COVID-19, por exemplo, pode exercer uma ação imunossupressora via receptores A2A e A2B nas células do sistema imunológico do hospedeiro (ABOUELKHAIR, 2020). O aumento da atividade das enzimas CD39 e CD73 contribuem para a redução dos níveis de ATP e aumento da quantidade de adenosina. Isso poderia conter a “tempestade de citocinas” causada pela COVID-19 e promover um ambiente anti-inflamatório no local da infecção (CEKIC; LINDEN, 2016; FRANCIOSI et al., 2021).

A descompensação do sistema imunológico ocorre na COVID-19 e o papel da sinalização purinérgica e do estresse oxidativo nesse processo ainda não são totalmente compreendidos, além de como o organismo se comporta após essa infecção. A presente pesquisa parte da premissa que o sistema purinérgico e o estresse oxidativo tem participação nas alterações patológicas na COVID-19 e que estas alterações podem ter uma relação com a progressão da doença COVID-19.

Pacientes que desenvolveram a COVID-19 relatam manifestações clínicas persistentes após a cura da doença, como fadiga, dores e alterações no apetite e sono. Durante a pandemia, as pesquisas científicas centraram-se, principalmente, na prevenção e no tratamento na fase aguda da infecção. É de fundamental importância identificar os sintomas percebidos pelos indivíduos após a COVID-19 e correlacionar com aspectos inflamatórios do estresse oxidativo e sistema purinérgico, a fim de elucidar e contribuir para entendimento fisiopatológico dessa doença, justifica-se o estudo.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar a relação entre os sintomas pós-COVID de pacientes acometidos com COVID-19 com grau leve e moderado com marcadores inflamatórios do sistema purinérgico e estresse oxidativo.

### 1.3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a atividade das enzimas ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (CD39), ecto-5'-nucleotidase (CD73) e adenosina desaminase (ADA) em linfócitos em pacientes após a infecção pela COVID-19 e que desenvolveram a doença na forma leve e moderada e nos indivíduos do grupo controle;
- b) Avaliar a atividade das enzimas ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (CD39), ecto-5'-nucleotidase (CD73) e adenosina desaminase (ADA) em plaquetas após a infecção pela COVID-19 e que desenvolveram a doença na forma leve e moderada e nos indivíduos do grupo controle;
- c) Avaliar os parâmetros do estresse oxidativo em pacientes que desenvolveram a forma leve e moderada da COVID-19 e nos indivíduos do grupo controle.
- d) Caracterizar a amostra através dos dados clínico patológicos dos prontuários médicos nos grupos leve e moderado e comparar com o grupo controle.
- e) Avaliar os sinais e sintomas persistentes percebidos pelos indivíduos após o desenvolvimento da doença COVID-19.
- f) Associar e ponderar as diferentes variáveis laboratoriais coletadas de marcadores inflamatórios com a suas respectivas razões de chance na caracterização do COVID-19 por meio do modelo ModSP.
- g) Elaborar a partir dos resultados dos exames laboratoriais modelos preditivos e exploratórios que auxiliam explicar e detectar a probabilidade de chances de um indivíduo possuir COVID-19.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo analítico de corte transversal, de abordagem qualitativa e quantitativa, que analisou pacientes recuperados da COVID-19 que foram atendidos na Unidade Básica de Saúde (UBS) de Belmonte, SC, Brasil. Os indivíduos foram alocados de acordo com o caso de maneira cronológica, em dois estratos de gravidade da doença. A testagem reagentes para COVID-19 foi realizada utilizando um dos seguintes métodos bioquímicos/biomoleculares: teste de expressão gênica (RT-PCR), sorológico (Imunocromatografia), pesquisa de antígeno, teste enzimaimunoensaio (ELISA) ou imunoensaio por eletroquimioluminescência (ECLIA). Três grupos foram estabelecidos: *i.* pacientes que desenvolveram a forma leve da doença ( $n= 15$ ), *ii.* pacientes que desenvolveram a forma moderada da doença ( $n= 15$ ), e *iii.* o grupo controle ( $n= 15$ ). Neste último, foram incluídos indivíduos que não obtiveram testagem positiva e não desenvolveram síndrome gripal no último ano de referência da data da coleta, em 2021. Os critérios de classificação da gravidade da doença seguiram as referências das Orientações de Manejo de pacientes com COVID-19 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2020). Todos os participantes foram informados sobre os objetivos e procedimentos da pesquisa, as dúvidas esclarecidas e procedido o convite à participação voluntária do estudo, sendo que aqueles que aceitaram participar assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), conforme o Apêndice A.

A coleta de material biológico, informações de prontuário e questionário dos pacientes leves e moderados foram realizadas no ano de 2021. O questionário de sintomas (anexo A) foram respondidos após a coleta de material biológico pelos participantes da pesquisa. As amostras foram coletadas após no máximo a decorrência de 21 dias do início da doença e melhora geral dos sintomas. Nas amostras de soro foram avaliados atividade enzimática de componentes do sistema purinérgico e estresse oxidativo. As análises laboratoriais foram realizadas nos laboratórios de pesquisas da UFFS, *campus* Chapecó, no período de 2021 a 2022.

#### 2.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos neste estudo indivíduos com idade superior a dezoito (18) anos completos, que desenvolveram a doença da COVID-19, diagnosticados por meio de testes

moleculares (RT-PCR), sorológicos (Imunocromatografia) ou pesquisa de antígeno, teste enzimaimunoensaio (ELISA) ou imunoensaio por eletroquimioluminescência (ECLIA). Os indivíduos do grupo controle foram voluntários, com idade acima dezoito (18) anos completos, que não apresentaram sinais ou sintomas da Síndrome Gripal no último ano e/ou teste positivo para COVID-19.

Os critérios de exclusão compreenderam indivíduos gestantes, lactantes, oncológicos e pacientes que fizeram uso de terapia imunossupressora.

## 2.2 QUESTIONÁRIO DE SINTOMAS – COVID-19

Após a assinatura do TCLE (apêndice A) os participantes do estudo receberam o questionário em que puderam identificar os sintomas que persistiam mesmo após a remissão ou provável cura da COVID-19. Logo em seguida ao preenchimento do questionário, foram encaminhados para a coleta sanguínea para caracterização de biomarcadores inflamatórios e componentes do sistema purinérgico em linfócitos e plaquetas e do estresse oxidativo.

## 2.3 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

A coleta de sangue dos participantes foi realizada em um único momento após assinatura do TCLE e preenchimento do questionário de sintomas. Foram coletados dezoito mililitros (18 ml) de sangue total em tubos *vacutainer* com EDTA, para isolamento de linfócitos, com citrato de sódio, para isolamento de plaquetas e em tubos sem anticoagulante para separação do soro. O procedimento de coleta ocorreu na sala de coletas da UBS, sendo realizado por profissional capacitado na área, garantindo a privacidade e sigilo dos indivíduos. Todo o procedimento de coleta das amostras biológicas, manipulação e descartes de resíduos infectantes foram executados em consonância com as normas de biossegurança.

### 2.3.1 Processamento e separação dos componentes sanguíneos

Para a obtenção do soro, as amostras foram coletadas em um tubo contendo gel separador, que foi centrifugado a uma rotação de 3.500 rpm por 15 minutos, após, o soro foi retirado e armazenado em tubos eppendorf no ultrafreezer à -80°C.

Para separação da camada de linfócitos utilizou-se a metodologia de Böyum (1968), onde as amostras de sangue foram coletadas com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e

foram diluídas em volume igual de solução salina. Posteriormente a amostra diluída foi transferida para um tubo cônico contendo Lymphoprep (Ficoll-Histopaque), seguida de centrifugação a 1800 rpm, em temperatura ambiente, por 30 minutos. Após a centrifugação, houve a formação de um gradiente de densidade. Nesta etapa, uma camada forma-se, composta pelas células mononucleares (linfócitos e monócitos) entre as camadas de plasma e Ficoll, essas células foram cuidadosamente retiradas com pipeta e transferida para tubo cônico limpo e acrescentado salina, seguida por centrifugação de 10 minutos a 1500 rpm. Após, ocorreu o descarte do sobrenadante e acrescentado salina até a lavagem completa das células e remoção das plaquetas. As amostras de linfócitos foram armazenadas no ultrafreezer.

No processo de separação das plaquetas utilizou-se a metodologia de Pilla et al., (1996) modificada por Lunkes et al., (2003) onde as amostras de sangue coletadas nos tubos de citrato foram centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio, que foi centrifugado por 30 minutos a 5000 rpm para que as plaquetas se depositem no fundo do tubo de ensaio. Após, o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1 ml do tampão HEPES 3,5 mM a pH 7,2, homogeneizando até a completa dissolução. Esse homogeneizado foi centrifugado por mais 10 minutos a 5.000 rpm. Posteriormente, retirou-se o sobrenadante e foi adicionado 500µl do tampão HEPES às plaquetas. Após homogeneização, foi separado 250µl da amostra em dois eppendorf, e esses foram armazenadas no ultrafreezer à -80°C.

Para obtenção de plasma, foi utilizado os tubos com EDTA e citrato e realizou-se a centrifugação da amostra a uma rotação de 3.500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante contendo o plasma foi identificado, armazenado em eppendorf no ultrafreezer à -80°C para posterior realização das análises.

## 2.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas foram determinadas de acordo com o método de Bradford e ajustadas nas concentrações de 0,1–0,2 mg/mL para amostras de linfócitos, utilizando cloreto de sódio 0,9% quando necessário para diluição (BRADFORD, 1976).

## 2.5 ENSAIOS ENZIMÁTICOS E BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

A atividade das ectoenzimas do sistema purinérgico foi verificada nos linfócitos e em plaquetas (CD39, CD73, ADA). A atividade das enzimas CD39 e CD73 foi determinada como previamente descrito por LEAL et al. (2005). A atividade da enzima ADA foi determinada de acordo com o protocolo já descrito por GIUSTI e GALANTI (1984).

Para a dosagem da vitamina C foi realizada o método de acordo com a metodologia descrita por JACQUES-SILVA et al. (2001). A metodologia empregada para avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) seguiu o protocolo de JENTZSCH et al. (1996).

## 2.6 ANALISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 9.0 (San Diego, CA, EUA). Para testar a normalidade foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. As diferenças entre os grupos para as atividades enzimáticas e parâmetros do estresse oxidativo foram avaliadas por meio da análise de variância de um fator (ANOVA One-way). Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão,  $\bar{x}$  (DP) para as variáveis paramétricas, e como mediana e intervalo interquartil para modelos de distribuição desconhecido. Para análise dos questionários, a frequência absoluta e relativa e os testes de homogeneidade e de contagem de Poisson foram empregados para analisar as múltiplas respostas entre os grupos.

Para verificar a associação das variáveis referentes ao sistema purinérgico e estresse oxidativo, foi inicialmente realizada uma análise exploratória de correspondência múltipla entre as variáveis métricas. A partir da verificação da baixa correlação entre as variáveis, refutando a multicolinearidade, todas estas foram adicionadas para construção do modelo de regressão logística multinominal, considerando somente efeitos principais de cada. As variáveis que apresentaram um valor do logaritmo da taxa de falsa descoberta, na análise geral do modelo, superior a 0,5 (“cut-off”), estas foram removidas pelo método backward. Os testes de Wald e razão de verossimilhança foram utilizados para verificar a contribuição individual de cada variável para o efeito global do modelo. Análise da razão de chance e respectivo Intervalo de Confiança (IC, 95%) foi calculada para avaliar o peso das variáveis em prever a chance destas em categorizar o desfecho. Por fim, no intuito de gerar uma modelagem estatística robusta, o modelo gerado foi utilizado para gerar 10.000 permutações dos dados observados, sendo este

novo banco utilizado para estabelecer a formulação matemática de predição com base das chances das variáveis independentes categorizarem os três grupos do presente estudo.

O software Jamovi (versão 2.3.21) e o Microsoft Excel 2016 foram utilizados para as análises estatísticas. Foram considerados testes estatisticamente significantes aqueles cujo valor de P foi inferior a 0,05.

## 2.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para execução do projeto, foram solicitadas autorizações aos órgãos competentes, que incluem a Secretaria Municipal de Saúde do Município de Belmonte-SC. Os responsáveis pelo estabelecimento assinaram as declarações de ciência e concordância.

A presente pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos através da Plataforma Brasil na Universidade Federal da Fronteira Sul, aprovada pelo CAAE 47417821.5.0000.5564, número do parecer: 4.836.301.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Um total de 45 participantes foram incluídos no presente estudo, sendo 15 indivíduos compondo o grupo que não teve manifestações sintomatológicas do quadro da Covid-19 (Grupo Controle) e 30 que contraíram a COVID-19. Estes últimos, 15 preencheram os critérios da forma leve da doença (Grupo Covid Leve) e os outros 15 apresentaram a forma moderada (Grupo Covid Moderado).

**Tabela 1.** Caracterização da amostra de acordo com gênero e idade.

| Grupo                 | Gênero    | Idade        | Peso         | IMC         |
|-----------------------|-----------|--------------|--------------|-------------|
| Controle (n=15)       | Feminino  | 38,1 (9,04)  | 70,4 (15,43) | 26,5 (5,45) |
|                       | Masculino | 40,4 (14,31) | 79,0 (11,20) | 27,5 (3,74) |
| Covid Leve (n=15)     | Feminino  | 44,5 (15,77) | 70,2 (19,99) | 28,7 (7,57) |
|                       | Masculino | 40,3 (16,71) | 81,1 (15,71) | 26,4 (4,06) |
| Covid Moderado (n=15) | Feminino  | 48,3 (9,89)  | 76,0 (14,24) | 29,7 (5,04) |
|                       | Masculino | 30,6 (10,34) | 74,4 (11,61) | 24,1 (2,56) |

Quanto ao gênero os participantes no grupo controle, 10 eram do sexo feminino (67%) e 5 do sexo masculino (33%); no grupo leve, 8 participantes eram do sexo feminino (53%) e 7 do sexo masculino (47%), no grupo moderado, 8 participantes eram do sexo feminino (53%) e 7 do sexo masculino (47%).

A média da idade dos participantes do grupo controle foi de  $38,1 \pm 9,04$  anos para o sexo feminino e de  $40,4 \pm 14,31$  anos para o sexo masculino. A média da idade entre os indivíduos do grupo Covid Leve foi de  $44,5 \pm 15,78$  anos para o sexo feminino e de  $40,3 \pm 16,71$  anos para sexo masculino. Já no grupo Covid Moderado, a média de idade feminina foi de  $48,3 \pm 9,90$  e de  $30,6 \pm 10,34$  anos no sexo masculino.

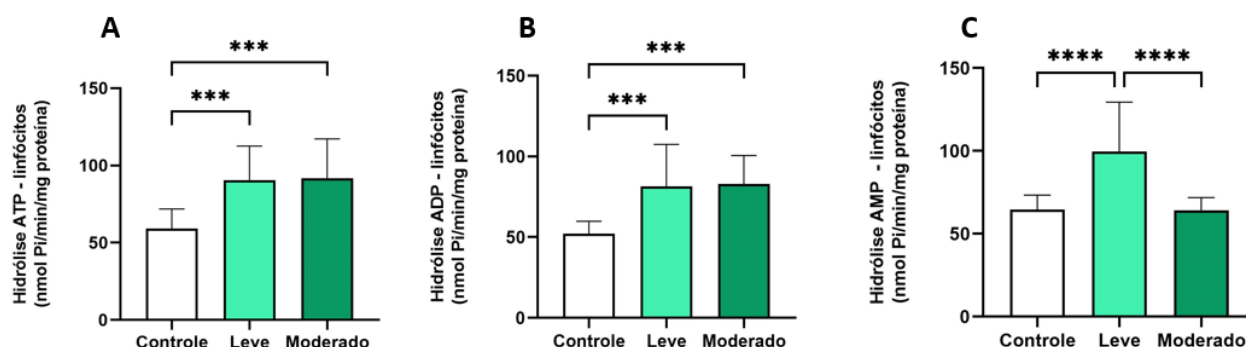
O grupo controle foi composto de indivíduos que não obtiveram testagem positiva e não desenvolveram síndrome gripal no último ano. Todas as amostras do grupo controle foram testadas com teste rápido de anticorpos para COVID-19, tendo resultado negativo obrigatório para todas as amostras para que o indivíduo fosse incluído na pesquisa.

### 3.2 PARÂMETROS DO SISTEMA PURINÉRGICOS

Conforme demonstra a Figura 1A, a hidrólise foi aumentada em pacientes que contraíram a COVID-19 em comparação com o grupo controle. Entre o grupo leve e o grupo controle houve diferença na hidrólise do ATP ( $90,51 \pm 21,99$  nmol Pi/min/mg do grupo leve vs.  $59,11 \pm 12,71$  nmol Pi/min/mg do controle, com valor de  $p=0,0008$ ) e entre o grupo moderado  $91,67 \pm 25,52$  nmol Pi/min/mg, valor de  $p=0,0005$  comparado ao controle.

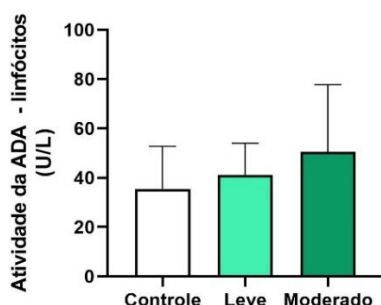
Na Figura 1B, os resultados se mantêm semelhantes a hidrólise de ATP, demonstrando o aumento da hidrólise do ADP, com diferença entre o grupo controle ( $52,07 \pm 7,73$  nmol Pi/min/mg) e leve ( $81,45 \pm 26,02$  nmol Pi/min/mg)  $p=0,0005$  e entre o grupo controle ( $52,07 \pm 7,73$  nmol Pi/min/mg) e moderado ( $82,80 \pm 17,74$  nmol Pi/min/mg) com  $p=0,0003$ .

A Figura 1C, demonstra que houve aumento da hidrólise do AMP nos casos leves ( $99,65 \pm 29,77$  nmol Pi/min/mg) da doença em comparação ao grupo controle ( $64,58 \pm 8,78$  nmol Pi/min/mg) ( $p < 0,0001$ ), porém os experimentos demonstraram uma redução significativa na hidrólise do AMP do grupo moderado ( $64,22 \pm 7,56$  nmol Pi/min/mg) em comparação ao grupo leve ( $99,65 \pm 29,77$  nmol Pi/min/mg), com valor de  $p < 0,0001$ .



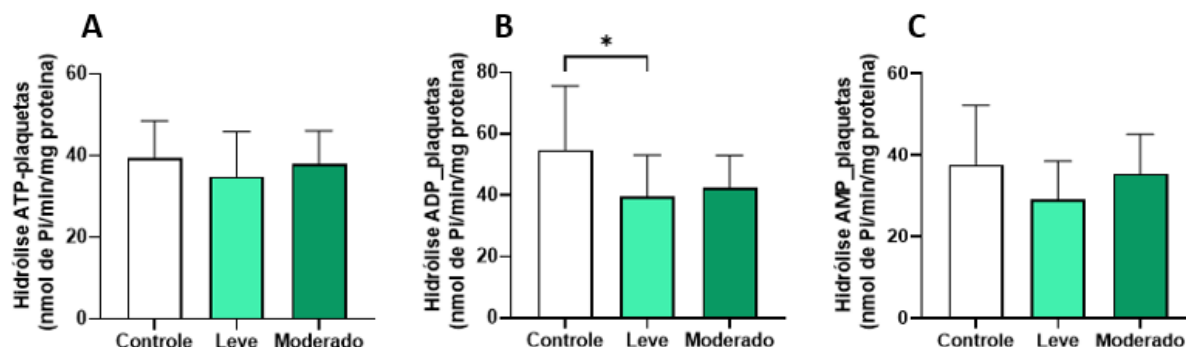
**Figura 1.** Hidrólise de ATP (A), ADP (B) e AMP (C) em linfócitos de indivíduos controle (n=15), leve (n=15) e moderado (n=15) que contraíram COVID-19. A atividade de CD39 foi medida pela hidrólise de ATP e ADP, enquanto a atividade de CD73 foi medida pela hidrólise de AMP. Análise estatística: ANOVA de uma via. \*(p < 0,05); \*\* (p < 0,01); \*\*\* (p < 0,001); \*\*\*\* (p < 0,0001).

A Figura 2 demonstra a atividade da ADA nos linfócitos, não houve diferença estatisticamente significativa quanto à atividade da ADA. Porém há uma tendência de aumento na atividade dessa enzima nos pacientes que contraíram os SARS-CoV-2 quando comparadas ao grupo controle.



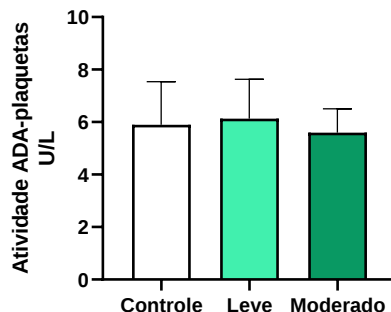
**Figura 2.** Atividade da ADA em linfócitos de indivíduos que desenvolveram a forma leve (n=15) e moderada (n=15) da COVID-19 em relação ao grupo controle (n=15).

A Figura 3A demonstra a hidrólise do ATP nas plaquetas dos pacientes do estudo, onde não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos (controle:  $39,31 \pm 9,23$  nmol Pi/min/mg; leve:  $34,87 \pm 10,94$  nmol Pi/min/mg e moderado:  $38,01 \pm 8,08$  nmol Pi/min/mg). A Figura 3B demonstra a hidrólise do ADP nas plaquetas, onde a hidrólise foi aumentada no grupo controle ( $54,78 \pm 20,78$  nmol Pi/min/mg) em comparação ao grupo leve ( $39,39 \pm 13,69$  nmol Pi/min/mg) com valor de  $p = < 0,05$ . A Figura 3C demonstra a hidrólise do AMP, onde não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.



**Figura 3.** Hidrólise de ATP (A), ADP (B) e AMP (C) em plaquetas dos indivíduos do grupo controle (n=15), leve (n=15) e moderado (n=15) que contraíram COVID-19. A atividade de CD39 foi medida pela hidrólise de ATP e ADP, enquanto a atividade de CD73 foi medida pela hidrólise de AMP. Análise estatística: ANOVA de uma via. \*( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ); \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

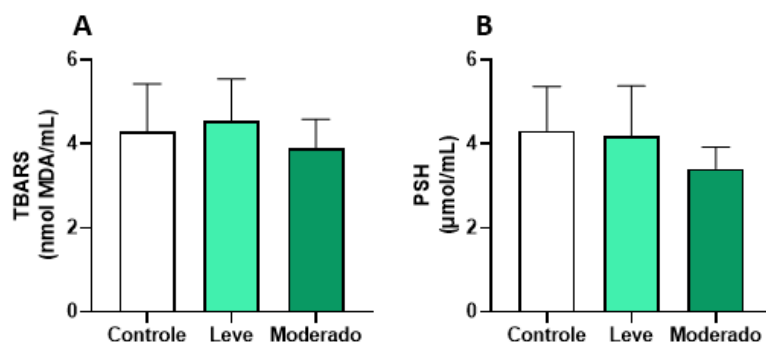
A Figura 4 demonstra a atividade da ADA em plaquetas, onde não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.



**Figura 4:** Atividade da ADA em plaquetas de indivíduos que desenvolveram a forma leve (n=15) e moderada (n=15) da COVID-19 em relação ao grupo controle (n=15).

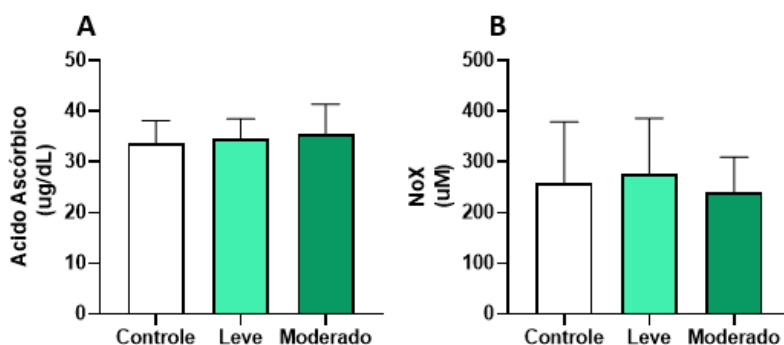
### 3.3 PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO

Conforme demonstra a Figura 5A E 5B, não houve diferença estatística entre os grupos controle, leve e moderado nas concentrações de TBARS e PSH.



**Figura 5.** Concentração de TBARS (Figura 5A) e PSH (Figura 5B) indivíduos que desenvolveram a forma leve (n=15) e moderada (n=15) da COVID-19 em relação ao grupo controle (n=15).

A figura 6A e 6B demonstra que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle, leve e moderado nas concentrações de TBARS (controle:  $4,30 \pm 1,12$  nmol MDA/mL, leve:  $4,55 \pm 0,99$  nmol MDA/mL e moderado:  $3,90 \pm 0,68$  nmol MDA/mL), PSH ( $4,32 \pm 1,05$  μmol/mL, leve:  $4,18 \pm 1,20$  μmol/mL e moderado:  $3,41 \pm 0,50$  μmol/mL), Ácido ascórbico (controle:  $33,78 \pm 4,41$  ug/dL, leve:  $34,59 \pm 3,93$  ug/dL e moderado:  $35,54 \pm 5,86$  ug/dL) e NoX (controle:  $258,2 \pm 120,8$  uM, leve:  $277,1 \pm 109,5$  uM e moderado:  $240,9 \pm 68,9$  uM).



**Figura 6.** Concentração de Ácido ascórbico (Figura 6A) e NoX (Figura 6B) em indivíduos que desenvolveram a forma leve (n=15) e moderada (n=15) da COVID-19 em relação ao grupo controle (n=15).

### 3.3 QUESTIONÁRIO DE SINTOMAS APÓS A COVID-19

Após a coleta das amostras biológicas, os participantes da pesquisa responderam ao questionário referente aos sintomas após recuperação da COVID-19, conforme demonstra a figura 7.



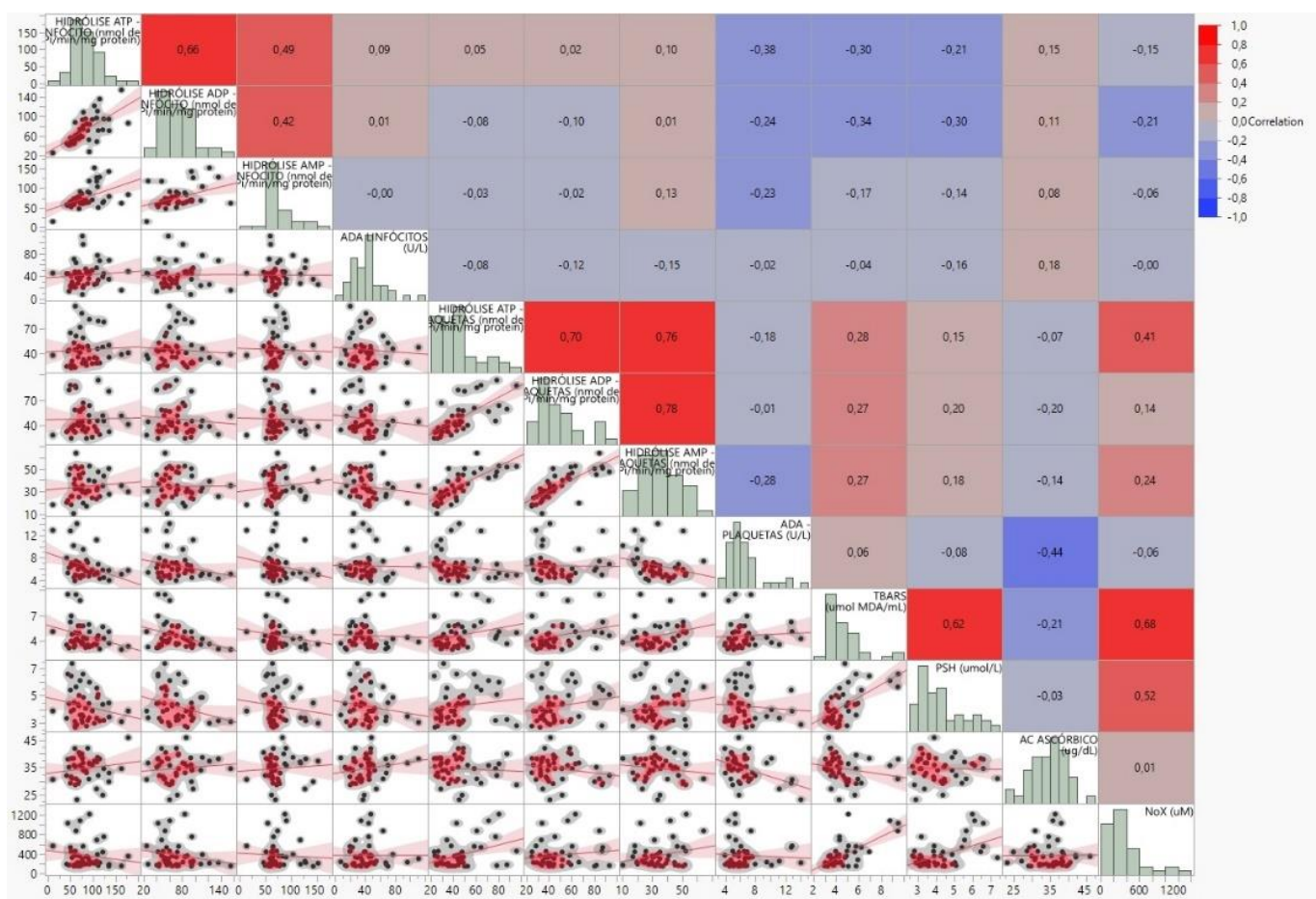
**Figura 7.** Questionário de sintomas pós-COVID-19 respondido pelos indivíduos do grupo moderado e leve. Os indivíduos do grupo foram retirados da análise, isto é, não são considerados não-respondentes devido a especificidade do questionário ser voltado aos indivíduos que desenvolveram a doença.

### 3.4 ANÁLISES EXPLORATÓRIA E CONFIRMATÓRIA DAS VARIÁVEIS CONTÍNUAS REFERENTES AO ESTUDO

Inicialmente foram realizadas investigações exploratórias das variáveis coletadas no estudo a fim de investigar possíveis associações de preditores que pudessem modelar uma

análise confirmatória acerca da probabilidade de chances de um indivíduo ter ou não COVID-19.

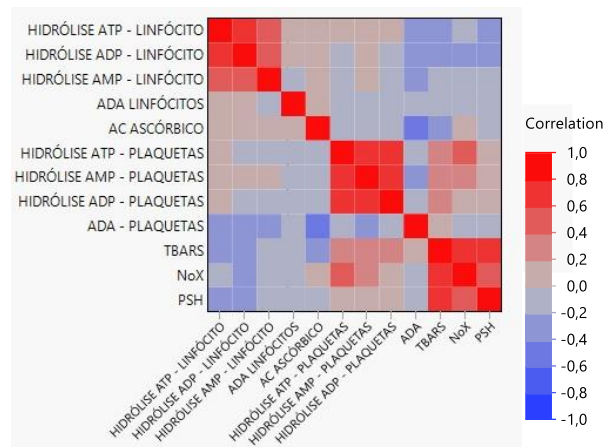
A Figura 8 abaixo é possível verificar a análise exploratória com os valores de correlação, interações das médias, desvios e coeficientes entre as variáveis e suas respectivas plotagens em gráfico de dispersão. Na linha diagonal que divide a figura encontram-se as frequências dos dados univariados.



**Figura 8.** Análise estatística exploratória que investiga o grau de correlação entre as variáveis contínuas que foram utilizadas para a construção do modelo de regressão logística como do modelo de redes neurais para previsão de indivíduos apresentarem ou não Covid-19 com base nos inputs analisados. Na metade diagonal inferior da figura, o gráfico de dispersão dos dados é acompanhado da linha de ajuste da correlação de Pearson, o contorno elíptico que relaciona as médias, desvios padrões e correlações entre X,Y. Na metade diagonal superior, os valores do coeficiente de Pearson estão plotados por painel do tipo “Heat Map”, sendo que a quanto maior a tonalidade vermelha, maior a correlação entre as variáveis.

A Figura 9 sumariza em clusters plotados em painel do tipo “Heat Map” as variáveis agrupadas pela matriz de covariação entre as variáveis incluídas neste estudo. Com base nessa

análise, foram selecionadas as variáveis dos 3 blocos visualmente identificados com mesma dimensão e de tonalidade vermelha-escura da Figura 9.



**Figura 9.** Painel do tipo “Heat Map” mostra a correlação agrupada conforme a matriz de covariância entre as variáveis bioquímicas coletadas preditoras de pacientes que desenvolveram a COVID-19 e o grupo controle.

Ao calcular a regressão, os preditores que obtiveram valores  $\log\text{Worth}$  menores que a adotada como “cut-off” neste estudo ( $\text{False Discover Ratio } \log\text{Worth} > 0,5$ ) foram removidas. Em seguida, foi analisado o modelo geral resultante, observando uma boa descrição global dos preditores associados com o desfecho categórico dos três grupos, isto é, Controle, Covid Leve e Covid Moderado ( $\chi^2 = 48,6$ ,  $P < 0,001$ ).

Foi possível caracterizar um modelo de regressão logística que consistiu na incorporação de oito variáveis preditoras das 12 calculadas no presente estudo, em sua maioria, envolvidas no sistema purinérgico. O uso da regressão logística teve como objetivo verificar a como se comportam, em termos de associação com o desfecho categórico, os parâmetros comumente utilizados na pesquisa básica para compreender mecanismos de inflamação, no entanto, com poucos estudos abordando a sua associação no cenário de prática clínica.

A tabela 2 apresenta o grau de associação entre os preditores e a tabela 3 traz o valor de  $\chi^2$  e o ajuste do modelo de regressão gerado.

**Tabela 2.** Valores de logWorth das variáveis de entrada do modelo de regressão logística mostrando os preditores que caracterizaram o desfecho de modo satisfatório.

| Variáveis independentes   | FDR      |         |
|---------------------------|----------|---------|
|                           | Logworth | PValue  |
| HIDRÓLISE AMP - LINFÓCITO | 5,587    | 0,00000 |
| HIDRÓLISE ADP - LINFÓCITO | 1,574    | 0,02669 |
| HIDRÓLISE ADP - PLAQUETAS | 1,103    | 0,07883 |
| HIDRÓLISE ATP - PLAQUETAS | 1,103    | 0,07883 |
| ADA - PLAQUETAS           | 1,103    | 0,07883 |
| ADA - LINFÓCITOS          | 1,103    | 0,07883 |
| PSH                       | 0,894    | 0,12757 |
| TBARS                     | 0,498    | 0,31773 |

**Tabela 3.** Teste  $X^2$  para validação estatística do modelo geral e o grau de ajuste deste por meio dos valores de AICs e BIC.

| Modelo     | -LogLikelihood | DF | QuiQuadrado | Prob>ChiSq |
|------------|----------------|----|-------------|------------|
| Difference | 24,308194      | 16 | 48,61639    | <,0001*    |
| Full       | 25,129359      |    |             |            |
| Reduced    | 49,437553      |    |             |            |

|              |         |
|--------------|---------|
| RSquare (U)  | 0,4917  |
| AICc         | 112,566 |
| BIC          | 118,779 |
| Observations | 45      |

**Tabela 4.** Testes  $\chi^2$  das razões de verossimilhança indicando as variáveis que contribuem para o modelo de regressão gerado.

| Preditor                  | Nparm | DF | $\chi^2$   | Prob>ChiSq |
|---------------------------|-------|----|------------|------------|
| HIDRÓLISE ADP - LINFÓCITO | 2     | 2  | 10,0193036 | 0,0067*    |
| HIDRÓLISE AMP - LINFÓCITO | 2     | 2  | 29,8880029 | <,0001*    |
| ADA LINFÓCITOS            | 2     | 2  | 5,65626006 | 0,0591     |
| HIDRÓLISE ATP - PLAQUETAS | 2     | 2  | 6,14194712 | 0,0464*    |
| HIDRÓLISE ADP - PLAQUETAS | 2     | 2  | 6,9339614  | 0,0312*    |
| ADA - PLAQUETAS           | 2     | 2  | 5,86188874 | 0,0533     |
| TBARS                     | 2     | 2  | 2,29308321 | 0,3177     |
| PSH                       | 2     | 2  | 4,38521143 | 0,1116     |

Na tabela 4, é possível identificar que as variáveis hidrólise do AMP e do ADP em linfócitos e a hidrólise do ATP e ADP em plaquetas apresentam relevância significativa para explicar o modelo. Assim o modelo gerado apresenta variáveis bioquímicas capazes de prever e discriminar os quadros de COVID-19 leve e moderado, bem como distinguir aqueles que não apresentaram a doença, a partir de ensaios comumente utilizados para avaliar o estresse oxidativo e o sistema purinérgico. Na tabela 5, estão representados os valores que estimam o desfecho categórico (Controle, Covid leve e Covid moderado).

Dentro do modelo, foi realizado o teste de efeito a análise individual dos parâmetros, para identificação daqueles que apresentam efeitos principais no modelo de maior ponderação,

demonstrados na Tabela 6.

**Tabela 5.** Valores que estimam para cada preditor a probabilidade de prever o desfecho categórico dos 3 grupos

| Term                                                   | Estimate   | Std Error | $\chi^2$ | Prob> $\chi^2$ | Lower 95%  | Upper 95%  |
|--------------------------------------------------------|------------|-----------|----------|----------------|------------|------------|
| <b>Razão da chance entre Covid Moderado e Controle</b> |            |           |          |                |            |            |
| Intercept                                              | -10,039691 | 5,9459737 | 2,85     | 0,0913         | -23,558296 | 0,48420482 |
| HIDRÓLISE ADP - LINFÓCITO                              | 0,07624788 | 0,033116  | 5,30     | 0,0213*        | 0,02273333 | 0,15430203 |
| HIDRÓLISE AMP - LINFÓCITO                              | -0,0189123 | 0,0386711 | 0,24     | 0,6248         | -0,1000315 | 0,05683398 |
| ADA LINFÓCITOS                                         | 0,05056662 | 0,0292981 | 2,98     | 0,0844         | 0,00114179 | 0,12282295 |
| HIDRÓLISE ATP - PLAQUETAS                              | 0,06583053 | 0,055406  | 1,41     | 0,2348         | -0,0322765 | 0,19189286 |
| HIDRÓLISE ADP - PLAQUETAS                              | -0,0830183 | 0,0480875 | 2,98     | 0,0843         | -0,1919143 | 0,00262625 |
| ADA - PLAQUETAS                                        | 0,36328725 | 0,2770788 | 1,72     | 0,1898         | -0,164145  | 0,97072976 |
| TBARS                                                  | -0,04445   | 0,3741739 | 0,01     | 0,9054         | -0,8255012 | 0,70129527 |
| PSH                                                    | 0,66911639 | 0,5582331 | 1,44     | 0,2307         | -0,3711029 | 1,92816655 |
| <b>Razão da chance entre Covid Leve e Controle</b>     |            |           |          |                |            |            |
| Intercept                                              | -19,881303 | 8,2983063 | 5,74     | 0,0166*        | -40,016346 | -6,4622749 |
| HIDRÓLISE ADP - LINFÓCITO                              | 0,0132131  | 0,0376067 | 0,12     | 0,7253         | -0,0765668 | 0,08421663 |
| HIDRÓLISE AMP - LINFÓCITO                              | 0,12129589 | 0,04351   | 7,77     | 0,0053*        | 0,05319911 | 0,23387551 |
| ADA LINFÓCITOS                                         | 0,07116118 | 0,0395364 | 3,24     | 0,0719         | 0,00070739 | 0,16249575 |
| HIDRÓLISE ATP - PLAQUETAS                              | 0,14277278 | 0,0699202 | 4,17     | 0,0412*        | 0,02607059 | 0,30904019 |
| HIDRÓLISE ADP - PLAQUETAS                              | -0,1528204 | 0,0779391 | 3,84     | 0,0499*        | -0,3435217 | -0,0223552 |
| ADA - PLAQUETAS                                        | 0,74050554 | 0,3869884 | 3,66     | 0,0557         | 0,11232179 | 1,68293935 |
| TBARS                                                  | -0,7240636 | 0,5463615 | 1,76     | 0,1851         | -1,9561024 | 0,25365848 |
| PSH                                                    | 1,35295497 | 0,7459482 | 3,29     | 0,0697         | 0,04515554 | 3,13177637 |

**Tabela 6.** Avaliação uniforme de entrada independente dos preditores e os seus respectivos efeitos principais no modelo de regressão gerado.

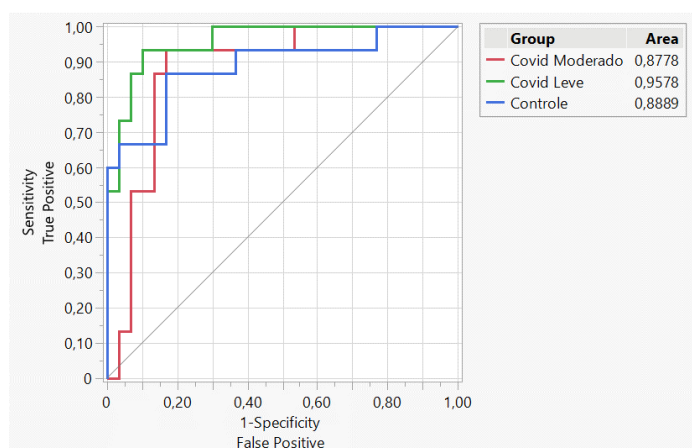
| Column                                                | Main Effect | Total Effect | ,2 | ,4 | ,6 | ,8 |
|-------------------------------------------------------|-------------|--------------|----|----|----|----|
| HIDRÓLISE ATP - LINFÓCITO (nmol de Pi/min/mg protein) | 0,229       | 0,48         |    |    |    |    |
| HIDRÓLISE ADP - PLAQUETAS (nmol de Pi/min/mg protein) | 0,141       | 0,36         |    |    |    |    |
| ADA - PLAQUETAS (U/L)                                 | 0,115       | 0,293        |    |    |    |    |
| AC ASCÓRBICO (ug/dL)                                  | 0,077       | 0,211        |    |    |    |    |
| HIDRÓLISE AMP - PLAQUETAS (nmol de Pi/min/mg protein) | 0,052       | 0,158        |    |    |    |    |
| HIDRÓLISE ATP - PLAQUETAS (nmol de Pi/min/mg protein) | 0,036       | 0,11         |    |    |    |    |
| ADA LINFÓCITOS (U/L)                                  | 0,018       | 0,053        |    |    |    |    |
| TBARS (umol MDA/mL)                                   | 0,011       | 0,031        |    |    |    |    |

Utilizando ainda os dados observados, por meio da projeção do modelo na matriz de confusão (Tabela 7) que relaciona os valores observados com os previstos pelo modelo, foi possível verificar que este tem uma taxa de erro de classificação de 26,7%. Em adição, *Receiver Operating Characteristic Curve* e a sua respectiva Área sob a Curva (Figura 10) demonstram a sensibilidade e a especificidade de predição do modelo proposto.

**Tabela 7.** Matriz de confusão ou de classificação de acertos dos eventos corretamente classificados e daqueles não-eventos que foram erroneamente preditos.

| Atual<br>Grupo | Contagem Prevista |            |          |
|----------------|-------------------|------------|----------|
|                | Covid Moderado    | Covid Leve | Controle |
| Covid Moderado | 10                | 2          | 3        |
| Covid Leve     | 2                 | 13         | 0        |
| Controle       | 2                 | 3          | 10       |

| Atual<br>Grupo | Taxa Prevista  |            |          |
|----------------|----------------|------------|----------|
|                | Covid Moderado | Covid Leve | Controle |
| Covid Moderado | 0,667          | 0,133      | 0,200    |
| Covid Leve     | 0,133          | 0,867      | 0,000    |
| Controle       | 0,133          | 0,200      | 0,667    |



**Figura 10.** Receiver Operating Characteristic Curve e a Área sob a Curva demonstram a sensibilidade e especificidade do modelo proposto.

#### 4. DISCUSSÃO

No contexto da COVID-19, a atividade aumentada das enzimas CD39 e CD73 contribuem para que os níveis de e ATP sejam reduzidos e, portanto, que os níveis de adenosina aumentem no organismo. A adenosina através da ativação dos seus receptores específicos, tem ação anti-inflamatória e imunossupressora, logo, tem a capacidade de diminuir a liberação de citocinas e a quimiotaxia das células inflamatórias no local da infecção (CEKIC; LINDEN, 2016; FRANCIOSI et al., 2021).

Um estudo analisou a expressão de CD39 e CD73 em pacientes com COVID-19 e observaram que há uma tendência a frequência elevada na expressão de CD39 em linfócitos citotóxicos, apesar de não observarem diferença estatística na pesquisa, esse resultado corrobora com o presente estudo, indicando que a atividade dessa enzima pode influenciar no

prognóstico da doença (Figura 1A e 1B) (AHMADI et al., 2020). Além disso, houve uma diminuição da expressão de CD73 em linfócitos citotóxicos e células NK em pacientes com COVID-19 quando comparados com o grupo controle. Assim, a ausência de CD73 permite maior secreção de citocinas, como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Portanto, a diminuição da atividade da CD73 no nosso estudo, pode estar relacionada com a progressão dos sintomas em pacientes moderados, quando comparados ao grupo que desenvolveu sintomas leves (Figura 1C). Resultados semelhantes foram descritos por Dorneles e colaboradores (2022) e Shahbaz e colaboradores (2021), que observaram um aumento das proporções de CD39 e uma diminuição de CD73 em células T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes graves com COVID-19.

Em um outro estudo recente, pesquisadores relacionaram a desregulação da ectoenzima CD39 com a gravidade da COVID-19, levando um aumento dos níveis plasmáticos de ATP e ADP extracelular (eATP e eADP) e uma redução nos níveis de ADA. O estudo sugere ainda, que a regulação positiva da CD39 e consequentemente as concentrações de eADP aumentadas, colaboram com o estado de ativação plaquetária em pacientes infectados e que o uso de um antagonista do receptor P2Y<sub>12</sub> (que é ativado pelo ADP) pode combater a tromboinflamação em pacientes com COVID-19. Nosso estudo demonstrou uma diminuição na hidrólise de ADP de pacientes do grupo leve em plaquetas em comparação com o grupo controle, o eADP é pró-inflamatório e pode contribuir para o estado de tromboinflamação em pacientes com COVID-19 (DÍAZ-GARCÍA et al., 2022).

Os resultados dos níveis dos parâmetros do estresse oxidativo do estudo, não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos leve e moderado com o grupo controle. Muito se estuda o papel da dieta antioxidantes no controle do estresse oxidativo em doenças infecciosas, segundo a “teoria biológica dos antioxidantes” o consumo de vitamina E, C, D e minerais como ferro, selênio e zinco podem proteger o organismo do dano celular oxidativo (TRUJILLO-MAYOL et al., 2021). Portanto, há evidências científicas que demonstram que uma dieta ou suplementação rica em compostos antioxidantes, podem ser eficazes no controle do estresse oxidativo e inflamação em pacientes com COVID-19, inclusive em pacientes com lesões cardíacas em estado crítico e doenças hepáticas. (RISTIC-MEDIC et al., 2021; WANG; ZHANG; BAI, 2020).

Considerando que o estudo não acompanhou a dieta alimentar ou tratamento adjuvante não prescrito e há evidências que o consumo de antioxidante pode reduzir o dano oxidativo nas células, a hipótese de que a dieta antioxidante pode ter influenciado na infecção viral pela COVID-19 e no estado imunológico dos pacientes é válida (IDDIR et al., 2020).

Além de marcadores inflamatórios do sistema purinérgico e do estresse oxidativo, observamos, após aplicação do questionário de sintomas, que inúmeros pacientes ainda apresentavam sintomas mesmo após a alta médica. Esse fenômeno pode ser definido como síndrome pós-covid, onde alguns sintomas como fadiga, dispneia, perda total ou parcial do olfato e paladar, dor no peito, dores musculares, tosse seca, dor de garganta, febre e dor de cabeça podem persistir, mesmo após a cura da doença. (PIERCE et al., 2022).

Nosso estudo demonstrou que nos pacientes do grupo moderado, esses sintomas são mais evidentes, quando comparado com o grupo leve. A fadiga autorreferida do estudo foi a queixa mais comum entre o grupo moderado. Quando questionados sobre a fadiga e estar sentindo mais cansado após uma atividade, o grupo moderado teve 93% de respostas positivas e 7% negativas. Em comparação ao grupo leve, 40% dos entrevistados responderam positivamente a essa pergunta. Uma das teorias que explica a fadiga em pacientes após a COVID-19, é que o vírus infecta o sistema neuronal e pode entrar no estado de latência, isso permite que o vírus confunda o sistema imunológico do hospedeiro enquanto infecta novos neurônios, causando sintomas neurológicos como a fadiga (PIERCE et al., 2022). O estudo corrobora com trabalhos científicos já publicados que avaliaram e demonstraram altos níveis de fadiga em pacientes pós-covid (EL SAYED; SHOKRY; GOMAA, 2021; HUANG et al., 2020b).

A disgeusia (alterações na percepção no paladar) e a anosmia (perda da função olfativa) foram observadas em maior proporção nos indivíduos do grupo moderado, sendo que 40% dos indivíduos apresentavam perda total do paladar, 27% apresentavam piora no paladar em relação à antes da COVID-19 e 33% não perceberam diferença. Estudos sugerem que há uma alta expressão de ECA2 nas células epiteliais da língua, ocasionando infecção no local e consequente dano aos receptores gustativos (MASTRANGELO; BONATO; CINQUE, 2021; XU et al., 2020).

Quanto a função olfativa, 47% dos indivíduos responderam que perderam totalmente o olfato, 33% perceberam piora na função olfativa e 20% não perceberam diferença após a doença. Essas características sugerem que o SARS-CoV-2 pode gerar um comprometimento neurosensorial através de infecção e danos as células do epitélio olfatório, resultando um processo inflamatório no local, onde gera uma obstrução da fenda olfatória e infecção direta as células neuronais, resultando na anosmia (MASTRANGELO; BONATO; CINQUE, 2021).

As alterações no paladar e olfato afetam diretamente a percepção sensorial do indivíduo e podem implicar em outro parâmetro avaliado, a perda de apetite. Isso se apresenta, no presente

estudo, 60% dos casos moderados e 20% nos casos leves. A falta de apetite pode alterar o comportamento alimentar e levar a sérios problemas de perda de peso, desnutrição e sarcopenia, principalmente em pacientes idosos, além de disfunções motoras. Isso se observa no dado coletado sobre a força muscular, onde 80% dos pacientes do grupo moderado relataram sentir piora em relação a força muscular após apresentar a doença. Esses fatores afetam diretamente a qualidade de vida dos indivíduos (BYRNE, 2022; GRUND; BAUER, 2022).

Em um estudo que avaliava a possibilidade de manter o apetite em pacientes recuperados da COVID-19, foi demonstrado que esses pacientes apresentavam maior saciedade, devido a sentir inchaço, náuseas, sensação de estômago pesado e ausência de fome (CHAABAN; HØIER; ANDERSEN, 2021). Isso também foi percebido no presente estudo, onde os pacientes do grupo moderado relataram sentir que estavam propensos a desenvolver sintomas gastrointestinais após a alta médica, como vômito (20%), diarreia (20%), náusea (13%) e 7% relataram estar sujeitos a desenvolver dois sintomas (náusea e vômito)

Em relação ao sono, quando questionados como se sentiam, 33% dos indivíduos do grupo moderado, relataram sentir piora após o desenvolvimento da COVID-19, o que corrobora com um estudo de Garrigues e colaboradores, que avaliaram a os sintomas persistentes após a alta de pacientes com COVID-19 e demonstraram que 30,8% dos indivíduos apresentaram distúrbios do sono.

A tosse foi o desconforto mais relatado pelos pacientes do grupo moderado (40%), seguido por tosse e falta de ar (20%), onde alguns pacientes relataram apresentar mais que um sintoma, como irritação na garganta (20%), falta de ar (13%) e dor de garganta (7%). Esses achados corroboram com um estudo brasileiro realizado por pesquisadores da Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz) onde a tosse foi o sintoma mais frequente (34%) percebido pelos pacientes após o desenvolvimento e cura da COVID-19 (DE MIRANDA et al., 2022).

Quanto ao modelo de análise de correlação dos preditores bioquímicos desenvolvido no presente estudo, a partir da análise de correlação foi verificado um padrão de *clusters*, a partir da hidrólise do ATP, ADP, AMP, atividade da ADA em plaquetas e linfócitos, concentração de TBARS e PSH para avaliar a probabilidade do indivíduo através desses exames bioquímicos, de ter o diagnóstico da COVID-19. A partir dos resultados dos exames bioquímicos que avaliaram parâmetros do sistema purinérgico e do estresse oxidativo o modelo de predição em detectar a probabilidade de chances de um indivíduos possuir a doença COVID-19 se mostrou estatisticamente significativo conforme demonstra a Tabela 3.

## 5. CONCLUSÃO

Após a pandemia global da COVID-19, a comunidade científica se esforça para entender a fisiopatologia dessa infecção viral e elucidar quais são as consequências para aqueles que sobreviveram. Para tal, o estudo avaliou o envolvimento do sistema purinérgico em linfócitos e plaquetas e do estresse oxidativo, além disso, identificamos os principais sintomas que a síndrome pós-covid pode desenvolver em pacientes que apresentaram a forma leve e moderada da doença.

São necessários mais estudos para a investigação de como os sintomas pós-COVID podem influenciar a qualidade de vida dos pacientes, por quanto tempo persistem e como deve ser o manejo da população após desenvolver essa doença.

## REFERÊNCIAS

- ABOUELKHAIR, M. A. Targeting adenosinergic pathway and adenosine A2A receptor signaling for the treatment of COVID-19: A hypothesis. **Medical Hypotheses**, v. 144, p. 110012, nov. 2020.
- AGTERESCH, H. J. et al. Adenosine Triphosphate: Established and Potential Clinical Applications. **Drugs**, v. 58, n. 2, p. 211–232, 1999.
- AHMADI, P. et al. Defining the CD39/CD73 Axis in SARS-CoV-2 Infection: The CD73-Phenotype Identifies Polyfunctional Cytotoxic Lymphocytes. **Cells**, v. 9, n. 8, p. 1750, 22 jul. 2020.
- ANTONIOLI, L. et al. The role of purinergic pathways in the pathophysiology of gut diseases: Pharmacological modulation and potential therapeutic applications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, n. 2, p. 157–188, ago. 2013.
- ANTONIOLI, L. et al. Adenosine signaling and the immune system: When a lot could be too much. **Immunology Letters**, v. 205, p. 9–15, jan. 2019a.
- ANTONIOLI, L. et al. The Purinergic System as a Pharmacological Target for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases. **Pharmacological Reviews**, v. 71, n. 3, p. 345–382, jul. 2019b.
- BELOUZARD, S.; CHU, V. C.; WHITTAKER, G. R. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 14, p. 5871–5876, 7 abr. 2009.
- BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum**, v. 97, p. 77–89, 1968.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Orientações para manejo de pacientes com COVID-19.

Brasília–DF. 2020. Disponível em:

<https://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2020/June/18/Covid19-Orientac--o--esManejoPacientes.pdf> Acesso em: 08/10/2022 22:20

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. **Pharmacological Reviews**, v. 24, n. 3, p. 509–581, set. 1972.

BURNSTOCK, G.; BOEYNAEMS, J.-M. Purinergic signalling and immune cells. **Purinergic Signalling**, v. 10, n. 4, p. 529–564, dez. 2014.

BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 16, n. 5, p. 433–440, jan. 1985.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems. Em: **International Review of Cytology**. [s.l.] Elsevier, 2004. v. 240p. 31–304.

BYRNE, D. V. Effects and Implications of COVID-19 for the Human Senses, Consumer Preferences, Appetite and Eating Behaviour: Volume I. **Foods**, v. 11, n. 12, p. 1738, 14 jun. 2022.

CARTER, C. et al. COVID-19 disease: invasive ventilation. **Clinics in Integrated Care**, v. 1, p. 100004, jul. 2020.

CEKIC, C.; LINDEN, J. Purinergic regulation of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 3, p. 177–192, mar. 2016.

CHAABAN, N.; HØIER, A. T. Z. B.; ANDERSEN, B. V. A Detailed Characterisation of Appetite, Sensory Perceptual, and Eating-Behavioural Effects of COVID-19: Self-Reports from the Acute and Post-Acute Phase of Disease. **Foods**, v. 10, n. 4, p. 892, 19 abr. 2021.

CHEN, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, fev. 2020.

CHERNYAK, B. V. et al. COVID-19 and Oxidative Stress. **Biochemistry (Moscow)**, v. 85, n. 12–13, p. 1543–1553, dez. 2020.

DE MIRANDA, D. A. P. et al. Long COVID-19 syndrome: a 14-months longitudinal study during the two first epidemic peaks in Southeast Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 116, n. 11, p. 1007–1014, 1 nov. 2022.

DEAGLIO, S.; ROBSON, S. C. Ectonucleotidases as Regulators of Purinergic Signaling in Thrombosis, Inflammation, and Immunity. Em: **Advances in Pharmacology**. [s.l.] Elsevier, 2011. v. 61p. 301–332.

DI VIRGILIO, F. et al. A rationale for targeting the P2X7 receptor in Coronavirus disease 19. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 21, p. 4990–4994, nov. 2020.

DÍAZ-GARCÍA, E. et al. Role of CD39 in COVID-19 Severity: Dysregulation of Purinergic Signaling and Thromboinflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 847894, 31 jan. 2022.

DORNELES, G. P. et al. Alterations in CD39/CD73 axis of T cells associated with COVID-19 severity. **Journal of Cellular Physiology**, v. 237, n. 8, p. 3394–3407, ago. 2022.

EL SAYED, S.; SHOKRY, D.; GOMAA, S. M. Post-COVID-19 fatigue and anhedonia: A cross-sectional study and their correlation to post-recovery period. **Neuropsychopharmacology Reports**, v. 41, n. 1, p. 50–55, mar. 2021.

FAN, E. et al. An Official American Thoracic Society/European Society of Intensive Care Medicine/Society of Critical Care Medicine Clinical Practice Guideline: Mechanical Ventilation in Adult Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 195, n. 9, p. 1253–1263, maio 2017.

FRANCIOSI, M. L. M. et al. Possible role of purinergic signaling in COVID-19. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 19 mar. 2021.

GARRIGUES, E. et al. Post-discharge persistent symptoms and health-related quality of life after hospitalization for COVID-19. **Journal of Infection**, v. 81, n. 6, p. e4–e6, dez. 2020.

GODING, J. W.; HOWARD, M. C. Ecto-enzymes of lymphoid cells. **Immunological Reviews**,

v. 161, n. 1, p. 5–10, fev. 1998.

GRUND, S.; BAUER, J. M. Malnutrition and Sarcopenia in COVID-19 Survivors. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 38, n. 3, p. 559–564, ago. 2022.

GUO, Y.-R. et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. **Military Medical Research**, v. 7, n. 1, p. 11, dez. 2020.

HADJADJ, J. et al. **Impaired type I interferon activity and exacerbated inflammatory responses in severe Covid-19 patients**. [s.l.] Infectious Diseases (except HIV/AIDS), 23 abr. 2020. Disponível em: <<http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.04.19.20068015>>. Acesso em: 2 abr. 2021.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, fev. 2020a.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, fev. 2020b.

HUANG, C. et al. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. **The Lancet**, v. 397, n. 10270, p. 220–232, jan. 2021.

IDDIR, M. et al. Strengthening the Immune System and Reducing Inflammation and Oxidative Stress through Diet and Nutrition: Considerations during the COVID-19 Crisis. **Nutrients**, v. 12, n. 6, p. 1562, 27 maio 2020.

IQBAL, A. et al. The COVID-19 Sequelae: A Cross-Sectional Evaluation of Post-recovery Symptoms and the Need for Rehabilitation of COVID-19 Survivors. **Cureus**, 2 fev. 2021.

JACQUES-SILVA, M. C. et al. Diphenyl Diselenide and Ascorbic Acid Changes Deposition of Selenium and Ascorbic Acid in Liver and Brain of Mice: DEPOSITION OF SELENIUM AND ASCORBIC ACID IN LIVER AND BRAIN OF MICE. **Pharmacology & Toxicology**, v. 88, n. 3, p. 119–125, mar. 2001.

JENTZSCH, A. M. et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 2, p. 251–256, jan. 1996.

KANTHI, Y. et al. New (re)purpose for an old drug: purinergic modulation may extinguish the COVID-19 thromboinflammatory firestorm. **JCI Insight**, v. 5, n. 14, p. e140971, 23 jul. 2020.

LEAL, D. B. R. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1721, n. 1–3, p. 9–15, jan. 2005.

LETKO, M.; MARZI, A.; MUNSTER, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 562–569, abr. 2020.

LI, F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. **Annual Review of Virology**, v. 3, n. 1, p. 237–261, 29 set. 2016.

LI, G. et al. Coronavirus infections and immune responses. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 424–432, abr. 2020.

LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Oxidative stress, the term and the concept. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 461, n. 3, p. 441–444, jun. 2015.

LIGUORI, I. et al. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. Volume 13, p. 757–772, abr. 2018.

LINTZMAIER PETIZ, L. et al. P2Y14 Receptor as a Target for Neutrophilia Attenuation in Severe COVID-19 Cases: From Hematopoietic Stem Cell Recruitment and Chemotaxis to Thrombo-inflammation. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 17, n. 1, p. 241–252, fev. 2021.

LUNKES, G. I. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. **Thrombosis Research**, v. 109, n. 4, p. 189–194, 15 fev. 2003.

MARTINS, C. C. et al. Increased oxidative stress and inflammatory markers contrasting with the activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway in patients with metabolic syndrome. **Clinical Biochemistry**, v. 89, p. 63–69, mar. 2021.

MASTRANGELO, A.; BONATO, M.; CINQUE, P. Smell and taste disorders in COVID-19: From pathogenesis to clinical features and outcomes. **Neuroscience Letters**, v. 748, p. 135694, mar. 2021.

MERAD, M.; MARTIN, J. C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 355–362, jun. 2020.

MUHAMMAD, Y. et al. Deficiency of antioxidants and increased oxidative stress in COVID-19 patients: A cross-sectional comparative study in Jigawa, Northwestern Nigeria. **SAGE Open Medicine**, v. 9, p. 205031212199124, jan. 2021.

NTYONGA-PONO, M.-P. COVID-19 infection and oxidative stress: an under-explored approach for prevention and treatment? **Pan African Medical Journal**, v. 35, n. Supp 2, 29 abr. 2020.

OATES, J. A.; WOOD, A. J. J.; FITZGERALD, G. A. Dipyridamole. **New England Journal of Medicine**, v. 316, n. 20, p. 1247–1257, 14 maio 1987.

ORELLANA, J. D. Y. et al. Excesso de mortes durante a pandemia de COVID-19: subnotificação e desigualdades regionais no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, n. 1, p. e00259120, 2021.

PACHECO, P. A. F.; FARIA, R. X. The potential involvement of P2X7 receptor in COVID-19 pathogenesis: A new therapeutic target? **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 93, n. 2, fev. 2021.

PIERCE, J. D. et al. Post-COVID-19 Syndrome. **Nursing Research**, v. 71, n. 2, p. 164–174, mar. 2022.

PILLA, C. et al. ATP diphosphohydrolase activity (apyrase, EC 3.6.1.5) in human blood platelets. **Platelets**, v. 7, n. 4, p. 225–230, 1996.

QIN, C. et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 762–768, 28 jul. 2020.

RIBEIRO, D. E. et al. Hyperactivation of P2X7 receptors as a culprit of COVID-19 neuropathology. **Molecular Psychiatry**, v. 26, n. 4, p. 1044–1059, abr. 2021.

RISTIC-MEDIC, D. et al. Liver disease and COVID-19: The link with oxidative stress, antioxidants and nutrition. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 34, p. 5682–5699,

14 set. 2021.

SHAHBAZ, S. et al. The Quality of SARS-CoV-2–Specific T Cell Functions Differs in Patients with Mild/Moderate versus Severe Disease, and T Cells Expressing Coinhibitory Receptors Are Highly Activated. **The Journal of Immunology**, v. 207, n. 4, p. 1099–1111, 15 ago. 2021.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015.

SOUZA, A. S. R. et al. General aspects of the COVID-19 pandemic. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 21, n. suppl 1, p. 29–45, fev. 2021.

TARUNO, A. ATP Release Channels. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 808, 11 mar. 2018.

TAY, M. Z. et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363–374, jun. 2020.

TRUJILLO-MAYOL, I. et al. Western Dietary Pattern Antioxidant Intakes and Oxidative Stress: Importance During the SARS-CoV-2/COVID-19 Pandemic. **Advances in Nutrition**, v. 12, n. 3, p. 670–681, maio 2021.

VANDERSTOCKEN, G. et al. Protective Role of P2Y2 Receptor against Lung Infection Induced by Pneumonia Virus of Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e50385, 21 nov. 2012.

WANG, J.-Z.; ZHANG, R.-Y.; BAI, J. An anti-oxidative therapy for ameliorating cardiac injuries of critically ill COVID-19-infected patients. **International Journal of Cardiology**, v. 312, p. 137–138, ago. 2020.

WHO. WORD HEALTH ORGANIZATION. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-openingremarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. 2020. Acesso em: 07/03/2021 10:35.

WHO. WORD HEALTH ORGANIZATION. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. 2021. Disponível em: <https://covid19.who.int/> Acesso em: 25/01/2023 19:00.

WOO, P. C. Y. et al. Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis. **Viruses**, v. 2, n. 8,

p. 1804–1820, 24 ago. 2010.

WU, J. T.; LEUNG, K.; LEUNG, G. M. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. **The Lancet**, v. 395, n. 10225, p. 689–697, fev. 2020.

XU, H. et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. **International Journal of Oral Science**, v. 12, n. 1, p. 8, dez. 2020.

YANG, B.; CHEN, Y.; SHI, J. Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 8, p. 4881–4985, 24 abr. 2019.

YANG, Y. et al. Reactive Oxygen Species in the Immune System. **International Reviews of Immunology**, v. 32, n. 3, p. 249–270, jun. 2013.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 5, p. 673–694, maio 2008.

ZHANG, Z.; RONG, L.; LI, Y.-P. *Flaviviridae* Viruses and Oxidative Stress: Implications for Viral Pathogenesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–17, 19 ago. 2019.

## ANEXO A

## QUESTIONÁRIOS DOS SINTOMAS

(HUANG et al., 2021)

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**1- Você sente algum desconforto desde que recebeu alta do hospital?**

Se sim, por favor especifique: \_\_\_\_\_

**2- Como você descreveria seu estado de saúde atual?**☐ O mesmo que antes da COVID-19☐ Muitas vezes sinto fadiga e é mais fácil ficar cansado após a atividade agora do que antes do COVID-19☐ Melhor condição de saúde do que antes de COVID-19**3- Você já apresentou algum dos seguintes sintomas de dor que apareceram após COVID-19 e são persistentes?**☐ Não☐ Dor de cabeça☐ Mialgia☐ Dor no peito☐ Dor nas articulações. Se sim, por favor preencha a tabela abaixo.

Se apresentou qualquer outro sintoma, por favor especifique:

---



---

| Articulações | Mão | Pé | Tornozelo | Mandíbula | Cotovelo | Ombro | Pescoço | Quadril | Joelho |
|--------------|-----|----|-----------|-----------|----------|-------|---------|---------|--------|
|              |     |    |           |           |          |       |         |         |        |

Sensibilidade

Inchaço

Escala  
numérica de  
dor

0

10

Sem dor

Dor insuportável

**4- Você já apresentou algum dos seguintes sintomas de dor que apareceram após COVID-19 e são persistentes?**

☐ Não                      ☐ Dor de garganta                      ☐ Dificuldade de engolir

**5- Você já apresentou algum dos seguintes sintomas de dor que apareceram após COVID-19 e são persistentes?**

☐ Não                      ☐ Febre Baixa (37,3-38,0)                      ☐ Palpitações  
☐ Tonturas                      ☐ Congestão nasal                      ☐ Erupção cutânea

**6- Você está mais sujeito a sofrer dos seguintes sintomas após a alta?**

☐ Não                      ☐ Diarreia                      ☐ Náusea                      ☐ Vômitos

**7- Como você sente seu olfato em comparação em como sentia antes da COVID-19?**

☐ O mesmo que antes   ☐ Pior que antes   ☐ Melhor que antes   ☐ Perda total

**8- Como você sente seu paladar em comparação em como sentia antes da COVID-19?**

☐ O mesmo que antes   ☐ Pior que antes   ☐ Melhor que antes   ☐ Perda total

**9- Como você sente seu apetite em comparação em como sentia antes da COVID-19?**

☐ O mesmo que antes   ☐ Pior que antes                      ☐ Melhor que antes

**10- Como você se sente em relação ao seu sono em comparação em como era antes da COVID-19?**

☐ O mesmo que antes   ☐ Pior que antes                      ☐ Melhor que antes

**11- Como você se sente em relação à sua força muscular em comparação de como se sentia antes da COVID-19?**

☐ O mesmo que antes   ☐ Pior que antes                      ☐ Melhor que antes

**12- Você já notou queda de cabelo em comparação de como era antes da COVID-19?**

☐ Sem queda de cabelo antes ou depois de COVID-19  
☐ A queda de cabelo é a mesma de antes  
☐ Perde mais cabelo do que antes                      ☐ Perde menos cabelo do que antes

## APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFFS

Prezado(a) participante,

Você está sendo convidado(a) para participar da pesquisa: **Avaliação do sistema purinérgico e inflamação após infecção pela COVID-19**, desenvolvida por Bárbara Stolarski, discente do curso de mestrado em Ciências Biomédicas da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Chapecó – SC, sob coordenação do Professor Dr. Leandro Henrique Manfredi.

### 1. Objetivo central

Até o momento, foram registradas mais de dois milhões e meio de mortes pela COVID-19. O objetivo do estudo é avaliar os parâmetros inflamatórios e do sistema purinérgico em pacientes que desenvolveram a COVID-19 na forma leve, moderada e grave e comparar com pacientes que não se desenvolveram essa doença. Para contribuir para entendimento dessa doença e colaborar com o desenvolvimento de novos tratamentos eficazes, justifica-se o estudo.

### 2. Critérios de inclusão

Serão incluídos na pesquisa indivíduos com idade superior a dezoito (18) anos completos, que desenvolveram a doença da COVID-19. Serão excluídos indivíduos gestantes, lactantes e pacientes que fazem uso de medicamentos imunossupressores. Os indivíduos do grupo controle serão voluntários, com idade entre dezoito(18) anos completos que não apresentaram sinais ou sintomas da Síndrome Gripal no último ano e/ou teste positivo para COVID-19. Sua participação não é obrigatória e você tem plena autonomia para decidir se quer ou não participar, bem como desistir da colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação e sem nenhuma forma de penalização. Você não será penalizado de nenhuma maneira caso decida não consentir sua participação, ou desista da mesma. Contudo, ela é muito importante para a execução da pesquisa. Você não receberá remuneração e nenhum tipo de recompensa nesta pesquisa, sendo sua participação voluntária.

### 3. Mecanismos para garantir o sigilo e privacidade

Serão garantidas a confidencialidade e a privacidade das informações por você prestadas. Qualquer dado que possa identificá-lo será omitido na divulgação dos resultados da pesquisa e o material armazenado em local seguro.

A qualquer momento, durante a pesquisa, ou posteriormente, você poderá solicitar do pesquisador informações sobre sua participação e/ou sobre a pesquisa, o que poderá ser feito através dos meios de contato explicitados neste Termo.

#### **4. Identificação do participante ao longo do trabalho**

Seu nome não será mencionado durante qualquer etapa desta pesquisa, bem como em quaisquer publicações, cursos, relatórios e afins. Apenas o nome da Instituição será mencionado. Para manter o seu anonimato, será utilizada uma codificação numérica sequencial. Cada participante terá um número distinto em todos os materiais e dados relacionados a ele.

#### **5. Tempo de duração da coleta/procedimento/experimento**

A sua participação na pesquisa consiste em responder aos questionários qualidade de vida e questões de autorrelato os sintomas apresentados. Ocorrerá uma coleta e utilização de materiais biológicos (sangue) e disponibilização das **informações dos prontuários médicos** referentes à idade, sexo, peso, altura, histórico de doenças inflamatórias, comorbidades (hipertensão, síndrome metabólica, diabetes, entre outras), informações referentes ao tratamento medicamentoso durante a doença COVID-19, histórico de distúrbios trombóticos, resultado de exames complementares durante a infecção pelo SARS-CoV-2 e dados referentes a vacinação para a COVID-19.

#### **6. Tempo de duração da coleta e preenchimento do questionário**

O tempo de duração médio da coleta é de aproximadamente dez minutos e do preenchimento dos questionários aproximadamente vinte minutos.

#### **7. Guarda dos dados e materiais coletados na pesquisa**

Todos os materiais biológicos serão guardados em freezer, devidamente identificados com numeração sequencial, nome do projeto e pesquisador responsável. Os outros materiais provenientes da pesquisa ficarão guardados em armário trancado com chave, ao qual somente o pesquisador responsável terá acesso. As tabelas com informações dos participantes da pesquisa ficarão guardadas nos computadores dos pesquisadores envolvidos, com acesso somente com senha. Todos os materiais serão mantidos pelo período de duração da pesquisa (5 anos).

#### **8. Benefícios diretos (individuais ou coletivos) aos participantes da pesquisa**

A pesquisa também propiciará o desenvolvimento do conhecimento científico sobre a participação do sistema purinérgico e o envolvimento com progressão da doença COVID-19, possibilitando avanços nos processos de diagnóstico e tratamentos futuros. Os benefícios relacionados a pesquisa incluem o acesso dos participantes aos resultados laboratoriais e orientações em caso de alguma alteração patológica, sendo estes encaminhados para atendimento especializado.

#### **9. Previsão de riscos ou desconfortos**

Esta pesquisa pode acarretar alguns riscos aos participantes, entretanto, cabe aos pesquisadores amenizá-los ou eliminá-los. Para realização das análises biológicas, será coletada uma amostra de sangue dos participantes. Tal procedimento poderá gerar desconforto, além de hematoma no local da punção. Para amenizar ou eliminar os riscos de desconforto e possíveis lesões, este procedimento será realizado por profissional da saúde farmacêutico, devidamente capacitado. Caso ocorra hematoma no local da punção será realizado compressas de gelo por 15 minutos, se o hematoma persistir, será fornecido ao participante, gratuitamente, a pomada Hirudoid® que é indicada para tratar hematomas após injeções ou realização de exames de sangue.

Caso algum pesquisador apresente sintomas sugestivos para a COVID-19, o mesmo não participará da coleta e/ou análises laboratoriais, até alta do episódio.

**10. Divulgação dos resultados da pesquisa**

A devolutiva dos resultados obtidos na pesquisa será realizada por meio de publicações científicas e participação em eventos científicos da área, com palestras e com o uso de *poster* e *banner* ou informativos online. Os dados pessoais dos participantes não serão divulgados em nenhum momento, preservando o anonimato.

Os principais resultados provenientes da pesquisa serão divulgados individualmente para cada participante por contato telefônico e/ou por e-mail.

Ao final da pesquisa, todo material será mantido em arquivo, por pelo menos 5 anos, conforme Resolução 466/12 e orientações do CEP/ENSP e com o fim deste prazo, será descartado

Caso concorde em participar, uma via deste termo ficará em seu poder e a outra será entregue ao pesquisador. Desde já agradecemos sua participação.

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Nome completo do (a) participante: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

Belmonte-SC, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável

**Contato profissional com o(a) pesquisador(a) responsável:** Tel: (49) 8802-5160 e-mail: leandro.manfredi@uffs.edu.br. Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS: Tel e Fax - 49- 2049-3745/ e-mail: cep.uffs@uffs.edu.br.

**Endereço para correspondência:** Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS, Universidade Federal da Fronteira Sul, Bloco da Biblioteca, Sala 310, 3º andar, Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul, CEP 89815-899, Chapecó, Santa Catarina, Brasil.

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

## **APÊNDICE B**

### Informações clínico patológicas

As informações obtidas dos participantes da pesquisa a partir da consulta aos prontuários médicos.

- 1) Idade
- 2) Sexo
- 3) Peso e altura (para o cálculo do índice de massa corpórea, IMC)
- 4) Histórico de doença inflamatória
- 5) Histórico de comorbidades (hipertensão, síndrome metabólica, diabetes...)
- 6) Tratamento medicamentoso durante a doença COVID-19
- 7) Histórico de distúrbios trombóticos
- 8) Histórico de vacinação para COVID-19
- 9) Resultado de exames complementares realizados durante a infecção pela COVID-19 (PCR, hemograma, perfil metabólico...).