



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

VANESSA MYLENNIA FLORÊNCIO DE CARVALHO

**IMPLICAÇÕES DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NAS
VIAS APOPTÓTICA E AUTOFÁGICA NA PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO
SARS-CoV-2**

Recife

2025

VANESSA MYLENNA FLORENCIO DE CARVALHO

**IMPLICAÇÕES DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NAS
VIAS APOPTÓTICA E AUTOFÁGICA NA PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO
SARS-CoV-2**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutora em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Michelly Cristiny Pereira

Coorientadora: Dra. Priscilla Stela Santana de Oliveira

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Carvalho, Vanessa Mylenna Florêncio de.

Implicações da expressão gênica de proteínas envolvidas nas vias apoptótica e autofágica na patogênese da infecção pelo SARS-CoV-2 / Vanessa Mylenna Florêncio de Carvalho. - Recife, 2025. 77f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2025.

Orientação: Maira Galdino da Rocha Pitta.

Coorientação: Michelly Cristiny Pereira.

Coorientação: Priscilla Stela Santana de Oliveira.

Inclui referências e anexos.

1. Apoptose; 2. Autofagia; 3. COVID-19; 4. Morte celular; 5. SARS-CoV-2. I. Pitta, Maira Galdino da Rocha. II. Pereira, Michelly Cristiny. III. Oliveira, Priscilla Stela Santana de. IV. Título.

VANESSA MYLENNA FLORENCIO DE CARVALHO

**IMPLICAÇÕES DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NAS
VIAS APOPTÓTICA E AUTOFÁGICA NA PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO
SARS-CoV-2**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutora em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 27/02/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anderson Rodrigues de Almeida
Universidade Federal de Pernambuco

Profª.Dra. Camilla Albertina Dantas de Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fabricio Oliveira Souto
Universidade Federal de Pernambuco

Profª.Dra. Juliana Prado Gonçalves
Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz/PE

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me manteve de pé e me deu à força necessária para trilhar este caminho com êxito. Meu refúgio, minha fé e meu consolo nos momentos mais sombrios e desesperançosos desta caminhada...sem Ti nada sou!

Aos meus pais e minha irmã, por terem segurado firme à minha mão, me encorajando todos os dias a não desistir. Eu amo vocês.

Ao meu esposo, por sempre apoiar e dar asas aos meus sonhos, torcer pelo meu sucesso e me fazer acreditar que eu posso e eu consigo! Aguentou a distância e os dias fora de casa, sempre transmitindo paz e equilíbrio. Te amo, meu amor! Obrigada por tudo.

A Bárbara Oliveira, por ter chegado e me estendido a mão...ser meu suporte e companheira para tudo. Obrigada lindinha, por cada ajuda e palavra de incentivo! A Thaci, por toda dica e disponibilidade para me acompanhar nas citometrias da vida...minha sincera gratidão!

A minha orientadora, Prof^a Maira, pela oportunidade que me foi dada e por ter depositado toda a confiança no meu trabalho. Muito obrigada!

As minhas queridas co-orientadoras, Michelly e Priscilla, pelo caminho trilhado juntas e por todo o carinho e amizade construídas nesta jornada. Vocês são um espelho e referencial de pessoas que admiro e me inspiro. Obrigada pela paciência, ajuda e compreensão nesta reta final, vocês foram indispensáveis para a conclusão deste ciclo em minha vida.

*...Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
acreditar nos sonhos que se tem
Ou que os seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém
Quem acredita sempre alcança...*

RESUMO

O SARS-CoV-2, causador da COVID-19, continua circulando globalmente devido ao surgimento de novas variantes. Estudos indicam que a interação entre apoptose e autofagia desempenha um papel importante na progressão da doença. Em condições de estresse celular, a autofagia pode atuar como um mecanismo de proteção, mas, caso falhe, pode levar à apoptose, exacerbando danos teciduais e a resposta inflamatória. Foi demonstrado que o desequilíbrio entre esses processos pode contribuir para a patogênese da COVID-19, resultando em danos aos tecidos e agravamento da resposta inflamatória. Desta forma, este estudo visou investigar a participação de proteínas de morte celular envolvidas na fisiopatologia da infecção pelo SARS-CoV-2, correlacionando com as variáveis clínicas. Para tanto, a expressão dos genes apoptóticos (CASPASE 3, BID, PAWR e APAF-1) e autofágicos (MAP1LC3, ULK1, SQSTM1 e ATG5) foram avaliados por RT-qPCR em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de 140 pacientes (n=73 infectados e n=67 não infectados pelo vírus). Adicionalmente, a atividade da caspase 3/7 em relação aos linfócitos foi realizada por citometria de fluxo. Pacientes com COVID-19 apresentaram maior expressão dos genes CASPASE 3 (p= 0,0269), BID (p= 0,0104) e MAP1LC3 (p= 0,0018), sendo CASPASE 3 correlacionado positivamente com o sexo masculino (p= 0,0032), com uma maior carga viral (p= 0,0110), com as variáveis clínicas febre (p= 0,0013), cefaleia (p= 0,0368), astenia (p= 0,0119), dor de garganta (p= 0,05), coriza (p= 0,0241) e com a comorbidade hipertensão (HAS) (p= 0,0466). BID também apresentou correlação clínica com febre (p= 0,0002), cefaleia (p= 0,0441), dispneia (p= 0,0204) e HAS (p= 0,0240). A análise comparativa entre as variantes p1 x ômicron, evidenciou que ambas as variantes apresentaram superexpressão do gene mais diferencialmente expresso CASPASE 3 (p= 0,0269 e p= 0,0257, respectivamente). Além disso, a linfopenia foi confirmada pelo aumento da atividade de caspase 3/7 em linfócitos TCD4⁺ e linfócitos B, ambos p= 0,0079. Esses achados sugerem que CASPASE 3 pode ser um possível alvo terapêutico promissor no combate à doença; e que ambas as vias de morte celular estão envolvidas na replicação viral da COVID-19, sendo que a indução à apoptose em tecidos, incluindo a linfopenia, se correlacionam com sintomas clínicos dos pacientes. Embora os resultados indiquem que CASPASE 3 pode ser um possível alvo terapêutico, estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese e avaliar possíveis estratégias de intervenção.

Palavras-chaves: Apoptose. Autofagia. COVID-19. Morte celular. SARS-CoV-2.

ABSTRACT

SARS-CoV-2, the cause of COVID-19, continues to circulate globally due to the emergence of new variants. Studies indicate that the interaction between apoptosis and autophagy plays an important role in the progression of the disease. Under conditions of cellular stress, autophagy can act as a protective mechanism, but if it fails, it can lead to apoptosis, exacerbating tissue damage and the inflammatory response. Thus, this study aimed to investigate the participation of cell death proteins involved in the pathophysiology of SARS-CoV-2 infection, correlating with clinical variables. The expression of apoptotic (CASPASE 3, BID, PAWR and APAF-1) and autophagic (MAP1LC3, ULK1, SQSTM1 and ATG5) genes were evaluated by RT-qPCR in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 140 patients (n=73 infected and n=67 not infected by the virus). Additionally, caspase 3/7 activity in relation to lymphocytes was measured by flow cytometry. Patients with COVID-19 had a higher expression of the CASPASE 3 (p= 0.0269), BID (p= 0.0104) and MAP1LC3 (p= 0.0018) genes, with CASPASE 3 being positively correlated with male gender (p= 0.0032), with a higher viral load (p= 0.0110), with the variables clinical fever (p= 0.0013), headache (p= 0.0368), asthenia (p= 0.0119), sore throat (p= 0.05), runny nose (p= 0.0241) and with the comorbid hypertension (HAS) (p= 0.0466). BID also showed clinical correlation with fever (p= 0.0002), headache (p= 0.0441), dyspnea (p= 0.0204) and HAS (p= 0.0240). The comparative analysis between the p1 x omicron variants showed that both variants presented overexpression of the most differentially expressed gene CASPASE 3 (p= 0.0269 and p= 0.0257, respectively). Furthermore, lymphopenia was confirmed by increased caspase 3/7 activity in CD4⁺ T lymphocytes and B lymphocytes, both p= 0.0079. These findings suggest that CASPASE 3 may be a promising possible therapeutic target to combat the disease; and that both cell death pathways are involved in the viral replication of COVID-19, with the induction of apoptosis in tissues, including lymphopenia, correlating with clinical symptoms in patients. Although the results indicate that CASPASE 3 may be a possible therapeutic target, additional studies are needed to confirm this hypothesis and evaluate possible intervention strategies.

Keywords: Apoptosis. Autophagy. COVID-19. Cell death. SARS-CoV-2.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 — Estrutura viral do SARS-CoV-2, seu mecanismo de interação com o receptor e sua região codificadora de poliproteína 1a/1ab.** Proteínas estruturais do SARS-CoV-2: nucleocapsídeo (N), membrana (M), envelope (E) e spike (S). A proteína S é composta por duas subunidades (S1 e S2), sendo a S1 responsável pela ligação ao receptor de membrana celular (ACE2).....20
- Figura 2 — Estágios clínicos da COVID-19.** I: Período de incubação que dura em média 5 dias, representado por uma alta taxa de replicação viral. II: Fase sintomática inflamatória, com início entre o 5º e duração até o 11º dia, caracterizado pelo aparecimento de sintomas clínicos leves. III: Fase pulmonar precoce, iniciada no 11º dia e estendida até o 14º dia, representada pela presença de detritos virais e ativação do sistema imune, com hipóxia leve e infiltrados de vidro fosco progressivo. IV: Fase pulmonar tardia, entre o 14º e 28º dia de infecção pelo SARS-CoV-2, caracterizado por sintomas clínicos severos e desregulação do sistema imune.....27
- Figura 3 — Esquema ilustrando as vias intrínseca e extrínseca da apoptose.** Os dois principais tipos de vias de apoptose são a via intrínseca (mitocondrial), onde a célula recebe um estímulo de estresse para se destruir de um dos seus próprios genes ou proteínas, devido à detecção de danos no DNA; e a via extrínseca (receptores de morte), onde a célula recebe um sinal para iniciar a apoptose de outras células do organismo. Ambas as vias vão convergir para o mesmo local, na chamada via de execução, onde a caspase 3 efetora é a responsável pela maioria dos efeitos deletérios da apoptose.....29
- Figura 4 — Etapas gerais da autofagia.** i) Iniciação: ULK1 e complexo PI3K classe III ii) Nucleação iii) Alongamento: maquinaria de conjugação do tipo ubiquitina....32
- Figura 5 — Representação esquemática das etapas realizadas durante o estudo.....37**
- Figura 6 - Estratégia de gating para a determinação da Intensidade Média de Fluorescência (MFI) nas populações de células TCD4+ e células B.....41**
- Figura 7 — Níveis da expressão do gene CASPASE 3 (A), BID (B), PAWR (C) e APAF1 (D) entre pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 e não infectados pelo vírus. *p< 0.05; ns: não significativo.....45**

Figura 8 —	Níveis da expressão do gene MAP1LC3 (A), ULK1 (B), SQSTM1 (C) e ATG5 (D) entre pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 e não infectados pelo vírus. ** $p < 0.01$; ns: não significativo.....	46
Figura 9 -	Fold change de log10 da expressão dos genes apoptóticos PAR4, APAF1, BID e CASPASE3 e dos genes autofágicos SQSTM1, ULK1, MAP1LC3 e ATG5 entre pacientes infectados (+) e não infectados (-) pelo SARS-CoV-2. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns: não significativo.....	47
Figura 10 —	- Relação entre os níveis da expressão do gene CASPASE 3 (A), BID (B) e MAP1LC3 (C) entre os sexos masculino e feminino de pacientes infectados <i>versus</i> não infectados pelo SARS-CoV-2. ** $p < 0.01$; ns: não significativo.....	48
Figura 11 —	Relação entre os ciclos de quantificação da expressão dos genes CASPASE 3 (A), BID (B), MAP1LC3 (C) e os níveis da carga viral.....	50
Figura 12 -	Intensidade Média de Fluorescência (IMF) da atividade de caspase 3/7 em relação as células TCD4+ e linfócitos B de pacientes infectados <i>versus</i> não infectados pelo SARS-CoV-2.....	51
Figura 13 —	A: Níveis da expressão do gene CASPASE 3 entre pacientes infectados com a variante ômicron e não infectados pelo SARS-CoV-2. **** $p < 0.0001$; * $p < 0.05$. B: Representação esquemática do log10 CASPASE 3 entre as variantes p1 <i>versus</i> ômicron.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 —	Anticorpos utilizados na marcação das PBMCs para citometria de fluxo.....	41
Tabela 2 —	Características clínicas dos pacientes sintomáticos infectados e não infectados pelo SARS-CoV-2.....	44
Tabela 3 —	Associação entre a expressão gênica de CASPASE 3, BID e MAP1LC3 e as variáveis clínicas em pacientes infectados (I) e não infectados (NI) pelo SARS-CoV-2.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
Ag-RDTs	Testes de diagnóstico rápido de detecção de antígeno
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APAF-1	Fator Ativador de Protease Apoptótica-1
ATGs	Genes relacionados a autofagia
ATG5	Gene relacionado a autofagia 5
BAK	Antagonista homólogo do Bcl-2
BAX	Proteína associada ao Bcl-2
BID	Agonista de morte do domínio de interação BH3
BRAs	Bloqueadores dos Receptores tipo I da Angiotensina II
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	DNA complementar
COVID-19	Doença coronavírus 2019
Cq	Quantification cycle
Cyt c	Citocromo c
D1	Primeira dose de vacina
D2	Duas doses de vacina
DAD	Dano alveolar difuso
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMVs	Vesículas de membrana dupla
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DU	Dose única
ESPII	Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional
e0	Expectativa de vida ao nascer
e65	Expectativa de vida aos 65 anos
FasL	Ligante Fas
FDA	Federal Drug Administration
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana

I	Infectado
IL-6	Interleucina 6
IQR	Intervalo interquartil
LACEN-PE	Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco
LC3/MAP1LC3	Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos tipo ubiquitina
LDH	Lactato desidrogenase
LINAT	Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas
MERS-CoV	Coronavírus causador da Síndrome Respiratória do Oriente Médio
IMF	Intensidade Mediana de Fluorescência
MHV	Vírus da Hepatite Murina
MOMP	Permeabilização da Membrana Externa Mitocondrial
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
NI	Não infectado
NLR	Relação neutrófilo-linfócito
NS	Não significativo
NUPIT-SG	Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica-Suely Galdino
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAWR	Proteína de resposta a apoptose prostática
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada
PCR	Proteína C Reativa
RAMs	Reações Adversas a Medicamentos
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV	Coronavírus causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SQSTM1	Complexo sequestossomo 1

TC	Tomografia de tórax
TM	Domínio Transmembranar
TMPRSS2	Protease transmembrana serina 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
ULK1	Complexo quinase 1 ativadora de autofagia semelhante a unc-51
UBRAG	Gene associado a resistência à irradiação UV do regulador de autofagia
VOC	Variantes Preocupantes
VOCs	Variantes de Preocupação
VOIs	Variantes de Interesse
VTM	Meio de transporte viral
XIAPs	Inibidor de proteínas de apoptose ligado ao cromossomo X

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
3.1	CORONAVÍRUS SARS-CoV-2.....	19
3.2	EPIDEMIOLOGIA.....	21
3.3	FORMAS DE TRANSMISSÃO.....	23
3.4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	23
3.5	DIAGNÓSTICO.....	25
3.5.1	Teste imunocromatográfico.....	25
3.5.2	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR).....	25
3.6	FISIOPATOLOGIA.....	26
3.6.1	Apoptose.....	28
3.6.1.1	<i>Caspase 3</i>	30
3.6.1.2	<i>APAF-1</i>	30
3.6.1.3	<i>PAWR</i>	31
3.6.1.4	<i>BID</i>	31
3.6.2	Autofagia.....	31
3.6.2.1	<i>ULK1</i>	33
3.6.2.2	<i>MAP1LC3</i>	33
3.6.2.3	<i>ATG5</i>	33
3.6.2.4	<i>SQSTM1</i>	34
3.7	TRATAMENTO.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	37
4.2	COMITÊ DE ÉTICA.....	37
4.3	RECRUTAMENTO DAS AMOSTRAS.....	38
4.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	38
4.5	COLETA, PROCESSAMENTO E OBTENÇÃO DAS PBMCs.....	38

4.6	EXTRAÇÃO DO RNA.....	39
4.7	SÍNTESE DO cDNA E EXPRESSÃO GÊNICA.....	39
4.8	DESCONGELAMENTO DAS PBMCs PARA CITOMETRIA DE FLUXO.....	40
4.9	CITOMETRIA DE FLUXO.....	40
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5	RESULTADOS.....	43
5.1	PERFIL CLÍNICO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO.....	43
5.2	EXPRESSÃO DOS GENES APOPTÓTICOS CASPASE 3, BID, PAWR E APAF-1.....	44
5.3	EXPRESSÃO DOS GENES AUTOFÁGICOS MAP1LC3, ULK1, SQSTM1 E ATG5.....	45
5.4	RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE CASPASE 3, BID, MAP1LC3 E AS VARIÁVEIS CLÍNICAS.....	47
5.5	RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE CASPASE 3, BID, MAP1LC3 E A CARGA VIRAL.....	50
5.6	ATIVIDADE DA CASPASE 3/7 AUMENTA NOS LINFÓCITOS T E B DURANTE A INFECÇÃO POR SARS-CoV-2.....	51
5.7	EXPRESSÃO GÊNICA DE CASPASE 3 DA VARIANTE P.1 <i>versus</i> ÔMICRON.....	51
6	DISCUSSÃO.....	53
7	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60
	ANEXO A – PARECER FINAL DO COMITÊ DE ÉTICA.....	71
	ANEXO B – CONTROLE INTERNO FMO DA CITOMETRIA DE FLUXO.....	76
	ANEXO C – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DO GRUPO DE PACIENTES INFECTADOS PELA VARIANTE ÔMICRON DA COVID-19.....	77

1 INTRODUÇÃO

A doença do coronavírus 2019 (COVID-19), causada pelo coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), surgiu pela primeira vez em Wuhan, na China, em dezembro de 2019. Em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou-a uma pandemia; e até o final de 2024, mais de 7 milhões de mortes foram relatadas, representando grandes ameaças socioeconômicas e a saúde pública mundial (Trześniowska *et al.*, 2024; Who, 2024). O SARS-CoV-2 é um vírus altamente transmissível e patogênico, com um amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo desde casos assintomáticos a mortes rápidas (Lundstrom *et al.*, 2023).

Desde a sua descoberta, o SARS-CoV-2 tem sido alvo de interesse por pesquisa intensiva, para descobrir quais as vias de sinalização são responsáveis pela alta patogenicidade desse vírus, e entender o impacto da comorbidade associada ao COVID-19. Postula-se que durante a infecção, o SARS-CoV-2 pode induzir diversas vias de morte celular, como apoptose e autofagia (Lundstrom *et al.*, 2023).

A apoptose é um tipo de morte celular programada que pode ser estabelecida pelo hospedeiro para limitar a propagação do vírus. Contudo, diversos estudos mostraram que a apoptose desordenada (Bader *et al.*, 2022; Zhu *et al.*, 2022; Donia *et al.*, 2021) interrompe a arquitetura e a integridade da rede broncoalveolar e favorece o aparecimento de lesões pulmonares e da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (Chu *et al.*, 2021).

A morte celular apoptótica é iniciada pelas vias extrínseca e intrínseca. A via intrínseca é desencadeada pela permeabilização da membrana mitocondrial, levando à liberação de citocromo C e outros fatores pró-apoptóticos no citoplasma, como BID (Liu *et al.*, 2021). A via extrínseca (via do receptor de morte), envolve a ativação de caspases (Zhu *et al.*, 2022). A caspase-3 é efetora da apoptose. Quando ativada pelas caspases iniciadoras (-2, -8, -9 e -10), ela catalisa muitas proteínas que atuam na fragmentação do DNA, colapso nuclear e condensação da cromatina (Uzuncakmak *et al.*, 2022).

Paralelamente, a autofagia é um processo intracelular envolvido na degradação de materiais citoplasmáticos danificados, como proteínas, lipídios e organelas, evolução celular, patogênese de alguns tipos de câncer, assim como imunidade inata (através da destruição de patógenos intracelulares [incluindo vírus]) e sua apresentação ao sistema imune adaptativo. Alguns vírus possuem mecanismos para escapar da autofagia. Em contrapartida, alguns vírus usam o processo autofágico durante sua replicação (Mao *et al.*, 2019; Deng *et al.*, 2020).

Foi mencionado o uso da maquinaria autofágica durante o processo de replicação de alguns vírus, incluindo HIV 1,2, vírus da hepatite B, vírus da hepatite C, picornavírus e vírus Cocksackie (Li *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2008; Brass *et al.*, 2008; Dreux *et al.*, 2009). Existem algumas evidências de que os coronavírus também utilizam máquinas de autofagia para sua replicação (Benvenuto *et al.*, 2020). Além disso, foi constatado que a COVID-19 afeta diversas fases da autofagia, que por sua vez, pode desempenhar um papel crítico no ciclo de vida viral (Tehrani *et al.*, 2022).

Diversos medicamentos e terapias antivirais foram recomendados para uso em situações de emergência para melhorar o quadro clínico da COVID-19 e reduzir a mortalidade. Todavia, apesar da existência de vacinas contra a doença, ainda se aguarda uma descoberta efetiva de alvo terapêutico que possa atenuar a replicação do vírus e diminuir a morte excessiva das células causada pela infecção (Ghareeb *et al.*, 2021; Aleem *et al.*, 2022).

Desta forma, apesar de diversos estudos relatarem que a infecção por SARS-CoV-2 está associada às vias de morte celular apoptose e autofagia (Deshpande *et al.*, 2024; Gassen *et al.*, 2021; Khan *et al.*, 2024; Deshpande *et al.*, 2021), quais destas vias são as mais críticas para o desenvolvimento dos sintomas da COVID-19 e como o SARS-CoV-2 as ativam, ainda precisam ser melhor esclarecidas. Portanto, conhecer os mecanismos fisiopatológicos do SARS-CoV-2 podem direcionar a inibição da apoptose e/ou autofagia como uma estratégia de intervenção eficaz no tratamento deste e de outros vírus altamente patogênicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a participação de proteínas de morte celular envolvidas na fisiopatologia da infecção pelo SARS-CoV-2.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil clínico dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2;
- Avaliar a expressão gênica de BID, PAWR, APAF1 e CASPASE 3 envolvidas na via apoptótica em células mononucleares do sangue periférico (*PBMCs*) de pacientes infectados e não infectados pelo SARS-CoV-2;
- Avaliar a expressão gênica de SQSTM1, MAP1LC3, ULK1 e ATG5 envolvidas na via autofágica em amostras de *PBMCs* de pacientes infectados e não infectados pelo SARS-CoV-2;
- Analisar comparativamente a expressão gênica de proteínas envolvidas nas vias de morte celular nas principais manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com COVID-19;
- Verificar a atividade do gene mais diferencialmente expresso em linfócitos TCD4 e linfócitos B de pacientes infectados e não infectados pelo SARS-CoV-2;
- Comparar a expressão do gene mais diferencialmente expresso na sequência temporal entre a variante P.1 *versus* variante ômicron.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

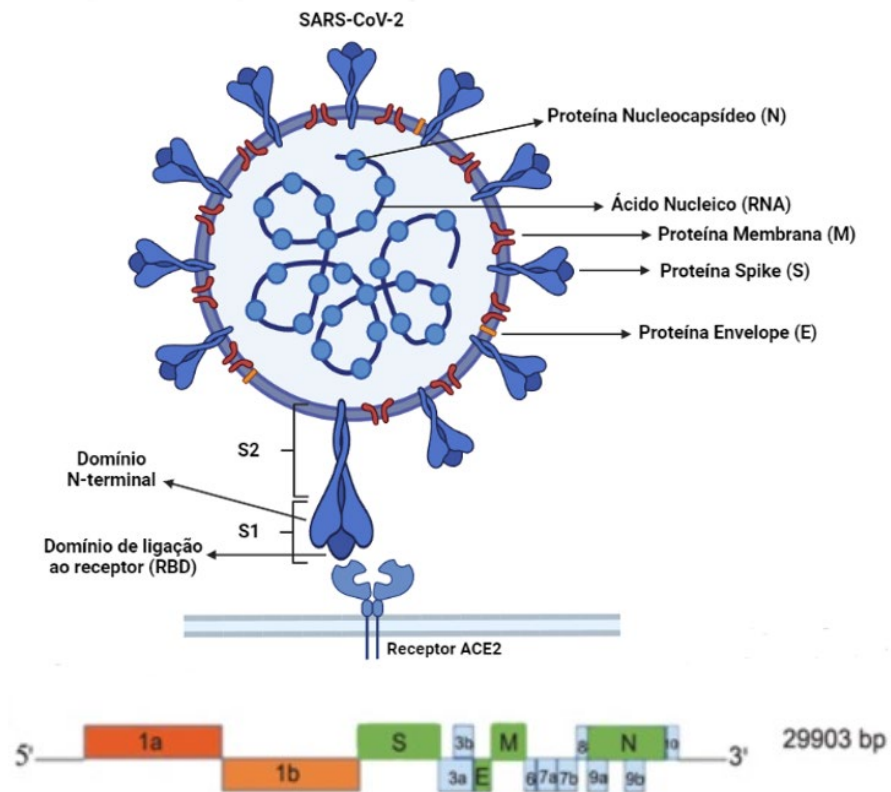
3.1 CORONAVÍRUS SARS-CoV-2

A infecção pelo SARS-CoV-2, referida como doença do coronavírus 2019, resultou em uma pandemia global sem precedentes, com centenas de milhões de casos e milhões de mortes em todo o mundo (Alfadda *et al.*, 2021; Hou *et al.*, 2023). A descoberta do vírus ocorreu em dezembro de 2019, após o surgimento de casos de pneumonia de causa desconhecida em Wuhan, cidade localizada na China (Huang *et al.*, 2020). Os primeiros pacientes apresentaram sintomas semelhantes aos da gripe, incluindo febre, tosse e dificuldade para respirar, porém, a gravidade da doença era maior e muitos pacientes necessitavam de suporte ventilatório (Who, 2020).

O nome SARS-CoV-2 foi atribuído devido à sua semelhança com o vírus responsável pela Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) em 2003. Assim como seus antecessores, os coronavírus SARS-CoV e MERS-CoV, o SARS-CoV-2 é capaz de causar infecções no trato respiratório inferior e levar ao desenvolvimento da grave SDRA (Li *et al.*, 2020; Fernandes *et al.*, 2022). Em janeiro de 2020, o sequenciamento genético do vírus foi concluído, permitindo o desenvolvimento de testes para detectar o vírus em amostras de pacientes (Wu *et al.*, 2020).

A organização genômica do SARS-CoV-2 é composta por um RNA de sentido positivo, com aproximadamente 29.903 nucleotídeos, que codifica pelo menos 29 proteínas virais (Wu *et al.*, 2020). O genoma é organizado em duas regiões principais: uma região codificadora de poliproteína 1a/1ab, que é responsável pela produção das proteínas envolvidas na replicação viral, e uma região codificadora de proteínas estruturais, que inclui as proteínas spike (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N) (Figura 1) (Wu *et al.*, 2020).

Figura 1- Estrutura viral do SARS-CoV-2, seu mecanismo de interação com o receptor e sua região codificadora de poliproteína 1a/1ab. Proteínas estruturais do SARS-CoV-2: nucleocapsídeo (N), membrana (M), envelope (E) e spike (S). A proteína S é composta por duas subunidades (S1 e S2), sendo a S1 responsável pela ligação ao receptor de membrana celular (ACE2).



Fonte: BioRender e autora (2023); e modificado de Jin Y, *et al.* 2020.

A proteína spike (S) tem sido o principal alvo de estudos para o desenvolvimento de vacinas e terapias para a COVID-19 (Walls *et al.*, 2020). Ela é composta por duas subunidades, S1 e S2, sendo que S1 contém o domínio N-terminal e o domínio de ligação ao receptor (RBD), responsáveis pela ligação do receptor, como mostra a figura 1 abaixo. Por sua vez, a subunidade S2 inclui um peptídeo de fusão de membrana interna, sequências repetidas de heptapeptídeos (HR1 e HR2), uma região externa e um domínio transmembranar (TM). O filamento S2 facilita a entrada do genoma viral nas células hospedeiras ao fundir as membranas virais e do hospedeiro (Hadj Hassine, 2022).

Durante o final de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) solicitou a classificação de novas cepas de SARS-CoV-2 como Variantes de Interesse (VOIs) e Variantes de Preocupação (VOCs) (Fernandes *et al.*, 2022). As VOIs são variantes com mutações que afetam a ligação do receptor, eficácia do tratamento, neutralização por anticorpos e potencial aumento da gravidade/transmissibilidade. Já as VOCs são variantes com forte evidência de

aumento da transmissibilidade e gravidade, redução notável na neutralização por anticorpos, diminuindo a eficácia de tratamentos e vacinas (Fernandes *et al.*, 2022).

Em comparação com a cepa de referência (Wuhan), cepas VOCs têm predominantemente alterações no gene S (Tregoning *et al.*, 2021). As variantes emergentes Alpha, Beta, Gamma, Delta e Ômicron foram classificadas como variantes preocupantes (VOC), que foram associadas ao aumento da transmissão, situação de doença mais grave (por exemplo, aumento de hospitalizações ou mortes), redução significativa na neutralização por anticorpos gerado durante infecção ou vacinação anterior, eficácia reduzida de tratamentos ou vacinas, ou falhas de detecção de diagnóstico (Zeng *et al.*, 2022).

Portanto, VOCs, além das já descritas, podem constantemente surgir com resistência perigosa à imunidade gerada pelas vacinas atuais para prevenir a COVID-19. Além disso, se algumas VOCs tiverem maior transmissibilidade ou virulência, aumentará a importância de medidas eficientes de saúde pública e programas de vacinação. A resposta global deve ser oportuna e baseada na ciência (Krause *et al.*, 2021).

3.2 EPIDEMIOLOGIA

A COVID-19 emergiu como uma grave pandemia, atingindo mais de 0,8 milhão de vidas em todo o mundo entre dezembro de 2019 e agosto de 2020. Em comparação com o SARS-CoV, a infecção de humano para humano por SARS-CoV-2 é mais facilmente transmitida e se espalha para quase todos os continentes, levando à declaração da OMS de Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional (ESPII) em 30 de janeiro de 2020 (Yesudhas; Srivastava; Gromiha, 2021).

Até a data de produção deste manuscrito, os casos de COVID-19 continuam sendo relatados globalmente em mais de 170 países. O ano de 2024 finalizou com mais de 777.023.352 casos de COVID-19 confirmados em laboratório em todo o mundo, com 7.078.571 mortes relatadas (Who, 2024).

A COVID-19 afeta pessoas de todas as idades, mas adultos mais velhos e pessoas com condições médicas subjacentes correm maior risco de desenvolver doenças graves. Homens são mais propensos a morrer de COVID-19 do que mulheres (Hu *et al.*, 2021). Em geral, o vírus é mais grave nas faixas etárias mais avançadas, com as maiores taxas de mortalidade entre as pessoas com mais de 80 anos. No entanto, os mais jovens também podem ficar gravemente doentes ou morrer de COVID-19. A gravidade da doença depende de vários fatores, como comorbidades já adquiridas, resposta do sistema imunológico e acesso a cuidados médicos (Hu *et al.*, 2021).

O impacto da COVID-19 nas taxas de mortalidade no Brasil tem sido significativo. O ano de 2024 fechou com 39.073.544 casos confirmados de COVID-19 com 714.597 mortes no país (Ministério da Saúde, 2025). A taxa geral de mortalidade por COVID-19 no Brasil durante 2020-21 foi de 14,8 por 10.000 habitantes. As taxas de mortalidade aumentam com a idade, atingindo 83,5 e 161,5 por 10.000 para faixas etárias mais avançadas (Szwarcwald *et al.*, 2022).

No Nordeste do Brasil, durante o primeiro ano da pandemia, ocorreram 66.358 mortes relacionadas à COVID-19, com uma taxa de mortalidade de 116,2 por 100.000 habitantes (Andrade *et al.*, 2022). A resposta do país à pandemia foi criticada por uma gestão inadequada, o que levou a consequências trágicas (Szwarcwald *et al.*, 2022).

A pandemia teve um impacto significativo na expectativa de vida no Brasil. Um estudo estimou uma queda na expectativa de vida ao nascer (e_0) em 2020 de 1,3 anos, nível de mortalidade não visto desde 2014. A redução da expectativa de vida aos 65 anos (e_{65}) em 2020 foi de 0,9 anos, colocando o Brasil de volta aos níveis de 2012. Nos primeiros 4 meses de 2021, as mortes por COVID-19 representaram 107% do total de 2020 (Castro *et al.*, 2021).

Em agosto de 2024, o Brasil tinha uma taxa de vacinação contra a COVID-19 de 225,92 doses por 100 pessoas. Isso coloca o Brasil em sétimo lugar entre os principais países da América Latina em termos de taxas de vacinação (Statista, 2025).

Em 23 de setembro de 2024, a OMS publicou o Relatório de Informações sobre Vacinação contra a COVID-19 analisando e apresentando dados referentes ao primeiro e segundo trimestres de 2024. Até o final do primeiro trimestre de 2024, 16,6 milhões de indivíduos foram relatados como tendo recebido uma dose da vacina contra a COVID-19. Desses, 6,4 milhões de indivíduos receberam a segunda dose da vacina durante o segundo trimestre de 2024 (Who, 2024). Em 2024, um total de 522.665.418 doses de vacinas foram aplicadas no Brasil (Ministério da saúde, 2025).

A OMS, em maio de 2023, declarou que a COVID-19 não é mais uma emergência de saúde global. Isso significa que a maioria dos países pode voltar à vida como a conhecíamos antes da doença, e que a pandemia está em tendência de queda (Who, 2023). Embora o SARS-CoV-2 tenha circulado e continue circulando amplamente e evoluindo, não é mais um evento incomum ou inesperado (Who, 2023). Porém, com o surgimento contínuo de variantes do SARS-CoV-2, continua sendo fundamental a necessidade de atualização constante das composições das vacinas contra a COVID-19.

3.3 FORMAS DE TRANSMISSÃO

O SARS-CoV-2 pode ser transmitido a uma pessoa saudável se ela tiver contato com a pessoa infectada ou qualquer um de seus pertences infectados. As gotículas respiratórias são as principais vias de transmissão (Yesudhas; Srivastava; Gromiha, 2021).

Estudos relataram que a transmissão por aerossol (transmissão aérea) também é possível para SARS-CoV-2, mas não há estudo claro sobre infecções neonatais (mãe para filho). No entanto, a transmissão pode ser evitada mantendo uma distância de 2 metros entre duas pessoas, usando máscaras ao sair e isolando as pessoas infectadas (Yesudhas; Srivastava; Gromiha, 2021).

A transmissão por contato direto ocorre quando um indivíduo entra em contato físico com uma pessoa infectada, como apertar as mãos ou abraçar. A transmissão por gotículas ocorre quando uma pessoa infectada tosse, espirra ou fala, e as gotículas contendo o vírus são expelidas no ar e caem nas membranas mucosas de outra pessoa. A transmissão por aerossóis ocorre quando o vírus fica suspenso no ar em partículas pequenas, que podem ser inaladas por outras pessoas (El-wahab *et al.*, 2021).

A carga viral, ou seja, a quantidade de vírus presente nas secreções respiratórias de uma pessoa infectada, é um fator importante na determinação da transmissibilidade do SARS-CoV-2 (Chen *et al.*, 2021). Estudos têm mostrado que indivíduos com cargas virais mais altas têm maior probabilidade de transmitir o vírus para outras pessoas. Além disso, a heterogeneidade de contato, ou seja, a variação no número e tipo de contatos que os indivíduos têm, também pode desempenhar um papel na disseminação do vírus. Algumas pessoas podem ter mais contatos próximos do que outras, e algumas podem ter contatos mais frequentes ou de maior duração, o que pode aumentar o risco de transmissão (Chen *et al.*, 2021).

Desta forma, o SARS-CoV-2 pode ser transmitido por contato direto, gotículas e aerossóis, e a carga viral e a heterogeneidade de contato podem influenciar a transmissibilidade do vírus. É importante seguir as diretrizes de saúde pública, como usar máscaras, praticar o distanciamento físico e evitar aglomerações, para reduzir o risco de transmissão (Chen *et al.*, 2021).

3.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A apresentação clínica da COVID-19 compreende uma ampla gama de sintomas inespecíficos, como febre, tosse seca, dispneia, cefaleia, produção de expectoração, perda de olfato e paladar, mialgia, fadiga, náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal (Oliveira *et al.*,

2020). No entanto, esses sintomas podem variar entre as populações, dependendo da localização geográfica e das doenças crônicas subjacentes (Kadirvelu *et al.*, 2022).

Os pacientes com COVID-19 podem ser classificados como assintomáticos ou sintomáticos, e os sintomas podem variar de leve à grave e crítico. A SARS é mais comum entre pessoas com fatores de risco, como idade avançada, tabagismo e aquelas com comorbidades associadas (diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares, obesidade, doenças pulmonares crônicas, doenças renais) (Oliveira *et al.*, 2020).

Os perfis dos sintomas também podem diferir de acordo com a variante da COVID-19 e a localização do indivíduo (Kadirvelu *et al.*, 2022). Por exemplo, foi relatado que a variante Ômicron BA.5 causa mais sintomas de resfriado e gripe em comparação com outras variantes (Whitaker *et al.*, 2022). A variante Delta é conhecida por causar sintomas semelhantes aos do vírus original, mas pode fazer com que as pessoas adoçam mais rapidamente, especialmente os mais jovens (Whitaker *et al.*, 2022).

Disfunções olfativas e gustativas são consideradas sintomas clínicos precoces da COVID-19 e podem ter valor diagnóstico e prognóstico (Singhal *et al.*, 2023). Eles podem preceder o início da doença clínica completa, e a recuperação desses sintomas também pode indicar a recuperação da infecção. Um estudo realizado em 2023 descobriu que a maioria dos relatos de disfunção do paladar em pacientes com COVID-19 eram genuínos e não devido à má interpretação da perda do olfato como perda do paladar (Nguyen *et al.*, 2023). O mesmo estudo demonstrou que a COVID-19 também pode afetar o paladar, ao contrário do resfriado típico.

Sobre as diferenças nos sintomas entre indivíduos vacinados e não vacinados com COVID-19 há informações limitadas. Um estudo comparando os sintomas apresentados e os perfis clínicos de indivíduos vacinados e não vacinados não encontrou diferença significativa entre os dois grupos (Fatima *et al.*, 2022). Outro estudo descobriu que, embora os casos de COVID-19 em pessoas totalmente vacinadas sejam menores, se uma pessoa vacinada contraísse COVID-19, o risco de sintomas prolongados (COVID longa) era reduzido quase pela metade em comparação com indivíduos não vacinados (Antonelli *et al.*, 2022).

É importante observar que a vacina contra a COVID-19 ainda é altamente eficaz na prevenção de infecções e doenças graves, hospitalização e morte. Mesmo que uma pessoa vacinada seja infectada com COVID-19, é menos provável que ela apresente sintomas graves e tenha uma doença mais curta do que indivíduos não vacinados (Antonelli *et al.*, 2022).

3.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da COVID-19 é baseado na história clínica e epidemiológica do paciente, bem como nos achados de exames complementares, como a radiografia de tórax e principalmente a tomografia de tórax (TC) revelando as imagens características de vidro fosco, que também foram observados em pacientes assintomáticos (Oliveira *et al.*, 2020). No entanto, o padrão ouro para o diagnóstico da COVID-19 é por meio da análise de ácidos nucleicos, ou seja, a detecção do RNA do SARS-CoV-2 em amostras de fluidos respiratórios (Hu *et al.*, 2021).

Devido a alta taxa de transmissão do SARS-CoV-2, medidas específicas são necessárias para conter o vírus, como o aprimoramento dos métodos diagnósticos para detecção de pacientes assintomáticos e levemente sintomáticos nas fases iniciais da doença (Oliveira *et al.*, 2020).

3.5.1 Teste imunocromatográfico

Os testes rápidos, como os testes de antígenos ou anticorpos contra a COVID-19, detectam proteínas virais do SARS-CoV-2 em vários tipos de amostras. Eles estão disponíveis como testes de diagnóstico rápido de uso único, que podem ser lidos visualmente ou processados e lidos usando um pequeno dispositivo portátil (Peeling *et al.*, 2021).

Esses testes rápidos podem ser produzidos de forma muito mais rápida e barata em grandes quantidades para implantação em larga escala. Embora esses testes possam ser altamente específicos, geralmente não são tão sensíveis quanto os testes moleculares, feitos pela Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) (Peeling *et al.*, 2021).

No estudo de Yamayoshi *et al.* (2020), foi examinado a sensibilidade de quatro Ag-RDTs disponíveis no Japão em agosto de 2020, além de também avaliarem a eficácia com vários tipos de amostras clínicas coletadas de pacientes com COVID-19 e as compararam com o resultados da RT-qPCR.

O principal resultado observado foi que, todos os quatro Ag-RDTs falharam em detectar antígenos virais em várias amostras das quais o vírus foi isolado por RT-qPCR. Essa descoberta indica que os Ag-RDTs atuais perderam e provavelmente perderão alguns pacientes com COVID-19 que estão disseminando SARS-CoV-2.

3.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

Em janeiro de 2020, o novo coronavírus foi isolado de pacientes de Wuhan, permitindo o seu sequenciamento genético. Isso possibilitou o desenvolvimento de métodos de diagnóstico

específicos para COVID-19, como a RT-qPCR, que envolve a extração de RNA das secreções nasofaríngea e orofaríngea, seguida da transcrição reversa para converter o RNA em DNA complementar (cDNA) e sua amplificação em tempo real (Corman *et al.*, 2020). Os kits de RT-qPCRs que têm sido aplicados ao diagnóstico da COVID-19 contêm sondas fluorescentes que reconhecerão e hibridarão a segmentos dos produtos de amplificação, aumentando a especificidade dos ensaios (Oliveira *et al.*, 2020).

A RT-qPCR é o padrão ouro para a confirmação da COVID-19 em amostras respiratórias superiores (secreção nasofaríngea e orofaríngea). Vários protocolos de RT-qPCR foram divulgados pela OMS para fornecer um diagnóstico adequado, ajudar a testar populações e contribuir para controlar a propagação da doença (Oliveira *et al.*, 2020).

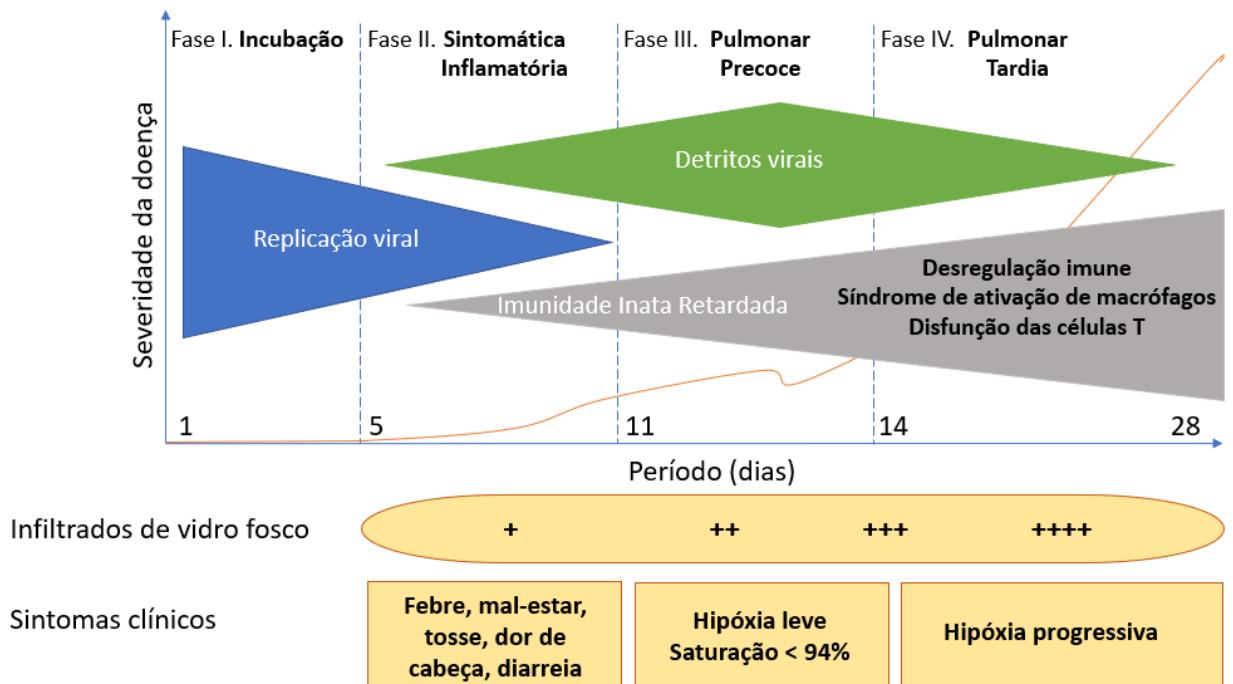
Porém, existem algumas limitações envolvendo esta técnica. A RT-qPCR é restrita a laboratórios certificados com equipamentos especializados, kits caros e técnicos treinados. Além disso, a RT-qPCR requer amostras do trato respiratório, como swabs nasais, o que pode atrasar o diagnóstico e tratamento (Li *et al.*, 2021a). Portanto, um diagnóstico oportuno e preciso requer um resultado de RT-qPCR combinado com sintomas clínicos típicos e testes sorológicos (Li *et al.*, 2021a).

3.6 FISIOPATOLOGIA

O SARS-CoV-2 apresenta características biológicas que estão principalmente envolvidas na interação com a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), que é amplamente expressa no corpo humano, incluindo tecidos renais, linfoides, cardiovasculares, além do sistema gastrointestinal (duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon), respiratório e sistema nervoso central (SNC). Com base em diferentes estudos, foi confirmado que a ACE2 atua como um receptor funcional para o SARS-CoV-2. A entrada celular do SARS-CoV-2 é mediada pela ligação de alta afinidade da proteína S ao ACE2 e pelo processamento da protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) na superfície da célula hospedeira, permitindo a ativação da proteína S (Lundstrom *et al.*, 2023).

Uma vez dentro da célula hospedeira, o vírus sofre replicação e formação de um RNA de fita negativa pelo RNA positivo de fita simples pré-existente através da atividade da RNA polimerase (transcrição) (Marik *et al.*, 2021). A COVID-19 progride por quatro fases distintas: a fase de incubação, a fase sintomática inflamatória e as fases pulmonar (precoce e tardia), como mostrado na figura 2. Durante o período de incubação, que dura em média 5 dias, os indivíduos podem transmitir o vírus a outras pessoas, mesmo que não apresentem sintomas (Marik *et al.*, 2021).

Figura 2- Estágios clínicos da COVID-19. I: Período de incubação que dura em média 5 dias, representado por uma alta taxa de replicação viral. II: Fase sintomática inflamatória, com início entre o 5º e duração até o 11º dia, caracterizado pelo aparecimento de sintomas clínicos leves. III: Fase pulmonar precoce, iniciada no 11º dia e estendida até o 14º dia, representada pela presença de detritos virais e ativação do sistema imune, com hipóxia leve e infiltrados de vidro fosco progressivo. IV: Fase pulmonar tardia, entre o 14º e 28º dia de infecção pelo SARS-CoV-2, caracterizado por sintomas clínicos severos e desregulação do sistema imune.



Fonte: BioRender e autora (2023).

A fase sintomática inflamatória desencadeada pela infecção por SARS-CoV-2, pode levar ao desenvolvimento de uma tempestade de citocinas, caracterizada por uma liberação excessiva e descontrolada de citocinas inflamatórias. Isso pode causar uma inflamação generalizada nos pulmões e em outros órgãos, levando a SDRA e disfunção orgânica múltipla, representada pelas fases pulmonar precoce e tardia (Mehta *et al.*, 2020).

A liberação inflamatória de citocinas e a apoptose retardada de neutrófilos contribuem para a trombose pulmonar e a tempestade de citocinas (Bikdeli *et al.*, 2020). Esses mecanismos são consistentes com marcadores clínicos observados em pacientes com COVID-19, como alta expressão de fator de necrose tumoral (TNF), relação neutrófilo-linfócito (NLR) elevada, dano alveolar difuso (DAD) via apoptose celular em epitélio respiratório e endotélio vascular, elevação da lactato desidrogenase (LDH) e proteína C reativa (PCR), alta produção de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), baixa contagem de plaquetas e trombose (Lundstrom *et al.*, 2023).

Além disso, as tempestades de citocinas induzidas pela inflamação, incluindo a produção de interleucina 6 (IL-6), TNF, fator estimulador de colônias de granulócitos, IL-1 β e

IL-7, estão associadas a piora dos desfechos clínicos em pacientes com COVID-19 (Mangalmurti *et al.*, 2020). No contexto das vias nos tecidos e órgãos do hospedeiro, os mecanismos moleculares subjacentes à liberação descontrolada de citocinas inflamatórias na infecção por SARS-CoV-2 ainda não foram totalmente elucidados (Li *et al.*, 2021b).

Estudos anteriores sugeriram que os vírus podem regular cuidadosamente a morte celular por meio de múltiplos mecanismos em diferentes tipos de células. Por um lado, a replicação e a disseminação do vírus são dificultadas devido à eliminação das células infectadas por meio da morte celular. Sob outra perspectiva, a morte celular desregulada causa dano celular descontrolado e resposta imune desordenada. Paralelamente, os vírus podem sequestrar a autofagia celular para serem vantajosos para nichos de replicação, evasão imune e liberação extracelular (Li *et al.*, 2022).

Atualmente, a relação entre SARS-CoV-2, morte celular e autofagia não está bem estabelecida, e compreender os mecanismos pelos quais o SARS-CoV-2 afeta o organismo é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de tratamento e prevenção eficazes contra a doença (Gao *et al.*, 2020).

3.6.1 Apoptose

A apoptose é uma morte celular programada comum, vital na manutenção da homeostase celular e na regulação de eventos fisiológicos e patológicos. As alterações morfológicas da apoptose são caracterizadas por encolhimento celular, condensação e fragmentação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (Carneiro *et al.*, 2020).

Foi descrito que a COVID-19 leva à liberação de citocinas que causam uma tempestade de citocinas, lesão orgânica e falência de múltiplos órgãos, podendo levar a SDRA (Mehta *et al.*, 2020). Essa tempestade pode ser resultado da morte celular em múltiplos órgãos (Uzuncakmak *et al.*, 2022).

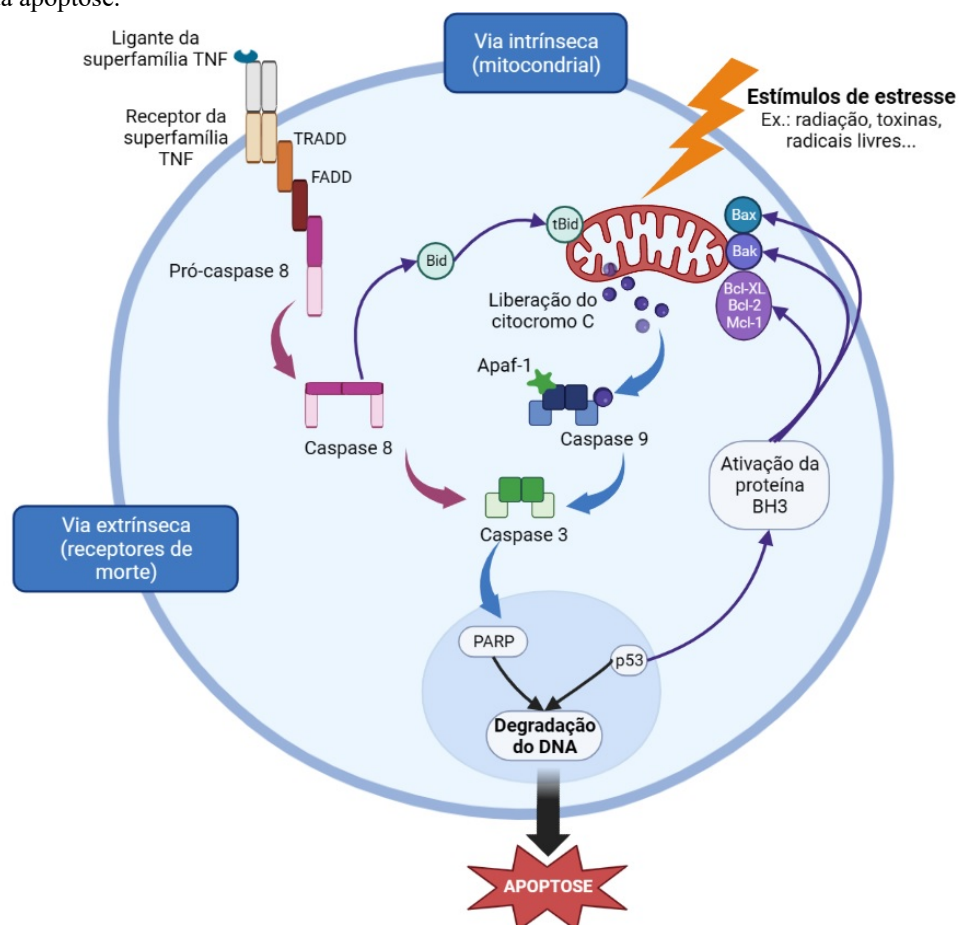
Além disso, depois de entrar na célula hospedeira, o SARS-CoV-2 replica RNAs e expressa proteínas, monta-se em partículas virais completas e eventualmente libera vírions, levando simultaneamente à morte celular e à liberação de conteúdo celular (Li *et al.*, 2022).

A apoptose pode ser desencadeada pelas vias extrínseca e intrínseca. A via extrínseca é iniciada quando ligantes de morte extracelulares, como o ligante Fas (FasL ou CD95) e o ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL), ligam-se aos seus respectivos receptores de morte na superfície celular, para montar o complexo de sinalização indutor de morte (DISC), causando a clivagem da procaspase-8 e, em seguida, a caspase-8 ativada cliva diretamente a procaspase-3/6/7 para induzir a apoptose celular (Li *et al.*, 2022).

Ao mesmo tempo, uma forma truncada do agonista de morte do domínio de interação BH3 (BID) processada pela caspase-8 ativada, pode se translocar para as mitocôndrias levando à permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP), mediada pela proteína associada ao BCL-2 (BAX) e pelo antagonista homólogo do BCL-2 (BAK). Posteriormente, o apoptossomo composto pelo cyt c, pelo fator ativador de protease apoptótica-1 (Apaf-1) e caspase-9, ativam as caspases efetoras-3/6/7 (Bedoui; Herold; Strasser, 2020).

A via intrínseca é estimulada por danos no DNA e estresse, o que podem ocasionar diretamente danos mitocondriais e MOMP a liberar cyt c no citoplasma. Os outros eventos subsequentes foram descritos acima (Li *et al.*, 2022). Ambas as vias de morte celular levam à ativação das caspases efetoras (caspases-3 e -7), para gerar uma cascata de eventos proteolíticos que levam à morte celular. Na figura 3, pode-se observar um esquema mostrando as vias intrínseca e extrínseca da apoptose.

Figura 3- Esquema ilustrando as vias intrínseca e extrínseca da apoptose. Os dois principais tipos de vias de apoptose são a via intrínseca (mitocondrial), onde a célula recebe um estímulo de estresse para se destruir de um dos seus próprios genes ou proteínas, devido à detecção de danos no DNA; e a via extrínseca (receptores de morte), onde a célula recebe um sinal para iniciar a apoptose de outras células do organismo. Ambas as vias vão convergir para o mesmo local, na chamada via de execução, onde a caspase 3 efetora é a responsável pela maioria dos efeitos deletérios da apoptose.



Fonte: BioRender e autora (2023).

O SARS-CoV-2 pode induzir vias relacionadas à inflamação, como a via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Sun *et al.*, 2020), que, na apoptose pode regular positivamente a expressão transcricional de alguns importantes inibidores de apoptose, como c-FLIP, inibidor de proteínas de apoptose ligado ao cromossomo X (XIAPs) e Bcl-2 (Kucharczak *et al.*, 2003). Ou seja, pode-se especular que o SARS-CoV-2 utilizaria a inibição da apoptose para evitar a eliminação, de modo a obter tempo e local suficientes para a replicação no estágio inicial (Li *et al.*, 2022).

Porém, estudos também demonstraram que as proteínas do SARS-CoV-2 participam da indução da apoptose (Li *et al.*, 2022). Ren *et al.* (2020), demonstraram que a proteína ORF3a do SARS-CoV-2, uma proteína acessória chave, induz a apoptose nas células. Além disso, foi relatado que SAR-CoV-2 ORF7b promove a expressão de TNF e induz apoptose dependente de TNF em células HEK293T e células Vero E6 (Yang *et al.*, 2021).

3.6.1.1 Caspase 3

A caspase-3, proteína efetora chave da apoptose, é ativada pelas caspases iniciadoras e, quando ativada, catalisa muitas proteínas celulares que funcionam na fragmentação do DNA, colapso nuclear e condensação da cromatina (Uzuncakmak *et al.*, 2022).

De acordo com um estudo recente, vesículas extracelulares derivadas de plasma de pacientes graves com COVID-19, aumentaram a atividade da caspase-3 e diminuíram a sobrevivência em células endoteliais microvasculares pulmonares humanas (Krishnamachary *et al.*, 2020). Uzuncakmak *et al.* (2022) também demonstraram que pacientes com COVID-19 apresentaram maior expressão de caspase-3 do que os voluntários saudáveis.

3.6.1.2 APAF-1

O fator ativador de protease apoptótica-1 (Apaf-1) é uma molécula fundamental na apoptose. O Apaf-1 oligomeriza em resposta à liberação do cyt c e forma um grande complexo conhecido como apoptossoma. A procaspase-9, uma caspase iniciadora na via mitocondrial, é recrutada e ativada pelo apoptossoma, levando ao processamento da caspase-3 a jusante (Shakeri *et al.*, 2017).

O apoptossoma, composto de cyt c, Apaf-1 e caspase-9, ativa as caspases executoras, que desempenham um papel importante na morte celular durante a infecção por SARS-CoV-2. A inibição da cascata de apoptose bloqueando os seus supressores foi sugerida como um alvo potencial para o tratamento da COVID-19. No entanto, os mecanismos moleculares exatos do

envolvimento do Apaf-1 na patogênese da COVID-19 ainda não são totalmente compreendidos (Li *et al.*, 2022).

3.6.1.3 PAWR

Também conhecida como Proteína de Resposta a Apoptose Prostática, PAWR é uma proteína supressora de tumor codificada em humanos pelo gene PAWR. Induz apoptose em células cancerígenas, mas não em células normais. PAWR está envolvida em vários tipos de câncer, incluindo câncer de próstata, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de endométrio e leucemia (Tan *et al.*, 2020). No entanto, não há evidências diretas do envolvimento do PAWR com a COVID-19 com base nos resultados da pesquisa fornecidos.

No entanto, por PAWR estar envolvida em vias de apoptose quando o ambiente está desregulado e inflamado por diversos tipos de câncer, pode ser uma sugestão de que exista uma correlação com a COVID-19, já que também é uma ambiente que induz a apoptose e liberação de citocinas pró-inflamatórias.

3.6.1.4 BID

BID (Agonista de Morte do Domínio de Interação BH3) é uma proteína pró-apoptótica pertencente à família de proteínas Bcl-2, que regula a MOMP. A BID é ativada por proteólise e desempenha um papel crucial na indução da apoptose, promovendo a ativação de Bax, homo-oligomerização de Bax e induzindo a MOMP. Esta permeabilização causa a liberação de várias proteínas mitocondriais, algumas das quais conduzem processos críticos a jusante na apoptose, como cyt c (Bedoui; Herold; Strasser, 2020).

Um estudo mostrou que a proteína ORF3a do SARS-CoV-2 poderia induzir eficientemente a apoptose clivando e ativando diretamente a caspase-8 para a via extrínseca e cross-talk para a via intrínseca via tBID, levando à liberação de cyt c e ativação de caspase-9 (Li *et al.*, 2022).

3.6.2 Autofagia

A autofagia é um processo de degradação celular que ocorre em resposta ao estresse do retículo endoplasmático e à resposta a proteínas desdobradas. Ela envolve a degradação de materiais citoplasmáticos por lisossomos. A autofagia pode funcionar como mecanismo de defesa e sobrevivência celular, gerando nutrientes para as células necessitadas (Li *et al.*, 2021b).

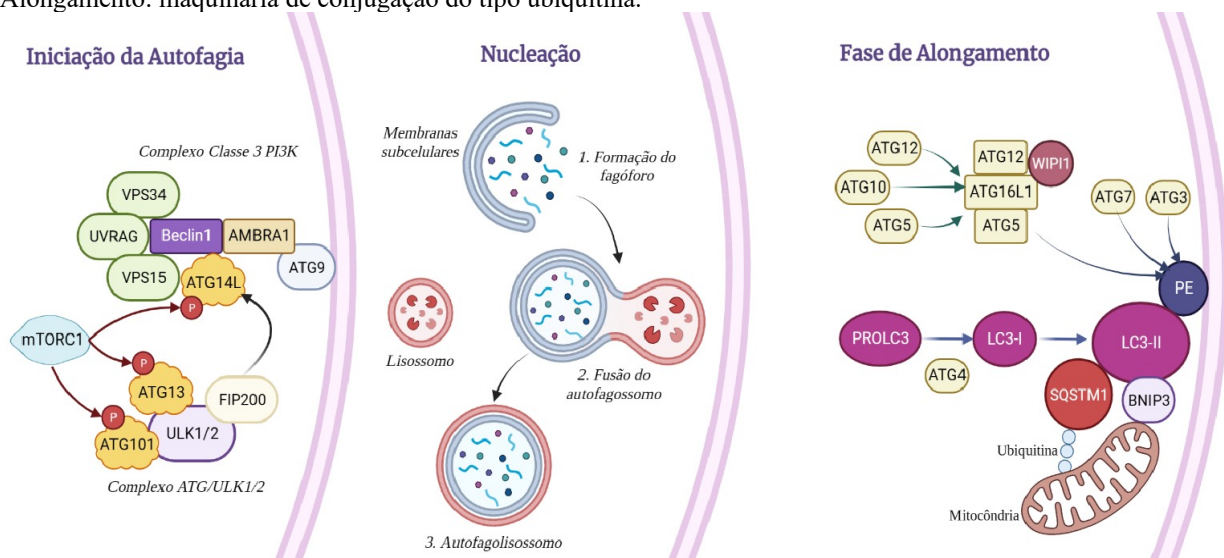
No entanto, quando a autofagia ocorre em excesso, pode levar à morte celular autofágica. A autofagia excessiva tem sido observada em células moribundas, indicando que

pode ser uma forma de morte celular ou uma tentativa fracassada de resgate de células estressadas (Li *et al.*, 2021b).

Na autofagia, as membranas subcelulares (como retículo endoplasmático (RE), complexo de Golgi, mitocôndrias e endossomos) englobam os componentes indesejados para formar uma estrutura de membrana dupla chamada fagóforo. A membrana do fagóforo se expande e se alonga até se fechar para formar o autofagossomo, que se funde com o lisossomo para formar o autofagolisossomo para degradação sob condições ácidas. Todo o processo é regulado por uma série de proteínas codificadas por genes relacionados a autofagia (ATGs) (Figura 4) (Li *et al.*, 2022).

Assim como outros coronavírus, o SARS-CoV-2 pode sequestrar o fluxo de autofagia para formar vesículas de membrana dupla (DMVs) derivados das membranas do RE. Porém, o SARS-CoV-2 pode inibir a autofagia por meio de vários mecanismos para facilitar sua replicação e transmissão (Koepke *et al.*, 2021). A proteína ORF3a do SARS-CoV-2 bloqueia a autofagia celular de várias maneiras. ORF3a interagindo com o gene associado a resistência à irradiação UV do regulador de autofagia (UBRAG), promove PI3KC3-C1, mas bloqueia PI3KC3-C2, levando à autofagia incompleta (Qu *et al.*, 2021). Portanto, estudos crescentes sugeriram que a interação entre SARS-CoV-2 e autofagia é extremamente intrincada, o que não foi totalmente estabelecido (Li *et al.*, 2022).

Figura 4- Etapas gerais da autofagia. i) Iniciação: ULK1 e complexo PI3K classe III ii) Nucleação iii) Alongamento: maquinaria de conjugação do tipo ubiquitina.



Fonte: BioRender e autora (2023).

3.6.2.1 ULK1

O complexo quinase 1 ativadora de autofagia semelhante a unc-51 (ULK1), é uma das moléculas que regula a autofagia (Li *et al.*, 2022).

Foi relatado que a proteína NSP15 do SARS-CoV-2 afeta a produção de autofagossomos por meio da interação com o eixo mTOR, que pode ser revertido pela rapamicina (um inibidor de mTOR). Sabe-se que o eixo mTOR exerce efeitos inibitórios na autofagia via inibição do complexo ULK1. Enquanto isso, a proteína PL^{pro} do SARS-CoV-2 cliva diretamente ULK1 para a destruição da formação do complexo ULK1-ATG13, inibindo o complexo (Mohamud *et al.*, 2021).

3.6.2.2 MAP1LC3

O sistema de junção da cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos tipo ubiquitina (MAP1LC3, conhecido como LC3), também é uma das moléculas que regula a autofagia (Li *et al.*, 2022). Ela está localizada na membrana do autofagossomo nos estágios iniciais, e é preservada até o final do processo para que possa ser usada como marcador para identificar o autofagossomo (Boroumand-Noughabi *et al.*, 2022).

Em estudos recentes, foi demonstrado que a infecção de células humanas com SARS-CoV-2 reduz o fluxo autofágico. Isso é caracterizado por dois aspectos, um acúmulo de SQSTM1 e a presença aumentada da forma processada de LC3B, LC3B-II (Koepke *et al.*, 2021). Notavelmente, o vírus é relativamente não afetado pela indução de autofagia com rapamicina, mas permanece sensível à ativação imune inata via interferons *in vitro*. Assim, o SARS-CoV-2 evita eficientemente as funções antivirais da autofagia (Koepke *et al.*, 2021).

3.6.2.3 ATG5

ATG5 é uma proteína que desempenha um papel crucial na autofagia, um processo celular que degrada e recicla componentes celulares. ATG5 é ativado por ATG7 e forma um complexo com ATG12, que é necessário para a lipidificação de proteínas da família ATG8 e sua incorporação em autofagossomos (Uniprot, 2023).

A autofagia tem sido mostrada como tendo um papel na patogênese da infecção por SARS-CoV-2, o vírus responsável pela COVID-19. Em um estudo, descobriu-se que ATG5 é dispensável para a replicação do vírus da hepatite murina (MHV) em macrófagos da medula óssea e fibroblastos embrionários primários de camundongo (Silva *et al.*, 2022). Outro estudo mostrou que ATG5 possui propriedades e funcionalidades únicas fora da via convencional da autofagia. Na ausência de ATG5, mas não de outros genes ATG, macrófagos se tornaram

sensibilizados à infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (Wang *et al.*, 2023). No entanto, não é possível descartar um papel não convencional para ATG5 na replicação do coronavírus.

3.6.2.4 SQSTM1

O complexo sequestossomo 1 (SQSTM1, também denominado p62) é responsável por marcar os componentes indesejados e levá-los ao autofagossomo para degradação (Li *et al.*, 2022).

Na presença das proteínas do SARS-CoV-2, E, M, ORF3a e ORF7a, o LC3B-II processado se acumula, enquanto a expressão de Nsp15 causa uma diminuição leve, mas consistente, no LC3B-II. De acordo com isso, a expressão de E, ORF3a, ORF7a e Nsp15 causa acúmulo de SQSTM1. Notavelmente, embora M induza um aumento da localização da membrana LC3B e do processamento de LC3B, não inibe a degradação de SQSTM1, indicando que esta proteína viral não bloqueia a autofagia clássica (Koepke *et al.*, 2021).

3.7 TRATAMENTO

As opções terapêuticas medicamentosas ainda seguem por caminhos experimentais e dividem opiniões entre profissionais da saúde, no entanto, seu uso tem sido justificado em tratamentos empíricos. Os tratamentos em potencial buscam interferir nos processos de interação celular do vírus e nos processos de replicação intracelular (Meneses, 2020).

Além disso, outras abordagens terapêuticas têm como objetivo modular o sistema imunológico inato para enfrentar o vírus ou inibir citocinas que são reguladas positivamente durante a replicação viral para diminuir a resposta fisiológica à doença, como é o caso dos corticosteróides. No tratamento da COVID-19, eles parecem estar relacionados a inibição da resposta inflamatória exacerbada. No momento, está indicado em quadros graves com nível de evidência fraco (Russell *et al.*, 2020).

Assim sendo, devido a semelhança estrutural com outros vírus, terapias antivirais têm sido testadas na luta contra a COVID-19. Vários medicamentos antivirais foram autorizados ou aprovados pela FDA para o tratamento da COVID-19, incluindo Remdesivir e Paxlovid (Cdc, 2023).

O Ritonavir-boosted Nirmatrelvir (Paxlovid) é um inibidor de protease oral que é ativo contra MPRO, uma protease viral que desempenha um papel essencial na replicação viral, clivando-o. A autorização de uso emergencial pela FDA, permite o uso do nirmatrelvir potencializado por ritonavir em pacientes não hospitalizados com COVID-19 leve a moderada,

que apresentam alto risco de evoluir para COVID-19 grave e estão dentro dos primeiros 5 dias do início dos sintomas. O estudo EPIC-HR demonstrou um benefício clínico do nirmatrelvir potencializado por ritonavir em pacientes não vacinados com alto risco de evoluir para COVID-19 grave (Amani; Amani, 2023).

O Remdesivir é um medicamento antiviral aprovado para o tratamento da COVID-19 leve a moderada. Ele é administrado por via intravenosa e demonstrou reduzir a duração das internações hospitalares para alguns pacientes (Coelho *et al.*, 2023). No entanto, um estudo recente descobriu que a combinação de corticosteroides com remdesivir não melhorou o tempo de recuperação clínica de pacientes com COVID-19 em comparação com o uso isolado do remdesivir (Coelho *et al.*, 2023).

Além dos medicamentos elucidados acima, as vacinas continuam sendo a chave central da prevenção e proteção contra infecções. Várias vacinas contra a COVID-19 receberam autorizações de uso emergencial (EUA) para prevenir a doença grave da COVID-19 causada pelo SARS-CoV-2. Elas foram fundamentais para controlar a gravidade da pandemia e melhorar os resultados clínicos (Padda; Parmar, 2023).

Atualmente, são quatro as principais vacinas autorizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso no Brasil: Coronavac, Janssen, Oxford-AstraZeneca e Pfizer (Portal do butantan, 2024). A Coronavac foi desenvolvida usando a tecnologia de vírus inativado e é administrada por meio de um regime de duas doses. A avaliação de segurança da vacina foi realizada em macacos rhesus, que são conhecidos por mimetizar sintomas semelhantes aos da COVID-19 após a infecção por SARS-CoV-2 (Yu *et al.*, 2020). Os resultados pré-clínicos usando duas doses (3 µg e 6 µg) com dois esquemas de imunização (nos dias 0 e 14 ou dias 0 e 28) indicaram evidências extensas de segurança e eficácia, com proteção completa contra a infecção por COVID-19 (Fernandes *et al.*, 2022).

As vacinas Janssen e Oxford-AstraZeneca, são baseadas em adenovírus recombinante construída a partir de vetores virais. Enquanto a Janssen possui um regime de dose única, são necessárias duas doses, com intervalo de 12 semanas, para a oxford-astrazeneca (portal do butantan, 2024). Ensaios clínicos testados em diversos países em mais de 60.000 participantes adultos, mostraram que as vacinas têm um perfil de segurança bem tolerado, sem eventos adversos graves relacionados à ela (Voysey *et al.*, 2021).

Paralelamente, a vacina Pfizer carrega um RNA mensageiro modificado por nucleosídeo que codifica a proteína S do SARS-CoV-2. É administrada sob um regime de 2 doses, também com um intervalo de 12 semanas (Fernandes *et al.*, 2022). Polack *et al.* (2020) demonstraram que esta vacina conferiu 95% de proteção contra a COVID-19 em pessoas com

16 anos de idade ou mais, com efeitos adversos leves semelhantes aos observados com outras vacinas virais conhecidas.

Contudo, dada a frequência alarmante do surgimento de novas variantes do SARS-CoV-2, a eficácia das vacinas existentes permanece em questão. Pode ser encorajador afirmar que, além do público em geral, pacientes com câncer e outros indivíduos imunocomprometidos, mostraram o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes após a vacinação com a maioria das vacinas convencionais (Kuruhade *et al.*, 2023).

Desta forma, como visto anteriormente, foi apontado que o SARS-CoV-2 desencadeia potentemente a apoptose de diferentes células hospedeiras, levando a lesões excessivas no tecido, bem como à perda de função, e isso pode facilitar a ocorrência da doença e a mortalidade em estágios posteriores. Portanto, bloquear a apoptose por meio da supressão da cascata de caspases, é uma maneira potencial de atenuar a disseminação viral e surgiu como possibilidade de alvo terapêutico anti-COVID-19 (Yuan *et al.*, 2023).

Sendo assim, inibidores de caspase têm sido sugeridos como uma estratégia terapêutica potencial para melhorar ou prevenir a COVID-19 grave (Premeaux *et al.*, 2022). Um estudo constatou que a inibição pan-caspase poderia reduzir a expressão de citocinas que estavam elevadas em pacientes com COVID-19, assim como sugeriu que inibidores de caspase poderiam ser usados para prevenir ou melhorar a COVID-19 grave (Plassmeyer *et al.*, 2022). No entanto, são necessárias mais pesquisas para determinar a eficácia e segurança dos inibidores de caspase no tratamento da COVID-19.

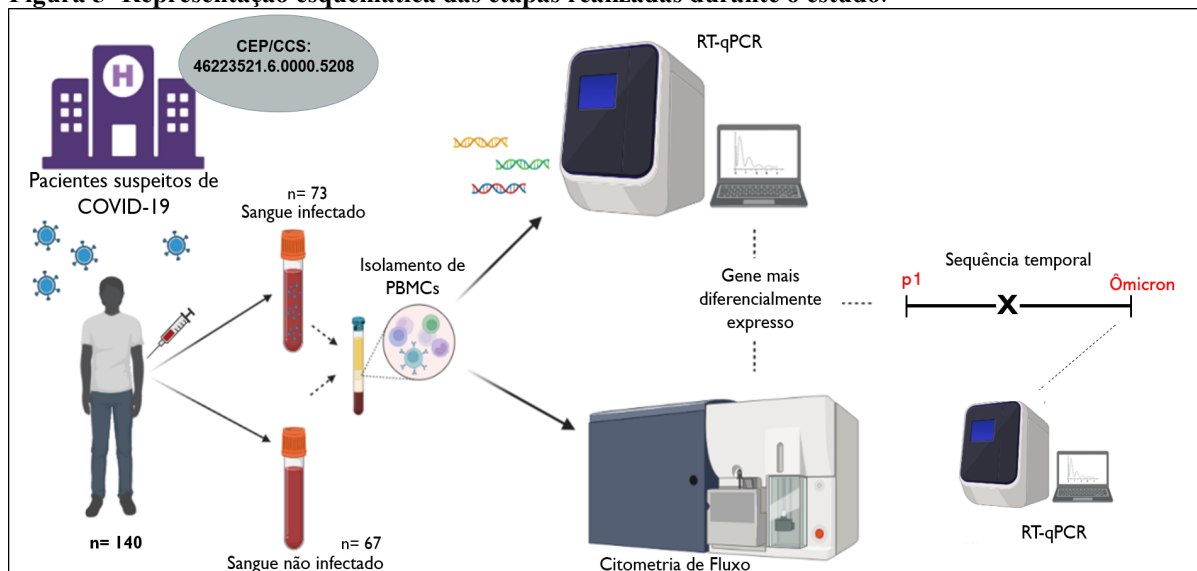
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Durante o pico pandêmico da COVID-19, o Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) pertencente ao Núcleo de pesquisa em Inovação Terapêutica – Suely Galdino (NUPIT-SG), foi certificado pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN-PE), para atuar como força-tarefa no diagnóstico da COVID-19.

O trabalho baseou-se em um estudo transversal, onde a primeira etapa foi a coleta de sangue de pacientes suspeitos de COVID-19, internados em um hospital de campanha no município de Caruaru – PE, após convênio da UFPE com a Associação Municipalista de Pernambuco (AMUPE), entre os meses de julho 2020 à dezembro de 2021. Após traigem do diagnóstico por RT-qPCR, foi feita a separação das PBMCs e a realização de nova RT-qPCR para verificar a expressão dos genes apoptóticos e autofágicos que foram selecionados para o estudo. Dentre os genes selecionados, foi realizado uma citometria de fluxo para aquele mais diferencialmente expresso. Por fim, para confirmar se o gene mais diferencilmente expresso se comportaria da mesma forma entre a variante p1 *versus* a variante ômicron da COVID-19, foi realizada uma nova RT-qPCR, conforme mostra a figura 5 abaixo.

Figura 5- Representação esquemática das etapas realizadas durante o estudo.



Fonte: BioRender e autora (2024).

4.2 COMITÊ DE ÉTICA

O projeto foi submetido e aprovado (CAAE: 46223521.6.0000.5208) pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos (CEP), localizado no 1º andar do Centro de Ciências da

Saúde (CCS), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (Anexo A).

4.3 RECRUTAMENTO DAS AMOSTRAS

Foram recebidos de cada paciente um swab nasofaríngeo em solução salina tamponada (PBS) ou meio de transporte viral (VTM), e dois tubos de EDTA contendo sangue total, acompanhados dos dados clínicos relatados em prontuário médico.

O swab nasofaríngeo foi utilizado para o diagnóstico laboratorial da COVID-19 por meio de RT-qPCR. Amostras com um *Quantification cycle* (Cq) até 40 foram consideradas detectáveis para SARS-CoV-2. Além disso, de acordo com o estudo de Waudby-West *et al.* (2021), amostras com um Cq entre 15-20, foram classificadas como uma alta carga viral, Cq entre 21-30 como carga viral intermediária e Cq entre 31-40 como baixa carga viral. Após a liberação do resultado, os pacientes suspeitos foram classificados em infectados e não infectados pelo vírus. Ao total, foram recrutados para esta pesquisa 140 amostras de pacientes (n=73 infectados e n=67 não infectados pelo SARS-CoV-2).

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos na pesquisa amostras de pacientes suspeitos sintomáticos, idade >18 anos, com diagnóstico laboratorial por RT-qPCR detectável ou não para o SARS-CoV-2. Amostras de pacientes assintomáticos, grávidas, pacientes com câncer ativo, imunodeprimidos e em uso de corticoide, foram excluídos do estudo.

4.5 COLETA, PROCESSAMENTO E OBTENÇÃO DAS PBMCs

De cada paciente foram coletados 2 tubos de 4 ml de sangue total em tubo com EDTA. Para o processamento de ambos os tubos, houve adição de Ficoll-Hypaque na proporção 1:1 com o sangue (4 mL de Ficoll para 4mL de sangue), seguida de centrifugação a 700G por 20 min., aceleração 6 e freio 4. Após isso, o anel de PBMC foi coletado com uma pipeta pasteur, adicionado a um tubo de 1,5 mL e centrifugado novamente, a 700G - 5 min. O sobrenadante foi descartado, um dos pellets foi ressuscitado em 750 µL de trizol para posterior extração de RNA; e o outro foi ressuscitado em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) + 900 µL de soro fetal bovino (SFB) para citometria de fluxo. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C.

4.6 EXTRAÇÃO DO RNA

A extração do RNA foi realizada pelo método do trizol-clorofórmio. Ao microtubo contendo PBMCs armazenada em trizol, como descrito no item 4.5 acima, foram adicionados 150 µL de clorofórmio e agitação durante 20 segundos, seguida de incubação por 3 min. e centrifugação a 16000G por 15 min. - 4° C. O sobrenadante translúcido foi transferido para outro microtubo, e a ele foram adicionados 375 µL de isopropanol a 100%, com incubação durante 10 minutos, seguida de centrifugação a 16000G durante 10 min. - 4°C. Após isso, o sobrenadante foi removido, e ao precipitado foram adicionados 750 µL de etanol 75%. O microtubo foi vortexado brevemente e centrifugado a 6300G durante 5 min. - 4°C. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o microtubo deixado aberto para evaporação do álcool. Para reidratação do RNA, o precipitado foi ressuspensão em solução RNase free, seguido de incubação a 55°C por aproximadamente 15 minutos. Em seguida, o RNA foi quantificado via espectrofotômetro pelo NanoDrop®.

4.7 SÍNTESE DO cDNA E EXPRESSÃO GÊNICA

A concentração ótima de RNA utilizada para síntese do cDNA foi de 500 ng definida experimentalmente, utilizando o Kit High-capacity cDNA archive Kit 2X (Applied Biosystems®). A expressão gênica foi realizada por RT-qPCR, utilizando o método de detecção por sondas de hidrólise TaqMan (Applied Biosystems®) no aparelho QuantStudio™ 5®. Resumidamente, uma mistura de 20 µL foi preparada contendo 10 µL do mastermix universal, 7,5 µL de água RNase free, 0,5 µL de sonda e 2 µL do cDNA, sob o seguinte protocolo de ciclagem: 50° C por 2 min., 95° C por 10 s, seguido de 40 ciclos de 95° C por 15 s e 60° C por 1 s. Os genes alvo avaliados para apoptose foram CASP3 (Hs00234387_m1), BID (Hs00609632_m1), APAF-1 (Hs00559441_m1) e PAWR (Hs01088574_m1); para autofagia foram utilizados MAP1LC3 (Hs01076567_g1), ULK1 (Hs00177504_m1), ATG5 (Hs00355494_m1) e SQSTM1 (Hs00177654_m1). A expressão relativa do RNA foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Como controle endógeno da reação, foi realizado experimentalmente para validação, a comparação entre os genes 18S (Hs03003631_g1) e GAPDH (Hs02786624_g1). O padrão de expressão entre eles manteve-se uniforme e por critério de disponibilidade, foi utilizado o 18S.

Além disso, de acordo com o protocolo do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), o sequenciamento genético das amostras detectáveis para SARS-CoV-2 com um $C_q \leq 26$, foi realizado em parceria com o Instituto Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz/PE (Fiocruz PE).

4.8 DESCONGELAMENTO DAS PBMCs PARA CITOMETRIA DE FLUXO

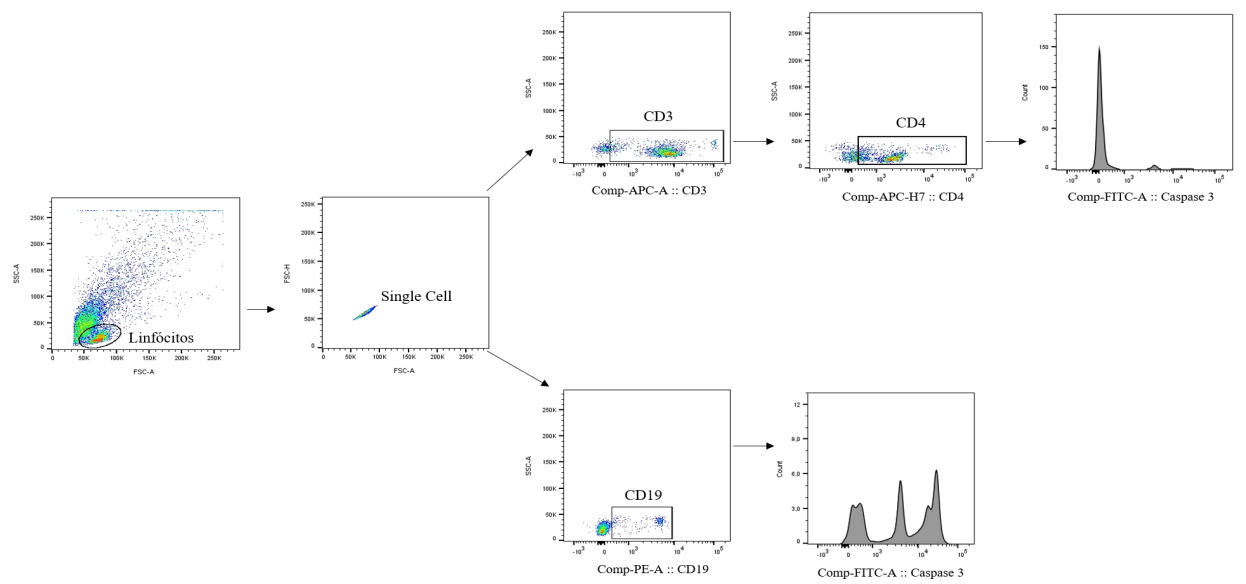
As PBMCs armazenadas em DMSO + SFB como descrito no item 4.5, foram descongeladas em banho-maria a 37° C e transferidas para um tubo de fundo cônico de 15 mL. Em seguida, foram adicionados vagarosamente 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, com posterior centrifugação a 400G/ 10 min./ 20° C. O sobrenadante foi descartado e duas lavagens sucessivas com PBS gelado a 400G/ 10 minutos/ 4° C foram realizadas. Após as lavagens, as PBMCs foram ressuspensas em 5 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e foi realizada a contagem das células por meio da câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi verificada pela utilização de Trypan Blue (SIGMA, St. Louis, MO). Um total de $1,5 \times 10^5$ células/poço foram colocadas em cultura por 48h, após padronização. O controle positivo (2,4 μ M de doxorubicina) também foi incluído.

Após 48h de cultura, ocorreu a preparação das células para marcação com o anticorpo. O sobrenadante e as células foram transferidos para um tubo cônico de 15 mL, lavado 2 vezes com PBS-BSA e centrifugado a 400G/ 10 min./ 4° C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células ressuspensas em 200 μ L de PBS foi transferido para a marcação com anticorpo em tubo de citometria BD FACSTM.

4.9 CITOMETRIA DE FLUXO

Para cada paciente, foram incluídos um controle negativo (células não marcadas) e uma marcação com todos os anticorpos. A fim de melhorar a qualidade e confiabilidade do resultado, através do posicionamento adequado dos gates, também foi utilizado o controle interno FMO (*Fluorescence Minus One Control*) (Anexo B). 100 μ l de PBMCs foram imunomarcadas utilizando o kit CellerEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit (Invitrogen, Cat. No. C10427) de acordo com as instruções do fabricante, junto com uma mistura de anticorpos BD® (tabela 1), à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS antes da aquisição, a qual foi realizada através do BD FACSAria™ III Cell Sorter (BD Biosciences, CA), utilizando 10.000 eventos. Como mostra a figura 6 abaixo, a análise subsequente com gating celular apropriado foi realizada para excluir detritos celulares.

Figura 6- Estratégia de gating para a determinação da Intensidade Média de Fluorescência (IMF) nas populações de células TCD4+ e células B.



Fonte: Autora (2024).

Tabela 1- Anticorpos utilizados na marcação das PBMCs para citometria de fluxo.

ANTICORPO	FLUOROCROMO	CLONE	FABRICANTE	VOLUME
Mouse Anti-human CD3 (Cat. 555335)	APC	-	BD Biosciences	2 µL
Mouse Anti-human CD4 (Cat. 560158)	APC-H7	RPA-T4	BD Biosciences	1 µL
Mouse Anti-human CD19 (Cat. 555413)	PE	-	BD Biosciences	2 µL
CellEvent Caspase-3/7 Green	FITC	-	Invitrogen	0,5 µL
SYTOX AADvanced Dead	Precp	-	Invitrogen	0,5 µL

Fonte: Autora (2024).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da expressão gênica foram analisados usando o programa estatístico GraphPad Prism, versão 8.0.1 (San Diego, CA). A normalidade das amostras foi verificada com o teste D’Agostino. Os dados numéricos foram expressos como média ± SD se apresentassem distribuição normal, ou mediana [IQR 25th-75th percentil] se não estivessem dentro da normalidade. Para análise entre dois grupos, foi utilizado o teste t não paramétrico de Mann-Whitney, uma vez que não seguiram a distribuição gaussiana. A análise entre três ou mais grupos, variou entre os testes One-way ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguido de múltiplas

comparações, a depender se seguiram ou não a distribuição normal, respectivamente. Os resultados obtidos na citometria de fluxo foram analisados no programa FlowJo v.10.1, expressos através da Intensidade Média de Fluorescência (IMF). Todos os outliers foram destituídos das análises. Além disso, a variabilidade entre o “n” amostral em relação aos diferentes genes do estudo, também está relacionada a não amplificação da amostra para o determinado gene, mesmo após repetição. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes; ns: não significativo.

5 RESULTADOS

5.1 PERFIL CLÍNICO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO

A tabela 2 abaixo mostra as variáveis clínicas dos diferentes grupos do estudo: pacientes sintomáticos infectados (n= 73) e não infectados (n= 67) pelo SARS-CoV-2. A média de idade em ambos os grupos foi de 47 ($\pm$ 19.559) anos e a maioria da população foi constituída de mulheres (55%).

No grupo de pacientes infectados pelo vírus, 57,53% deles apresentaram sintomas de tosse, seguidos de dispneia (47%), febre (45%) e cefaleia (41%). Em relação as comorbidades, hipertensão arterial sistêmica (HAS) liderou o ranking com aproximadamente 18%, seguido de obesidade (14%) e Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) (11%). Adesão a primeira dose da vacina (D1) foi observada em 20,5% dos indivíduos, ao passo que as duas doses completas (D2) foram relatadas em aproximadamente 14% do grupo. Apenas 5,5% dos indivíduos relataram terem tomado a dose única (DU) da vacina. Em contrapartida, aproximadamente 60% do grupo não tomaram nenhuma dose. Após o resultado do sequenciamento genético, a variante P.1, também conhecida como gama, foi a mais prevalente ($\pm$ 66%) do grupo.

Em relação ao grupo de pacientes suspeitos não infectados pelo vírus, aproximadamente 57% apresentaram sintomas de tosse [similar ao grupo anterior], seguidos de cefaleia (45%), febre e coriza, ambos com 39% e dispneia (36%). No que se refere as comorbidades, HAS também liderou com aproximadamente 16,5%, seguido de diabetes mellitus (9%) e obesidade (7,5%). Ao contrário do grupo anterior, a maior adesão à vacina foi observado em D2 (31%), seguida de D1 (21%) e DU (4,5%). No entanto, a maior parte dos indivíduos deste grupo também não tomaram nenhuma dose de vacina (43%).

Tabela 2- Características clínicas dos pacientes sintomáticos infectados e não infectados pelo SARS-CoV-2.

Características	Infectados SARS-CoV-2 (n=73)	Não infectados SARS-CoV-2 (n=67)
Idade (anos)	47.027 ± 19.559	46.9 ± 19.65
Sexo (masculino/feminino)	33/40	28/39
Sintomas		
Febre	33 (45,20%)	26 (38,80%)
Tosse	42 (57,53%)	38 (56,72%)
Cefaleia	30 (41,09%)	30 (44,77%)
Astenia	14 (19,17%)	13 (19,40%)
Anosmia/Ageusia	14 (19,17%)	7 (10,44%)
Necessidade de suporte respiratório	21 (28,76%)	10 (14,92%)
Dor de garganta	15 (20,54%)	10 (14,92%)
Coriza	19 (26,02%)	26 (38,80%)
Dispneia	34 (46,57%)	24 (35,82%)
Comorbidades		
HAS	13 (17,80%)	11 (16,41%)
Obesidade	10 (13,69%)	5 (7,46%)
DM2	6 (8,22%)	6 (8,95%)
Vacinação		
D1	15 (20,54%)	14 (20,89%)
D2	10 (13,69%)	21 (31,34%)
DU	4 (5,49%)	3 (4,49%)
Sem vacina	44 (60,28%)	29 (43,28%)
Variantes		
P.1	21 (65,61%)	
P.1.7	1 (3,13%)	
B.1.617.2	6 (18,75%)	
AY.99.2	3 (9,38%)	
AY.124	1 (3,13%)	

* HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; DM2: Diabetes Mellitus tipo 2; D1: Primeira dose da vacina; D2: Duas doses da vacina; DU: Dose única.

† Paciente com necessidade de suporte respiratório foi aquele considerado com SpO₂ < 94%, parâmetro considerado pelo National Institutes of Health (NIH) para COVID-19 severa.

Fonte: Autora (2023).

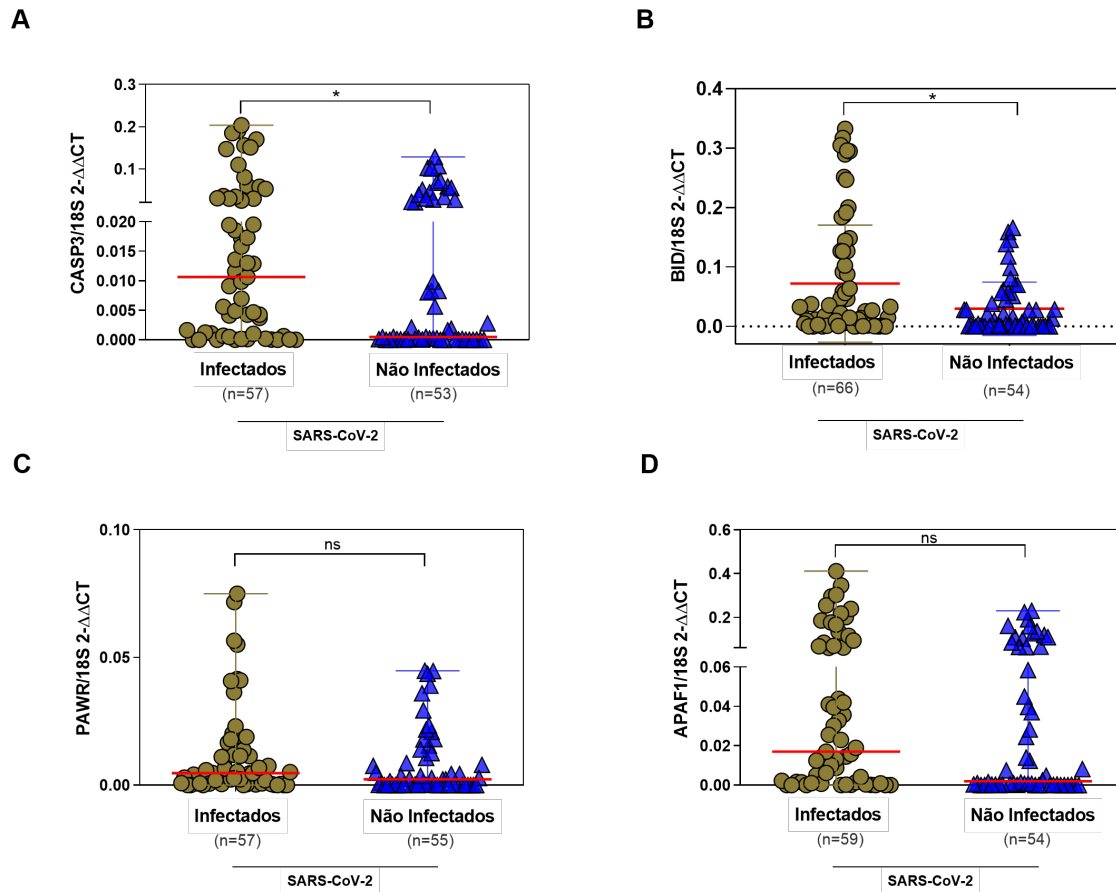
Para a variante ômicron, a média de idade no grupo de infectados foi de 41 anos, a maioria da população também foi constituída de mulheres e as demais características clínicas podem ser encontradas na tabela 4 (Anexo C).

5.2 EXPRESSÃO DOS GENES APOPTÓTICOS CASPASE 3, BID, PAWR E APAF1

Cnforme mostra a figura 7A, pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 apresentaram maior expressão relativa do gene CASPASE 3 (0,0107 [0,0008 – 0,0321]) quando comparado aos pacientes não infectados pelo vírus (0,0005 [5,569e-005 – 0,0288], p= 0,0269). Adicionalmente, pacientes infectados pelo vírus também superexpressaram BID (0,0196

[0,0025 – 0,1265]) quando comparado aos não infectados (0,0057 [0,0002 – 0,0466], $p=0,0104$, 7B). Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos para os genes PAWR (7C) e APAF1 (7D), ambos os genes tendem a uma maior mediana no grupo de infectados *versus* não infectados.

Figura 7- Níveis da expressão do gene CASPASE 3 (A), BID (B), PAWR (C) e APAF1 (D) entre pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 e não infectados pelo vírus. * $p < 0.05$; ns: não significativo.

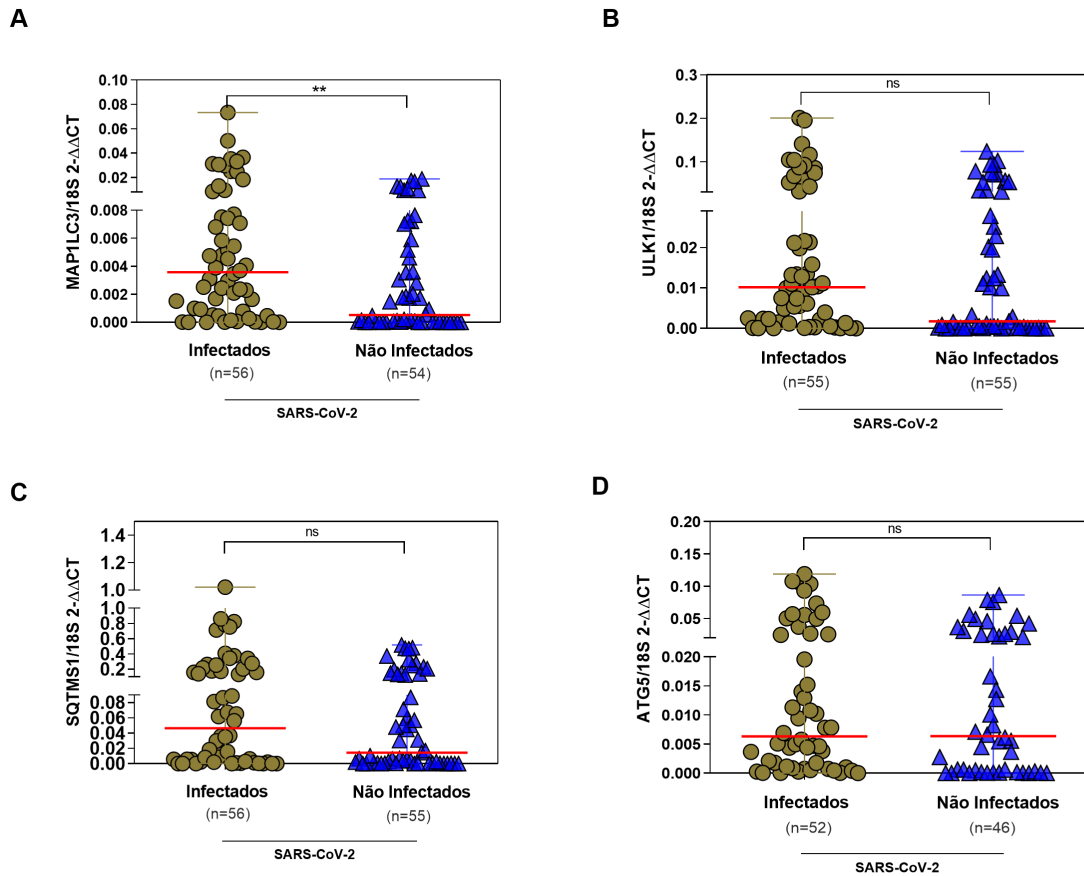


Fonte: Autora (2024).

5.3 EXPRESSÃO DOS GENES AUTOFÁGICOS MAP1LC3, ULK1, SQSTM1 E ATG5

Paralelamente, em relação aos genes autofágicos, a figura 8A evidencia que pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 apresentaram maior expressão do gene MAP1LC3 (0,0036 [0,0006 – 0,0083]) quando comparados aos pacientes não infectados pelo vírus (0,0005 [1,584e-005 – 0,0054], $p=0,0018$). Em contrapartida, para os genes ULK1 (8B), SQSTM1 (8C) e ATG5 (8D), não houve associação significativa entre os grupos, apesar de também apresentarem maior expressão quando comparado ao grupos dos não infectados.

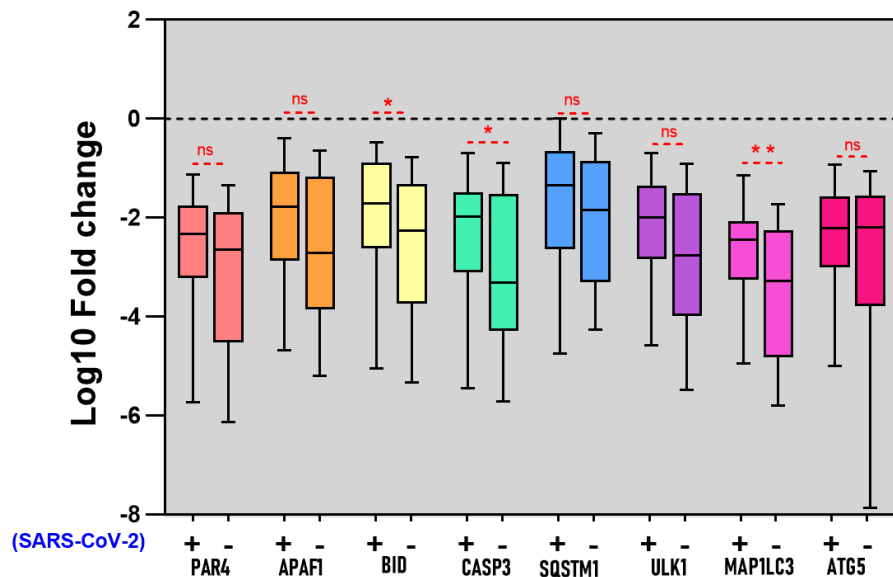
Figura 8- Níveis da expressão do gene MAP1LC3 (A), ULK1 (B), SQSTM1 (C) e ATG5 (D) entre pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 e não infectados pelo vírus. ** $p < 0.01$; ns: não significativo.



Fonte: Autora (2024).

Desta forma, vale destacar que embora apenas CASPASE 3, BID e MAP1LC3 apresentaram diferença significativa entre os grupos, todos os genes -apoptóticos e autofágicos- do estudo, apresentaram maior mediana nos pacientes infectados quando comparado aos não infectados pelo vírus (Figura 9).

Figura 9- Fold change de log10 da expressão dos genes apoptóticos PAR4, APAF1, BID e CASPASE3 e dos genes autofágicos SQSTM1, ULK1, MAP1LC3 e ATG5 entre pacientes infectados (+) e não infectados (-) pelo SARS-CoV-2. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns: não significativo.



Fonte: Autora (2024).

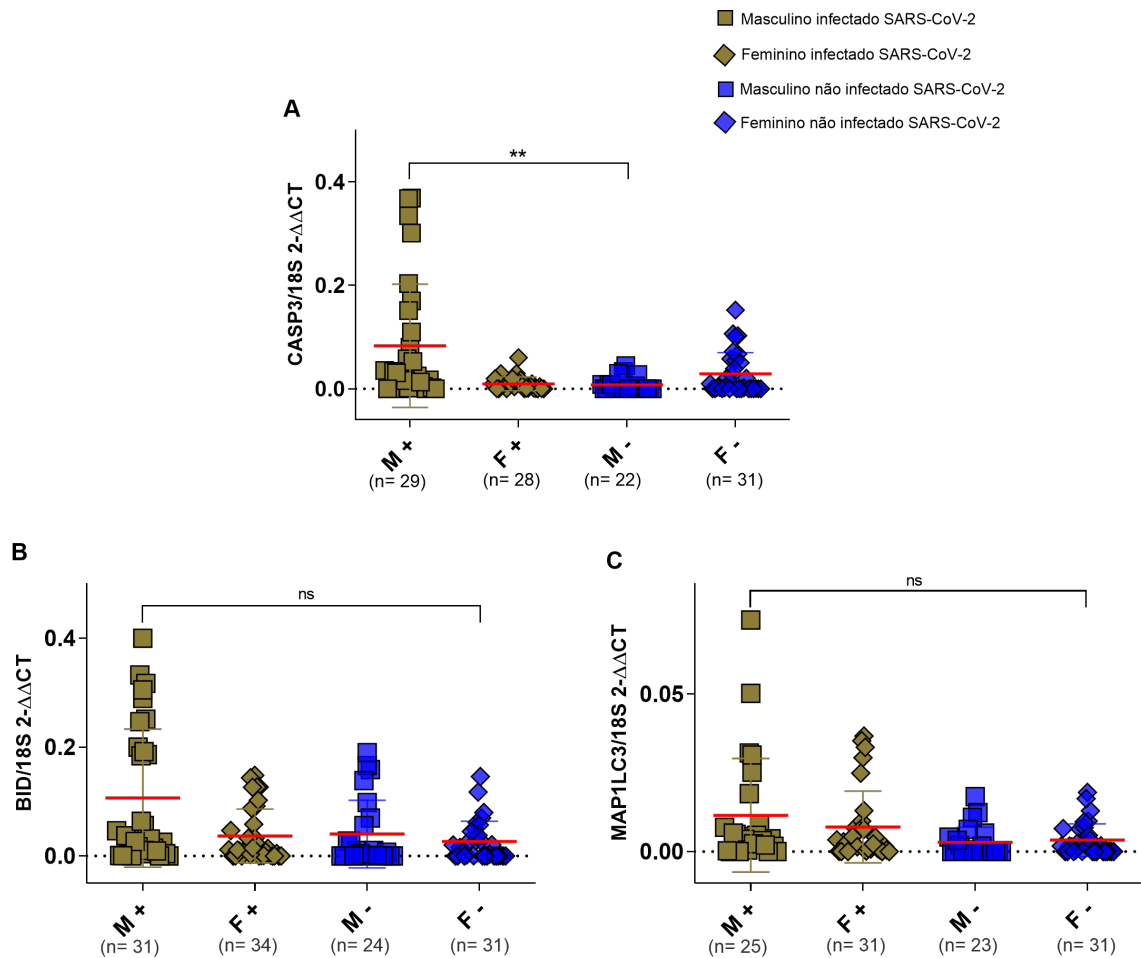
5.4 RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE CASPASE 3, BID, MAP1LC3 E AS VARIÁVEIS CLÍNICAS

Apenas os genes apoptóticos (CASPASE 3 e BID) e autofágico (MAP1LC3) que apresentaram significância estatística entre os grupos de pacientes infectados e não infectados, seguiram análise em relação aos parâmetros clínicos.

No que se refere ao sexo, a figura 10A abaixo demonstra que os pacientes do sexo masculino infectados pelo SARS-CoV-2, apresentaram uma maior expressão do gene CASPASE 3 (0,0246 [0,0029 – 0,1303]) quando comparado aos pacientes não infectados do mesmo sexo (0,0004 [0,0001 – 0,0083], $p = 0,0032$). Não houve diferença significativa entre os grupos de pacientes infectados *versus* não infectados do sexo feminino.

Para os genes BID (10B) e MAP1LC3 (10C), nenhum dos sexos apresentaram significância estatística em relação aos grupos de pacientes infectados *versus* não infectados pelo SARS-CoV-2, apesar dos homens também apresentarem um padrão de expressão gênica maior.

Figura 10- Relação entre os níveis da expressão do gene CASPASE 3 (A), BID (B) e MAP1LC3 (C) entre os sexos masculino e feminino de pacientes infectados *versus* não infectados pelo SARS-CoV-2. ** $p < 0.01$; ns: não significativo.



Fonte: Autora (2024).

Em relação as variáveis clínicas, conforme observado na tabela 3 verificou-se associação significativa de CASPASE 3 com os sintomas febre ($p = 0,0013$), cefaleia ($p = 0,0368$), astenia ($p = 0,0119$), dor de garganta ($p = 0,05$), coriza ($p = 0,0241$), dispneia ($p = 0,0043$) e com a comorbidade hipertensão ($p = 0,0466$). Para as referidas variáveis, pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 apresentaram uma maior expressão do gene.

Da mesma forma, uma superexpressão do gene BID em pacientes infectados pelo vírus também apresentou associação significativa com os sintomas febre ($p = 0,0002$), cefaleia ($p = 0,0441$), dispneia ($p = 0,0204$) e com a comorbidade hipertensão ($p = 0,0240$).

Em relação ao gene MAP1LC3, não houve associação significativa com nenhum dos sintomas e comorbidades.

Tabela 3- Associação entre a expressão gênica de CASPASE 3, BID e MAP1LC3 e as variáveis clínicas em pacientes infectados (I) e não infectados (NI) pelo SARS-CoV-2.

Variável clínica	Paciente	CASPASE 3	Valor p	BID	Valor p	MAP1LC3	Valor p
Febre	I	(0,0165[0,0047-0,0819])	p= 0,0013**	(0,0465[0,0141-0,1266])	p= 0,0002***	(0,0054[0,0025-0,0130])	p= 0,9340
	NI	(0,0005[5,569e-005-0,0288])		(0,0057[0,0002-0,0466])		(0,0057[0,0002-0,0466])	
Tosse	I	(0,0111[0,0032-0,0341])	p= 0,0679	(0,0290[0,0049-0,0599])	p= 0,0530	(0,0048[0,0009-0,0088])	p= 0,4324
	NI	(0,0005[5,569e-005-0,0288])		(0,0057[0,0002-0,0466])		(0,0057[0,0002-0,0466])	
Cefaleia	I	(0,0172[0,0011-0,0603])	p= 0,0368*	(0,0267[0,0061-0,0732])	p= 0,0441*	(0,0031[0,0013-0,0067])	p= 0,4084
	NI	(0,0005[5,569e-005-0,0288])		(0,0057[0,0002-0,0466])		(0,0057[0,0002-0,0466])	
Astenia	I	(0,0270[0,0022-0,3018])	p= 0,0119*	(0,0142[0,0045-0,0560])	p= 0,2784	(0,0030[0,0007-0,0677])	p= 0,6164
	NI	(0,0005[5,569e-005-0,0288])		(0,0057[0,0002-0,0466])		(0,0057[0,0002-0,0466])	
Anosmia/Ageusia	I	(0,0043[0,0004-0,1175])	p= 0,1692	(0,0220[0,0045-0,0560])	p= 0,1322	(0,0024[4,155e-005-0,0068])	p= 0,1780
	NI	(0,0005[5,569e-005-0,0288])		(0,0057[0,0002-0,0466])		(0,0057[0,0002-0,0466])	
S. Respiratório	I	(0,0133[0,0002-0,0746])	p= 0,0589	(0,0173[0,0009-0,1445])	p= 0,0829	(0,0039[0,0001-0,0143])	p= 0,2763
	NI	(0,0005[5,569e-005-0,0288])		(0,0057[0,0002-0,0466])		(0,0057[0,0002-0,0466])	
Dor de garganta	I	(0,0165[0,0044-0,0338])	p= 0,05*	(0,0326[0,0062-0,0638])	p= 0,0571	(0,0049[0,0015-0,0067])	p= 0,7489
	NI	(0,0005[5,569e-005-0,0288])		(0,0057[0,0002-0,0466])		(0,0057[0,0002-0,0466])	
Coriza	I	(0,0154[0,0038-0,0338])	p= 0,0241*	(0,0142[0,0077-0,0326])	p= 0,2816	(0,0039[0,0021-0,0062])	p= 0,6046
	NI	(0,0005[5,569e-005-0,0288])		(0,0057[0,0002-0,0466])		(0,0057[0,0002-0,0466])	
Dispneia	I	(0,0158[0,0029-0,1135])	p= 0,0043**	(0,0342[0,0072-0,1085])	p= 0,0204*	(0,0045[0,0006-0,0157])	p= 0,6315
	NI	(0,0005[5,569e-005-0,0288])		(0,0057[0,0002-0,0466])		(0,0057[0,0002-0,0466])	
Obesidade	I	(0,0117[0,0005-0,0467])	p= 0,2407	(0,0119[0,0014-0,1573])	p= 0,2598	(0,0021[0,0005-0,0045])	p= 0,3406
	NI	(0,0005[5,569e-005-0,0288])		(0,0057[0,0002-0,0466])		(0,0057[0,0002-0,0466])	
HAS	I	(0,0130[0,0081-0,0399])	p= 0,0466*	(0,0484[0,0097-0,1429])	p= 0,0240*	(0,0070[0,0029-0,0218])	p= 0,7353
	NI	(0,0005[5,569e-005-0,0288])		(0,0057[0,0002-0,0466])		(0,0057[0,0002-0,0466])	
DM	I	(0,0106[0,0030-0,0916])	p= 0,1712	(0,0222[0,0075-0,1397])	p= 0,1258	(0,0162[0,0035-0,0857])	p= 0,2387
	NI	(0,0005[5,569e-005-0,0288])		(0,0057[0,0002-0,0466])		(0,0057[0,0002-0,0466])	

* S. Respiratório: Suporte Respiratório; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; DM: Diabetes Mellitus; I: infectado; NI: não infectado.

† Os valores estão representados pela mediana com (25th – 75th percentil).

‡ *p< 0,05; **p< 0,01 e ***p< 0,001.

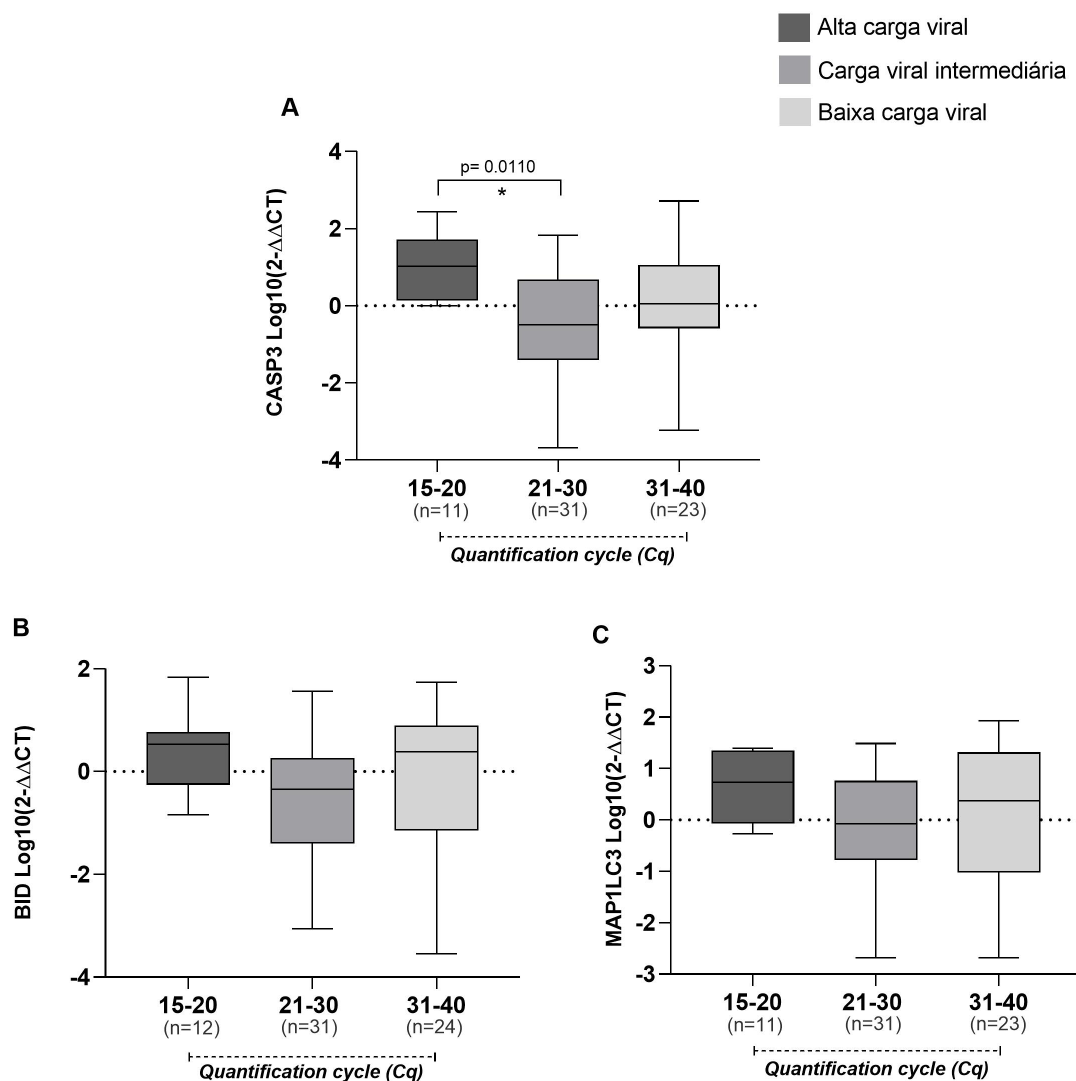
Fonte: Autora (2023).

5.5 RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE CASPASE 3, BID, MAP1LC3 E A CARGA VIRAL

As amostras detectáveis para SARS-CoV-2, de acordo com o estudo de Waudby-West *et al.* (2021), como citado anteriormente, foram classificadas em relação a carga viral em 3 grupos distintos: alta carga viral, carga viral intermediária e baixa carga viral. Conforme mostra a figura 11 abaixo, pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 com alta carga viral, apresentaram uma maior expressão do gene CASPASE 3 quando comparado aos pacientes com uma carga viral intermediária (11A). Não houve diferença em relação à baixa carga viral.

Paralelamente, os genes BID (11B) e MAP1LC3 (11C) também não apresentaram variação de expressão quando comparado aos diferentes valores do Cq/níveis da carga viral.

Figura 11- Relação entre os ciclos de quantificação da expressão dos genes CASPASE 3 (A), BID (B), MAP1LC3 (C) e os níveis da carga viral.



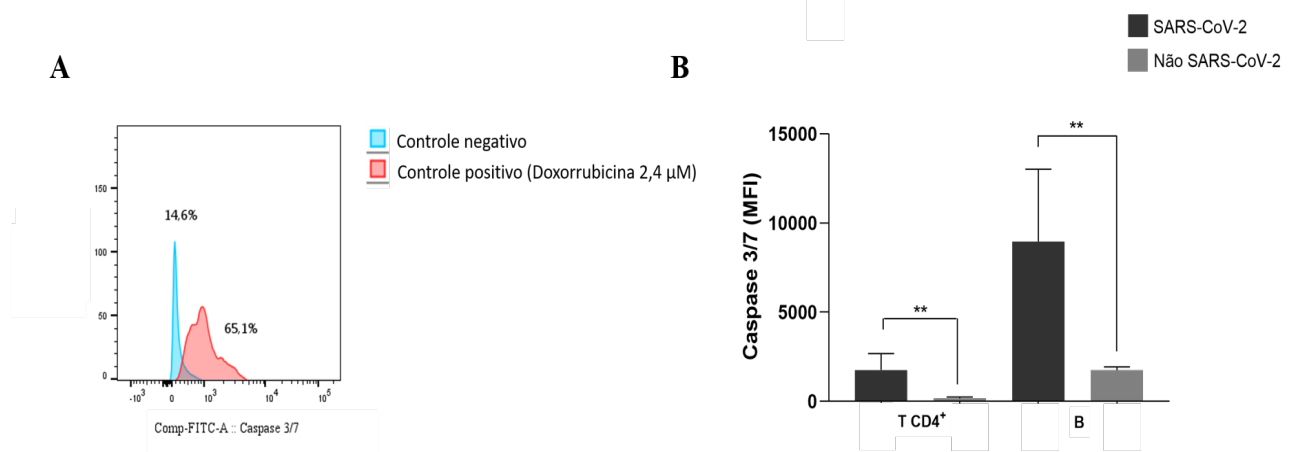
Fonte: Autora (2024).

5.6 ATIVIDADE DA CASPASE 3/7 NOS LINFÓCITOS T E B DURANTE A INFECÇÃO POR SARS-CoV-2

A atividade da caspase 3/7 foi avaliada em linfócitos T CD4⁺ e linfócitos B (CD19⁺) a partir do isolamento de PBMCs de pacientes infectados e não infectados pelo SARS-CoV-2.

Como demonstrado na figura 12A, foi utilizado a doxorrubicina na concentração de 2,4 µM, por um período de 48h, como controle positivo do ensaio. A IMF da coloração de caspase 3/7 ativa aumentou tanto na população de células TCD4⁺ (1354[1209-2497]), p= 0,0079) quanto na população de células B (9163[5294-12545], p= 0,0079) após infecção por SARS-CoV-2, em comparação com as células TCD4⁺ (187[111,1-230,5]) e B (1786[1551-1922]) dos pacientes não infectados (12B).

Figura 12- Intensidade Média de Fluorescência (IMF) da atividade de caspase 3/7 em relação as células TCD4⁺ e linfócitos B de pacientes infectados *versus* não infectados pelo SARS-CoV-2.

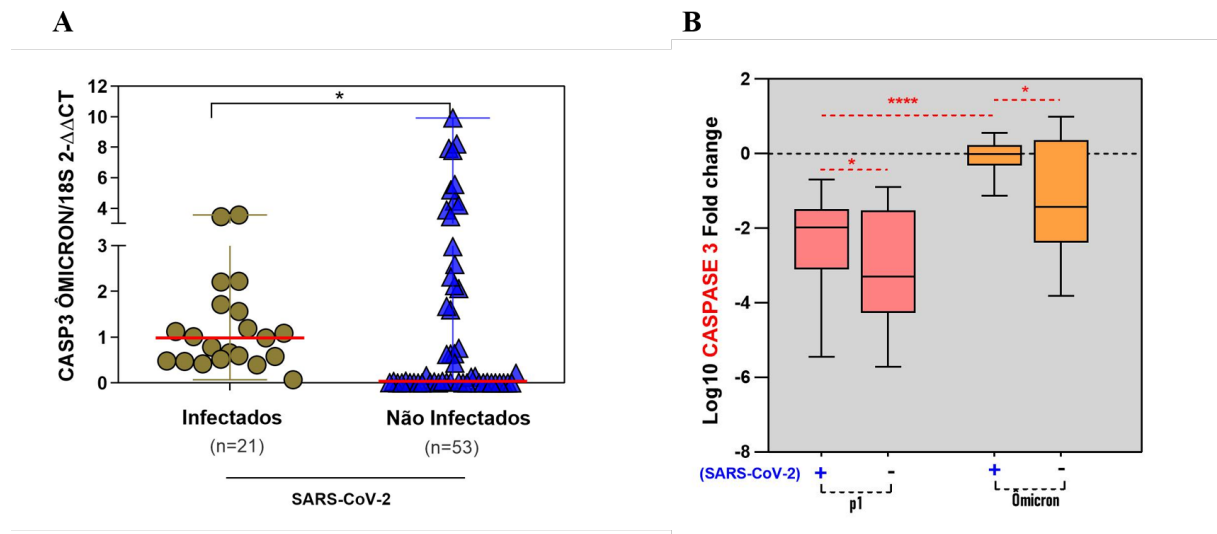


Fonte: Autora (2024).

5.7 EXPRESSÃO GÊNICA DE CASPASE 3 DA VARIANTE P.1 *versus* ÔMICRON

Conforme mostra a figura 13A abaixo, pacientes infectados pela variante ômicron do SARS-CoV-2, também apresentaram maior expressão do gene CASPASE 3 (0,9860 [0,5030 – 1,641]) quando comparado aos pacientes não infectados (0,03808 [0,0043 – 2,221], p= 0,0257). A comparação entre as variantes p1 x ômicron, entre pacientes infectados *versus* não infectados, pôde confirmar que ambas as variantes apresentaram superexpressão do gene mais diferencialmente expresso CASPASE 3 no grupo dos infectados (13B). Ao comparar apenas os grupos de infectados pelo SARS-CoV-2, a variante ômicron apresentou maior expressão do gene CASPASE 3 quando comparado a variante p1 (p< 0,0001).

Figura 13- A: Níveis da expressão do gene CASPASE 3 entre pacientes infectados com a variante ômicron e não infectados pelo SARS-CoV-2. **** $p < 0.0001$; * $p < 0.05$. **B:** Representação esquemática do log10 CASPASE 3 entre as variantes p1 *versus* ômicron.



6 DISCUSSÃO

A pandemia da COVID-19 resultou em mais de 7 milhões de mortes em todo o mundo e novas variantes continuam a surgir de tempos em tempos. O processo de infecção se manifesta de maneira diferente entre populações, sexo, raça, faixas etárias, etnia e presença de comorbidades associadas (Biswas *et al.*, 2020).

Diante disso, os resultados do nosso estudo mostraram que pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 apresentaram maior expressão dos genes CASPASE 3, BID e MAP1LC3, sendo CASPASE 3 correlacionados aos sintomas clínicos. Além disso, houve uma maior proporção de mulheres infectadas pelo vírus, apesar dos homens terem apresentado maior expressão da proteína de morte caspase 3. Somado à isto, indivíduos infectados com uma maior carga viral, apresentaram também aumento de CASPASE 3. As comorbidades mais prevalentes foram HAS, DM e obesidade. A linfopenia foi confirmada pelo aumento da atividade de CASPASE 3 frente aos linfócitos. E como resultado inédito, indivíduos infectados pelo variante ômicron do SARS-CoV-2, apresentaram maior expressão de CASPASE 3 quando comparado à variante P.1.

Como foco principal da nossa pesquisa, é reconhecido que a morte celular e a autofagia são cruciais para manter a homeostase do hospedeiro e participar da patogênese da doença. No entanto, o conhecimento das interações e mecanismos relacionados do SARS-CoV-2 entre a morte celular e autofagia requer uma explicação. Nossos resultados revelaram que pacientes com COVID-19 apresentaram uma maior expressão do gene autofágico MAP1LC3 e dos genes apoptóticos CASPASE 3 e BID, e que algumas variáveis clínicas, uma maior carga viral e a linfopenia foram observados e associados ao aumento da proteína de morte caspase 3.

Corroborando com os achados deste trabalho, diversos estudos mostraram uma maior expressão de CASPASE 3 em indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 quando comparado a controles saudáveis (Maleki *et al.*, 2021; Magro *et al.*, 2021; Krishnamachary *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2020). Além disso, Li *et al.* (2022) também demonstraram que os genes apoptóticos CASP3 e BID aumentaram significativamente em células dendríticas plasmocitóides de pacientes com COVID-19. Bem como, PBMCs de pacientes com COVID-19 mostraram uma regulação positiva da apoptose (Xiong *et al.*, 2020). Simultaneamente, evidências encontradas no trabalho de Prentice *et al.* (2004), identificaram a co-localização da proteína NSP8 da replicase do SARS-CoV com o marcador de autofagia MAP1LC3, sugerindo que o SARS-CoV pode interagir com a maquinaria autofágica.

Desta forma, é hipotético dizer que a autofagia tem uma dupla face durante a infecção por SARS-CoV-2. De um lado, ela exerce sua atividade antiviral pela indução do virófago e regulação da resposta imune; por outro, a autofagia é manipulada pelo SARS-CoV-2 para favorecer sua replicação e transmissão, escape de imunovigilância e resposta pró-inflamatória. Além disso, os autofagossomos acumulativos induziriam a apoptose celular, resultando em dano celular e lesão tecidual (Li *et al.*, 2022). Isto pode explicar porque MAP1LC3 é superexpresso em pacientes com COVID-19 mas não tem associação com nenhuma variável clínica. Apoiando a nossa hipótese, enquanto a apoptose serve para eliminar as células infectadas para limitar a propagação do vírus, a resposta apoptótica exacerbada pode prejudicar a integridade epitelial, levando à ruptura da barreira e resultados clínicos desfavoráveis (Chu *et al.*, 2021). Ou seja, a partir do que a literatura traz de evidência e os resultados encontrados neste trabalho, sugerimos que a autofagia induz apoptose, e que a apoptose exacerbada causada pela infecção do SARS-CoV-2 leva aos desfechos clínicos (como febre, cefaleia, astenia, dispneia) dos pacientes.

Os pacientes do nosso estudo tinham uma média de idade de 47 ± 19 anos e eram na maioria mulheres (55%). Parece que todas as faixas etárias da população são susceptíveis à infecção por SARS-CoV-2, mas nosso resultado se aproxima dos dados encontrados em diversos estudos onde a média de idade foi de 49 (Huang *et al.*, 2020) e 50 anos (Wu *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020; Guan *et al.*, 2020). No entanto, outros estudos não obtiveram resultados semelhantes, apresentando pacientes >50 anos confirmados de COVID-19 (Yang *et al.*, 2020; Zhang Jin-jin *et al.*, 2020). Da mesma forma, um estudo multicêntrico realizado por Quian *et al.* (2020), demonstraram que a COVID-19 era maior em mulheres do que homens, corroborando com os nossos achados, ao passo que outros estudos mostraram o inverso (Chen *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020).

Somado à isto, foi identificado que durante o nosso período de coleta, a variante P.1 foi a mais prevalente do grupo, junto a uma baixa adesão às vacinas. Estudos recentes mostraram que a linhagem P.1, considerada uma VOC, apresenta uma afinidade maior ao receptor ACE2, sendo associada a uma maior taxa de casos graves e óbitos de COVID-19, principalmente na população não vacinada (Chen *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). Além disso, de acordo com o estudo de Freitas *et al.* (2021), eles verificaram que no período em que predominou a linhagem P.1, houve uma maior proporção de mulheres infectadas, apesar do risco de morte ser maior entre homens com faixa etária de 40-59 anos; coerente com os achados da nossa pesquisa.

Embora em nosso estudo a proporção de mulheres infectadas tenha sido maior, observamos que homens infectados pelo vírus apresentaram uma maior expressão gênica da proteína de morte caspase 3. Corroborando com os nossos achados, Biswas *et al.* (2020), indicaram em seu estudo que pacientes do sexo masculino com COVID-19 foram associados a um risco significativamente aumentado de mortalidade em comparação com pacientes do sexo feminino.

Conforme revisado em outro estudo, foi afirmado que pacientes do sexo masculino podem ter maior expressão da ACE2, que pode ser regulada por hormônios sexuais masculinos, tornando-os mais propensos à infecção por SARS-CoV-2 (La Vignera *et al.*, 2020). Além disso, pode ser em parte porque a expressão de ACE2 codificada pelo gene ACE2 está no cromossomo X, permitindo assim que as mulheres sejam potencialmente heterozigotas, enquanto os homens que são definitivamente homozigotos permitem que sejam potencialmente expressores elevados de ACE2 (Gemmati *et al.*, 2020). Além disso, embora alguns estudos relatem que um dos cromossomos X das mulheres sejam inativados, algumas porções cromossômicas ficam de fora desta inativação. Esta diferença também elenca o alargamento da resposta imunológica da mulher, visto que vários genes presentes no cromossomo X codificam uma associação forte com a resposta imunológica (Carvalho *et al.*, 2021). Sendo assim, as mulheres podem neutralizar a progressão da infecção por SARS-CoV-2 e resultados clínicos graves devido ao transporte de alelos heterozigotos ligados ao cromossomo X.

Em relação aos sintomas, os de apresentação mais frequentes neste estudo foram tosse (57%), seguido de dispneia (47%), febre (45%) e cefaleia (41%). Uma vez que na doença os sintomas estão associados, é o que se observa porém numa proporção muito menor, quando em comparação com a meta-análise de 4.203 pacientes com COVID-19 na China, onde febre, tosse e dispneia (80,5%, 58,3% e 23,8%, respectivamente) foram observadas como as apresentações clínicas mais frequentes (Zhang *et al.*, 2020).

Yang *et al.* (2020) também relataram que febre (98%), tosse (77,0%) e dispneia (63,5%) foram os sintomas mais comuns em pacientes com COVID-19. Em contrapartida, sintomas menos comuns incluem produção de escarro, hemoptise, diarreia, dor de garganta, calafrios, náuseas e vômitos em estudos de pacientes na China (Huang *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020; Guan *et al.*, 2020). Essa grande discrepância na frequência dos sintomas clínicos, pode ser devido as diferentes localizações geográficas, as populações do estudo, raça, etnia, crenças e outros fatores do hospedeiro (Biswas *et al.*, 2020).

Outro achado relevante do nosso estudo mostrou que 40% dos pacientes com COVID-19 tinham alguma comorbidade associada, sendo as mais prevalentes HAS, obesidade e DM2.

Esses resultados seguem a mesma linha do estudo de Buffon *et al.* (2022), onde na sua população de estudo verificaram que 86% dos pacientes possuíam alguma comorbidade, sendo HAS, obesidade e DM2 também as principais. Além deles, de acordo com Geteneh *et al.* (2021), HAS e DM também foram as comorbidades médicas predominantes observadas em seu estudo.

Um mecanismo plausível pelo qual a obesidade pode influenciar o desenvolvimento da forma grave da COVID-19 é a inflamação imune inata sistêmica de baixo grau (adiposite), que pode predispor o órgão infectado à lesão imune inata quando a replicação viral não é controlada na fase inicial da doença (Russell *et al.*, 2023). Paralelamente, em pacientes diabéticos a função imunológica natural é reduzida consideravelmente, o que pode limitar o corpo a produzir o respectivo anticorpo contra qualquer infecção. Como a imunidade natural é diminuída em condições comórbidas e como os pacientes normalmente fazem uso da polifarmácia, as perceptíveis reações adversas a medicamentos (RAMs) juntamente com a regulação negativa da função imunológica podem ocorrer nesses pacientes e aumentar o risco de mortalidade (Berbudi *et al.*, 2020; Biswas *et al.*, 2020).

Sabe-se também que após a transmissão do SARS-CoV-2 para o corpo humano, o receptor ACE2 acelera a ligação desse vírus às suas células-alvo. ACE2 é fortemente expressa em células epiteliais do pulmão, intestino, rim e vasos sanguíneos, que é predominantemente regulada positivamente em pacientes com diabetes ou hipertensão tratados com inibidores da ECA (IECAs) e bloqueadores dos receptores tipo I da angiotensina II (BRAs) (Li *et al.*, 2017; Fang *et al.*, 2020). Essa regulação positiva de ACE2 em pacientes com diabetes e hipertensão tratando com IECA ou BRA, pode agravar a infecção por SARS-CoV-2. É, portanto, hipotetizado por alguns autores que pacientes diabéticos e hipertensos podem eventualmente aumentar o risco de desenvolver COVID-19 (Li *et al.*, 2017; Fang *et al.*, 2020; Wan *et al.*, 2020), o que está de acordo com os resultados do nosso estudo.

Além disso, a taxa de apoptose depende da replicação viral (Li *et al.*, 2020). Consistente com nossos resultados, de acordo com Naveca *et al.* (2021), as infecções por SARS-CoV-2 P.1 estão associadas a cargas virais mais altas. Eles revelaram que indivíduos infectados por P.1 apresentaram um menor valor de Cq (19,8) em comparação com indivíduos não infectados por esta variante (Cq = 23,0), indicando que a carga viral era ~ dez vezes maior em infecções por P.1 do que em não-P.1 (Naveca *et al.*, 2021). Isto pode explicar porque em nosso estudo, pacientes com uma maior carga viral apresentaram uma maior expressão da proteína pró-apoptótica caspase 3.

Em contrapartida, a variante ômicron tem uma taxa de infecção muito mais rápida do que as outras variantes (Jung *et al.*, 2022). As numerosas mutações no genoma viral da ômicron

e suas sublinhagens atribuem a ela uma quantidade maior de aptidão viral, devido à alteração da transmissão e da fisiopatologia do vírus. Com uma rápida mudança na estrutura viral, a ômicron e suas subvariantes, possuem a capacidade de escapar da eficiência de neutralização induzida por vacinação ou infecções anteriores (Chatterjee *et al.*, 2023). Um incidente relatado na Noruega detalha um cenário alarmante sobre a transmissão da variante ômicron. De 117 indivíduos que foram a uma festa, 76% deles eram vítimas da ômicron. De todos eles, 96% das pessoas que compareceram à festa foram vacinadas (Brandal *et al.*, 2021). Este fato alarmante destaca as altas taxas de transmissão desta variante, mesmo em indivíduos totalmente vacinados, corroborando com os achados deste estudo.

Desta forma, à medida que a pandemia progrediu, o SARS-CoV-2 evoluiu da variante P.1 para a variante ômicron [até a realização do presente estudo], caracterizada pela diminuição da infectividade pulmonar, doença menos grave, mas maior taxa de transmissibilidade e capacidade de evasão da resposta imunológica (Xiao *et al.*, 2023). Além disso, o estudo de Hou *et al.* (2022) revelou que, embora a infecção de todas as variantes avaliadas do SARS-CoV-2 tenha induzido apoptose em organoides do prosencéfalo e do mesencéfalo, a sublinhagem BA.2 da ômicron desencadeou uma magnitude substancialmente maior de apoptose em comparação com a de outras variantes do SARS-CoV-2; corroborando com os nossos achados.

Vale destacar que nosso estudo apresentou algumas limitações. Primeiro, os pacientes foram obtidos em diferentes momentos durante a evolução da COVID-19, embora a maioria tenham sido da época da variante circulante P.1. Além disso, tivemos uma quantidade limitada de amostras ômicron disponíveis, junto a falta de informações mais detalhadas sobre às mesmas (ex.:o valor de Cq para comparação da carga viral em relação à variante P.1). Em segundo lugar, a dificuldade de acesso venoso fez com que a quantidade de sangue coletado não fosse suficiente para aumentar a abrangência de genes apoptóticos e autofágicos do estudo.

Para concluir nossos achados, identificamos que células TCD4⁺ e células B de pacientes com COVID-19 apresentaram uma maior atividade de caspase 3/7. Tanto a linfocitose quanto a linfopenia foram associadas à síndrome respiratória aguda grave do SARS-CoV-2. Porém, enquanto a linfocitose indica uma resposta antiviral ativa, a linfopenia é um sinal de mau prognóstico (Shouman *et al.*, 2024).

No estudo de Pontelli *et al.* (2022), o SARS-CoV-2 foi detectado em PBMCs de pacientes com COVID-19, mais proeminentemente em linfócitos B. Além disso, uma intensa diminuição de células T no sangue periférico foi observada em até 85% dos pacientes graves com COVID-19 (Chen *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020). Células T de pacientes com COVID-19 apresentam vários marcadores de exaustão, e a análise do transcriptoma de suas PBMCs

indicou regulação positiva de genes envolvidos na apoptose e nas vias de sinalização p53 (Diao *et al.*, 2020; Xiong *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2020). Outro estudo de Cizmecioglu *et al.* (2021), relataram que a ativação de caspases relacionadas à apoptose também foi observada em células T de pacientes infectados. Esses dados sugerem que a infecção por SARS-CoV-2 pode induzir a morte celular por apoptose em PBMCs.

O mecanismo fundamental de como a linfopenia estaria associada ao SARS-CoV-2 seria a tempestade de citocinas inflamatórias provocada pela infecção viral, que altera o metabolismo da célula hospedeira para um estado mais ácido. Essa "acidemia hiperlática" junto com a tempestade de citocinas suprime a proliferação de células T e desencadeia apoptose intrínseca/extrínseca (André *et al.*, 2022). Consistente com nossos resultados, eles também identificaram que a exposição de PBMCs humanos ao SARS-CoV-2 induziu rapidamente a apoptose em populações de células T CD4⁺ e CD8⁺, detectada pela ativação da caspase 3/7 (Pontelli *et al.*, 2022).

Por fim, o aumento da expressão de CASPASE 3 na COVID-19 está intimamente relacionada às características clínicas da doença. Desta forma, ela pode ser vista como um potencial alvo terapêutico em estratégias de tratamento da COVID-19. Manipular essa via poderia, teoricamente, ajudar a mitigar o dano celular excessivo sem comprometer a resposta imunológica necessária para combater o vírus, podendo ter um mérito relevante não apenas para o gerenciamento da COVID-19, mas também para futuras pandemias; sendo necessários mais estudos para entender completamente as consequências de modular a CASPASE 3 no contexto da infecção viral.

7 CONCLUSÃO

- Pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 apresentaram superexpressão dos genes apoptóticos CASPASE 3 e BID; e do gene autofágico MAP1LC3;
- Ambas as vias de morte celular estão envolvidas na replicação viral, sendo que a autofagia induz apoptose, e a apoptose exacerbada se correlaciona com os desfechos clínicos estudados (febre, cefaleia, astenia, coriza e dispneia) dos pacientes;
- A linfopenia foi confirmada nos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, através do aumento da atividade de CASPASE 3;
- A análise comparativa na sequência temporal entre as variantes P.1 x ômicron, pôde confirmar que ambas as variantes apresentaram superexpressão do gene mais diferencialmente expresso CASPASE 3, sendo a variante ômicron mais diferencialmente expressa.
- Modular CASPASE 3 pode representar um possível alvo terapêutico promissor no combate à COVID-19. Estudos futuros são necessários para validar sua eficácia e segurança, assim como para melhor compreender melhor seus mecanismos de ação e possíveis aplicações clínicas.
- Perspectivas para experimentos futuros: Análises funcionais (investigar o efeito da inibição da CASPASE 3 na resposta imune *in vitro* e posteriormente *in vivo*); Estudos longitudinais (avaliar pacientes ao longo do tempo para entender se a superexpressão de genes apoptóticos persiste ou não. COVID 19 longa?); Associação com resposta imunológica (correlacionar apoptose/autofagia com a produção de citocinas e perfil imunológico dos pacientes).

REFERÊNCIAS

ALEEM, Abdul; AB, Akbar Samad; SLENKER, Amy K. Emerging variants of SARS-CoV-2 and novel therapeutics against coronavirus (COVID-19). 2021.

ALFADDA, Assim A. et al. Clinical and biochemical characteristics and outcomes of suspected COVID-19 hospitalized patients: RT-PCR swab positive and negative comparison. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 11, p. 1623-1629, 2021.

AMANI, Behnam; AMANI, Bahman. Efficacy and safety of nirmatrelvir/ritonavir (Paxlovid) for COVID-19: A rapid review and meta-analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 95, n. 2, p. e28441, 2023.

ANDRADE, Lucas Almeida et al. Spatiotemporal pattern of covid-19–related mortality during the first year of the pandemic in Brazil: a population-based study in a region of high social vulnerability. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 132, 2022.

ANDRÉ, Sonia et al. T cell apoptosis characterizes severe Covid-19 disease. **Cell Death & Differentiation**, v. 29, n. 8, p. 1486-1499, 2022.

ANTONELLI, Michela et al. Risk factors and disease profile of post-vaccination SARS-CoV-2 infection in UK users of the COVID Symptom Study app: a prospective, community-based, nested, case-control study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 43-55, 2022.

ARAF, Yusha et al. Omicron variant of SARS-CoV-2: genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. **Journal of medical virology**, v. 94, n. 5, p. 1825-1832, 2022.

BADER, Stefanie M. et al. Programmed cell death: the pathways to severe COVID-19?. **Biochemical Journal**, v. 479, n. 5, p. 609-628, 2022.

BEDOUI, Sammy; HEROLD, Marco J.; STRASSER, Andreas. Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 21, n. 11, p. 678-695, 2020.

BENVENUTO, Domenico et al. Evolutionary analysis of SARS-CoV-2: how mutation of Non-Structural Protein 6 (NSP6) could affect viral autophagy. **Journal of Infection**, v. 81, n. 1, p. e24-e27, 2020.

BERBUDI, Afiat et al. Type 2 diabetes and its impact on the immune system. **Current diabetes reviews**, v. 16, n. 5, p. 442-449, 2020.

BIKDELI, Behnood et al. COVID-19 and thrombotic or thromboembolic disease: implications for prevention, antithrombotic therapy, and follow-up: JACC state-of-the-art review. **Journal of the American college of cardiology**, v. 75, n. 23, p. 2950-2973, 2020.

BISWAS, Subrata K.; MUDI, Sonchita R. Genetic variation in SARS-CoV-2 may explain variable severity of COVID-19. **Medical hypotheses**, v. 143, p. 109877, 2020.

BOROUMAND-NOUGHABI, Samaneh et al. Deregulation of the Expression of Beclin1 and Light Chain 3 (LC3), Autophagy-Related Genes, in COVID-19 Patients. **Medical Journal of the Islamic Republic of Iran**, v. 36, 2022.

BRANDAL, Lin T. et al. Outbreak caused by the SARS-CoV-2 Omicron variant in Norway, November to December 2021. **Eurosurveillance**, v. 26, n. 50, p. 2101147, 2021.

BRASS, Abraham L. et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. **science**, v. 319, n. 5865, p. 921-926, 2008.

BUFFON, Marina Raffin et al. Critically ill COVID-19 patients: a sociodemographic and clinical profile and associations between variables and workload. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 75, 2022.

CARNEIRO, Benedito A.; EL-DEIRY, Wafik S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 17, n. 7, p. 395-417, 2020.

CARVALHO, Alessandro Clementino; PAIVA, Priscila Henrique Moraes. SARS-COV-2: fatores associados à suscetibilidade à forma grave da covid-19. **Journal Archives of Health**, v. 2, n. 3, p. 314-331, 2021.

CASTRO, Marcia C. et al. Reduction in life expectancy in Brazil after COVID-19. **Nature Medicine**, v. 27, n. 9, p. 1629-1635, 2021.

CDC. **Treatments for Severe Illness**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/your-health/treatments-for-severe-illness.html>. Acesso em: 25 maio 2023.

CHATTERJEE, Srijan et al. A detailed overview of SARS-CoV-2 omicron: its sub-variants, mutations and pathophysiology, clinical characteristics, immunological landscape, immune escape, and therapies. **Viruses**, v. 15, n. 1, p. 167, 2023.

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.

CHEN, Paul Z. et al. Heterogeneity in transmissibility and shedding SARS-CoV-2 via droplets and aerosols. **Elife**, v. 10, p. e65774, 2021.

CHEN, Rita E. et al. Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies. **Nature medicine**, v. 27, n. 4, p. 717-726, 2021.

CHU, Hin et al. Targeting highly pathogenic coronavirus-induced apoptosis reduces viral pathogenesis and disease severity. **Science advances**, v. 7, n. 25, p. eabf8577, 2021.

CIZMECIOGLU, Ahmet et al. Apoptosis-induced T-cell lymphopenia is related to COVID-19 severity. **Journal of medical virology**, v. 93, n. 5, p. 2867-2874, 2021.

COELHO, Luís et al. Remdesivir and corticosteroids in the treatment of hospitalized COVID-19 patients. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 4482, 2023.

CORMAN, Victor M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 3, p. 2000045, 2020.

DENG, Huiming et al. Itraconazole inhibits the Hedgehog signaling pathway thereby inducing autophagy-mediated apoptosis of colon cancer cells. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 7, p. 539, 2020.

DESHPANDE, Rushikesh; ZOU, Chunbin. Programmed cell death in SARS-CoV-2 infection: A short review. **Journal of Respiration**, v. 1, n. 4, p. 223-228, 2021.

DESHPANDE, Rushikesh et al. SARS-CoV-2 accessory protein Orf7b induces lung injury via c-myc mediated apoptosis and ferroptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 2, p. 1157, 2024.

DHAMA, Kuldeep et al. Global emerging Omicron variant of SARS-CoV-2: Impacts, challenges and strategies. **Journal of infection and public health**, 2022.

DIAO, Bo et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in immunology**, p. 827, 2020.

DONIA, Ahmed; BOKHARI, Habib. Apoptosis induced by SARS-CoV-2: can we target it?. **Apoptosis**, v. 26, n. 1, p. 7-8, 2021.

DREUX, Marlène et al. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 33, p. 14046-14051, 2009.

EL-WAHAB, Ekram W. Abd et al. SARS-CoV-2 transmission channels: a review of the literature. **MEDICC review**, v. 22, p. 51-69, 2021.

FANG, Lei; KARAKIULAKIS, George; ROTH, Michael. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection?. **The lancet respiratory medicine**, v. 8, n. 4, p. e21, 2020.

FATIMA, Samar et al. COVID-19 infection among vaccinated and unvaccinated: Does it make any difference?. **PloS one**, v. 17, n. 7, p. e0270485, 2022.

FERNANDES, Queenie et al. Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. **Annals of medicine**, v. 54, n. 1, p. 524-540, 2022.

FREITAS, André Ricardo Ribas et al. The emergence of novel SARS-CoV-2 variant P. 1 in Amazonas (Brazil) was temporally associated with a change in the age and sex profile of COVID-19 mortality: A population based ecological study. **The Lancet Regional Health–Americas**, v. 1, 2021.

GAO, Yong et al. Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 7, p. 791-796, 2020.

GASSEN, Nils C. et al. SARS-CoV-2-mediated dysregulation of metabolism and autophagy uncovers host-targeting antivirals. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 3818, 2021.

GEMMATI, Donato et al. COVID-19 and individual genetic susceptibility/receptivity: role of ACE1/ACE2 genes, immunity, inflammation and coagulation. Might the double X-chromosome in females be protective against SARS-CoV-2 compared to the single X-chromosome in males?. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 10, p. 3474, 2020.

GETENEH, Alene et al. Clinical characteristics of patients infected with SARS-CoV-2 in North Wollo Zone, North-East Ethiopia. **Pan African Medical Journal**, v. 38, n. 1, 2021.

GHAREEB, Doaa A. et al. Potential therapeutic and pharmacological strategies for SARS-CoV2. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 51, p. 281-296, 2021.

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.

HADJ HASSINE, Ikbel. Covid-19 vaccines and variants of concern: A review. **Reviews in medical virology**, v. 32, n. 4, p. e2313, 2022.

HISCOTT, John et al. The global impact of the coronavirus pandemic. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 53, p. 1-9, 2020.

HOU, Peili et al. The ORF7a protein of SARS-CoV-2 initiates autophagy and limits autophagosome-lysosome fusion via degradation of SNAP29 to promote virus replication. **Autophagy**, v. 19, n. 2, p. 551-569, 2023.

HOU, Yuxin et al. Enhanced replication of SARS-CoV-2 Omicron BA. 2 in human forebrain and midbrain organoids. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 381, 2022.

HU, Ben et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141-154, 2021.

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.

JIN, Yuefei et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19. **Viruses**, v. 12, n. 4, p. 372, 2020.

JUNG, Christoph et al. Omicron: what makes the latest SARS-CoV-2 variant of concern so concerning?. **Journal of virology**, v. 96, n. 6, p. e02077-21, 2022.

KADIRVELU, Balasundaram et al. Variation in global COVID-19 symptoms by geography and by chronic disease: A global survey using the COVID-19 Symptom Mapper. **EClinicalMedicine**, v. 45, p. 101317, 2022.

KHAN, Asifa; LING, Jiaxin; LI, Jinlin. Is Autophagy a Friend or Foe in SARS-CoV-2 Infection?. **Viruses**, v. 16, n. 9, p. 1491, 2024.

KOEPKE, Lennart et al. Manipulation of autophagy by SARS-CoV-2 proteins. **Autophagy**, v. 17, n. 9, p. 2659-2661, 2021.

KRAUSE, Philip R. et al. SARS-CoV-2 variants and vaccines. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 2, p. 179-186, 2021.

KRISHNAMACHARY, Balaji et al. The potential role of extracellular vesicles in COVID-19 associated endothelial injury and pro-inflammation. **medRxiv**, 2020.

KUCHARCZAK, Jérôme et al. To be, or not to be: nf- κ b is the answer $\therefore$ role of rel/nf- κ b in the regulation of apoptosis. **Oncogene**, [S.L.], v. 22, n. 56, p. 8961-8982, 8 dez. 2003.

KURHADE, Chaitanya et al. Low neutralization of SARS-CoV-2 Omicron BA. 2.75. 2, BQ. 1.1 and XBB. 1 by parental mRNA vaccine or a BA. 5 bivalent booster. **Nature medicine**, v. 29, n. 2, p. 344-347, 2023.

LA VIGNERA, Sandro et al. Sex-specific SARS-CoV-2 mortality: among hormone-modulated ACE2 expression, risk of venous thromboembolism and hypovitaminosis D. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 8, p. 2948, 2020.

LI, Caiqin et al. Comparison of clinical and serological features of RT-PCR positive and negative COVID-19 patients. **Journal of International Medical Research**, v. 49, n. 2, p. 0300060520972658, 2021.

LI, Fei et al. SARS-CoV-2 spike promotes inflammation and apoptosis through autophagy by ROS-suppressed PI3K/AKT/mTOR signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1867, n. 12, p. 166260, 2021.

LI, Jianhua et al. Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. **Journal of virology**, v. 85, n. 13, p. 6319-6333, 2011.

LI, Qun et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus–infected pneumonia. **New England journal of medicine**, v. 382, n. 13, p. 1199-1207, 2020.

LI, Shufen et al. SARS-CoV-2 triggers inflammatory responses and cell death through caspase-8 activation. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 235, 2020.

LI, Xiao C.; ZHANG, Jianfeng; ZHUO, Jia L. The vasoprotective axes of the renin-angiotensin system: physiological relevance and therapeutic implications in cardiovascular, hypertensive and kidney diseases. **Pharmacological research**, v. 125, p. 21-38, 2017.

LI, Xue et al. Cell deaths: Involvement in the pathogenesis and intervention therapy of COVID-19. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 186, 2022.

LIU, Haolin et al. The basis of a more contagious 501Y. V1 variant of SARS-CoV-2. **Cell Research**, v. 31, n. 6, p. 720-722, 2021.

LIU, Yakun et al. Cell-type apoptosis in lung during SARS-CoV-2 infection. **Pathogens**, v. 10, n. 5, p. 509, 2021.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LUNDSTROM, Kenneth et al. COVID-19 signalome: Pathways for SARS-CoV-2 infection and impact on COVID-19 associated comorbidity. **Cellular Signalling**, v. 101, p. 110495, 2023.

MAGRO, Cynthia M. et al. Severe COVID-19: a multifaceted viral vasculopathy syndrome. **Annals of diagnostic pathology**, v. 50, p. 151645, 2021.

MALEKI, Behzad Hajizadeh; TARTIBIAN, Bakhtyar. COVID-19 and male reproductive function: a prospective, longitudinal cohort study. **Reproduction**, v. 161, n. 3, p. 319-331, 2021.

MANGALMURTI, Nilam; HUNTER, Christopher A. Cytokine storms: understanding COVID-19. **Immunity**, v. 53, n. 1, p. 19-25, 2020.

MAO, Jingrong et al. Autophagy and viral infection. **Autophagy regulation of innate immunity**, p. 55-78, 2019.

MARIK, Paul E. et al. A scoping review of the pathophysiology of COVID-19. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 35, p. 20587384211048026, 2021.

MEHTA, Puja et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. **The lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1033-1034, 2020.

MENESES, Abel Silva. HISTÓRIA NATURAL DA COVID-19 E SUAS RELAÇÕES TERAPÊUTICAS. SciELO Preprints. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.733>. Acesso em 31 de maio de 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE-CORONAVÍRUS. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br>. Acesso em 4 de janeiro de 2025.

MINISTÉRIO DA SAÚDE-VACINÔMETRO COVID-19. Disponível em: https://infoms.saude.gov.br/extensions/SEIDIGI_DEMAS_Vacina_C19/SEIDIGI_DEMAS_Vacina_C19.html. Acesso em 4 de janeiro de 2025.

MOHAMUD, Yasir et al. The papain-like protease of coronaviruses cleaves ULK1 to disrupt host autophagy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 540, p. 75-82, 2021.

NAVECA, Felipe Gomes et al. COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P. 1 emergence. **Nature medicine**, v. 27, n. 7, p. 1230-1238, 2021.

NGUYEN, Ha et al. Covid-19 affects taste independently of smell: results from a combined chemosensory home test and online survey from a global cohort (N=10,953). **medRxiv**, p. 2023.01. 16.23284630, 2023.

OLIVEIRA, Beatriz Araujo et al. SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: a mini review on diagnostic methods. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, 2020.

PADDA, Inderbir S.; PARMAR, Mayur. COVID (SARS-CoV-2) **Vaccine**. 2023.

PEELING, Rosanna W. et al. Scaling up COVID-19 rapid antigen tests: promises and challenges. **The Lancet infectious diseases**, v. 21, n. 9, p. e290-e295, 2021.

PLASSMEYER, Matthew et al. Caspases and therapeutic potential of caspase inhibitors in moderate–severe SARS-CoV-2 infection and long COVID. **Allergy**, v. 77, n. 1, p. 118-129, 2022.

POLACK, Fernando P. et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. **New England journal of medicine**, v. 383, n. 27, p. 2603-2615, 2020.

PONTELLI, Marjorie C. et al. SARS-CoV-2 productively infects primary human immune system cells in vitro and in COVID-19 patients. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 4, p. mjac021, 2022.

PORTAL DO BUTANTAN. Disponível em: <https://butantan.gov.br/covid/butantan-tira-duvida/tira-duvida-noticias/quais-sao-as-diferencas-entre-as-vacinas-contra-covid-19-que-estao-sendo-aplicadas-no-brasil>. Acesso em 8 de novembro de 2024.

PREMEAUX, Thomas A. et al. Emerging insights on caspases in COVID-19 pathogenesis, sequelae, and directed therapies. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 615, 2022.

PRENTICE, Erik et al. Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase proteins. **Journal of virology**, v. 78, n. 18, p. 9977-9986, 2004.

QIAN, G.-Q. et al. Epidemiologic and clinical characteristics of 91 hospitalized patients with COVID-19 in Zhejiang, China: a retrospective, multi-centre case series. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 113, n. 7, p. 474-481, 2020.

QU, Yafei et al. ORF3a-mediated incomplete autophagy facilitates severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 replication. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 716208, 2021.

REN, Yujie et al. The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells. **Cellular & molecular immunology**, v. 17, n. 8, p. 881-883, 2020.

RUSSELL, Clark D.; LONE, Nazir I.; BAILLIE, J. Kenneth. Comorbidities, multimorbidity and COVID-19. **Nature medicine**, v. 29, n. 2, p. 334-343, 2023.

RUSSELL, Clark D.; MILLAR, Jonathan E.; BAILLIE, J. Kenneth. Clinical evidence does not support corticosteroid treatment for 2019-nCoV lung injury. **The lancet**, v. 395, n. 10223, p. 473-475, 2020.

SHAKERI, Raheleh; KHEIROLLAHI, Asma; DAVOODI, Jamshid. Apaf-1: Regulation and function in cell death. **Biochimie**, v. 135, p. 111-125, 2017.

SHANG, Jian et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. **Nature**, v. 581, n. 7807, p. 221-224, 2020.

SHOUMAN, Shaimaa et al. SARS-CoV-2-associated lymphopenia: possible mechanisms and the role of CD147. **Cell Communication and Signaling**, v. 22, n. 1, p. 349, 2024.

SILVA, Rafael Cardoso Maciel Costa et al. Autophagy modulators in coronavirus diseases: a double strike in viral burden and inflammation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p. 326, 2022.

SINGHAL, Surinder K. et al. Olfactory and taste dysfunction in COVID-19-incidence and recovery. **The Egyptian Journal of Otolaryngology**, v. 39, n. 1, p. 1-8, 2023.

STATISTA. Number of COVID-19 vaccination doses per 100 population administered in Latin America and the Caribbean as of August 13, 2024, by country. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/1194813/latin-america-covid-19-vaccination-rate-country/>. Acesso em 4 de janeiro de 2025.

SUN, Jiya et al. Comparative transcriptome analysis reveals the intensive early stage responses of host cells to SARS-CoV-2 infection. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 593857, 2020.

SZWARCWALD, Célia Landmann et al. COVID-19 mortality in Brazil, 2020-21: consequences of the pandemic inadequate management. **Archives of Public Health**, v. 80, n. 1, p. 255, 2022.

TAN, Jiahong et al. Expression of PAWR predicts prognosis of ovarian cancer. **Cancer Cell International**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2020.

TAYLOR, Matthew P.; KIRKEGAARD, Karla. Potential subversion of autophagosomal pathway by picornaviruses. **Autophagy**, v. 4, n. 3, p. 286-289, 2008.

TEHRANI, Atefeh Shirazi et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 induces hepatocyte cell death, active autophagosome formation and caspase 3 up-regulation in postmortem cases: stereological and molecular study. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 256, n. 4, p. 309-319, 2022.

TREGONING, John S. et al. Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. **Nature reviews immunology**, v. 21, n. 10, p. 626-636, 2021.

TRZEŚNIEWSKA, Agata et al. Did the COVID-19 Pandemic Affect the Stress Levels among the Mothers of Premature Infants? A Narrative Review of the Present State of Knowledge, Prevention Strategies, and Future Directions. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 21, n. 8, p. 1095, 2024.

UNIPROT. Q9H1Y0 · ATG5_HUMAN. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9H1Y0/entry>. Acesso em: 25 de maio de 2023.

UZUNCAKMAK, S. Karabulut et al. Investigation of CYP2E1 and Caspase-3 Gene Expressions in COVID-19 patients. **Gene Reports**, v. 26, p. 101497, 2022.

VOYSEY, Merryn et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. **The Lancet**, v. 397, n. 10269, p. 99-111, 2021.

WALLS, Alexandra C. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281-292. e6, 2020.

WAN, Yushun et al. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. **Journal of virology**, v. 94, n. 7, p. 10.1128/jvi. 00127-20, 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, Fulong et al. ATG5 provides host protection acting as a switch in the atg8ylation cascade between autophagy and secretion. **Developmental Cell**, [S.L.], v. 58, n. 10, p. 866-884, maio 2023. Elsevier BV.

WANG, Ming et al. Clinical diagnosis of 8274 samples with 2019-novel coronavirus in Wuhan. **MedRxiv**, p. 2020.02. 12.20022327, 2020.

WANG, Zijun et al. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. **Nature**, v. 592, n. 7855, p. 616-622, 2021.

WAUDBY-WEST, Rupert et al. The association between SARS-CoV-2 RT-PCR cycle threshold and mortality in a community cohort. **European Respiratory Journal**, v. 58, n. 1, 2021.

WHITAKER, Matthew et al. Variant-specific symptoms of COVID-19 in a study of 1,542,510 adults in England. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 6856, 2022.

WHO. Coronavirus disease (COVID-19) outbreak situation. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>. Acesso em: 06 fev. 2025.

WHO. Declaração sobre a décima quinta reunião do Comitê de Emergência do RSI (2005) sobre a pandemia de COVID-19. Disponível em: [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic). Acesso em: 22 maio 2023.

WU, Fan et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265-269, 2020.

WU, Zunyou; MCGOOGAN, Jennifer M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. **jama**, v. 323, n. 13, p. 1239-1242, 2020.

XIAO, Xibin et al. Outcomes and risk factors of SARS-CoV-2 omicron variant in B-cell lymphoma patients following CD19 targeted CAR-T therapy. **Cancer Medicine**, v. 12, n. 22, p. 20838-20846, 2023.

XIONG, Yong et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. **Emerging microbes & infections**, v. 9, n. 1, p. 761-770, 2020.

YAMAYOSHI, Seiya et al. Comparison of rapid antigen tests for COVID-19. **Viruses**, v. 12, n. 12, p. 1420, 2020.

YANG, Ruiping et al. SARS-CoV-2 accessory protein ORF7b mediates tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in cells. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 654709, 2021.

YANG, Xiaobo et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. **The lancet respiratory medicine**, v. 8, n. 5, p. 475-481, 2020.

YU, Pin et al. Age-related rhesus macaque models of COVID-19. **Animal models and experimental medicine**, v. 3, n. 1, p. 93-97, 2020.

YUAN, Cui et al. The role of cell death in SARS-CoV-2 infection. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 8, n. 1, p. 357, 2023.

YESUDHAS, Dhanusha; SRIVASTAVA, Ambuj; GROMIHA, M. Michael. COVID-19 outbreak: history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics. **Infection**, v. 49, p. 199-213, 2021.

ZENG, Baoqi et al. Effectiveness of COVID-19 vaccines against SARS-CoV-2 variants of concern: a systematic review and meta-analysis. **BMC medicine**, v. 20, n. 1, p. 1-15, 2022.

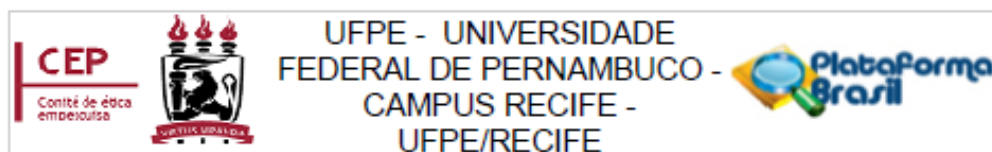
ZHANG, Jin-jin et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. **Allergy**, v. 75, n. 7, p. 1730-1741, 2020.

ZHANG, John JY et al. Risk factors for severe disease and efficacy of treatment in patients infected with COVID-19: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 16, p. 2199-2206, 2020.

ZHENG, Hong-Yi et al. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. **Cellular & molecular immunology**, v. 17, n. 5, p. 541-543, 2020.

ZHU, Zhoujie et al. Therapy targets SARS-CoV-2 infection-induced cell death. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 870216, 2022.

ANEXO A – PARECER FINAL DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Implicações das vias apoptótica e autofágica na patogênese da infecção pelo vírus SARS-CoV-2

Pesquisador: VANESSA MYLENNIA FLORENCIO DE CARVALHO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 48223521.8.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

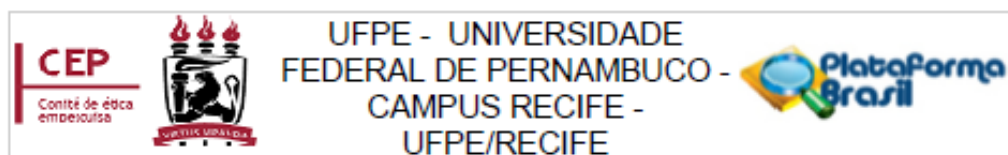
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.748.903

Apresentação do Projeto:

O Projeto submetido ao presente Comitê de Ética refere-se à Tese de Doutorado da discente Vanessa Mylenna Florêncio de Carvalho, vinculada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco. O projeto é orientado pela Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta e coorientado pela Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira. Trata-se de um estudo com abordagem do tipo experimental analítica-quantitativa que pretende investigar a participação de proteínas de morte celular envolvidas na fisiopatologia da infecção pelo vírus SARS-CoV-2. A pesquisa será realizada no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas- LINAT pertencente ao Núcleo de Pesquisa e Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG). Serão selecionadas 300 amostras de RNA extraídas de swab nasofaríngeo de pacientes confirmados para COVID-19. Estas amostras serão agrupadas de acordo com as principais manifestações clínicas da doença: assintomáticos (n=100), sintomas leves (n=100) e sintomas graves (n=100). Todas as informações serão adquiridas a partir dos prontuários médicos, os quais chegarão junto com a amostra do paciente no Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, local que há 1 ano vem atuando como força-tarefa no diagnóstico da COVID-19. As cópias dos prontuários ficarão arquivadas no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) sob a responsabilidade da pesquisadora Vanessa Mylenna Florêncio de Carvalho por um período de 5 anos. Serão incluídas no estudo as amostras de pacientes com idade

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 4.748.903

superior a 18 anos, com diagnóstico laboratorial por RT-PCR confirmado para COVID-19. Este projeto utilizará apenas a amostra de RNA e os dados clínicos dos prontuários dos pacientes, os quais chegarão prontos no Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica. Não haverá contato do pesquisador com o paciente para a coleta da amostra.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

Investigar a participação de proteínas de morte celular envolvidas na fisiopatologia da infecção pelo vírus SARS-CoV-2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão gênica das proteínas Bax, Bid, Bcl-2, caspases 3, 6, 7, 8 e PAR-4 envolvidas nas vias apoptóticas em amostras de swab nasofaríngeo de indivíduos infectados pelo vírus SARS-coV 2;
- Avaliar a expressão gênica das proteínas Beclin1, LC3-II, ULK1, P62 e Atg5 envolvidas na via autofágica em amostras de swab nasofaríngeo de indivíduos infectados pelo vírus SARS-coV 2;
- Caracterizar o perfil clínico-demográfico dos pacientes com COVID-19;
- Distinguir as vias de morte celular que estão envolvidas nas principais manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com COVID-19;
- Estabelecer o papel funcional de um dos genes mais diferencialmente expressos em um modelo in vitro de infecção pelo vírus SARS-coV2;
- Analisar o papel modulador da dexametasona em resposta as proteínas de morte celular.

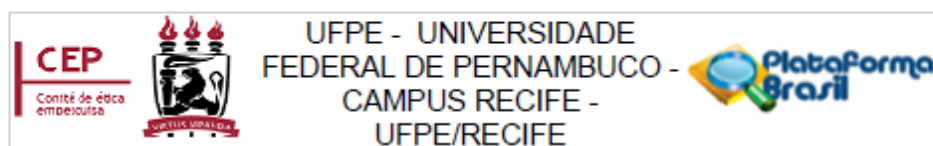
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

A pesquisadora afirma haver um possível risco de quebra de sigilo das informações contidas, ou ainda extravio. No entanto, para minimizar esse risco, a pesquisadora responsável se compromete a manusear e guardar os prontuários com o máximo de cuidado e manter a confidencialidade das informações obtidas. Sendo assim, a análise de risco está adequada ao objetivo proposto no projeto.

BENEFÍCIOS

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 4.748.903

A pesquisadora relata a existência apenas de benefício indireto, baseado na justificativa de que toda e qualquer descoberta de novos alvos terapêuticos para a COVID-19 deve beneficiar a sociedade. A pesquisadora realiza a prospecção de que os resultados obtidos poderão propiciar avanços para a terapia desta doença e assim fornecer uma alternativa capaz de apresentar resultados mais eficazes que os medicamentos atualmente disponíveis no mercado. Sendo assim, a análise está adequada a metodologia proposta.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta excelente referencial teórico, argumentação simples e linear, além de uma inquestionável relevância científica. A metodologia, além de um rigor científico, possui um nível de detalhamento capaz de eliminar quaisquer dúvidas a respeito das etapas do projeto. Do ponto de vista ético, não apresenta qualquer inconsistência.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos anexados estão de acordo com as recomendações do CEP, são eles:

1. O Termo de Confidencialidade foi devidamente assinado pela pesquisadora;
2. O Currículo Lattes de todos os envolvidos na referida pesquisa foram anexados (apesar do projeto detalhado não especificar em que fase cada colaborador está envolvido);
3. A Folha de Rosto está devidamente assinada e carimbada;
4. Solicitação de dispensa de TCLE
5. O projeto detalhado - Com análise de risco e de benefício adequada ao projeto.
6. Carta de Anuência do NUPIT devidamente assinada e carimbada.
7. Carta de Autorização de uso de dados, devidamente assinada e carimbada.

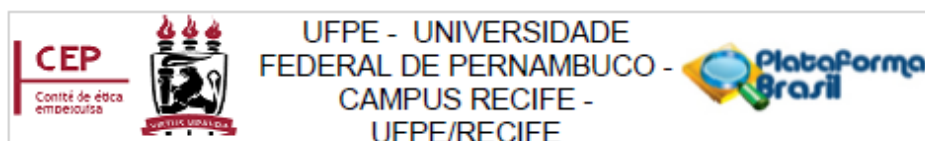
Recomendações:

Nos objetivos específicos, especificar qual gene expresso em um modelo in vitro de infecção pelo vírus SARS-CoV2se pretende estabelecer o papel funcional. Caso este gene venha a ser definido apenas após a realização dos experimentos, cabe reflexão sobre a adição deste como objetivo específico. Da maneira como foi exposto não existe integração entre o objetivo e a metodologia, ainda que não ofereça qualquer dano à avaliação ética.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 4.748.903

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

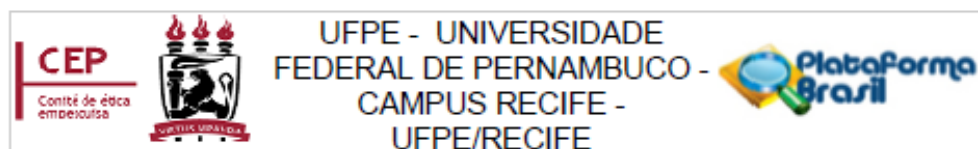
Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1736019.pdf	20/05/2021 19:30:09		Aceito
Outros	CARTA_DE_RESPOSTA_AS_PENDENCIAS.docx	20/05/2021 19:29:30	VANESSA MYLENN FLORENCIO DE	Aceito
Outros	Carta_de_anuência_NUPIT.pdf	20/05/2021 19:28:17	VANESSA MYLENN FLORENCIO DE	Aceito
Outros	DISPENSA_DE_TCLE.pdf	20/05/2021	VANESSA	Aceito

Endereço: Av. das Engenhas, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-500
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 4.748.903

Outros	DISPENSA_DE_TCLE.pdf	19:27:54	FLORENCIO DE CARVALHO	Aceito
Outros	Autorizacao_uso_dados.pdf	20/05/2021 19:27:18	VANESSA MYLENN FLORENCIO DE	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	20/05/2021 19:25:53	VANESSA MYLENN FLORENCIO DE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.docx	28/04/2021 19:17:15	VANESSA MYLENN FLORENCIO DE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_vinculo.pdf	27/04/2021 21:36:25	VANESSA MYLENN FLORENCIO DE	Aceito
Outros	TERMO_DE_CONFIDENCIALIDADE.docx	27/04/2021 21:33:22	VANESSA MYLENN FLORENCIO DE	Aceito
Outros	ficha_clinica_covid.docx	27/04/2021 21:30:30	VANESSA MYLENN FLORENCIO DE	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Barbara_de_Oliveira_Silva.pdf	27/04/2021 21:29:17	VANESSA MYLENN FLORENCIO DE	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Priscilla_Stela_Santana_de_Oliveira.pdf	27/04/2021 21:28:44	VANESSA MYLENN FLORENCIO DE	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Vanessa_Mylenna_Florenco_de_Carvalho.pdf	27/04/2021 21:27:46	VANESSA MYLENN FLORENCIO DE	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Michelly_Cristiny_Pereira.pdf	27/04/2021 21:25:55	VANESSA MYLENN FLORENCIO DE	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Maira_Galdino_da_Rocha_Pitta.pdf	27/04/2021 21:24:32	VANESSA MYLENN FLORENCIO DE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

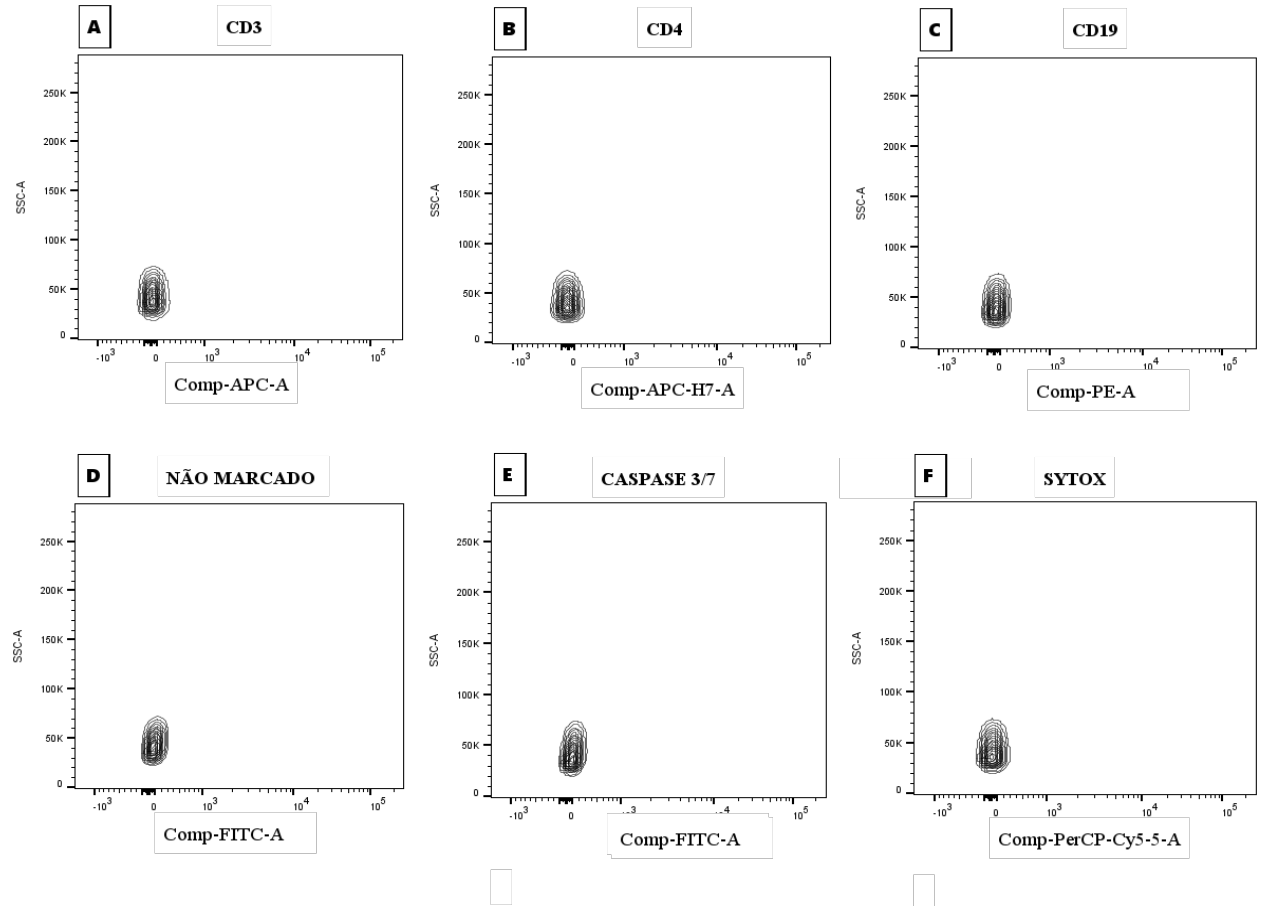
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2125-8588 E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br

ANEXO B – CONTROLE INTERNO FMO DA CITOMETRIA DE FLUXO

Figura 14- Controles internos de aquisição FMO. Imunomarcção com todos os anticorpos do painel menos o CD3 (A); menos o CD4 (B); menos o CD19 (C); menos caspase 3/7 (E); menos o sytox (F). D: Controle negativo de caspase 3/7.



ANEXO C – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DO GRUPO DE PACIENTES INFECTADOS PELA VARIANTE ÔMICRON DA COVID-19

Tabela 4- Características clínicas dos pacientes sintomáticos infectados e não infectados pela variante ômicron do vírus SARS-CoV-2.

Características	Infectados SARS-CoV-2 (n=23)
Idade (anos)	41.304 ± 14.784
Sexo (masculino/feminino)	6/17
Sintomas	
Febre	12 (52,17%)
Tosse	17 (73,91%)
Cefaleia	18 (78,26%)
Astenia	11 (47,83%)
Anosmia/Ageusia	6 (26,09%)
Dor de garganta	16 (69,57%)
Coriza	15 (65,22%)
Dispneia	3 (13,04%)
Comorbidades	
Obesidade	-
HAS	4 (17,39%)
DM2	1 (4,35%)
DCV	2 (8,70%)
Vacinação	
D3	8 (34,78%)
D4	12 (52,17%)
DU	2 (8,69%)
Sem vacina	1 (4,35%)
Variante	
Ômicron	23 (100%)

* HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; DM2: Diabetes Mellitus tipo 2; DCV: Doença Cardiovascular; D3: Terceira dose da vacina; D4: Quatro doses da vacina; DU: Dose única.

Fonte: Autora (2024).