



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMACOLOGIA CLÍNICA

LÍVIA DE OLIVEIRA SALES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *PTAFR* E *PF-4* COMO POTENCIAIS
BIOMARCADORES MOLECULARES PLAQUETÁRIOS DE ESTRATIFICAÇÃO
DE RISCO NA COVID-19**

FORTALEZA - CE

2023

LÍVIA DE OLIVEIRA SALES

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *PTAFR* E *PF-4* COMO POTENCIAIS
BIOMARCADORES MOLECULARES PLAQUETÁRIOS DE ESTRATIFICAÇÃO DE
RISCO NA COVID-19

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia Clínica.

Orientadora: Profa. Dra. Caroline Aquino
Moreira-Nunes.

Coorientadora: Profa. Dra. Raquel Carvalho
Montenegro.

FORTALEZA - CE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S155a Sales, Livia de Oliveira.
Avaliação da expressão dos genes PTAFR e PF-4 como potenciais biomarcadores moleculares plaquetários de estratificação de risco na COVID-19 / Livia de Oliveira Sales. – 2023.
67 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Caroline Aquino Moreira-Nunes.

Coorientação: Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro.

1. COVID-19. 2. Plaquetas. 3. PAF. 4. PF-4. 5. Biomarcadores. I. Título.

CDD 615.1

LÍVIA DE OLIVEIRA SALES

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *PTAFR* E *PF-4* COMO POTENCIAIS BIOMARCADORES MOLECULARES PLAQUETÁRIOS DE ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO NA COVID-19

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia Clínica.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Caroline Aquino Moreira-Nunes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. André Salim Khayat
Universidade Federal do Pará (UFPA)

À todas as vítimas fatais da COVID-19 (*in memoriam*) e
seus familiares.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo o cuidado, sabedoria, amor e misericórdia. Obrigada por lembrar-me constantemente que andas comigo e do quanto sois forte e corajosa. Palavras nunca serão suficientes para agradecê-lo.

À minha família, pelo amor incondicional e cuidado. Vocês são meu porto seguro e meu espelho de vida. Obrigada por não medirem esforços para me verem bem e feliz. Agradeço à minha avó, Maria José, que tem de forte não só o nome, por todo zelo e proteção. Obrigada por sempre fazer das minhas lutas, as suas. Obrigada por me ensinar a ter fé e a não temer as adversidades. Contigo sei que não importa por onde andes, sempre terei para onde voltar. Devo a ti muito do que sou hoje. Agradeço aos meus pais, Reuber e Helena, por todo o suporte, encorajamento e educação. Obrigada por serem meus maiores incentivadores e por todas as oportunidades e sacrifícios que me ofereceram para que chegasse até esse dia. Essa conquista é nossa! E à minha tia, Anelicia, que sempre esteve comigo, apoiando, acolhendo e fazendo dos meus, os seus sonhos.

À minha orientadora, Caroline Aquino, por todos os ensinamentos e oportunidades, pela amizade, confiança e por sempre estar disposta a me ouvir, acalantar e apoiar. Obrigada por me inspirar, como mulher e como exemplo de pessoa e profissional. Obrigada por tornar a vida acadêmica mais leve e fluida. Minha admiração, respeito e carinho por você são enormes. Sou muito feliz e grata por nossos caminhos terem se encontrado.

À minha coorientadora, Raquel Montenegro, pelo direcionamento, orientação e suporte técnico e científico.

Aos membros da banca examinadora, Juliana Navarro e André Salim, por terem aceitado o convite e por contribuírem com o enriquecimento desse projeto.

Aos amigos e membros do Laboratório de Farmacogenética – NPDM/UFC, em especial, a Beatriz, o Emerson, o Jean e a Flávia por toda a ajuda acadêmica e pelo amparo, disponibilidade, apoio e amizade além das paredes do laboratório. Obrigada por tanto me ensinarem. A ajuda de vocês foi fundamental para que esse dia chegasse.

A todos os colaboradores e amigos do Laboratório Hipólito Monte, que me acolheram, aconselharam, incentivaram e que me abraçaram como uma filha. Obrigada por terem me proporcionado tantos aprendizados. Obrigada por toda a confiança, encorajamento e compreensão durante todo esse período. E à minha dupla de bancada e amiga de vida, Vaneska, por todo o cuidado, amparo, sintonia e parceria. Sua essência, determinação e profissionalismo me inspiram todos os dias. Obrigada por ter acreditado em mim quando eu mais descreditei e ter me direcionado sabiamente em tantos momentos. Suas palavras foram um incentivo durante toda essa trajetória. Esse trabalho tem muito de você.

Ao meu namorado, Lucas, pelo companheirismo, incentivo, apoio e paciência durante meus maiores momentos de instabilidade emocional. Obrigada por dividir tantos sonhos comigo e vibrar na realização de cada um deles.

Aos meus amigos, que sempre estiveram comigo quando mais precisei, agradeço a vocês pelos conselhos, carinho, por acreditarem e torcerem comigo para a chegada desse dia.

Meus mais sinceros agradecimentos a todos vocês, que contribuíram de alguma forma com o início, desenvolvimento e finalização desse projeto. A vocês, meu muito obrigada, de todo coração. Esse trabalho é nosso!

“Se tu podes crer, tudo é possível ao que crê.”

Marcos 9:23

RESUMO

Mesmo diante dos programas de vacinação e do declínio significativo dos casos graves da doença, a COVID-19 nos desafia em diferentes aspectos. A infecção pelo SARS-CoV-2 apresenta quadros de gravidade diversos o que sugere a influência de fatores genéticos no desfecho clínico desses pacientes. Nos casos de COVID-19 grave, diferentes estudos descreveram a presença de marcadores da coagulação elevados, aumento da ativação e agregação plaquetária e um risco significativo de complicações trombóticas. E, diante da participação dessas células em diversas infecções virais e da sua atuação negativa quando associada a uma resposta pró-trombótica, compreender o papel mecanicista do SARS-CoV-2 com as plaquetas mostra-se um caminho promissor. A expressão do Fator de Ativação de Plaquetas (*PAF*) e do Fator Plaquetário 4 (*PF-4*) em diferentes infecções virais, como na dengue, foram associadas ao aparecimento de sintomas mais graves da doença e uma maior replicação do vírus. Nesse contexto, este estudo teve por objetivo avaliar o perfil de expressão dos genes *PTAFR* e *PF-4* em pacientes hospitalizados e demonstrar sua correlação com a forma grave da COVID-19. Para isto, caracterizamos o perfil de expressão de *PTAFR* e *PF-4* através da técnica PCR em tempo real de 93 pacientes com COVID-19 em atenção hospitalar, no qual, demonstramos uma hiperexpressão desses genes quando comparada a indivíduos saudáveis ($p < 0,05$). No entanto, não houve associação significativa entre as suas expressões e os parâmetros clínico-epidemiológicos abordados ($p > 0,05$). Ainda, para a análise comparativa, estratificamos os pacientes de acordo com tipo de internação, desfecho clínico e gênero, em relação, a idade e os exames laboratoriais, onde a correlação da idade ao desfecho e gênero ($p < 0,05$), contagem de leucócitos ($p < 0,001$) e de plaquetas ($p < 0,0001$) e *International Normalized Ratio* (INR) ($p < 0,05$) ao desfecho clínico, e entre os valores de PCR ($p < 0,05$) e D-dímero (DDM) ($p < 0,05$) ao tipo de internação, foram apontados como possíveis marcadores de prognóstico clínico e de monitoramento da doença. No entanto, não houveram correlações significativas entre: idade, leucometria e INR ao tipo de internação; entre os níveis de PCR e DDM ao desfecho; e contagem de leucócitos e de plaquetas, PCR, INR e DDM ao gênero ($p > 0,05$). Dessa forma, nossos resultados sustentam a hipótese que as expressões aumentadas de *PTAFR* e *PF-4* estão associadas a um contexto clínico mais graves da doença, com necessidade de atenção hospitalar e podem ser importantes preditores de risco da COVID-19 grave.

Palavras-chaves: COVID-19. Plaquetas. PAF. PF-4. Biomarcadores.

ABSTRACT

Even in the face of vaccination programs and the significant decline in serious cases of the disease, COVID-19 challenges us in different aspects. SARS-CoV-2 infection presents different severity levels, which suggests the influence of genetic factors on the clinical outcome of these patients. In cases of severe COVID-19, different studies have described the presence of elevated coagulation markers, increased platelet activation and aggregation, and a significant risk of thrombotic complications. And, given the participation of these cells in several viral infections and their negative action when associated with a pro-thrombotic response, understanding the mechanistic role of SARS-CoV-2 with platelets appears to be a promising path. The expression of Platelet Activating Factor (PAF) and Platelet Factor 4 (PF-4) in different viral infections, such as dengue, were associated with the appearance of more severe symptoms of the disease and greater replication of the virus. In this context, this study aimed to evaluate the expression profile of the PTAFR and PF-4 genes in hospitalized patients and demonstrate their correlation with the severe form of COVID-19. To this end, we characterized the expression profile of PTAFR and PF-4 using the real-time PCR technique of 93 patients with COVID-19 in hospital care, in which we demonstrated a hyperexpression of these genes when compared to healthy individuals ($p < 0,05$). However, there was no significant association between their expressions and the clinical-epidemiological parameters addressed ($p > 0,05$). Furthermore, for comparative analysis, we stratified patients according to type of hospitalization, clinical outcome and gender, in relation to age and laboratory tests, where the correlation between age and outcome and gender ($p < 0,05$), count of leukocytes ($p < 0,001$) and platelets ($p < 0,0001$) and International Normalized Ratio (INR) ($p < 0,05$) to clinical outcome, and between CRP values ($p < 0,05$) and D -dimer (DDM) ($p < 0,05$) to the type of hospitalization, were identified as possible markers of clinical prognosis and monitoring of the disease. However, there were no significant correlations between: age, leukometry and INR and type of hospitalization; between CRP and DDM levels at outcome; and leukocyte and platelet counts, CRP, INR and MDD according to gender ($p > 0,05$). Therefore, our results support the hypothesis that increased expressions of PTAFR and PF-4 are associated with a more severe clinical context of the disease, requiring hospital care and may be important predictors of the risk of severe COVID-19.

Keywords: COVID-19. Platelets. PAF. PF-4. Biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura e organização genômica do SARS-CoV-2.....	1
Figura 2 – Representação esquemática do mecanismo de entrada e do ciclo de replicação do SARS-CoV-2.....	3
Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo de tromboinflamação desencadeada pelo SARS-CoV-2.....	6
Figura 4 – Comparação da expressão de PTAFR e PF-4 entre pacientes internados com COVID-19 e as amostras controle.....	26
Figura 5 – Comparação da expressão de PTAFR e PF-4 entre os pacientes com COVID-19 hospitalizados e as variáveis de tipo de internação, desfecho e gênero.....	27
Figura 6 – Comparação da expressão gênica de PTAFR e PF-4 entre os pacientes com COVID-19 estratificados por grupos de idade.....	28
Figura 7 – Análise comparativa entre a expressão de PTAFR e PF-4 nos pacientes com COVID-19 relacionada com a contagem de leucócitos.....	29
Figura 8 – Comparação entre as distribuições das variáveis plaquetárias e a expressão dos genes PTAFR e PF-4 em pacientes com COVID-19 hospitalizados.....	30
Figura 9 – Análise comparativa entre a expressão de PTAFR e PF-4 nos pacientes com COVID-19 relacionada aos valores da proteína C reativa.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios de estratificação do estudo e seus aspectos clínicos	17
Tabela 2 – Regentes utilizados na síntese de cDNA	18
Tabela 3 – Identificação de primers	19
Tabela 4 – Reagentes utilizados na PCR em tempo real	19
Tabela 5 – Parâmetros clínico-epidemiológicos dos pacientes diagnosticados com a COVID-19 em relação ao gênero	22
Tabela 6 – Características do período de internação dos pacientes diagnosticados com a COVID-19 em relação ao gênero	23
Tabela 7 – Características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais dos pacientes diagnosticados com a COVID-19 que necessitaram de internação	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE-2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ACTB	β -actina
COVID-19	Doença do Coronavírus – 2019
CXC/CCL	Receptores de Quimiocinas
DDM	D-dímero
E	Proteína de Envelope
FXII	Fator XII da coagulação
H1N1	Influenza A subtipo H1N1
H3N2	Influenza A subtipo H3N2
HCV	Vírus da Hepatite
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV-1	Herpes Vírus Simples A
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
M	Proteína de Membrana
M-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófago
N	Proteína de Nucleocapsídeo
NETs	<i>Extracellular Neutrophil Traps</i> /Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
PAF	<i>Platelet Activation Factor</i> /Fator de Ativação de Plaquetas
PCR	Proteína C Reativa
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i> /Factor de Crescimento derivado de Plaquetas

PF-4/CXCL4	<i>Platelet Factor 4</i> /Fator Plaquetário 4
PTAFR	<i>Platelet Activating Factor Receptor</i> / Receptor de Fator Ativador de Plaquetas
S	Proteína <i>Spike</i>
S1	Subunidade S1
S2	Subunidade S2
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SPC	Síndrome das Plaquetas Cinzentas
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TAP	Tempo de Atividade da Protrombina
TMPRSS2	Protease Transmembranar Serina 2
TTPA	Tempo De Tromboplastina Parcial Ativado
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VPM	Volume Plaquetário Médio
VWF	Fator de Von Willebrand

SUMÁRIO

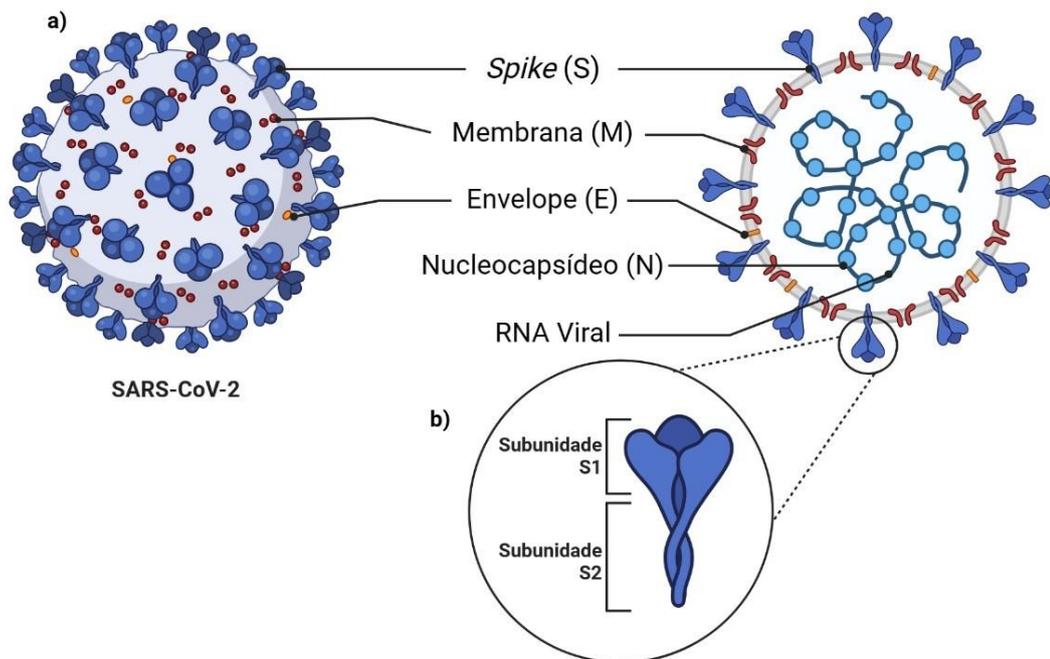
1 ASPECTOS GERAIS DO SARS-CoV-2	1
1.1 Fisiopatologia e Patogênese do SARS-CoV-2	2
1.2 Hipercoagulação Plaquetária, Imunotrombose e a COVID-19	4
1.3 Infecções Virais, incluindo o SARS-CoV-2 e a sua interação com as Plaquetas	7
<i>1.3.1 Atuação dos Marcadores Plaquetários PAF e PF-4 nas Infecções</i>	<i>9</i>
1.4 Estratégias Terapêuticas e Tratamentos de Suporte na COVID-19	11
1.5 Justificativa	13
2 OBJETIVO GERAL	15
2.1 Objetivos Específicos	15
3 MATERIAS E MÉTODOS	16
3.1 Coleta de Amostras e Aspectos Éticos	16
3.2 Critérios de Inclusão e Exclusão	16
3.4 Extração de RNA	18
3.5 Transcrição Reversa RNA-DNA	18
3.6 Detecção e Especificações do Ensaio	18
<i>3.6.1 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real</i>	<i>19</i>
<i>3.6.2 Validação da Expressão Gênica por Real-Time PCR Quantitativo (qPCR)</i>	<i>19</i>
3.7 Análise Estatística	20
4 RESULTADOS	21
4.1 Características do Estudo	21
4.2 Testes de Hipótese	23
4.3 Análise de Expressão dos Genes <i>PTAFR</i> e <i>PF-4</i>	26
5 DISCUSSÃO	32
6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	40
7 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXO A – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	54

1 ASPECTOS GERAIS DO SARS-CoV-2

A COVID-19 (doença pelo Coronavírus - 2019), relatada pela primeira vez na China, é causada pela infecção do Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2). Um vírus de RNA fita simples de sentido positivo, envelopado e pertencente à família *Coronaviridae*, que têm em comum a presença de quatro proteínas estruturais – proteína *Spike* (S), proteína de envelope (E), proteína de membrana (M) e proteína de nucleocapsídeo (N) – que estão intimamente relacionadas com a virulência desse coronavírus e são encarregadas pela manutenção e replicação viral (FIGURA 1) (GU *et al.*, 2020; KANG *et al.*, 2020; MANNE *et al.*, 2020).

A proteína S possui função vital para a infecção e patogênese da COVID-19, além de ser a glicoproteína determinante da fusão do vírus nas células. Essa proteína ainda é subdividida, onde o ectodomínio é dividido em subunidades, a S1, que auxilia na ligação ao receptor ACE-2 na superfície da célula do hospedeiro, e a segunda, S2, que é responsável pela fusão de membrana (FIGURA 1) (CHILAMAKURI; AGARWAL, 2021; DHAMA *et al.*, 2020; MACHHI *et al.*, 2020).

Figura 1 – Estrutura e organização genômica do SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de Pizzato *et al.* (2022).

Legenda: **a)** Representação esquemática da estrutura do vírus SARS-CoV-2 e as posições das glicoproteínas *Spike*, envelope, membrana, nucleocapsídeo e genoma viral. **b)** Representação esquemática ampliada mostrando as subunidades S1 e S2 da glicoproteína de pico do SARS-CoV-2. Criado com BioRender.com.

O SARS-CoV-2 ficou conhecido por sua mutagênese e alta patogenicidade devido à rápida disseminação de pessoa para pessoa (ZAID *et al.*, 2020). Por intermédio da protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2), uma serina protease que atua na clivagem proteolítica e na ativação da proteína *Spike*, o SARS-CoV-2 ligam-se a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2) a fim de contribuir com a fusão do vírus a membrana celular do hospedeiro e em seguida, a entrada do genoma viral na célula (DHAMA *et al.*, 2020; MACHHI *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020a).

Ainda que a infecção por esse vírus apresente tropismo pelas células do endotélio respiratório, estudos apontam casos de pacientes que desenvolveram quadros intensos de trombose, incluindo infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral isquêmico (CONNORS; LEVY, 2020; MANNE *et al.*, 2020). Apesar de serem consideradas as principais células efetoras da hemostasia e desempenharem um papel importante na formação de trombos, as plaquetas também são responsáveis por mediar respostas inflamatórias e imunológicas (MIDDLETON; WEYRICH; ZIMMERMAN, 2016; KOUPENOVA *et al.*, 2018).

Uma vez que a ativação plaquetária ocorre mediante a eventos inflamatórios ou infecciosos, comumente estes vêm associados a uma resposta pró-trombótica e, conseqüentemente, a uma hiperatividade plaquetária, como é observado em diversas infecções virais, incluindo o vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite C (HCV), vírus ebola, vírus da influenza, vírus da dengue e entre outros. Semelhante ao processo de trombocitopenia, coagulopatia e inflamação observados em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, levando a um aumento significativo de eventos trombóticos e embólicos (GU *et al.*, 2020; KOUPENOVA *et al.*, 2019; MANNE *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020a).

Desse modo, uma compreensão sistemática dos efeitos trombóticos do SARS-CoV-2 é necessária para o redirecionamento e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas capazes de minimizar os danos associados a doença (BARRETT *et al.*, 2021).

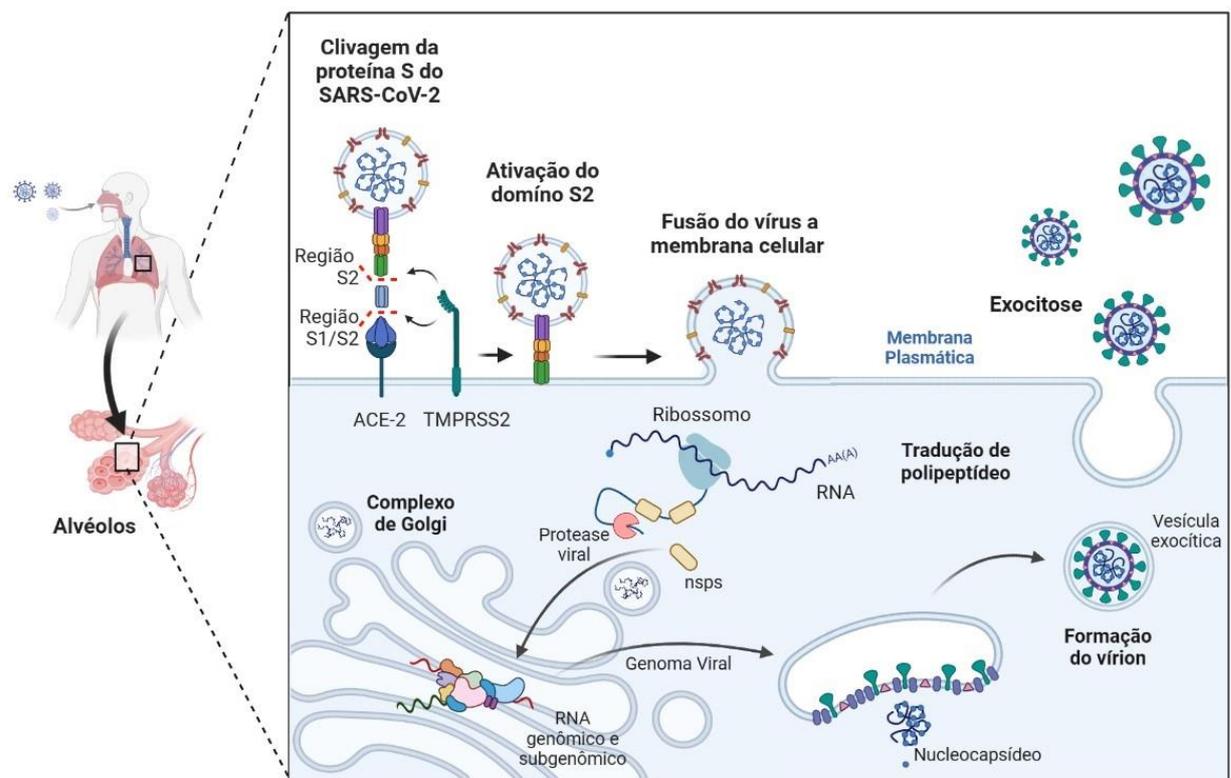
1.1 Fisiopatologia e Patogênese do SARS-CoV-2

A infecção pelo SARS-CoV-2 se inicia quando a proteína de pico viral se liga a seu receptor na membrana da célula hospedeira, sendo o ACE-2 considerado o principal receptor responsável pela entrada do vírus na célula. Além de que a alta expressão de ACE-2 na mucosa

nasal e oral viabiliza a entrada deste por inalação. Após sua ligação a ACE-2, a protease TMPRSS2 cliva e ativa a proteína de pico para favorecer a fusão do envelope viral com a membrana celular (HOFFMANN *et al.*, 2020; SUNGNAK *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2020; ZUMLA *et al.*, 2016).

Dependendo da disponibilidade de proteases na superfície da célula hospedeira, a proteína *Spike* possibilita a entrada do vírus por endocitose ou via fusão direta do envelope viral com a membrana celular. Dentro dos alvéolos, devido à expressão considerável de ACE-2 e TMPRSS2, as células epiteliais que revestem as vias aéreas inferiores são o alvo principal. Daí em diante as proteínas estruturais se movem ao longo da via secretora para o complexo de Golgi, onde será realizada a montagem da progênie viral e então, a sua liberação da célula hospedeira por exocitose (DHAMA *et al.*, 2020; ZUMLA *et al.*, 2016) (FIGURA 2).

Figura 2 – Representação esquemática do mecanismo de entrada e do ciclo de replicação do SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de Hartenian *et al.* (2020).

Legenda: A proteína S do SARS-CoV-2 liga-se a ACE-2 e cliva as subunidades S1/S2 através da TMPRSS2, viabilizando a entrada do vírus nas células do hospedeiro e a consequente tradução do genoma viral. No complexo de Golgi ocorre a transcrição e a replicação, onde o RNA subgenômico é traduzido em proteínas estruturais e acessórias que são inseridas ao RNA genômico no nucleocapsídeo. Então, o vírion é formado e liberado por exocitose. ACE-2, Enzima Conversora de Angiotensina 2; TMPRSS2, Protease Transmembrana Serina 2; nsps, Proteínas Não-estruturais. Criado com BioRender.com.

À medida que as células epiteliais são infectadas, o vírus induz a apoptose como parte do ciclo de replicação, estando relacionado ao vazamento vascular que dá início a infecção local e ao recrutamento de células imunes na tentativa de conter a infecção. Neste contexto, o aumento de citocinas nos pulmões, podem agravar essa resposta inflamatória e levar ao surgimento da pneumonia (CAO, 2020; YUFANG *et al.*, 2020).

Mesmo que, grande parte dos pacientes apresentem sintomas leves e bom prognóstico, uma fração desses indivíduos, principalmente idosos e/ou aqueles com doenças crônicas, podem evoluir para Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) e até o óbito. Desse modo, a identificação de marcadores que monitorem a progressão da doença e auxiliem no tratamento precoce é fundamental para a otimização da conduta médica e para melhor assistência desses pacientes (HENRY *et al.*, 2020; LI; DE CLERCQ, 2020; ZENG *et al.*, 2020).

Além disso, estudos clínicos observaram que pacientes críticos com a doença, apresentam parâmetros plaquetários anormais, como contagem de plaquetas diminuída, bem como alterações no perfil de coagulação, incluindo diminuição do tempo de atividade da protrombina (TAP), razão normalizada internacional (INR), tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA), D-dímero (DDM) e fibrinogênio aumentados, quando comparado a indivíduos saudáveis (BAO *et al.*, 2020; GOSHUA *et al.*, 2020; SAFIABADI TALI *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2020b).

E, apesar que a sua fisiopatologia não tenha sido completamente explicada, uma resposta imune-inflamatória ininterrupto e desproporcional é observada, principalmente, por parte de proteínas sinalizadoras derivadas de plaquetas (por exemplo, citocinas e quimiocinas) que mediam e regulam a resposta imune (DARIF *et al.*, 2021).

1.2 Hipercoagulação Plaquetária, Imunotrombose e a COVID-19

As plaquetas são pequenos fragmentos celulares derivados dos megacariócitos, que além de atuarem no estabelecimento da hemostasia, desempenham importantes funções na resposta imune. Quando ativadas, as plaquetas liberam substâncias responsáveis pelo recrutamento de células de defesa para o local da lesão/inflamação e promovem a sua adesão

aos trombos plaquetários, modulando assim a resposta funcional dos leucócitos (LIPPI; PLEBANI; HENRY, 2020; MCFADYEN; STEVENS; PETER, 2020; RIBES *et al.*, 2020).

Comumente, a ativação plaquetária ocorre em resposta a doenças inflamatórias e/ou infecciosas. A infecção estimula uma resposta inflamatória sistêmica, na qual a ativação dos sistemas de defesa do hospedeiro resulta na ativação de vias da coagulação, levando a formação de trombina como componente de comunicação entre a imunidade humoral e celular, denominado imunotrombose. Durante esse processo, uma espécie de barreira física é formada pelas plaquetas e pelas células imunes com o objetivo de impedir a disseminação do patógeno (DELABRANCHE; HELMS; MEZIANI, 2017; MANNE *et al.*, 2020; THACHIL, 2020; XU; ZHOU; XU, 2020).

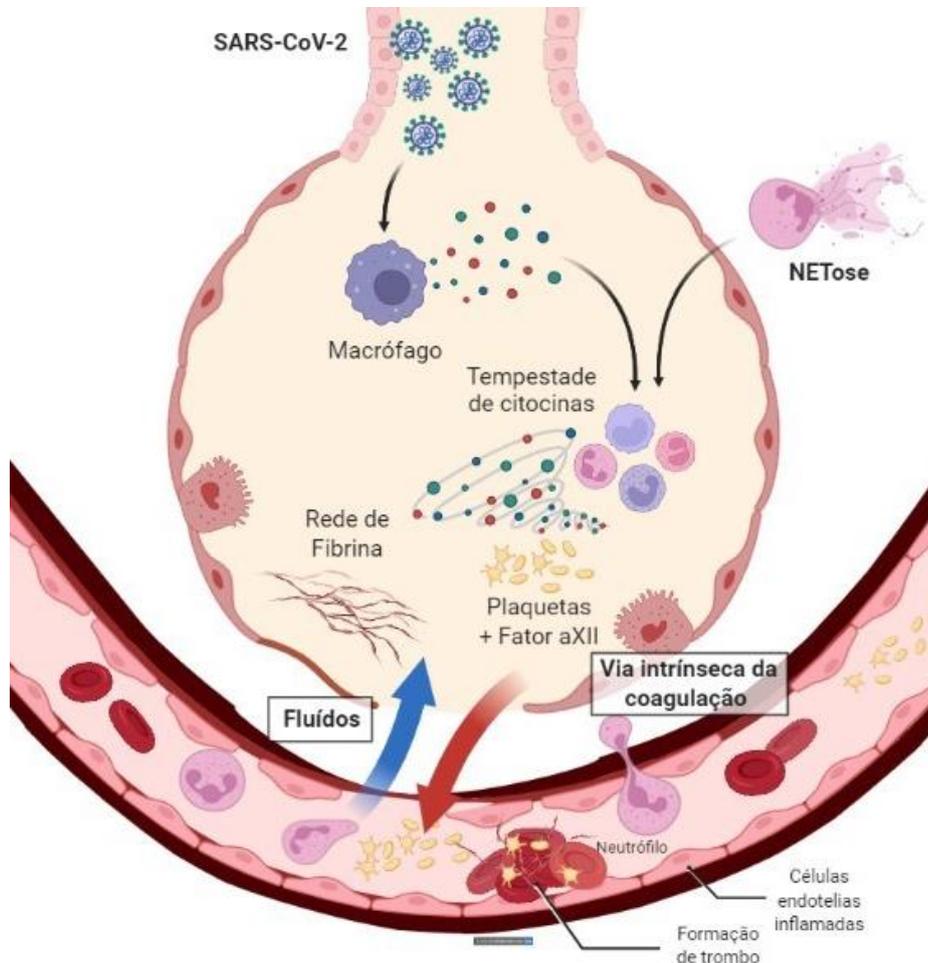
Embora seja considerada uma forma eficaz de auxiliar na proteção do organismo, suas contribuições críticas para a trombose já são conhecidas. No decorrer de diversas infecções – virais ou bacterianas – as plaquetas ativadas aderem ao subendotélio e a sua hiperatividade resulta na formação de trombos, levando à isquemia arterial e até a embolias pulmonares (THACHIL, 2020; XU; ZHOU; XU, 2020; KOUPENOVA *et al.*, 2018; MANNE *et al.*, 2020).

Na COVID-19, evidências mostraram que o vírus pode interagir diretamente com as plaquetas e modular suas funções trombóticas e inflamatórias. Um estudo realizado por Zhang *et al.* (2020b), descreveu que as plaquetas de pacientes com a doença são hiperativas e que o vírus se liga diretamente ao receptor ACE-2 das plaquetas por meio da proteína *Spike*, aumentando a sua ativação *in vitro* (MANNE *et al.*, 2020; MCFADYEN; STEVENS; PETER, 2020).

Quando em contato com o sistema respiratório, o vírus desencadeia um processo inflamatório através da liberação de diversas citocinas responsáveis pelo recrutamento de células de defesa, levando a produção de mais citocinas e estabelecendo o ciclo de inflamação do epitélio pulmonar e de eventos pró-coagulantes, como representado na Figura 3 (CONNORS; LEVY, 2020; TUFAN; GÜLER; MATUCCI-CERINIC, 2020). Nesse aspecto, a liberação de polifosfatos pelo microrganismo atuam na ativação das plaquetas e do fator XII da coagulação (FXII), enquanto, o sistema complemento e a NETose levam a formação de trombina. No qual, a associação da desordem da resposta imune e os eventos pró-coagulantes desencadeiam a formação de trombos, deslocando essa ação para uma tromboinflamação. À medida que, os danos nos vasos sanguíneos possibilitam a passagem de fluídos para a cavidade

pulmonar, levando a insuficiência respiratória (FIGURA 3) (CONNORS; LEVY, 2020; TUFAN; GÜLER; MATUCCI-CERINIC, 2020).

Figura 3 – Representação esquemática do mecanismo de tromboinflamação desencadeada pelo SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de Dhama *et al.* (2020).

Legenda: Quando o vírus é identificado pelas células imunes, ocorre a produção de citocinas inflamatórias que atraem células de defesa na tentativa de conter o vírus. Na presença de uma resposta imune desregulada e da produção exacerbada dessas citocinas é estabelecido o ciclo de inflamação. Resultando no acúmulo de fluídos nos bronquíolos e na vasoconstrição via ativação plaquetária, diminuindo a capacidade de troca de oxigênio. Criado com BioRender.com.

A NETose é um tipo de morte celular programada causada principalmente pelos neutrófilos e está associada a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) durante o processo (ZHANG *et al.*, 2023). A liberação de quimiocinas é conhecida por aumentar o recrutamento de leucócitos para o local da lesão, provendo a NETose, que estimula a formação de trombina pelo FXII e auxilia na indução do estado trombótico observado nesses pacientes. Ademais, um estudo de autópsia em pacientes com a doença, demonstrou um aumento do Fator Plaquetário 4 (PF-4) liberado pelas plaquetas, que se correlacionam com o

aumento da NETose e da formação de microtrombos (MIDDLETON *et al.*, 2020; PERDOMO *et al.*, 2019; ZUO *et al.*, 2020).

Durante a infecção, a tempestade de citocinas, muitas dessas de origem plaquetária, tem sido sugerida como uma das causas principais do dano pulmonar que ocorre nesses pacientes. A fase inicial da SDRA é constituída pela inflamação local, acúmulo de células inflamatórias, entre elas, leucócitos e plaquetas, ativação desordenada da coagulação e alterações na permeabilidade endotelial. Nesse contexto, a ativação do complemento pode induzir a ativação e a agregação plaquetária, levando a promoção da trombose (JOSE; MANUEL, 2020; WASHINGTON; ESPONDA; GIBSON, 2020).

Desse modo, as células endoteliais em conjuntos com as plaquetas, leucócitos e a cascatas de coagulação atuam negativamente na reação tromboinflamatória, levando a eventos tromboembólicos em pacientes com COVID-19 grave (JACKSON; DARBOUSSET; SCHOENWAELDER, 2019; RIBES *et al.*, 2020).

1.3 Infecções Virais, incluindo o SARS-CoV-2 e a sua interação com as Plaquetas

As plaquetas são amplamente conhecidas por suas contribuições para a trombose, a hemostasia e por possuírem uma ampla expressão de receptores imunes e de adesão, como receptores de quimiocinas (CXC/CCL). No entanto, sua interação e favorecimento às infecções virais vêm despertando um crescente interesse entre pesquisadores (ASSINGER *et al.*, 2014; GUO *et al.*, 2017; KROUPENOVA *et al.*, 2018; SIMON *et al.*, 2015).

O citoplasma das plaquetas contém três tipos de grânulos: α , densos ou δ e lisossomas. Os grânulos α são formados por fator de Von Willebrand (VWF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), trombina, fator plaquetário 4 (PF-4), fator de ativação de plaquetas (PAF) e moléculas de adesão celular, além de quimiocinas e citocinas, que quando liberadas em maior quantidade modulam a função celular, promovendo a ativação, agregação e secreção plaquetária. Esses fatores produzidos pelas plaquetas também participam do recrutamento de neutrófilos, linfócitos, macrófagos e outras células inflamatórias, levando o organismo ao estado hiperinflamatório (BLAIR; FLAUMENHAFT, 2009; MORRELL *et al.*, 2014; KROUPENOVA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018).

O envolvimento dessas células nas defesas virais ocorre por meio de sua atividade direta, através da liberação de receptores específicos, fagocitose viral ou pela formação de complexos vírus-plaquetas, levando à trombocitopenia. Já pela via indireta, o vírus é neutralizado por intermédio da formação de agregados com os leucócitos, apoptose plaquetária e/ou ativação do endotélio vascular (MAOUIA *et al.*, 2020).

As plaquetas desempenham um importante papel na defesa imune do hospedeiro contra os vírus, elas englobam as partículas virais e assim reduzem a viremia. Entretanto, elas também podem contribuir com o aumento da inflamação e lesão tecidual nessas infecções, como na influenza, imunodeficiência humana, hepatite B e C, ebola, dengue, sarampo, varíola, HSV-1 (herpes vírus simples A), coxsackievirus B, adenovírus e citomegalovírus, atuando na internalização dos vírions, na ativação plaquetária e contribuindo com o transporte dessas partículas (ANTONIAK; MACKMAN, 2021; LI; LI; NI, 2020; KROUPENOVA *et al.*, 2020; PAGE; PRETORIUS, 2020; YEAMAN, 2019).

Ademais, a interação das plaquetas na patogênese da COVID-19 vem sendo discutida. Um estudo de Barrett *et al.* (2021), identificou em pacientes falecidos com a doença, a presença de partículas virais nos pulmões e em megacariócitos morfológicamente ativos na produção de plaquetas na medula óssea. As mesmas partículas foram ainda observadas em plaquetas circulantes, sugerindo assim, que o SARS-CoV-2 é transferido dos megacariócitos para as plaquetas ou fagocitados por estas quando circulantes (ASSINGER *et al.*, 2014; GUO *et al.*, 2017; KROUPENOVA *et al.*, 2018; SIMON *et al.*, 2015; ZAID *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020b).

Outros dois estudos descreveram a ativação plaquetária em pacientes com COVID-19 grave, demonstrando níveis aumentados de agregados de plaquetas e células imunes (HOTTZ *et al.*, 2020; MANNE *et al.*, 2020). Além disso, um deles mostrou que as plaquetas desses pacientes continham RNA viral, sugerindo que essas células podem absorver o mRNA do SARS-CoV-2, como também, apresentar modificações na expressão de genes plaquetários, semelhantes as observadas em pacientes infectados pelo vírus H1N1 (MANNE *et al.*, 2020).

Nesse contexto, compreender o papel mecanicista do SARS-CoV-2 com as plaquetas e o seu desenvolver da cascata de eventos pró-coagulatórios, pode ser uma ferramenta primordial para a triagem diagnóstica precoce de complicações trombóticas no tratamento e no prognóstico da doença (BARRETT *et al.*, 2021; KROUPENOVA *et al.*, 2019).

1.3.1 Atuação dos Marcadores Plaquetários PAF e PF-4 nas Infecções

A infecção pelo SARS-CoV-2 apresenta quadros de gravidade diversos, o que sugere a influência de variações genéticas individuais em sua fisiologia. Diferentes estudos descreveram a presença de marcadores de coagulação elevados e tromboembolismo pulmonar em casos graves da doença, além de acentuada ativação e agregação plaquetária. Bem como, observações clínicas também apresentaram altas concentrações de citocinas inflamatórias no plasma de pacientes críticos (ACKERMANN *et al.*, 2020; BÖSMÜLLER *et al.*, 2020; BOWLES *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2020; RANUCCI *et al.*, 2020; SALAMANNA *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020b).

Nesse sentido, o Fator de Ativação de Plaquetas (PAF), descrito pela primeira vez em 1972, vem demonstrando desempenhar um papel central em vários processos fisiológicos, incluindo a apoptose, reprodução e angiogênese, atuando também como mediador pró-inflamatório em diversas doenças crônicas – câncer, doenças renais, doenças cardiovasculares, asma, alergias – e nas infecções (BENVENISTE; HENSON; COCHRANE, 1972; DA SILVA-JR *et al.*, 2017; LORDAN *et al.*, 2019; PALUR RAMAKRISHNAN *et al.*, 2017; TSOUPRAS; LORDAN; ZABETAKIS, 2018; YOST; WEYRICH; ZIMMERMAN, 2010).

Fisiologicamente, PAF é expresso na superfície das células de defesa, endoteliais e nas plaquetas, atuando como agonista dos receptores do fator de ativação plaquetária, sendo considerado um importante mediador da inflamação em resposta a infecções virais e bacterianas. Embora PAF promova uma resposta inflamatória natural, seu efeito pode se tornar patogênico na presença de uma atividade excessiva ou desregulada, resultantes de alterações nos seus ciclos de síntese e terminação, decorrentes de variações genéticas ou doenças (KLEIN; DAO; KHAN, 2021; PRESCOTT *et al.*, 2000; ZIMMERMAN *et al.*, 2002).

O PAF e seu receptor (*PTAFR*) são conhecidos por estarem envolvidos não só na entrada de bactérias nas células, mas também de vírus. No qual, foi demonstrado a participação de PAF na entrada dos vírus H1N1 (Influenza A subtipo H1N1) e H3N2 (Influenza A subtipo H3N2), como também do HIV, onde a terapia antirretroviral com efeitos anti-PAF pode atenuar o metabolismo de PAF no sangue desses pacientes. Além disso, os antagonistas de *PTAFR* foram descritos por seu potencial protetor contra as manifestações neurológicas associadas ao HIV-1 (DEMOPOULOS; ANTONOPOULOU; THEOHARIDES, 2020; DEMOPOULOS, 2020; EGGERT *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2010; TSOUPRAS *et al.*, 2008).

Ademais, a expressão de *PAF* também foi associada as infecções causadas pelo vírus da dengue e pelo vírus sincicial respiratório. Sendo evidenciado que o bloqueio das vias do *PTAFR* com um antagonista, preveniu o aparecimento de sintomas mais graves da doença na dengue. Do mesmo modo que, o antagonismo de *PTAFR* em camundongos infectados com Influenza A induziu uma proteção contra lesão pulmonar e mortalidade (DEMOPOULOS; ANTONOPOULOU; THEOHARIDES, 2020; GARCIA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2009; ZABETAKIS *et al.*, 2020).

Nos estágios iniciais da COVID-19, uma semelhança é observada na apresentação clínica da infecção pelo SARS-CoV-2 e o vírus da dengue. Um estudo realizado em modelos animais exposto ao vírus da dengue evidenciou que a deleção de genes receptores de *PAF* e a administração de seus antagonistas, resultaram em uma menor gravidade da doença. E, embora o papel do *PAF* na COVID-19 não tenha sido completamente esclarecido, alguns estudos já apontaram esse fator como um colaborador na lesão pulmonar aguda e a SDRA nesses pacientes (CHOW *et al.*, 2021).

Ainda, foi relatado que as plaquetas desencadeiam a degranulação dos mastócitos perivasculares, podendo estes serem secretados e estimulados por *PAF*, levando a respostas hiperinflamatórias e a lesão tecidual. Além de ser a principal fonte de citocinas pró-inflamatórias nos pulmões e curiosamente expressarem o Sistema Renina-Angiotensina (SRA), que está estritamente relacionado a COVID-19. O receptor ACE-2 do SRA atua como porta de entrada do vírus na célula, à medida que a angiotensina II estimula a formação de *PAF* (ALEVIZOS *et al.*, 2013; DEMOPOULOS, 2020; THEOHARIDES, 2020).

Após a ativação, as plaquetas também secretam o Fator Plaquetário 4 (PF-4/CXCL4), sintetizado pelos megacariócitos e armazenados pelos grânulos α dessas células, cuja a principal função fisiológica é regular a coagulação sanguínea. PF-4 é disposto na circulação mediante ao dano tecidual, inflamação, estresse oxidativo ou através da estimulação por patógenos, como as interações vírus-plaquetas (ASSINGER, 2014; QIU *et al.*, 2020; SALAMANNA *et al.*, 2020; ZALDIVAR *et al.*, 2010).

Descoberta em 1955, essa quimiocina tem sido comumente relacionada a inibição da hematopoese, coagulação, cicatrização, inibição da proliferação de células endoteliais e da angiogênese e regulação de respostas imunes e inflamatórias, além de estar envolvida no controle de diferentes processos regulatórios, como apoptose, diferenciação e proliferação

celular (DEUTSCH; JOHNSON; SEEGER, 1955; GUO *et al.*, 2017; KASPER; PETERSEN, 2011; VANDERCAPPELLEN; VAN DAMME; STRUYF, 2011).

O PF-4 favorece o recrutamento de neutrófilos e contribui com o processo de exocitose dessas células, promovendo a liberação de mieloperoxidase e lisozima. Sendo considerado um fator eficaz na eliminação do vírus da gripe, como o H1N1, secretando moléculas antivirais para induzir a depuração viral. Além de ser utilizado como um inibidor de amplo espectro e supressor da infecção de linfócitos T pelo HIV-1 (AUERBACH *et al.*, 2012; GUO *et al.*, 2017; KOUPENOVA *et al.*, 2019).

Em contrapartida, outros estudos já apontaram a atuação dessa quimiocina como fator indutor da replicação do HIV em macrófagos derivados de fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). Como também, outro grupo demonstrou que quando em concentrações elevadas no plasma de pacientes com dengue, CXCL4 promove uma maior replicação desses vírus em monócitos *in vitro*. Além de seus níveis elevados terem sido detectados no fígado de pacientes com hepatite alcoólica e proporcionalmente aumentados no soro de pacientes com hepatite viral (GUO *et al.*, 2017; OJHA *et al.*, 2019; TSEGAYE *et al.*, 2013; VANDERCAPPELLEN; VAN DAMME; STRUYF, 2011; ZALDIVAR *et al.*, 2010).

Diante do exposto referente a atuação de marcadores plaquetários nos processos trombóticos, inflamatórios e a sua participação na fisiologia das infecções virais, como o seu envolvimento na COVID-19, um melhor entendimento do potencial infectante do vírus e dos quadros clínicos prognósticos associados a variações genéticas, poderiam auxiliar na compreensão do perfil de coagulação e inflamatório de pacientes recém diagnosticados com as diferentes formas da doença e na determinação de virulência desse patógeno, guiando condutas clínicas mais rápidas, como também, viabilizando o reaproveitamento e o direcionamento de novas formas de tratamento (BISWAS *et al.*, 2022; LIPSITCH *et al.*, 2021; UZUN *et al.*, 2022).

1.4 Estratégias Terapêuticas e Tratamentos de Suporte na COVID-19

Diante das circunstâncias da pandemia e dentre as diferentes vacinas disponíveis, um cenário incerto ainda é enfrentado. Embora os programas de vacinação tenham proporcionado uma grande melhora na erradicação da doença e um declínio de seus casos graves, a sua rápida transmissão permitiu uma ampla diversidade genética desse vírus. No qual,

resultou no surgimento de variantes preocupantes que assumem uma redução significativa na neutralização por anticorpos gerados durante a infecção ou vacinação anterior (GHASEMIYEH *et al.*, 2021; FLANAGAN *et al.*, 2021; ØSTERGAARD *et al.*, 2021; THAKUR *et al.*, 2021).

Embora a maioria dessas vacinas sejam bem toleradas, elas podem não responder de forma semelhante em todos os indivíduos. No contexto atual, a vacina contra a COVID-19 fornece diferentes níveis de imunidade, desse modo, possui uma eficácia variável. Além disso, alguns estudos já mostram que a vacina é menos imunogênica em indivíduos imunocomprometidos e portadores de neoplasias hematológicas, como também, apresentam resposta imune reduzida a depender da variante genética do vírus à qual foi exposto (ALEMAN *et al.*, 2021; KEARNS *et al.*, 2021; KHOURY *et al.*, 2021; MITTELMAN *et al.*, 2022; PLANAS *et al.*, 2021).

Dentre as intervenções medicamentosas adotadas, os inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores do receptor de angiotensina, corticoides, broncodilatadores e anti-inflamatórios desempenharam um importante papel na terapia de suporte a doença. No entanto, diante da predisposição desses pacientes a eventos pró-trombóticos, fármacos com ação anticoagulante, antiplaquetária e antifibrinolítica demonstram ser uma via terapêutica valiosa de atuação em diferentes estágios da doença (DEMOPOULOS; ANTONOPOULOU; THEOHARIDES, 2020; GAVRIATOPOULOU *et al.*, 2021; TRIGGLE *et al.*, 2021).

Apoiando essa ideia, estudos realizados por um grupo, mostrou que a terapia com heparina, um fármaco amplamente utilizado como anticoagulante, está associado a uma melhora no prognóstico de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, como também, o seu uso em baixo peso molecular foi sugerido para o tratamento de quadros de hipercoagulação e danos vasculares desses pacientes (CLAUSEN *et al.*, 2020; TANG *et al.*, 2020a; TANG *et al.*, 2020b). Bem como, um ensaio clínico realizado na China, revelou que a terapia anticoagulante suplementada pelo antiplaquetário Dipyridamol preveniu a progressão para estágios mais graves da doença, aumentando significativamente a contagem de plaquetas e de leucócitos, além do decréscimo dos níveis de D-dímero (LIU *et al.*, 2020).

Assim, levando em consideração os diferentes estágios de progressão da doença e a carência terapêutica clinicamente eficaz, várias classes de medicamentos foram administradas emergencialmente no combate da COVID-19, sem grandes evidências de eficácia ou magnitude

de toxicidade. Nesse aspecto, o redirecionamento de medicamentos e a identificação de alvos farmacogenéticos capazes de impedir a replicação ou auxiliar na depuração viral e/ou conter os eventos inflamatórios da doença, tem sido uma estratégia importante para o alcance de terapias mais eficazes e bem-sucedidas (BISWAS *et al.*, 2022; DE PRIYASHA *et al.*, 2021; MAJUMDER; MINKO, 2021; PERICO *et al.*, 2021).

1.5 Justificativa

A COVID-19 continua a nos desafiar em diversos aspectos e mesmo após o desenvolvimento das vacinas ainda é acompanhado o surgimento de alguns novos casos. O boletim epidemiológico do Ministério da Saúde emitido em outubro de 2022, apontou o Brasil como o quarto país com o maior número de casos acumulados da doença e o quinto em novos casos, ficando o Ceará com a maior taxa de mortalidade da região Nordeste. Desse modo, compreender os fatores que contribuem para o aumento da gravidade da doença e seus mecanismos genéticos é considerado um caminho promissor a se trilhar (BARRETT *et al.*, 2021; BRASIL, 2022; GU *et al.*, 2020; KOUPENOVA *et al.*, 2019; MANNE *et al.*, 2020).

Nesse aspecto, as plaquetas são conhecidas por desenvolverem um importante papel na defesa imune do hospedeiro contra os vírus. Entretanto, elas também podem atuar negativamente no aumento da infecção e no transporte de partículas virais. Além de diferentes estudos descreverem a atuação das plaquetas na fisiopatologia da doença, induzindo a trombose ou interagindo com outras células imunes na promoção da tromboinflamação, como também, a presença de marcadores de coagulação elevados (ACKERMANN *et al.*, 2020; BÖSMÜLLER *et al.*, 2020; BOWLES *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2020; RANUCCI *et al.*, 2020; SALAMANNA *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020b).

A infecção pelo SARS-CoV-2 apresenta diferentes condições clínicas e o estudo das variações no perfil genético desses pacientes auxiliaria na identificação dos indivíduos com alto ou baixo risco, no direcionamento terapêutico, como contribuiria para o conhecimento da biologia da infecção e da doença. Uma vez que vários estudos apontam a influência da diversidade genética nas formas de infecção causadas pelo vírus, na modulação da gravidade e na sua correlação com o prognóstico do paciente (ANASTASSOPOULOU *et al.*, 2020; DEVAUX *et al.*, 2020; ELHABYAN *et al.*, 2020; SECOLIN *et al.*, 2021).

Desse modo, definir melhor o papel das plaquetas, caracterizando e estratificando seus marcadores em pacientes com as formas brandas e severas da COVID-19, como, avaliando o uso de terapias direcionadas a essas células, contribuiriam para a compreensão do perfil de coagulação e inflamação observados nas diferentes formas da doença, podendo assim, auxiliar na determinação da virulência do patógeno e a guiar condutas clínicas mais rápidas e mais eficazes (BISWAS *et al.*, 2022; LIPSITCH *et al.*, 2021; UZUN *et al.*, 2022).

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão dos genes *PTAFR* e *PF-4* e a sua associação com os parâmetros clínico-epidemiológicos de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2.

2.1 Objetivos Específicos

- Investigar os principais fatores de risco com base nos parâmetros clínicos para o desenvolvimento das formas graves da COVID-19;
- Avaliar a expressão dos genes *PTAFR* e *PF-4* em pacientes diagnosticados com a COVID-19 que necessitaram de internação;
- Correlacionar os marcadores de coagulação e inflamatórios com a avaliação molecular e verificar sua associação com os casos graves da doença;
- Caracterizar o papel dos genes *PTAFR* e *PF-4* como potenciais biomarcadores plaquetários nas diferentes formas clínicas da COVID-19 de acordo com o desfecho clínico de alta ou óbito.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Coleta de Amostras e Aspectos Éticos

O presente estudo inclui pacientes infectados pelo vírus SARS-CoV-2 atendidos em dois hospitais de referência da rede pública da cidade de Fortaleza - CE. As amostras foram provenientes das unidades de atendimento à saúde e oriundas do Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ) e do Instituto Doutor José Frota (IJF) e, fazem parte do banco de amostras biológicas do Laboratório de Farmacogenética da Universidade Federal do Ceará (UFC).

As coletas foram realizadas entre o período de março de 2020 a março de 2021 e a inclusão dos pacientes no estudo ocorreu após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme rege a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, sobre aspectos éticos envolvendo a pesquisa com seres humanos e, obteve a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da UFC sob o número de parecer 4.029.490 (Anexo 1).

3.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram inclusos no estudo pacientes não vacinados recebidos pelos centros de atendimento mencionados, no período de março de 2020 a março de 2021, que aceitaram participar do estudo e que receberam diagnóstico para a COVID-19 por testes molecular e/ou imunocromatográfico.

Assim, foram excluídos os pacientes que receberam alta em até 24 horas de internação, que apresentavam doenças pré-existentes que resultassem em parâmetros de coagulação anormais e que não possuíam todos os parâmetros clínicos abordados no estudo.

3.3 Amostras Biológicas e Dados Clínicos

O estudo contou com o total de 132 pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 com diagnóstico comprovado pela técnica de PCR em tempo real e/ou teste imunocromatográfico para a doença. Foram analisadas e coletadas amostras dos pacientes que aceitaram participar do estudo e que necessitaram de internação por mais de 24 horas em um dos centros de atendimento mencionados.

Além das amostras de sangue, também foram coletados os dados clínicos que constavam nos prontuários dos pacientes, que incluem idade, sexo, doenças de base, exames laboratoriais, tipo e tempo total de internação, desfecho e sintomatologia para análise e estratificação de fatores de risco para o desenvolvimento das formas graves da doença, estabelecidos de acordo com os parâmetros abordados no estudo e estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Critérios de estratificação do estudo e seus aspectos clínicos

Parâmetros Clínicos	Valores de Referência	Contexto Clínico
Idade (anos)	15-44 45-64 ≥65	Distribuição etária conforme relatada por Li <i>et al.</i> , 2020. O estudo aponta a predominância de formas graves da doença em adultos com 60 anos de idade ou mais. Além de descrever um menor número de casos em crianças com menos de 15 anos.
Contagem de Leucócitos (x10 ³)/mm ³	<4 4-10 >10	Valores definidos com base no estudo de Zhou <i>et al.</i> , 2020. No qual, descreve a leucocitose como fator de risco para pacientes adultos internado com COVID-19.
Contagem de Plaquetas (x10 ³)/mm ³	<150 150-400 >400	Distribuição conforme o estudo de Esmael <i>et al.</i> , 2022. O estudo correlaciona os parâmetros de coagulação aos desfechos clínicos em pacientes hospitalizados com COVID-19. No qual, a presença de trombocitopenia pode ser indicativa de uma doença mais grave.
PCR (mg/L)	≤10 11-20 21-100 >100	Valores distribuídos conforme relatado por Lawrence A. <i>et al.</i> , 2020. No qual, níveis de PCR entre 10 e 20 mg/L indicam infecção viral leve. Níveis >20-40 mg/L podem representar um nível de dano tecidual (reversível) associado à resposta natural ao combate à doença viral. Enquanto, valores >100 mg/L refletem danos teciduais avançados e estão associados a um prognóstico desfavorável da doença.
TAP (INR)	0,80-1,30 >1,30	Critério de estratificação de dados conforme a distribuição realizada por Li <i>et al.</i> , 2020.
D-dímero (ng/mL)	≤500 500-1.000 >1.000	Distribuição baseada no estudo de Zhou <i>et al.</i> , 2020. As evidências apontam que os níveis de D-dímero maiores que 1.000 ng/mL em pacientes com COVID-19 estão associados à uma maior gravidade da doença e podem auxiliar na identificação de pacientes com prognóstico desfavorável em estágio inicial.

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Legenda: O modelo apresentado detalha os critérios de distribuição do estudo baseado nas evidências de outros autores dentro do contexto de pacientes hospitalizados com a COVID-19.

Dentre o total de amostras coletadas, 93 pacientes que apresentaram todas as informações clínicas e que estavam dentro dos critérios de inclusão e exclusão estabelecidos pelo estudo seguiram para as análises. As análises ainda contaram com um grupo controle de 15 indivíduos saudáveis, para a comparação estatística da expressão gênica dos genes plaquetários *PAF* (*PTAFR*) e *PF-4*.

3.4 Extração de RNA

As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubo com anticoagulante EDTA e encaminhadas ao Laboratório de Farmacogenética para a realização da extração de RNA. O RNA foi extraído a partir da camada leucocitária, através do kit comercial TRIzol™ LS Reagent (Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante.

3.5 Transcrição Reversa RNA-DNA

A partir de 10 µL de RNA, foi sintetizado o cDNA de acordo com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems®) para transformar o RNA extraído e purificado em cDNA. A etapa de conversão foi realizada no equipamento Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems®). A reação utiliza as quantidades de reagentes descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Regentes utilizados na síntese de cDNA

Reagentes	Volume (µL)
Água ultrapura	4,2
Buffer	2
dNTP	0,8
Primer	2
Transcriptase Reversa	1,0
Amostra	10
Volume Final	20

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

A ciclagem utilizada foi de 25°C durante 10 minutos e 37°C por 120 minutos. Após essa etapa, as amostras foram armazenadas em freezer -20°C até a sua utilização para análise.

3.6 Detecção e Especificações do Ensaio

Para a análise da expressão dos genes *PAF* (*PTAFR*) e *PF-4*, foram utilizados *primers* e sondas *TaqMan® Gene Expression Assay* (ThermoFisher®). A sequência dos genes de interesse (*PTAFR* e *PF-4*) e de referência (*ACTB*), foram enviados à *Applied Biosystems* para desenho e síntese de *primers*. O método de detecção foi de acordo com as sequências fornecidas pelo fabricante (TABELA 3).

Tabela 3 – Identificação dos *primers*

Gene	TaqMan® Assay ID
<i>ACTB</i>	Hs01060665_g1
<i>PAF (PTAFR)</i>	Hs00265399_s1
<i>PF-4</i>	Hs00236998_m1

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

3.6.1 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

O protocolo da reação utilizou as quantidades de reagentes descritas na tabela 4, totalizando uma reação final de 10 µL. A detecção da expressão dos genes por PCR em tempo real (qPCR) foi realizada utilizando o kit comercial *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems®). O protocolo de amplificação da reação constituiu-se das seguintes ciclagens: 50°C/2 min, 95°C/10 min e 50 ciclos de 95°C/15 seg e 60°C/1 min.

Tabela 4 – Reagentes utilizados na PCR em tempo real

Reagentes	Volume (µL)
Água ultrapura	3,0
<i>TaqMan Gene Expression Master Mix</i>	5,0
<i>Primers/Sondas</i>	1,0
cDNA	1,0
Volume Final	10

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

3.6.2 Validação da Expressão Gênica por *Real-Time* PCR Quantitativo (qPCR)

Após a amplificação, os fragmentos foram quantificados pela análise dos dados fluorescentes através do software versão 1.1 no equipamento *QuantStudio® 5* (Applied Biosystems®).

Para estabelecer o grau de expressão do gene escolhido para a etapa de validação, utilizou-se como referência o nível de expressão do gene *ACTB*, gene de expressão constitutiva e que se presta como referência de expressão entre as diferentes amostras (TABELA 3).

Na análise de PCR em tempo real, a quantificação é baseada no Ciclo de Quantificação (CQ), que é inversamente proporcional ao logaritmo do número de cópias iniciais (TYAGI *et al.*, 1998). O CQ é definido como o primeiro ciclo de amplificação no qual a fluorescência indica que os produtos de PCR se tornaram detectáveis. Para determinar a linha de corte para a expressão gênica alterada nas células de pacientes com a doença, o valor de CQ foi determinado também em amostras de indivíduos saudáveis.

Estabelecidos os CQ de cada amostra, o cálculo do nível de expressão foi realizado através do Método CQ comparativo ou Método $2^{-\Delta\Delta\text{CQ}}$, dessa forma, o nível de expressão do gene de interesse foi relatado em relação ao do gene de referência para cada amostra (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008):

$$\text{Expressão do Gene de Interesse} = 2^{-\Delta\Delta\text{CQ}}$$

Onde $\Delta\text{CQ} = (\text{CQ gene de interesse}) - (\text{CQ gene de referência})$ para cada triplicata

$$\Delta\Delta\text{CQ} = (\Delta\text{CQ experimental}) - (\Delta\text{CQ controle})$$

Para validação do método $2^{-\Delta\Delta\text{CQ}}$, deve-se assumir que a eficiência de amplificação do gene alvo e a eficiência de amplificação do controle interno devem ser aproximadamente iguais (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Cada amostra em análise foi realizada em triplicata para a validação da técnica e dos valores de CT, de acordo com os *guidelines* internacionais para avaliação de expressão gênica por PCR em tempo real (BUSTIN *et al.*, 2009).

3.7 Análise Estatística

Os testes de Chi-Quadrado e o de Fisher foram aplicados a depender da frequência amostral para comparar a provável influência entre as variáveis clínicas dos pacientes em estudo. Posteriormente, os dados estatísticos para a análise de expressão gênica de *PTAFR* e *PF-4* foram apresentados a partir da média ou mediana \pm desvio padrão da média (EPM) dos grupos experimentais em triplicatas biológicas no resultado do estudo. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para avaliar a distribuição das amostras. As análises comparativas paramétricas, foram realizadas pela Análise de Variância de uma Via (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni e o teste t foram utilizados quando dois grupos ou mais foram analisados.

Para as estatísticas não paramétricas, foi empregado o teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos e o teste de Kruskal-Wallis, seguindo do pós-teste de comparação múltipla de Dunn quando mais de dois grupos foram analisados.

Ambas as análises foram realizadas através do programa *GraphPad Prism* (versão 8.0.1) assumindo o nível de significância de 99% ($p \leq 0,001$) e 95% ($p \leq 0,05$). Os dados da validação da eficiência de amplificação dos genes alvo e dos controles foram apresentados em Regressão Linear.

4 RESULTADOS

4.1 Características do Estudo

O presente estudo consiste na análise de prontuários e na avaliação da expressão gênica dos genes *PTAFR* e *PF-4* de 93 pacientes diagnosticados com a COVID-19, que necessitaram de internação. Destes, 27 foram recebidos pelo Hospital São José de Doenças Infecciosas (HSJ) e 66 pelo Instituto Doutor José Frota (IJF), sediados na cidade de Fortaleza – CE.

Dos pacientes selecionados, 31 (33,3%) eram do sexo feminino e 62 (66,7%) do sexo masculino, mostrando uma proporção de 2:1 casos neste gênero. A idade média de pacientes com a doença foi mais jovem para o sexo feminino quando comparado ao masculino – 45,0 (15-87) e 57,9 (18-89), respectivamente. Não apresentando nenhum caso em menores de 15 anos de idade. Ainda, um total de 43 pacientes tiveram como causa principal da hospitalização a infecção pelo SARS-CoV-2, enquanto, os demais se internaram por motivos adjacentes e se contaminaram durante esse período e consequentemente desenvolveram complicações relacionadas a doença.

Das características clínicas observadas durante o processo admissional, os sintomas mais prevalentes entre ambos os gêneros foram dispneia, tosse seca, mialgia, febre e cefaleia e, e em menor ou nenhuma frequência foram destacados: pneumonia, odinofagia, anosmia, dor de garganta e entre outros que são detalhados na Tabela 5. Além dos pacientes classificados como assintomáticos devido a necessidade de internação por outras causas.

Já quando levado em consideração as doenças de base dos pacientes em estudo, a que se apresentou em maior frequência tanto em homens, quanto em mulheres foi a hipertensão e a diabetes, e isoladamente no gênero feminino, a obesidade. Quanto as menos observadas, destacaram-se o tabagismo, cardiopatias, doença renal, imunodeficiências e as doenças pulmonares (TABELA 5).

Tabela 5 – Parâmetros clínico-epidemiológicos dos pacientes diagnosticados com a COVID-19 em relação ao gênero

	Feminino	Masculino
Característica Clínicas		
Gênero (%)	31 (33,3)	62 (66,7)
Idade (anos)	45,0 (15-87)	57,9 (18-89)
Motivo de Internação		
Infecção pelo SARS-CoV-2 (%)	17 (39,5)	26 (60,5)
Outros (%) [¶]	14 (28,0)	36 (72,0)
Sinais e Sintomas		
Dispneia (%)	17 (54,8)	23 (37,1)
Tosse Seca (%)	8 (25,8)	17 (27,4)
Mialgia (%)	8 (25,8)	15 (24,2)
Febre (%)	5 (16,1)	15 (24,2)
Cefaleia (%)	5 (16,1)	8 (12,9)
Pneumonia (%)	2 (6,5)	0 (0,0)
Odinofagia (%)	2 (6,5)	3 (4,8)
Anosmia (%)	0 (0,0)	5 (8,1)
Dor de Garganta (%)	1 (3,2)	0 (0,0)
Assintomático (%)	13 (41,9)	37 (59,7)
Outros (%) [†]	2 (6,5)	6 (9,7)
Comorbidades e Doenças Crônicas		
Hipertensão (%)	13 (41,9)	12 (19,4)
Diabetes (%)	14 (45,2)	8 (12,9)
Obesidade (%)	11 (35,5)	3 (4,8)
Tabagismo (%)	3 (9,7)	6 (9,7)
Cardiopatias (%)	3 (9,7)	0 (0,0)
Doença Renal (%)	1 (3,2)	3 (4,9)
Imunodeficiências (%)	0 (0,0)	4 (6,5)
Doenças Pulmonares (%)	0 (0,0)	3 (4,8)
Sem comorbidades (%)	6 (19,4)	30 (48,4)
Outras (%) [‡]	10 (32,3)	11 (17,7)

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Os dados estão apresentados pelo número total de pacientes seguidos de seu percentual de acordo com as variáveis estudadas relacionadas as características clínicas dos pacientes.

[¶] Tratamento cirúrgico; tratamento não cirúrgico; politrauma; uso de substâncias psicoativas.

[†] Acidente vascular encefálico; angina; taquipneia, constipação, disenteria; calafrio.

[‡] Etilismo; tumores sólidos; distúrbios psiquiátricos; doenças genéticas; doenças neurodegenerativas; prostatites; distúrbios digestivos; hepatopatias.

Em relação aos aspectos durante o período de internação, foi observada uma maior necessidade de atendimento em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) em homens 60,0% (n=36), enquanto, mulheres apresentaram um percentual de 40,0% (n=24). E a média de tempo de internação para o gênero feminino foi de 27,1 (4-71) dias e para o masculino de 32,0 (7-91) dias (TABELA 6).

Tabela 6 – Características do período de internação dos pacientes diagnosticados com a COVID-19 em relação ao gênero

	Feminino	Masculino
Tipo de Internação		
Enfermaria (%)	7 (21,2)	26 (78,8)
UTI (%)	24 (40,0)	36 (60,0)
Desfecho Clínico		
Alta (%)	26 (33,8)	51 (66,2)
Óbito (%)	5 (31,3)	11 (68,7)
Tempo Médio de Internação		
(Dias)	27,1 (4-71)	32,0 (7-91)

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Os dados estão apresentados pelo número total de pacientes seguidos de seu percentual de acordo com as variáveis estudadas relacionadas ao desfecho clínico, tipo e período de internação.

4.2 Testes de Hipótese

Na tabela 7 aplicamos os testes de Chi-quadrado ou de Fisher a depender da frequência amostral esperada, com o intuito de correlacionar a existência de associação entre as variáveis clínicas analisadas. Os resultados obtidos consistem nas comparações entre: idade, tipo de internação, desfecho e gênero; e entre os achados laboratoriais – contagem de leucócitos e de plaquetas, PCR, TAP e D-dímero – com as variáveis citadas anteriormente. Os níveis de *p-valor* estatisticamente significativos foram definidos como 99% ($p \leq 0,001$) e 95% ($p \leq 0,05$), no qual, apontam uma provável influência entre os fatores comparados.

Ao relacionamos as variáveis de idade dos pacientes com as de desfecho e gênero, foi conseguido um $p < 0,05$, sugerindo que há uma influência significativa entre a idade e a evolução do paciente para alta ou óbito, sendo observado que indivíduos de 15 a 44 anos têm uma maior probabilidade de terem uma evolução favorável, enquanto aqueles com idade superior ou igual a 65 anos têm maiores chance de evoluírem negativamente. Já quando analisamos a idade relacionada ao sexo, é visto um maior número de casos da doença em homens com idade entre 15 e 44 anos, demonstrando uma maior predisposição nesse gênero de contrair formas da doença com maiores necessidades de atenção médica e hospitalização.

Em contrapartida, quanto a idade e a unidade de internação não houve correlação significativa, sugerindo que a idade dos pacientes não se trata de um fator determinante para o tipo de internação, dessa forma, não apresentando influência entre estes ($p = 0,7697$).

Em relação aos parâmetros laboratoriais, pode-se observar que tanto a contagem de leucócitos ($p < 0,001$), quanto a de plaquetas ($p < 0,0001$) tendem a influenciar no desfecho clínico, no qual, pacientes que se enquadraram dentro da faixa de normalidade demonstraram possuir melhor prognóstico e evolução para alta hospitalar. No entanto, não houve correlação significativa entre esses parâmetros e as variáveis de tipo de internação e gênero.

Da mesma forma, quando comparamos os níveis séricos da PCR com as variáveis de desfecho e gênero, nenhuma influência estatística foi vista ($p > 0,05$). Entretanto, ao relacionamos esses níveis ao tipo de internação, foi obtido uma significância de $p = 0,0307$. Demonstrando que esse marcador inflamatório pode ser um preditor de gravidade da doença e de prognóstico desfavorável.

Além disso, quando correlacionamos os valores do TAP ao desfecho clínico encontramos uma influência significativa entre eles ($p < 0,05$), no qual, pacientes que apresentaram valores de INR dentro dos valores de normalidade, apresentaram um maior percentual de alta hospitalar, enquanto, os que estavam fora dessa faixa tiveram evolução negativa, demonstrando uma possível influência desse parâmetro a um pior desfecho clínico.

Do mesmo modo, pode-se observar que os níveis de D-dímero tendem a intervir na unidade de internação, no qual pacientes com níveis desse exame superior a 1.000 ng/mL apresentaram um maior número de admissões em UTI, sendo uma variável clinicamente associada ao grupo de risco e ao acompanhamento da necessidade de intervenções terapêuticas com atividade anticoagulante.

Ainda na Tabela 7, nenhuma significância foi obtida na comparação entre os parâmetros de TAP ao tipo de internação e ao gênero ($p > 0,05$), deixando por conclusão que o mesmo não atua como um indicador da necessidade de atenção médica em enfermaria ou UTI, como também, não está relacionado ao gênero dos pacientes. No mesmo contexto, não houve correlação significativa quando avaliamos os valores de D-dímero com o desfecho e o gênero ($p > 0,05$).

Tabela 7 – Características clínicas, epidemiológicas e laboratoriais dos pacientes diagnosticados com a COVID-19 que necessitaram de internação

	<i>Tipo de Internação</i>		<i>p-valor</i>	<i>Desfecho</i>		<i>p-valor</i>	<i>Gênero</i>		<i>p-valor</i>
	<i>Enfermaria (n= 33)</i>	<i>UTI (n= 60)</i>		<i>Alta (n= 77)</i>	<i>Óbito (n= 16)</i>		<i>Feminino (n= 31)</i>	<i>Masculino (n= 62)</i>	
<i>Idade (anos)</i>									
15-44 (%)	15 (45,4)	23 (38,4)	0,7697	36 (46,7)	2 (12,5)	0,0246*	7 (22,6)	31 (50,0)	0,0256*
45-64 (%)	9 (27,3)	20 (33,3)		23 (29,9)	6 (37,5)		11 (35,5)	18 (29,0)	
≥65 (%)	9 (27,3)	17 (28,3)		18 (23,4)	8 (50,0)		13 (41,9)	13 (21,0)	
<i>Parâmetros Laboratoriais</i>									
<i>Contagem de Leucócitos (x10³) /mm³</i>									
<4	4 (12,1)	2 (3,3)	0,1890	7 (9,1)	1 (6,2)	0,0003*	2 (6,5)	4 (6,5)	0,2857
4-10	12 (36,4)	19 (31,7)		48 (62,3)	2 (12,5)		7 (22,5)	24 (38,7)	
>10	17 (51,5)	39 (65,0)		22 (28,6)	13 (81,3)		22 (71,0)	34 (54,8)	
<i>Contagem de Plaquetas (x10³) /mm³</i>									
<150	5 (15,1)	5 (8,3)	0,5933	7 (9,1)	3 (18,7)	<0,0001*	3 (9,7)	7 (11,3)	0,9660
150-400	19 (57,6)	38 (63,3)		48 (62,3)	9 (56,3)		19 (61,3)	38 (61,3)	
>400	9 (27,3)	17 (28,4)		22 (28,6)	4 (25,0)		9 (29,0)	17 (27,4)	
<i>PCR (mg/L)</i>									
≤10	6 (18,2)	1 (1,7)	0,0307*	7 (9,1)	0 (0,0)	0,4308	2 (6,5)	5 (8,1)	0,5678
11-20	3 (9,1)	4 (6,7)		5 (6,5)	2 (12,4)		1 (3,2)	6 (9,7)	
21-100	15 (45,4)	32 (53,3)		40 (51,9)	7 (43,8)		15 (48,4)	32 (51,6)	
>100	9 (27,3)	23 (38,3)		25(32,5)	7 (43,8)		13 (41,9)	19 (30,6)	
<i>TAP (INR)</i>									
0,80-1,30	28 (84,9)	56 (93,3)	0,6898	72 (93,5)	12 (75,0)	0,0442*	30 (96,8)	54 (87,1)	0,2633
>1,30	5 (15,1)	4 (6,7)		5 (6,5)	4 (25,0)		1 (3,2)	8 (12,9)	
<i>D-dímero (ng/mL)</i>									
≤500	3 (9,1)	1 (1,7)	0,0439*	4 (5,2)	0 (0,0)	0,5036	1 (3,2)	3 (4,8)	0,8473
501-1.000	6 (18,2)	4 (6,7)		9 (11,7)	1 (5,3)		4 (12,9)	6 (9,7)	
>1.000	24 (72,7)	55 (91,7)		64 (83,1)	15 (93,8)		26 (83,9)	53 (85,5)	

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Os dados estão apresentados pelo número total de pacientes de acordo com as variáveis estudadas seguidos de seu percentual.

P-valor calculado pelos testes de Chi-quadrado ou de Fisher.

*Indica um nível de significância menor que 0,001 ou menor que 0,05.

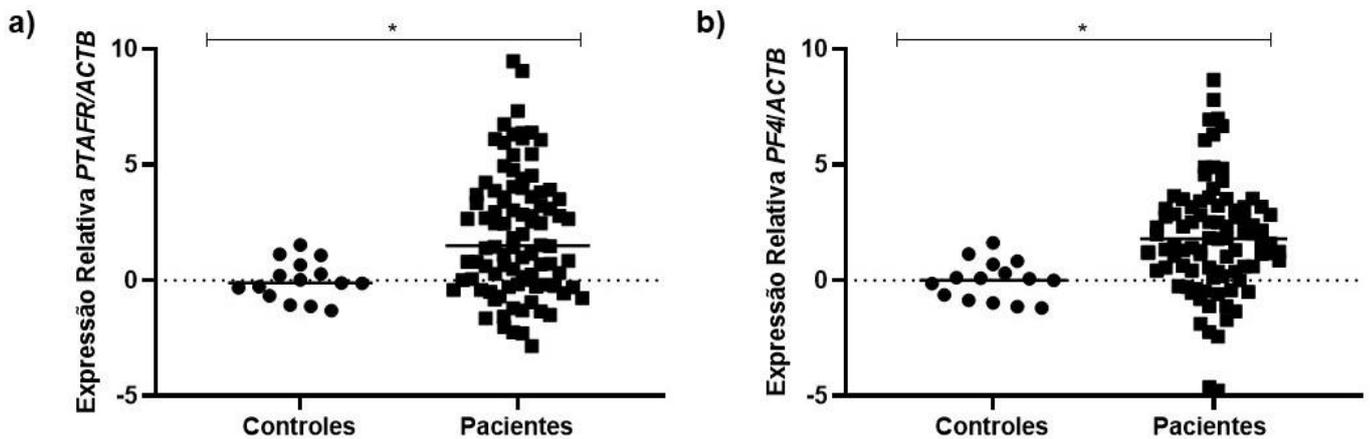
PCR, proteína C reativa; TAP, tempo de atividade da protrombina; INR, *International Normalized Ratio*; TAP, tempo de atividade da protrombina.

4.3 Análise de Expressão dos Genes *PTAFR* e *PF-4*

As 93 amostras dos pacientes em estudo foram submetidas a análise de expressão quantitativa através da técnica de PCR em tempo real (qPCR) de três genes, dos quais o *ACTB* foi usado como gene de referência para validar a expressão do teste e o *PTAFR* e o *PF-4* foram selecionados como genes de interesse. Ainda, para a validação e comparação estatística, foram utilizadas amostras controle de 15 indivíduos saudáveis submetidos as mesmas análises de expressão.

A expressão gênica de *PTAFR* e *PF-4* foi determinada através da comparação entre as amostras do grupo controle e as amostras dos pacientes. Quando analisadas estaticamente, mostraram-se significativamente aumentada em um fator de dez vezes em relação aos indivíduos saudáveis ($p < 0,05$), sendo observada uma hiperexpressão desses genes plaquetários em indivíduos com COVID-19 que necessitaram de atenção hospitalar. Entretanto, a análise individual demonstrou a presença de uma única amostra que não apresentou expressão do *PF-4*, mesmo expressando o *PTAFR* aproximadamente 6 vezes mais quando comparado aos controles, representada pelo paciente IJF-79 (FIGURA 4).

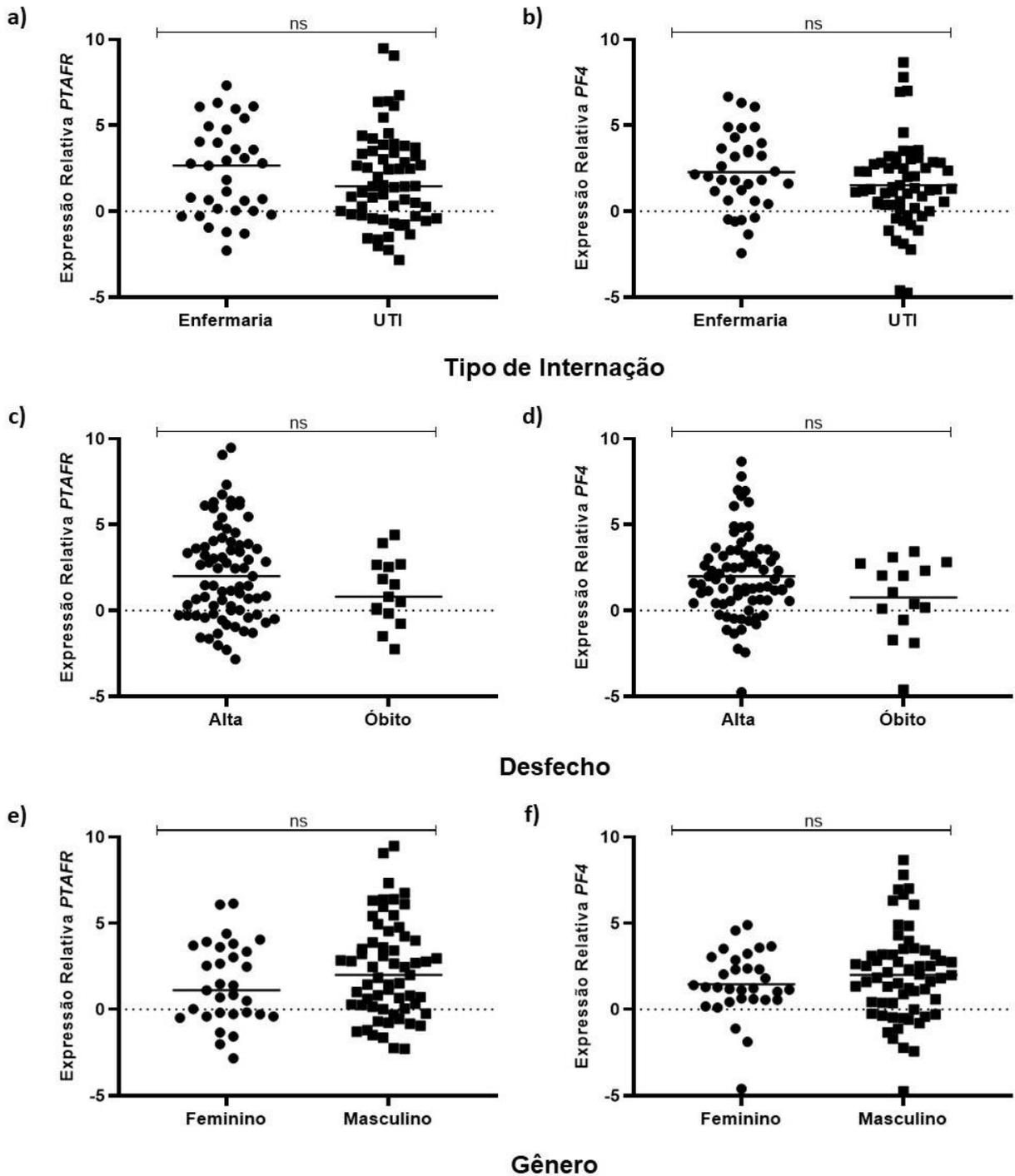
Figura 4 – Comparação da expressão de *PTAFR* e *PF-4* entre pacientes internados com COVID-19 e as amostras controle



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Os dados são apresentados pela média e mediana dos dois experimentos de comparação da expressão gênica, onde cada ponto do gráfico representa os valores de expressão de uma única amostra. As expressões relativas dos genes de interesse foram calculadas usando o *ACTB* como normalizador endógeno. **a)** Comparação da expressão de *PTAFR* entre as amostras de pacientes com COVID-19 hospitalizados e indivíduos saudáveis. **b)** Comparação da expressão de *PF-4* entre as amostras de pacientes com COVID-19 hospitalizados e indivíduos saudáveis. As análises estatísticas entre os grupos foram conduzidas pela realização do teste de Mann-Whitney e do teste t, respectivamente. * $p < 0,05$.

Figura 5 – Comparação da expressão de *PTAFR* e *PF-4* entre os pacientes com COVID-19 hospitalizados e as variáveis de tipo de internação, desfecho e gênero



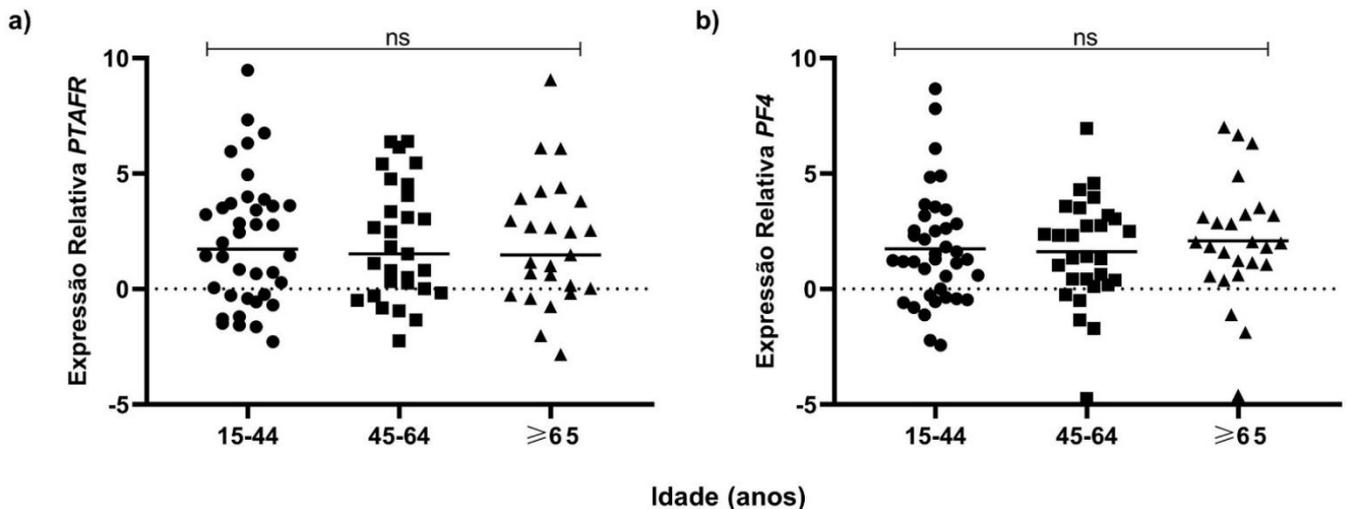
Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Os dados são apresentados pela média e mediana da correlação entre a expressão gênica dos pacientes com COVID-19 e as variáveis em estudo, onde cada ponto do gráfico representa a expressão de uma única amostra. **a) e b)** Comparação da expressão de *PTAFR* e *PF-4* entre a unidade de internação em enfermaria ou UTI. **c) e d)** Comparação da expressão de *PTAFR* e *PF-4* entre o desfecho clínico de alta ou óbito. **e) e f)** Comparação da expressão de *PTAFR* e *PF-4* entre os gêneros feminino e masculino. Os níveis de expressão entre as variáveis do estudo foram comparados utilizando o teste de Mann-Whitney para avaliação de *PTAFR* e do teste t para o *PF-4*. $p > 0,05$. ns, não significante.

Na figura 5 apresentamos a comparação entre as expressões dos genes alvo as variáveis de tipo de internação, desfecho clínico e gênero, porém, nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre elas ($p>0,05$). Entretanto, na análise individual é visto que existe uma maior expressão de *PTAFR* e *PF-4* em pacientes admitidos em UTI, quando comparado aos internados em enfermaria. Do mesmo modo, foi observado que alguns indivíduos do sexo masculino apresenta uma maior expressão de ambos os genes, quando comparado ao sexo feminino.

Quando estratificados por idade, as expressões do *PTAFR* e do *PF-4* foram comparadas entre pacientes com 15 a 14 anos, de 45 a 64 anos e maiores ou igual a 65 anos de idade, e os dados obtidos não foram estatisticamente significativos ($p>0,05$). No qual, foi observado um expressão aumentada dos genes de interesse, porém, semelhantes nos diferentes grupos de idade (FIGURA 6).

Figura 6 – Comparação da expressão gênica de *PTAFR* e *PF-4* entre os pacientes com COVID-19 estratificados por grupos de idade



Fonte: Dados da pesquisa.

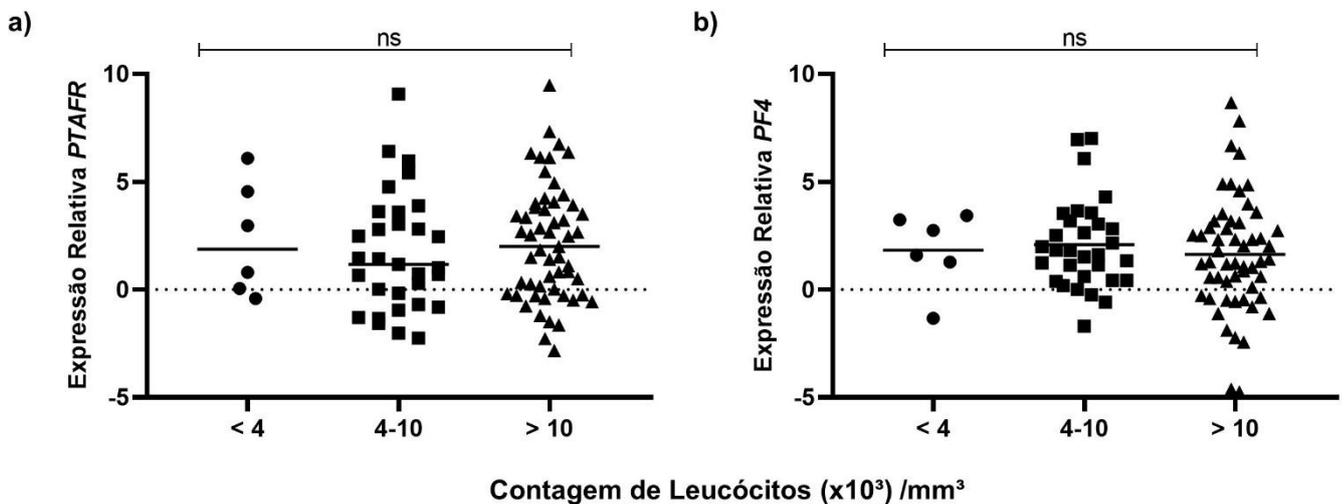
Legenda: As análises são representadas pela média e mediana da correlação entre a expressão dos genes de interesse com a distribuição etária do estudo, onde cada ponto do gráfico representa os valores de expressão de uma única amostra. **a)** Comparação da expressão de *PTAFR* entre pacientes com COVID-19 com os grupos etários. **b)** Comparação da expressão de *PF-4* entre pacientes com COVID-19 com os grupos etários. As comparações estatísticas foram realizadas pelos testes de Kruskal-Wallis, seguindo do teste de comparação múltipla de Dunn e pela ANOVA e pós-teste de Bonferroni, respectivamente. $p>0,05$. ns, não significativo.

Os pacientes foram ainda avaliados quanto os parâmetros laboratoriais coletados e a expressão dos genes em estudo. Para essa análise, os valores das expressões de *PTAFR* e *PF-4* foram estratificadas de acordo com critérios selecionados de risco e de prognóstico

desfavorável em paciente internados com a infecção pelo SARS-CoV-2, mencionados anteriormente na Tabela 1.

Para comparação entre a expressão gênica e a contagem de leucócitos nos paciente com COVID-19, os dados foram estratificados em três grupos: menos de 4.000 leucócitos por mm^3 , para pacientes com leucopenia; entre 4.000 e 10.000 leucócitos por mm^3 , para pacientes dentro dos valores de normalidade e, pacientes com mais de 10.000 leucócitos por mm^3 para os quadros de leucocitose. No entanto, apesar de ser notado uma maior expressão dos genes *PTAFR* e *PF-4* em alguns pacientes, quando comparados aos demais, estratificados no grupo com leucometria entre 4.000 a 10.000/ mm^3 e superior a 10.000/ mm^3 , nenhuma diferença significativa foi observada ($p>0,05$) (FIGURA 7).

Figura 7 – Análise comparativa entre a expressão de *PTAFR* e *PF-4* nos pacientes com COVID-19 relacionada com a contagem de leucócitos



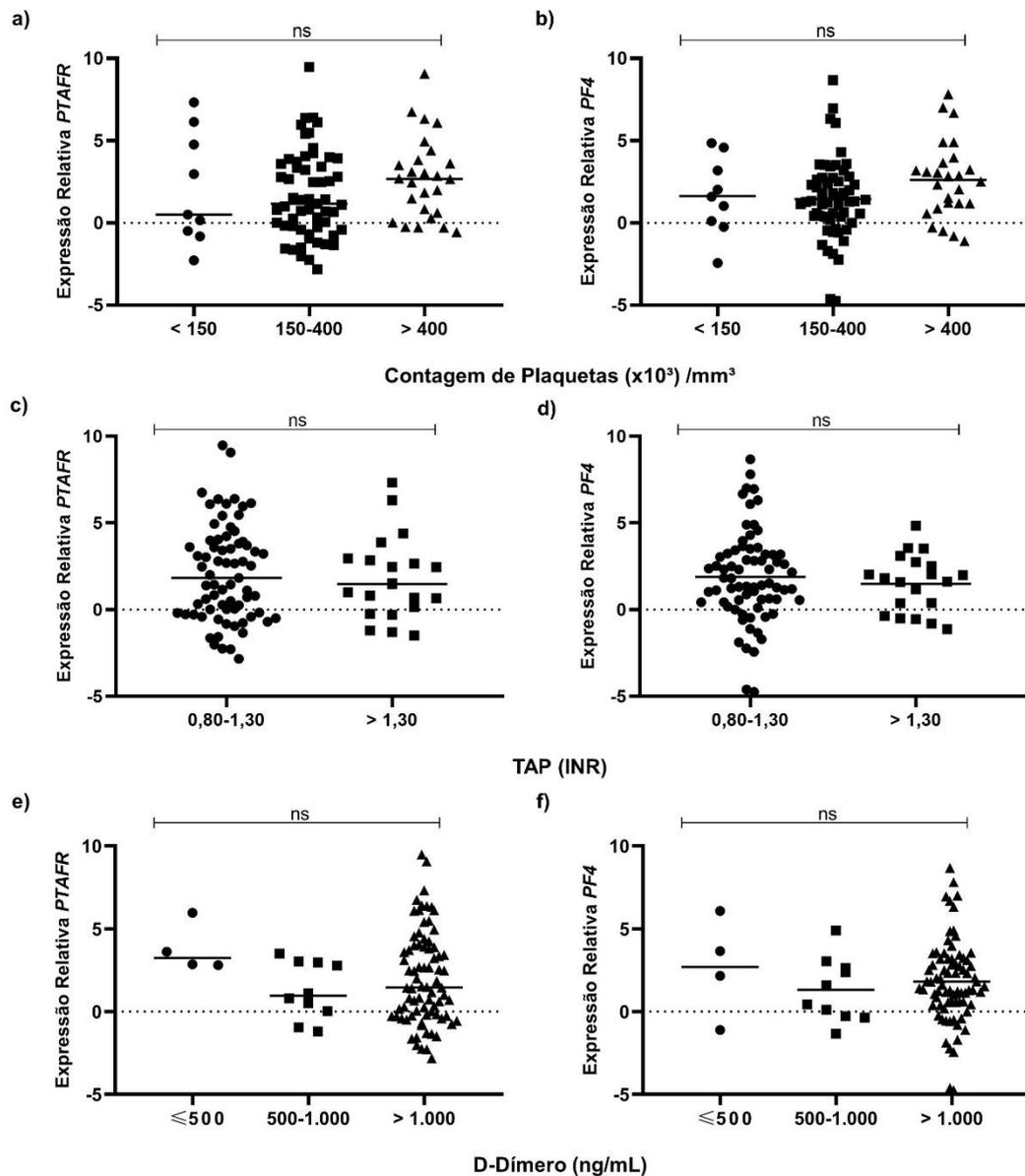
Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Os dados são apresentados pela média e mediana da correlação entre a expressão gênica dos pacientes com COVID-19 hospitalizados e a variável abordada, onde cada ponto do gráfico representa os valores de expressão de uma única amostra. **a)** Comparação da expressão de *PTAFR* e a leucometria. **b)** Comparação da expressão de *PF-4* e a leucometria. As comparações estatísticas foram realizadas pelos testes de Kruskal-Wallis, seguindo do teste de comparação múltipla de Dunn e pela ANOVA e pós-teste de Bonferroni, respectivamente. $p>0,05$. ns, não significativo.

Quanto a avaliação comparativa da expressão entre os genes plaquetários *PTAFR* e *PF-4* e a sua correlação com os parâmetros da coagulação, estratificamos esses dados com base na contagem de plaquetas, TAP (INR) e D-dímero. Estes ainda, foram separados em subgrupos, no qual, o primeiro foi dividido em: menos que 150.000 plaquetas por mm^3 , para as trombocitopenias; entre 150.000 a 400.000, para pacientes dentro do valor de referência e, mais que 400.00 plaquetas por mm^3 , para os casos de trombocitoses. O segundo, foi classificado em

INR entre 0,80 a 1,30 para pacientes dentro da faixa de normalidade e maior de 1,30 para indivíduos com esse parâmetro prolongado. Porém, nenhuma significância estatística foi obtida de ambas as análises ($p>0,05$) (FIGURA 8).

Figura 8 – Comparação entre as distribuições das variáveis plaquetárias e a expressão dos genes *PTAFR* e *PF-4* em pacientes com COVID-19 hospitalizados



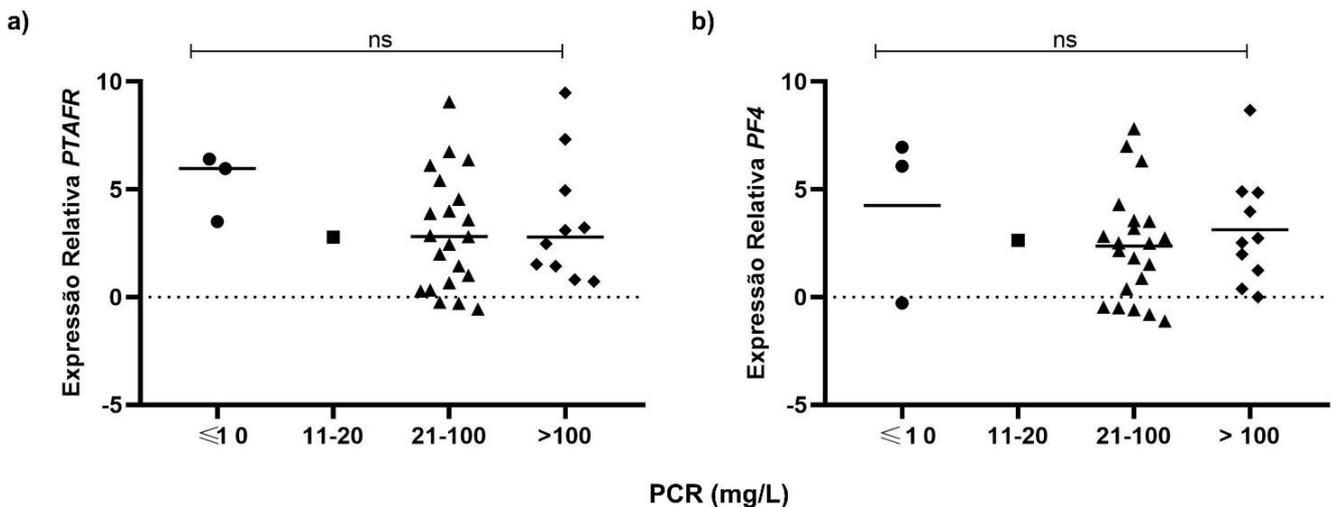
Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: As análises são representadas pela média e mediana da correlação da expressão gênica com os parâmetros laboratoriais plaquetários, onde cada ponto do gráfico representa os valores de expressão de uma única amostra. **a)** e **b)** Comparação da expressão dos genes *PTAFR* e *PF-4* com a contagem de plaquetas. **c)** e **d)** Comparação da expressão dos genes *PTAFR* e *PF-4* com os valores de TAP baseado no INR dos pacientes. **e)** e **f)** Comparação da expressão dos genes *PTAFR* e *PF-4* com os valores de D-dímero. Para as comparações do TAP (INR) foram utilizados o teste de Mann-Whitney e o teste t de Student, respectivamente. Para análise da contagem de plaquetas e do D-dímero foi utilizado os testes de Kruskal-Wallis, seguindo do teste de comparação múltipla de Dunn e pela ANOVA e pós-teste de Bonferroni. $p>0,05$. ns, não significativo.

No mesmo contexto, conforme apresentado na Figura 8, os valores de DDM foram apresentados como: menor ou igual a 500 ng/mL para pacientes dentro dos valores aceitáveis; entre 501 a 1.000 e maiores que 1.000 ng/mL, no qual, apesar de ambos estarem acima da faixa de referência, somente o último é associado a um contexto clínico mais grave e a um prognóstico desfavorável. No entanto, apesar da maior expressão dos genes em estudo observada em alguns pacientes com valores de D-dímero superior a mil, nenhuma diferença significativa foi demonstrada ($p>0,05$).

Também, selecionamos a proteína C reativa como marcador inflamatório para a análise comparativa com a expressão dos genes de interesse. No qual, valores séricos menores que 10 mg/L caracterizam uma infecção leve; entre 21-40 podem indicar um nível de dano tecidual reversível e, valores maiores que 100 mg/L já representa um dano tecidual avançado. Neste contexto, é notado uma maior expressão tanto do *PTAFR*, quando do *PF-4* em pacientes com PCR entre 21 e 100 mg/L e superiores a cem, entretanto, não houve correlação significativa ($p>0,05$) (FIGURA 9).

Figura 9 – Análise comparativa entre a expressão de *PTAFR* e *PF-4* nos pacientes com COVID-19 relacionada aos valores da proteína C reativa



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Os dados são apresentados pela média e mediana da correlação entre a expressão gênica e a distribuição dos valores da PCR em pacientes com COVID-19 hospitalizados, onde cada ponto do gráfico representa os valores de expressão de uma única amostra. **a)** Comparação entre a expressão de *PTAFR* e a PCR. **b)** Comparação da expressão de *PF-4* e a PCR. As comparações estatísticas foram realizadas pelos testes de Kruskal-Wallis, seguindo do teste de comparação múltipla de Dunn e pela ANOVA e pós-teste de Bonferroni, respectivamente. $p>0,05$. ns, não significativo.

5 DISCUSSÃO

Apesar das plaquetas serem consideradas as principais células efectoras da hemostasia, seu papel nas respostas imunológicas aos processos de infecção e inflamação são bastante discutidos. Em condições de hiperatividade, essas células podem atuar negativamente quando associadas a uma resposta trombótica. Alguns estudos descreveram a atividade das plaquetas atuando pró infecções virais tanto no transporte de suas partículas, como no aumento da inflamação, levando a um estado hiperinflamatório e uma consequente piora clínica (MIDDLETON; WEYRICH; ZIMMERMAN, 2016; KOUPENOVA *et al.*, 2018).

Recentemente, outros estudos demonstram níveis aumentados de agregação plaquetária, marcadores de coagulação elevados e tromboembolismo pulmonar em pacientes com quadros graves da COVID-19, além de já correlacionarem essas variações de prognóstico clínico a influência de fatores genéticos (BISWAS *et al.*, 2022; HOTTZ *et al.*, 2020; LIPSITCH *et al.*, 2021; MANNE *et al.*, 2020; UZUN *et al.*, 2022).

Para apresentação dos parâmetros clínicos-epidemiológicos dos pacientes com COVID-19 hospitalizados, dividimos as suas características clínicas em relação aos gêneros feminino e masculino, devido as correlações de influências ligadas ao sexo biológico como fator de risco na infecção pelo SARS-CoV-2 (FERRETTI *et al.*, 2022; JIN *et al.*, 2020).

Nesse contexto, observamos uma predominância da doença em homens (66,7%), com idade média de 57,9 anos (18-89). Em concordância com o nosso trabalho, Li *et al.* (2020) descreveu uma mediana de idade de 59 anos, variando entre 15 a 89 anos e, dentre esses, 56% eram do sexo masculino. A suscetibilidade reduzida das mulheres nas infecções virais é atribuída a expressão gênica ligada ao cromossomo X e aos hormônios sexuais, que desempenham um papel importante na imunidade inata e adaptativa (HAITAO *et al.*, 2020; JAILLON *et al.*, 2019).

Ademais, nenhuma admissão de pacientes com idade inferior a 15 anos foi realizada no período em estudo. Essa ausência seria justificada pelas condições impostas pela pesquisa dentro do contexto de gravidade clínica e internação. Uma vez que, crianças podem ser menos propensas a infecção por esse vírus, além de apresentarem sintomas mais leves, sendo responsável por essa sub-representação na contagem de casos confirmados (LI *et al.*, 2020).

Já quando os sinais e sintomas da internação foram avaliados, dispneia, tosse, mialgia, febre e cefaleia foram os mais comuns. Semelhanças de características clínicas foram descritas por Chen *et al.* (2020) e Huang *et al.* (2020), onde a maioria dos pacientes apresentaram febre, tosse, mialgia e dispneia nessa ordem de frequência. No entanto, nenhum deles mencionou a cefaleia como um dos sintomas mais comuns. Ainda, é apontado que internados na UTI foram mais propensos a relatar dispneia, sendo mais comum em pacientes críticos e, o início do sintoma pode ser marcador de um prognóstico negativo (WANG *et al.*, 2020).

Quanto as comorbidades apresentadas, a hipertensão arterial foi a mais comum, seguida de diabetes e obesidade. O mesmo foi visto por Richardson *et al.* (2020) e Khourssaji *et al.* (2020) em seus estudos de apresentação clínica de pacientes hospitalizados com a doença. Bem como, conforme relatado por Zhou *et al.* (2020), as doenças de base presentes em pacientes com COVID-19 aumentaram os riscos de mortalidade. Além disso, a hipertensão, seguida da diabetes e das doenças coronarianas, foram descritas como as doenças de base mais comuns em casos fatais de pneumonia pelo SARS-CoV-2 (VARGA *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020).

Dos 93 pacientes, 60 (64,5%) foram admitidos na UTI devido a necessidades de intervenções cirúrgicas ou devido a complicações da COVID-19, dentre estes, um total de 36 eram do sexo masculino. Além de ter sido observado um tempo médio de internação maior para esse gênero. Nesse contexto, vale ressaltar que os homens estão mais propensos a se envolverem em maus comportamentos de saúde – como o tabagismo e consumo de álcool – e apresentarem taxas mais altas de comorbidades pré-existentes que são associadas a um prognóstico desfavorável da COVID-19 (FERRETTI *et al.*, 2022; HAITAO *et al.*, 2020; JAILLON *et al.*, 2019).

Para as análises comparativas de acordo com as estratificações dos grupos de risco foi observado uma influência significativa da idade em relação ao desfecho, no qual, pacientes com idade entre 15 e 44 anos apresentaram um maior índice de alta hospitalar, enquanto, aqueles com idade superior ou igual a 65 anos tiveram pior prognóstico. O mesmo foi visto entre essa variável e o gênero, onde a doença foi mais frequente em mulheres mais velhas (≥ 65 anos) e em homens mais jovens com idade entre 15 a 44 anos. No entanto, em nosso estudo, a idade não foi um fator que influenciou a unidade de internação, uma vez que, os pacientes admitidos na UTI estavam proporcionalmente distribuídos entre os três grupos etários ($p > 0,05$).

Os grupos etários do estudo foram distribuídos de acordo com a descrição de Li *et al.* (2020). Em conformidade com nossos dados, alguns autores apontam a idade avançada como um dos fatores de risco para o óbito intra-hospitalar, como também, a associam à morte em pacientes com COVID-19. No qual, defeitos dependentes da idade na função das células T e B, e o aumento da produção de citocinas, podem levar a uma falha no controle da replicação viral e a uma consequente resposta pró-inflamatória exacerbada, levando a um desfecho desfavorável (OPAL; GIRARD; ELY, 2005; YANEZ *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020).

Ainda, em comparação com o número de casos aumentado em mulheres com 65 anos ou mais, é visto que apesar da idade avançada, as mulheres apresentam uma menor mortalidade. Essa disparidade de gênero está associada a impressões genéticas e as alterações hormonais presentes em idosos, sendo caracterizados como preditores de desfechos clínicos mais graves (FERRETTI *et al.*, 2022; SALONIA *et al.*, 2021). Em contrapartida com a nossa equivalência de distribuição de idade entre as unidades de internação, o estudo de Wang *et al.* (2020) descreve um maior número de admissões na UTI associado a pacientes mais velhos em comparação com aqueles não admitidos.

Entre os parâmetros laboratoriais abordados no estudo, as anormalidades comumente observadas foram a contagem de leucócitos, níveis de PCR e de DDM elevados. Embora alguns estudos apontem a leucopenia com frequência em pacientes com COVID-19 (GUAN *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2020), uma análise comparativa realizada com 52 pacientes internados que apresentaram leucocitose, demonstrou uma maior propensão ao desenvolvimento de doença grave, em decorrência a uma elevada resposta inflamatória sistêmica, resultando em uma maior probabilidade de internação em UTI e uma alta taxa de mortalidade (ZHAO *et al.*, 2020). Corroborando com um de nossos dados, no qual, a presença de valores da leucometria maior que 10.000 leucócitos /mm³ estiveram mais associados ao óbito.

Quanto a contagem de plaquetas, a estratificação dos grupos foi realizada conforme apresentado por Esmaeel *et al.* (2022). Ao relacionamos a distribuição dessas células aos tipos de internação e gênero, nenhuma estatística significativa foi obtida ($p > 0,05$). Embora a maioria dos pacientes em estudo apresentassem contagem de plaquetas dentro da faixa de normalidade (150.000-400.000 plaquetas /mm³), foi observado que estes tiveram melhor evolução clínica, quando comparado aos com quadros de trombocitopenias e as trombocitoses – com valores

$<150.000 /\text{mm}^3$ e $>400.000 /\text{mm}^3$, respectivamente – correlacionando-se com os números de óbitos ($p<0,0001$).

Na literatura é descrito que as condições inflamatórias intensas causadas pela COVID-19 ocasionam uma interrupção na hemostasia, afetando significativamente os parâmetros de coagulação, além desse comprometido ter sido associado a alta taxa de complicações trombóticas (ELBADRY *et al.*, 2020; FEI *et al.*, 2020; PANIGADA *et al.*, 2020). Um estudo de coorte retrospectivo mostrou que pacientes falecidos com a doença tinham maiores alterações na coagulação em relação aos sobreviventes, podendo ser um indicador eficiente para predizer o prognóstico desses pacientes e orientar o manejo clínico (QUINTANA-DÍAZ *et al.*, 2020).

Vários estudos apresentam uma menor proporção de trombocitose do que de trombocitopenia em pacientes com COVID-19, e geralmente mostram que as manifestações mais graves estão associadas a contagens de plaquetas mais baixas (BAZZAN *et al.*, 2020; CANZANO *et al.*, 2021; GUAN *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2020). Além disso, apesar de pacientes com plaquetas elevadas terem apresentado melhor sobrevida, estes, são mais propensos a ter uma duração mais longas dos sintomas da doença e uma frequência significativa de eventos trombóticos (LUCIJANIC *et al.*, 2021).

A proteína C reativa é um marcador de inflamação aguda produzido no fígado em resposta a citocinas inflamatórias (MARNELL; MOLD; DU CLOS, 2020; MORTENSEN, 2001). Os níveis dessa proteína acima do valor de referência foram predominantes em nossos grupos de estudo e, embora, seja visto na literatura que a elevação da PCR esteja relacionada a uma maior mortalidade (SMILOWITZ *et al.*, 2021), nenhuma correlação significativa foi observada quando comparada ao desfecho clínico.

Do mesmo modo, quando correlacionamos os níveis séricos da PCR com o gênero, nenhuma influência estatística foi vista. Semelhante ao que foi mostrado por Wang (2020) em um estudo retrospectivo, no qual, as suas concentrações não foram afetadas por fatores como idade, sexo e condição física. No entanto, no estágio inicial da COVID-19, os níveis de PCR formam positivamente relacionados a lesão pulmonar, podendo ser usado como indicador de monitoramento da doença. Porém, os seus níveis elevados foram significativamente associados ao tipo de internação. Em conformidade com o estudo de Sharifpour *et al.* (2020), que além da associação dos valores da PCR com o aumento das chances de mortalidade, é apontado que a

sua taxa de elevação durante os primeiros sete dias de internação pode ser uma ferramenta útil para prever a progressão da doença e a necessidade de transferência para UTI, podendo ser um marcador sérico de agravamento em pacientes com COVID-19. Como também, valores de PCR consistentemente aumentados, podem ser indicativos de infecções bacterianas na fase inicial da COVID-19 (PINK *et al.*, 2021).

Não houveram correlações significativas quando comparamos os valores de TAP baseado no INR com as variáveis de unidade de internação e gênero. Apesar desses mesmos valores terem sido significativos quando correlacionados ao desfecho clínico, demonstrando uma maior mortalidade em pacientes com INR prologado. Conforme ao que foi relatado em um estudo de correlação entre coagulopatia e gravidade da doença, onde níveis significativamente mais altos de INR e D-dímero foram observados em pacientes com doenças trombóticas e no grupo de óbito, sugerindo que a morte desses pode estar associada à coagulação intravascular disseminada (JIN *et al.*, 2020).

O D-dímero é produto da degradação da fibrina, um pequeno fragmento de proteína que é liberado durante o processo de fibrinólise. Seus níveis elevados indicam a existência de um estado hiper-coagulável, extremamente útil para a identificação das doenças trombóticas (ADAM *et al.*, 2009). Em nosso estudo, a maioria dos pacientes tinham os valores desse parâmetro elevados, no qual, níveis superiores a 1.000 ng/mL esteve mais presente em pacientes internados na UTI.

De acordo com o exposto por Huang *et al.* (2020), os valores de DDM na admissão foram mais elevados em pacientes da UTI. Ainda, os níveis desse parâmetro acima de 1.000 ng/mL foram associados a maiores chances de morte intra-hospitalar. Nesse contexto, os mecanismos contribuintes incluem as respostas sistêmicas desproporcional de citocinas que promovem a inflamação local, a indução de eventos pró-coagulantes e as alterações hemodinâmicas que predispõem a trombose, sendo indicado como um potencial marcador de prognóstico precoce de casos graves (LI *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020). Além disso, os níveis de D-dímero em nosso estudo, não influenciaram o desfecho clínico e nem esteve ligado ao gênero. Contudo, é notado que mesmo não sendo apontando nenhum nível de significância relacionada ao desfecho, um maior número de óbitos em pacientes com DDM elevado é descrito, onde é fortemente relacionado à um maior risco de morte quando relacionado a idade avançada, ao sexo masculino e a presença de doenças de base (HE *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*,

2020). No entanto, devido ao número relativamente pequeno nesse grupo, uma amostra maior é necessária para apoiar essa conclusão.

Ainda, no presente estudo, demonstramos que os níveis tanto do *PTAFR*, quanto do *PF-4* são significativamente hiperexpressos em pacientes hospitalizados com COVID-19, em comparação com indivíduos saudáveis. Assim, sustentando a hipótese de que esses genes estão associados aos casos mais graves de infecção pelo SARS-CoV-2 e podem servir como biomarcadores de estratificação de risco da doença, como também, poderiam viabilizar uma nova abordagem terapêutica e o reaproveitamento farmacológico.

Mesmo diante do restrito número de trabalhos descrevendo a atuação de *PAF* e do seu receptor frente à COVID-19, sua assinatura é observada em diversos processos infecciosos e inflamatórios. Níveis elevados de *PAF* foram relatados em rinites alérgicas (LABRAKIS-LAZANAS *et al.*, 1988) e urticárias crônicas (ULAMBAYAR *et al.*, 2019). Como também, a participação do receptor de *PAF* (*PTAFR*) na entrada dos vírus H1N1 (SWORDS *et al.*, 2001) e do HIV (KELESIDIS *et al.*, 2016) nas células hospedeiras.

Recentemente, a expressão diferencial desse gene foi também descrita em casos graves de crianças com infecção pelo vírus sincicial respiratório (DAPAT *et al.*, 2021). Como também, é visto uma expressão de *PTAFR* induzida pela infecção por rinovírus (GREILLER *et al.*, 2019). Ainda, *PAF* e seu receptor são conhecidos por estar envolvido no vírus da dengue, onde o bloqueio de *PTAFR* em modelo animal e a administração de seu antagonista previu manifestações mais graves da doença (SOUZA *et al.*, 2009).

Uma semelhança notável entre a apresentação clínica da COVID-19 e da dengue é descrita por Henrina *et al.* (2020), sugerindo uma via inflamatória em comum nessas doenças. Dentro desse contexto e das características plaquetárias e trombóticas presentes nas infecções pelo SARS-CoV2, é destacado a CXCL4 (PF-4) como umas das principais citocinas liberadas pelas plaquetas ativadas em respostas as infecções. Tratando-se de um evento marcante nas infecções virais pelo HIV, hepatite C, H1N1 e dengue (AFDHAL *et al.*, 2008; CHAIPAN *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2017; OJHA *et al.*, 2017).

Ainda, as plaquetas circulantes podem ser ativadas tanto pela ligação direta ao vírus, quanto pela resposta inflamatória do hospedeiro, aumentando assim, o risco de trombocitopenia (BOUWMAN *et al.*, 2002; ZAPATA; COX; SALVATO, 2014), muito parecido com o contexto clínico apresentando pelos pacientes com a COVID-19 (GUAN *et al.*, 2020; YANG

et al., 2020). Além disso, a liberação de PF-4 pelos grânulos α das plaquetas contribui com a formação do coágulo e a progressão da trombose, neutralizando os efeitos anticoagulantes da heparina no endotélio vascular (ESLIN *et al.*, 2004), desempenhando um importante papel no desenvolvimento da inflamação tecidual (BRANDT *et al.*, 1989; DEUEL *et al.*, 1981).

Outros estudos apontam a presença dessa citocina aumentada no plasma de pacientes com dengue, bem como, foi associada as infecções pelo H1N1, onde a deleção do *PF-4* resultou em uma diminuição da depuração viral, diminuindo a inflamação pulmonar em murinos (GUO *et al.*, 2017; TRUGILHO *et al.*, 2017). Em conformidade com os achados do nosso trabalho, e apoiando a utilidade do *PF-4* como indicador de gravidade das infecções virais, Ojha *et al.* (2019), descreveu a relação dessa citocina plaquetária com o aumento da propagação do vírus da dengue. No qual, foi observado a presença de concentrações levadas de PF-4 sérico, associada a uma replicação significativamente aumentada do vírus em monócitos *in vitro*, bem como, mostraram que partículas virais recém sintetizadas em monócitos em incubação eram capazes de infectar células em cultura, indicando ainda a formação de complexos PF4-heparina induzindo à trombocitopenia durante a fase inicial da infecção.

Desse modo, o papel dessa proteína é associado a intensificação da propagação e infecção da dengue. Além de ser sugerida a utilização desses mecanismos mediados pelo *PF-4* em outras infecções virais (OJHA *et al.*, 2019). Além disso, o estudo de Eslin *et al.* (2004), realizado em camundongos geneticamente modificados que superexpressam o *PF-4* humano, mostrou uma forte contribuição desse gene para a evolução da trombose arterial. Entretanto, estudos posteriores relacionado o papel de *PF-4* e as infecções pelo SARS-CoV-2 são necessários para apoiar os dados expostos nesse trabalho.

Ademais, durante a análise individual, foi observado que o paciente que não expressou o gene *PF-4* possuía plaquetas diminuídas e pior desfecho clínico. Uma justificativa para esse achado é descrita por alguns autores e, é compatível com uma condição genética rara ligada a deficiência total ou parcial dos grânulos α das plaquetas, denominada Síndrome das Plaquetas Cinzentas (SPC) (NURDEN *et al.*, 2007; RACCUGLIA *et al.*, 1971).

Em pacientes com a SPC, diferentes autores demonstraram a deficiência de proteínas armazenadas pelos grânulos α , incluindo as sintetizadas por megacariócitos, como, a PF-4 (GERRARD *et al.*, 1980; LAROCCA *et al.*, 2015; NURDEN *et al.*, 2007; WEISS *et al.*, 1979). Outro estudo ainda apontou que megacariócitos isolados de pacientes com a síndrome

podem conter esses grânulos, porém, eles não amadurecem durante a diferenciação dessas células, desse modo, permanecendo afuncional (NURDEN *et al.*, 2007).

Além disso, os pacientes com a doença exibem uma heterogeneidade tanto na gravidade do sangramento, quanto em sua resposta ao teste de função plaquetária. Sendo, geralmente, caracterizada por quadros de trombocitopenia, plaquetas grandes e hipogranulares, distúrbio hemorrágico de leve a moderado e coagulograma normal ou alterado (NURDEN *et al.*, 2007; RACCUGLIA *et al.*, 1971; WEISS *et al.*, 1979). Todavia, devido a particularidade desse paciente e a falta de informações concisas nos dados do prontuário, estudos complementares são necessários para a confirmação dessa condição genética.

Ademais, apesar da expressão gênica diferencial vista nos pacientes em estudo, não houve correlação significativa quando comparamos as expressões relativas desses genes com os grupos epidemiológicos e clínicos. Além de uma discussão dificultada pela escassez de dados na literatura que apoiem essa interação.

De modo que, os testes estatísticos não significativos não necessariamente descartam a diferença entre os pacientes e os grupos comparados no estudo, uma vez que, foi um período de colapso no sistema de saúde, especialmente pela falta de leitos. Apesar disso, nosso trabalho demonstrou várias características clínicas importantes para a estratificação de risco em pacientes com a forma grave da doença. Bem como, a relevância e a relação da presença desses marcadores no contexto das infecções e inflamações é constantemente citado em várias doenças e comumente associadas a uma condição clínica mais grave, podendo também, comporta-se como um importante preditor precoce de gravidade em pacientes com COVID-19, além de auxiliar no direcionamento e reaproveitamento de fármacos com potencial inibitório dos sítios de ligação dessas proteínas.

6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A COVID-19 é comumente leve e autolimitada, mas em uma parcela dos pacientes a doença pode ser grave e fatal. Determinar quais pacientes estão mais propensos a doença grave ou a mortalidade é essencial para a tomada de decisões clínicas apropriadas. Nesse contexto, as plaquetas associadas à variabilidade genética são apontadas como importantes marcadores de gravidade e de piora clínica.

É visto que pacientes com parâmetros plaquetários alterados apresentam quadros críticos da doença, com a ocorrência de eventos trombóticos e uma resposta inflamatória desregulada. Ainda, mesmo após o desenvolvimento das vacinas é acompanhado o surgimento de alguns novos casos e uma taxa de mortalidade considerável na região Nordeste, sugerindo a influência de fatores genéticos nessa população.

Todavia, algumas limitações presentes em nosso trabalho podem justificar os contratempos encontrados. Primeiro, alguns pacientes admitidos nos hospitais do estudo foram transferidos de outras unidades, conseqüentemente, alguns históricos médicos não eram conhecidos. Além disso, devido ao surto pandêmico, nem todos os prontuários foram alimentados detalhadamente. Como também, foi notado que nem todas as comorbidades e informações clínicas do momento admissional foram descritas.

Em segundo lugar, devido à falta de dados, alguns pacientes foram excluídos do estudo, limitando assim nosso n amostral. Em terceiro lugar, a falta de padronização das datas exatas de realização dos exames laboratoriais pode ter inevitavelmente afetado a nossa avaliação, de modo que, uma coleta padronizada em uma coorte maior ajudaria a definir melhor a apresentação clínica e os fatores de risco.

Em quarto lugar, alguns pacientes foram hospitalizados por causas adjacentes e contraíram a COVID-19 no período de hospitalização, podendo a gravidade da doença estar associada a um sistema imune que já estava comprometido, sendo a interpretação de nossos achados mais limitada e de difícil avaliação dos fatores de risco do hospedeiro para a gravidade da doença e mortalidade. Além disso, nossa população de estudo foi toda hospitalar, caracterizando um contexto mais crítico da COVID-19. Em quinto lugar, a maioria dos pacientes já estavam em tratamento medicamentoso tanto antes da admissão, como durante, o que pode ter afetado os achados laboratoriais.

7 CONCLUSÃO

Em nosso estudo, o gênero masculino, a idade avançada e a dispneia foram consideradas fatores de gravidade para a doença. Ainda, demonstramos que a contagem de leucócitos e de plaquetas, e os níveis de PCR, INR e D-dímero são parâmetros importantes para o monitoramento e prognóstico da doença.

Além disso, é visto que *PTAFR* e *PF-4* representam um potencial mecanismo fisiopatológico para a COVID-19 grave devido as suas atuações nas vias de sinalização inflamatórias e trombóticas, contribuindo com as condições de gravidade da doença. Bem como, mostramos a hiperexpressão desses genes em pacientes com necessidade de atenção médica hospitalar, podendo ser um importante marcador de risco associado a um contexto clínico mais grave. No entanto, pesquisas adicionais são necessárias para validar tanto a relação de *PTAFR*, quanto a de *PF-4* na COVID-19, bem como a sua predição de gravidade.

Desse modo, o entendimento do potencial infectante do vírus e das variações genéticas associadas aos quadros graves da doença auxiliariam na compreensão da tromboinflamação e na determinação de virulência desse patógeno, estratificando os perfis de risco e viabilizando o reaproveitamento medicamentoso.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, Maximilian et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 2, p. 120-128, 2020.
- ADAM SS, KEY NS, GREENBERG CS. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. **Blood**, The Journal of the American Society of Hematology. 2009 Mar 26;113(13):2878-87.
- AFDHAL, Nezam et al. Thrombocytopenia associated with chronic liver disease. **Journal of hepatology**, v. 48, n. 6, p. 1000-1007, 2008.
- ALEMAN, Adolfo et al. Variable cellular responses to SARS-CoV-2 in fully vaccinated patients with multiple myeloma. **Cancer cell**, v. 39, n. 11, p. 1442-1444, 2021.
- ALEVIZOS, Michail et al. Rupatadine inhibits inflammatory mediator release from human laboratory of allergic diseases 2 cultured mast cells stimulated by platelet-activating factor. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 111, n. 6, p. 542-547, 2013.
- ANASTASSOPOULOU, Cleo et al. Human genetic factors associated with susceptibility to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease severity. **Human genomics**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2020.
- ANTONIAK, Silvio; MACKMAN, Nigel. Platelets and viruses. **Platelets**, v. 32, n. 3, p. 325-330, 2021.
- ASSINGER, Alice et al. Human Cytomegalovirus–platelet interaction triggers toll-like receptor 2–dependent proinflammatory and proangiogenic responses. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 34, n. 4, p. 801-809, 2014.
- ASSINGER, Alice. Platelets and infection—an emerging role of platelets in viral infection. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 649, 2014.
- AUERBACH, David J. et al. Identification of the platelet-derived chemokine CXCL4/PF-4 as a broad-spectrum HIV-1 inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 24, p. 9569-9574, 2012.
- BAO, Changqian et al. SARS-CoV-2 induced thrombocytopenia as an important biomarker significantly correlated with abnormal coagulation function, increased intravascular blood clot risk and mortality in COVID-19 patients. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2020.
- BARRETT, Tessa J. et al. Platelets contribute to disease severity in COVID-19. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 19, n. 12, p. 3139-3153, 2021.
- BAZZAN, Mario et al. Low ADAMTS 13 plasma levels are predictors of mortality in COVID-19 patients. **Internal and Emergency Medicine**, v. 15, p. 861-863, 2020.
- BENVENISTE, Jacques; HENSON, Peter M.; COCHRANE, Charles G. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets the role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. **Journal of Experimental Medicine**, v. 136, n. 6, p. 1356-1377, 1972.

- BISWAS, Mohitosh et al. Pharmacogenetics and precision medicine approaches for the improvement of COVID-19 therapies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2022.
- BLAIR, Price; FLAUMENHAFT, Robert. Platelet α -granules: basic biology and clinical correlates. **Blood reviews**, v. 23, n. 4, p. 177-189, 2009.
- BÖSMÜLLER, Hans et al. The evolution of pulmonary pathology in fatal COVID-19 disease: an autopsy study with clinical correlation. **Virchows Archiv**, v. 477, n. 3, p. 349-357, 2020.
- BOUWMAN, J. J. M. et al. Procoagulant and inflammatory response of virus-infected monocytes. **European journal of clinical investigation**, v. 32, n. 10, p. 759-766, 2002.
- BOWLES, Louise et al. Lupus anticoagulant and abnormal coagulation tests in patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 3, p. 288-290, 2020.
- BRANDT, E. et al. Characterization of a platelet derived factor modulating phagocyte functions and cooperating with interleukin 1. **Lymphokine Research**, v. 8, n. 3, p. 281-287, 1989.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico Especial: Doença pelo Coronavírus – COVID-19**. Brasília, 2022. Disponível em: www.saude.gov.br/svs. Acesso em: 21 de outubro de 2022.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611– 622, 1 abr. 2009.
- CANZANO, Paola et al. Platelet and endothelial activation as potential mechanisms behind the thrombotic complications of COVID-19 patients. **Basic to Translational Science**, v. 6, n. 3, p. 202-218, 2021.
- CAO, Xuetao. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. **Nature reviews immunology**, v. 20, n. 5, p. 269-270, 2020.
- CHAIPAN, Chawaree et al. DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets. **Journal of virology**, v. 80, n. 18, p. 8951-8960, 2006.
- CHEN, Nanshan 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, 2020.
- CHILAMAKURI, Rameswari; AGARWAL, Saurabh. COVID-19: Characteristics and Therapeutics. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 206, 2021.
- CHOW, Jonathan H. et al. Aspirin use is associated with decreased mechanical ventilation, intensive care unit admission, and in-hospital mortality in hospitalized patients with coronavirus disease 2019. **Anesthesia & Analgesia**, v. 132, n. 4, p. 930-941, 2021.
- CLAUSEN, Thomas Mandel et al. SARS-CoV-2 infection depends on cellular heparan sulfate and ACE2. **Cell**, v. 183, n. 4, p. 1043-1057. e15, 2020.
- CONNORS, Jean M.; LEVY, Jerrold H. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 135, n. 23, p. 2033-2040, 2020.

- DA SILVA-JR, I. A. et al. Platelet-activating factor (PAF) receptor as a promising target for cancer cell repopulation after radiotherapy. **Oncogenesis**, v. 6, n. 1, p. e296-e296, 2017.
- DAPAT, Clyde et al. Gene signature of children with severe respiratory syncytial virus infection. **Pediatric Research**, v. 89, n. 7, p. 1664-1672, 2021.
- DARIF, Dounia et al. The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong?. **Microbial Pathogenesis**, p. 104799, 2021.
- DE Priyasha et al. Brief review on repurposed drugs and vaccines for possible treatment of COVID-19. **European Journal of Pharmacology**, p. 173977, 2021.
- DELABRANCHE, Xavier; HELMS, Julie; MEZIANI, Ferhat. Immunohaemostasis: a new view on haemostasis during sepsis. **Annals of intensive care**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.
- DEMOPOULOS, Constantinos A. Is Platelet-Activating Factor (PAF) a missing link for elucidating the mechanism of action of the coronavirus SARS-CoV-2 and explaining the side effects-complications of Covid-19 disease? 2020.
- DEMOPOULOS, Constantinos; ANTONOPOULOU, Smaragdi; THEOHARIDES, Theoharis C. COVID-19, microthromboses, inflammation, and platelet activating factor. **Biofactors**, v. 46, n. 6, p. 927-933, 2020.
- DEUEL, Thomas F. et al. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 7, p. 4584-4587, 1981.
- DEUTSCH, Erwin; JOHNSON, Shirley A.; SEEGERS, Walter H. Differentiation of certain platelet factors related to blood coagulation. **Circulation Research**, v. 3, n. 1, p. 110-115, 1955.
- DEVAUX, Christian A.; ROLAIN, Jean-Marc; RAOULT, Didier. ACE2 receptor polymorphism: Susceptibility to SARS-CoV-2, hypertension, multi-organ failure, and COVID-19 disease outcome. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 53, n. 3, p. 425-435, 2020.
- DHAMA, Kuldeep et al. Coronavirus disease 2019–COVID-19. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 4, 2020.
- DHAMA, Kuldeep et al. Coronavirus disease 2019–COVID-19. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 4, p. 10.1128/cmr. 00028-20, 2020.
- EGGERT, Dawn et al. Development of a platelet-activating factor antagonist for HIV-1 associated neurocognitive disorders. **Journal of neuroimmunology**, v. 213, n. 1-2, p. 47-59, 2009.
- ELBADRY, Mahmoud I. et al. Unusual pattern of thrombotic events in young adult non-critically ill patients with COVID-19 may result from an undiagnosed inherited and acquired form of thrombophilia. **British Journal of Haematology**, v. 196, n. 4, p. 902-922, 2022.
- ELHABYAN, Abdelazeem et al. The role of host genetics in susceptibility to severe viral infections in humans and insights into host genetics of severe COVID-19: A systematic review. **Virus research**, v. 289, p. 198163, 2020.

- ESLIN, Don E. et al. Transgenic mice studies demonstrate a role for platelet factor 4 in thrombosis: dissociation between anticoagulant and antithrombotic effect of heparin. **Blood**, v. 104, n. 10, p. 3173-3180, 2004.
- ESMAEEL, Hend M. et al. Coagulation parameters abnormalities and their relation to clinical outcomes in hospitalized and severe COVID-19 patients: prospective study. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 13155, 2022.
- FEI, Yang et al. Coagulation Dysfunction A Hallmark in COVID-19. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 144, n. 10, p. 1223-1229, 2020.
- FERRETTI, Virginia V. et al. Men with COVID-19 die. Women survive. **Maturitas**, v. 158, p. 34-36, 2022.
- FLANAGAN, Katie L. et al. SARS-CoV-2 vaccines: where are we now?. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 9, n. 10, p. 3535-3543, 2021.
- GARCIA, Cristiana C. et al. Platelet-activating factor receptor plays a role in lung injury and death caused by Influenza A in mice. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 11, p. e1001171, 2010.
- GAVRIATOPOULOU, Maria et al. Emerging treatment strategies for COVID-19 infection. **Clinical and experimental medicine**, v. 21, n. 2, p. 167-179, 2021.
- GERRARD, Jonathan M. et al. Biochemical studies of two patients with the gray platelet syndrome. Selective deficiency of platelet alpha granules. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 66, n. 1, p. 102-109, 1980.
- GHASEMIYEH, Parisa et al. A focused review on technologies, mechanisms, safety, and efficacy of available COVID-19 vaccines. **International immunopharmacology**, p. 108162, 2021.
- GOSHUA, George et al. Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. **The Lancet Haematology**, v. 7, n. 8, p. e575-e582, 2020.
- GREILLER, Claire L. et al. Vitamin D attenuates rhinovirus-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and platelet-activating factor receptor (PAFR) in respiratory epithelial cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 187, p. 152-159, 2019.
- GU, Sean X. et al. Thrombocytopeny and endotheliopathy: crucial contributors to COVID-19 thromboinflammation. **Nature Reviews Cardiology**, p. 1-16, 2020.
- GUAN, Wei-jie et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. **New England journal of medicine**, v. 382, n. 18, p. 1708-1720, 2020.
- GUO, L. et al. Critical role of CXCL4 in the lung pathogenesis of influenza (H1N1) respiratory infection. **Mucosal immunology**, v. 10, n. 6, p. 1529-1541, 2017.
- HAITAO, Tu et al. COVID-19 and sex differences: mechanisms and biomarkers. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2020. p. 2189-2203.
- HARTENIAN, Ella et al. The molecular virology of coronaviruses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 37, p. 12910-12934, 2020.

HE, Xiaokang et al. The poor prognosis and influencing factors of high D-dimer levels for COVID-19 patients. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1830, 2021.

HENRINA, Joshua et al. Coronavirus disease of 2019: a mimicker of dengue infection?. **SN Comprehensive Clinical Medicine**, v. 2, p. 1109-1119, 2020.

HENRY, Brandon Michael et al. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 58, n. 7, p. 1021-1028, 2020.

HOFFMANN, Markus et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **cell**, v. 181, n. 2, p. 271-280. e8, 2020.

HOTTZ, Eugenio D. et al. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. **Blood**, v. 136, n. 11, p. 1330-1341, 2020.

HUANG, Chaolin et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

JACKSON, Shaun P.; DARBOUSSET, Roxane; SCHOENWAELDER, Simone M. Thromboinflammation: challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 133, n. 9, p. 906-918, 2019.

JAILLON, Sébastien; BERTHENET, Kevin; GARLANDA, Cecilia. Sexual dimorphism in innate immunity. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 56, p. 308-321, 2019.

JIN, Jian-Min et al. Gender differences in patients with COVID-19: focus on severity and mortality. **Frontiers in public health**, p. 152, 2020.

JIN, Xin et al. The values of coagulation function in COVID-19 patients. **PLoS One**, v. 15, n. 10, p. e0241329, 2020.

JOSE, Ricardo J.; MANUEL, Ari. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 6, p. e46-e47, 2020.

KANG, Sisi et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 10, n. 7, p. 1228-1238, 2020.

KASPER, Brigitte; PETERSEN, Frank. Molecular pathways of platelet factor 4/CXCL4 signaling. **European journal of cell biology**, v. 90, n. 6-7, p. 521-526, 2011.

KEARNS, Pamela et al. Examining the immunological effects of COVID-19 vaccination in patients with conditions potentially leading to diminished immune response capacity—the OCTAVE trial. 2021.

KELESIDIS, Theodoros et al. The role of platelet-activating factor in chronic inflammation, immune activation, and comorbidities associated with HIV infection. **AIDS reviews**, v. 17, n. 4, p. 191, 2015.

- KESKI, Hakan. Hematological and inflammatory parameters to predict the prognosis in COVID-19. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 37, n. 4, p. 534-542, 2021.
- KHOURSSAJI, Mehdi et al. A biological profile for diagnosis and outcome of COVID-19 patients. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 58, n. 12, p. 2141-2150, 2020.
- KHOURY, David S. et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. **Nature medicine**, v. 27, n. 7, p. 1205-1211, 2021.
- KLEIN, Mark; DAO, Vinh; KHAN, Fatima. A Review of Platelet-Activating Factor As a Potential Contributor to Morbidity and Mortality Associated with Severe COVID-19. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 27, p. 10760296211051764, 2021.
- KOUPENOVA, Milka et al. Circulating platelets as mediators of immunity, inflammation, and thrombosis. **Circulation research**, v. 122, n. 2, p. 337-351, 2018.
- KOUPENOVA, Milka et al. The role of platelets in mediating a response to human influenza infection. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2019.
- KOUPENOVA, Milka; FREEDMAN, Jane E. Platelets and immunity: going viral. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 40, n. 7, p. 1605-1607, 2020.
- LABRAKIS-LAZANAS, K. et al. PAF of biological fluids in disease: blood levels in allergic rhinitis. **Haematologica**, v. 73, n. 5, p. 379-382, 1988.
- LAROCCA, Luigi M. et al. Megakaryocytic emperipolesis and platelet function abnormalities in five patients with gray platelet syndrome. **Platelets**, v. 26, n. 8, p. 751-757, 2015.
- LI, Conglei; LI, June; NI, Heyu. Crosstalk between platelets and microbial pathogens. **Frontiers in Immunology**, p. 1962, 2020.
- LI, Guangdi; DE CLERCQ, Erik. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). **Nature reviews Drug discovery**, v. 19, n. 3, p. 149-150, 2020.
- LI, Jinpeng et al. D-Dimer as a prognostic indicator in critically ill patients hospitalized with COVID-19 in Leishenshan Hospital, Wuhan, China. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 600592, 2020.
- LI, Qun et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus–infected pneumonia. **New England journal of medicine**, 2020.
- LIPPI, Giuseppe; PLEBANI, Mario; HENRY, Brandon Michael. Thrombocytopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: a meta-analysis. **Clinica chimica acta**, v. 506, p. 145-148, 2020.
- LIPSITCH, Marc et al. SARS-CoV-2 breakthrough infections in vaccinated individuals: measurement, causes and impact. **Nature Reviews Immunology**, p. 1-9, 2021.
- LIU, Zhixin et al. Composition and divergence of coronavirus spike proteins and host ACE2 receptors predict potential intermediate hosts of SARS-CoV-2. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 6, p. 595-601, 2020.

- LORDAN, Ronan et al. Forty years since the structural elucidation of platelet-activating factor (PAF): Historical, current, and future research perspectives. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4414, 2019.
- LUCIJANIC, Marko et al. Thrombocytosis in COVID-19 patients without myeloproliferative neoplasms is associated with better prognosis but higher rate of venous thromboembolism. **Blood cancer journal**, v. 11, n. 11, p. 189, 2021.
- MACHHI, Jatin et al. The natural history, pathobiology, and clinical manifestations of SARS-CoV-2 infections. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, p. 1-28, 2020.
- MAJUMDER, Joydeb; MINKO, Tamara. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. **The AAPS Journal**, v. 23, n. 1, p. 1-22, 2021.
- MANNE, Bhanu Kanth et al. Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 136, n. 11, p. 1317-1329, 2020.
- MAOUIA, Amal et al. The immune nature of platelets revisited. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 34, n. 4, p. 209-220, 2020.
- MARNELL, Lorraine; MOLD, Carolyn; DU CLOS, Terry W. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. **Clinical immunology**, v. 117, n. 2, p. 104-111, 2005.
- MCFADYEN, James D.; STEVENS, Hannah; PETER, Karlheinz. The emerging threat of (micro) thrombosis in COVID-19 and its therapeutic implications. **Circulation research**, v. 127, n. 4, p. 571-587, 2020.
- MIDDLETON, Elizabeth A. et al. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 136, n. 10, p. 1169-1179, 2020.
- MIDDLETON, Elizabeth A.; WEYRICH, Andrew S.; ZIMMERMAN, Guy A. Platelets in pulmonary immune responses and inflammatory lung diseases. **Physiological reviews**, v. 96, n. 4, p. 1211-1259, 2016.
- MITTELMAN, Moshe et al. Effectiveness of the BNT162b2mRNA COVID-19 vaccine in patients with hematological neoplasms in a nationwide mass vaccination setting. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 139, n. 10, p. 1439-1451, 2022.
- MORRELL, Craig N. et al. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 123, n. 18, p. 2759-2767, 2014.
- MORTENSEN, Richard F. C-reactive protein, inflammation, and innate immunity. **Immunologic research**, v. 24, p. 163-176, 2001.
- NURDEN, Alan T.; NURDEN, Paquita. The gray platelet syndrome: clinical spectrum of the disease. **Blood reviews**, v. 21, n. 1, p. 21-36, 2007.
- OJHA, Amrita et al. Platelet activation determines the severity of thrombocytopenia in dengue infection. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 41697, 2017.
- OJHA, Amrita et al. Platelet factor 4 promotes rapid replication and propagation of dengue and Japanese encephalitis viruses. **EBioMedicine**, v. 39, p. 332-347, 2019.

- OPAL, Steven M.; GIRARD, Timothy D.; ELY, E. Wesley. The immunopathogenesis of sepsis in elderly patients. **Clinical infectious diseases**, v. 41, n. Supplement_7, p. S504-S512, 2005.
- ØSTERGAARD, Søren Dinesen et al. Thromboembolism and the Oxford–AstraZeneca COVID-19 vaccine: side-effect or coincidence?. **The Lancet**, v. 397, n. 10283, p. 1441-1443, 2021.
- PAGE, Martin J.; PRETORIUS, Etheresia. A champion of host defense: a generic large-scale cause for platelet dysfunction and depletion in infection. In: **Seminars in thrombosis and hemostasis**. Thieme Medical Publishers, 2020. p. 302-319.
- PALUR RAMAKRISHNAN, Anand Vijaya Kumar et al. Platelet activating factor: a potential biomarker in acute coronary syndrome?. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 35, n. 1, p. 64-70, 2017.
- PANIGADA, Mauro et al. Hypercoagulability of COVID-19 patients in intensive care unit: a report of thromboelastography findings and other parameters of hemostasis. **Journal of thrombosis and haemostasis**, v. 18, n. 7, p. 1738-1742, 2020.
- PERDOMO, José et al. Neutrophil activation and NETosis are the major drivers of thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2019.
- PERICO, Luca et al. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. **Nature Reviews Nephrology**, v. 17, n. 1, p. 46-64, 2021.
- PINK, Isabell et al. C-reactive protein and procalcitonin for antimicrobial stewardship in COVID-19. **Infection**, v. 49, n. 5, p. 935-943, 2021.
- PIZZATO, Massimo et al. SARS-CoV-2 and the host cell: A tale of interactions. **Frontiers in Virology**, v. 1, 2022.
- PLANAS, Delphine et al. Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 B. 1.1. 7 and B. 1.351 variants to neutralizing antibodies. **Nature medicine**, v. 27, n. 5, p. 917-924, 2021.
- POTEMPA, Lawrence A. et al. Insights into the use of C-reactive protein as a diagnostic index of disease severity in COVID-19 infections. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 103, n. 2, p. 561, 2020.
- PRESCOTT, Stephen M. et al. Platelet-activating factor and related lipid mediators. **Annual review of biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 419-445, 2000.
- QIU, Jiahuang et al. Promoting platelets is a therapeutic option to combat severe viral infection of the lung. **Blood Advances**, v. 4, n. 8, p. 1640-1642, 2020.
- QUINTANA-DÍAZ, Manuel et al. Coagulation parameters: An efficient measure for predicting the prognosis and clinical management of patients with COVID-19. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 11, p. 3482, 2020.
- RACCUGLIA, Giovanni. Gray platelet syndrome: a variety of qualitative platelet disorder. **The American journal of medicine**, v. 51, n. 6, p. 818-828, 1971.
- RANUCCI, Marco et al. The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 7, p. 1747-1751, 2020.

- RIBES, Agnès et al. Thromboembolic events and Covid-19. **Advances in Biological Regulation**, v. 77, p. 100735, 2020.
- RICHARDSON, Safiya et al. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City area. **Jama**, v. 323, n. 20, p. 2052-2059, 2020.
- SAFIABADI TALI, Seyed Hamid et al. Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 3, p. e00228-20, 2021.
- SALAMANNA, Francesca et al. Platelet functions and activities as potential hematologic parameters related to Coronavirus Disease 2019 (Covid-19). **Platelets**, v. 31, n. 5, p. 627-632, 2020.
- SALONIA, Andrea et al. Severely low testosterone in males with COVID-19: A case-control study. **Andrology**, v. 9, n. 4, p. 1043-1052, 2021.
- SCHMITTGEN, Thomas D.; LIVAK, Kenneth J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101, 2008.
- SECOLIN, Rodrigo et al. Genetic variability in COVID-19-related genes in the Brazilian population. **Human genome variation**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2021.
- SHARIFPOUR, Milad et al. C-Reactive protein as a prognostic indicator in hospitalized patients with COVID-19. **PloS one**, v. 15, n. 11, p. e0242400, 2020.
- SIMON, Ayo Y.; SUTHERLAND, Michael R.; PRYZDIAL, Edward LG. Dengue virus binding and replication by platelets. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 126, n. 3, p. 378-385, 2015.
- SMILOWITZ, Nathaniel R. et al. C-reactive protein and clinical outcomes in patients with COVID-19. **European heart journal**, v. 42, n. 23, p. 2270-2279, 2021.
- SOUZA, Danielle G. et al. Essential role of platelet-activating factor receptor in the pathogenesis of Dengue virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 33, p. 14138-14143, 2009.
- SUNGNAK, Waradon et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. **Nature medicine**, v. 26, n. 5, p. 681-687, 2020.
- SWORDS, W. Edward et al. Binding of the non-typeable Haemophilus influenzae lipooligosaccharide to the PAF receptor initiates host cell signalling. **Cellular microbiology**, v. 3, n. 8, p. 525-536, 2001.
- TANG, Ning et al. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. **Journal of thrombosis and haemostasis**, v. 18, n. 4, p. 844-847, 2020b.
- TANG, Ning et al. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. **Journal of thrombosis and haemostasis**, v. 18, n. 5, p. 1094-1099, 2020a.
- THACHIL, Jecko. What do monitoring platelet counts in COVID-19 teach us?. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2020.

THAKUR, Vikram et al. Waves and variants of SARS-CoV-2: understanding the causes and effect of the COVID-19 catastrophe. **Infection**, p. 1-16, 2021.

THEOHARIDES, Theoharis C. COVID-19, pulmonary mast cells, cytokine storms, and beneficial actions of luteolin. **Biofactors (Oxford, England)**, 2020.

TRIGGLE, Chris R. et al. A comprehensive review of viral characteristics, transmission, pathophysiology, immune response, and management of SARS-CoV-2 and COVID-19 as a basis for controlling the pandemic. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 338, 2021.

TRUGILHO, Monique Ramos de Oliveira et al. Platelet proteome reveals novel pathways of platelet activation and platelet-mediated immunoregulation in dengue. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 5, p. e1006385, 2017.

TSEGAYE, Theodros Solomon et al. Platelet activation suppresses HIV-1 infection of T cells. **Retrovirology**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2013.

TSOUPRAS, Alexandros B. et al. Anti-platelet-activating factor effects of highly active antiretroviral therapy (HAART): a new insight in the drug therapy of HIV infection?. **AIDS research and human retroviruses**, v. 24, n. 8, p. 1079-1086, 2008.

TSOUPRAS, Alexandros; LORDAN, Ronan; ZABETAKIS, Ioannis. Inflammation, not cholesterol, is a cause of chronic disease. **Nutrients**, v. 10, n. 5, p. 604, 2018.

TUFAN, Abdurrahman; GÜLER, Aslihan Avanoğlu; MATUCCI-CERINIC, Marco. COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposing antirheumatic drugs. **Turkish journal of medical sciences**, v. 50, n. SI-1, p. 620-632, 2020.

TYAGI, Sanjay; BRATU, Diana P.; KRAMER, Fred Russell. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. **Nature biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 49, 1998.

ULAMBAYAR, Bastsetseg et al. Increased platelet activating factor levels in chronic spontaneous urticaria predicts refractoriness to antihistamine treatment: an observational study. **Clinical and translational allergy**, v. 9, n. 1, p. 33, 2019.

UZUN, Günalp et al. Immune-Mediated Platelet Activation in COVID-19 and Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022.

VANDERCAPPELLEN, Jo; VAN DAMME, Jo; STRUYF, Sofie. The role of the CXC chemokines platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 22, n. 1, p. 1-18, 2011.

VARGA, Zsuzsanna et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. **The Lancet**, v. 395, n. 10234, p. 1417-1418, 2020.

WANG, Dawei et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China. **jama**, v. 323, n. 11, p. 1061-1069, 2020.

WANG, L. C-reactive protein levels in the early stage of COVID-19. **Medecine et maladies infectieuses**, v. 50, n. 4, p. 332-334, 2020.

WANG, Yuhui et al. Platelet activation and antiplatelet therapy in sepsis: A narrative review. **Thrombosis research**, v. 166, p. 28-36, 2018.

- WASHINGTON, A. Valance; ESPONDA, Omar; GIBSON, Angelia. Platelet biology of the rapidly failing lung. **British journal of haematology**, v. 188, n. 5, p. 641-651, 2020.
- WEISS, Harvey J. et al. Heterogeneity in storage pool deficiency: studies on granule-bound substances in 18 patients including variants deficient in α -granules, platelet factor 4, β -thromboglobulin, and platelet-derived growth factor. **Blood**, v. 54, n. 6, p. 1296-1319, 1979.
- XU, Hao 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. 1-5, 2020.
- XU, Panyang; ZHOU, Qi; XU, Jiancheng. Mechanism of thrombocytopenia in COVID-19 patients. **Annals of hematology**, v. 99, n. 6, p. 1205-1208, 2020.
- YANEZ, N. David et al. COVID-19 mortality risk for older men and women. **BMC public health**, v. 20, n. 1, p. 1-7, 2020.
- YANG, Xiaobo et al. Thrombocytopenia and its association with mortality in patients with COVID-19. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 6, p. 1469-1472, 2020.
- YEAMAN, Michael R. The role of platelets in antimicrobial host defense. **Platelets**, p. 523-546, 2019.
- YOST, Christian C.; WEYRICH, Andrew S.; ZIMMERMAN, Guy A. The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses. **Biochimie**, v. 92, n. 6, p. 692-697, 2010.
- YUFANG, Shi et al. COVID-19 infection: the perspective on immune response. **Cell Death & Differentiation**, v. 27, n. 5, 2020.
- ZABETAKIS, Ioannis et al. COVID-19: the inflammation link and the role of nutrition in potential mitigation. **Nutrients**, v. 12, n. 5, p. 1466, 2020.
- ZAID, Younes et al. Platelets can associate with SARS-Cov-2 RNA and are hyperactivated in COVID-19. **Circulation research**, v. 127, n. 11, p. 1404-1418, 2020.
- ZALDIVAR, Mirko Moreno et al. CXC chemokine ligand 4 (Cxcl4) is a platelet-derived mediator of experimental liver fibrosis. **Hepatology**, v. 51, n. 4, p. 1345-1353, 2010.
- ZAPATA, Juan C.; COX, Dermot; SALVATO, Maria S. The role of platelets in the pathogenesis of viral hemorrhagic fevers. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 6, p. e2858, 2014.
- ZENG, Furong et al. Association of inflammatory markers with the severity of COVID-19: a meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 96, p. 467-474, 2020.
- ZHANG, Ruoyu et al. Neutrophil autophagy and NETosis in COVID-19: perspectives. **Autophagy**, v. 19, n. 3, p. 758-767, 2023.
- ZHANG, Si et al. SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19. **Journal of hematology & oncology**, v. 13, n. 1, p. 1-22, 2020a.
- ZHANG, Yan et al. Coagulopathy and antiphospholipid antibodies in patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 17, p. e38, 2020b.

ZHAO, Kaochang et al. Clinical features in 52 patients with COVID-19 who have increased leukocyte count: a retrospective analysis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, p. 2279-2287, 2020.

ZHOU, Fei et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054-1062, 2020.

ZIMMERMAN, Guy A. et al. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. **Critical care medicine**, v. 30, n. 5, p. S294-S301, 2002.

ZUMLA, Alimuddin et al. Coronaviruses—drug discovery and therapeutic options. **Nature reviews Drug discovery**, v. 15, n. 5, p. 327-347, 2016.

ZUO, Yu et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. **JCI insight**, v. 5, n. 11, 2020.

ANEXO A – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES GENÉTICOS PARA ESTRATIFICAÇÃO PROGNÓSTICA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM A COVID-19 E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO SARS-CoV-2 NO ESTADO DO CEARÁ

Pesquisador: Raquel Carvalho Montenegro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 31453320.7.0000.5054

Instituição Proponente: Universidade Federal do Ceará/ PROPESQ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.029.490

Apresentação do Projeto:

O último boletim do Ministério da Saúde, aponta Fortaleza como a capital com a maior incidência de casos da COVID-19, possuindo 729/1 milhão de habitantes. A rápida evolução no contágio e a insuficiência de informações acerca da fisiopatologia da doença levam ao aumento exponencial do número de casos. A infecção pelo SARS-CoV-2 apresenta quadros de gravidade diversas o que sugere a influência de fatores genéticos no desfecho clínico desses pacientes. Estes podem estar associados a variante genética do vírus, ou seja, mutações em proteínas específicas do vírus já demonstraram tornar o vírus mais ou menos infectante, bem como polimorfismos no hospedeiro. Em estudos recentes foram observadas diferenças de frequência alélicas variantes do gene TMPRSS2 entre asiáticos e italianos, onde níveis mais altos de TMPRSS2, são mais frequentes da população italiana do que da população do leste asiático. Esta proteína facilita a ligação do vírus a membrana da célula do hospedeiro e, assim, polimorfismos nessa região podem influenciar a virulência e a gravidade da doença em diferentes populações. Para desencadear uma resposta antiviral, o sistema imune inato precisa reconhecer a invasão do vírus e, geralmente, isso acontece pelo