



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À HEMATOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE MICROVESÍCULAS CIRCULANTES NA
INFECÇÃO POR SARS-COV-2 EM PACIENTES E INDIVÍDUOS CONVALESCENTES

ALUNA: GEYSE ADRIANA DA SILVA SOARES

Manaus, AM

2023

ALUNA: GEYSE ADRIANA DA SILVA SOARES

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE MICROVESÍCULAS CIRCULANTES NA
INFECÇÃO POR SARS-COV-2 EM PACIENTES E INDIVÍDUOS CONVALESCENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para obtenção do grau de *Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia*.

Orientadora: Adriana Malheiro Alle Marie, doutora em Imunologia Básica e Aplicada pela Universidade de São Paulo – FMRP, **HEMOAM/UFAM**.

Coorientadora: Andrea Monteiro Tarragô, doutora em Imunologia Básica e Aplicada pela Universidade Federal do Amazonas - UFAM, **HEMOAM**

Manaus, AM

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

G397cc Soares, Geysel Adriana da Silva

Caracterização do perfil de microvesículas circulantes na infecção por SARS-COV-2 em pacientes e indivíduos convalescentes / Geysel Adriana da Silva Soares. Manaus : [s.n], 2023.

106 f.: color.; 29 cm.

Dissertação - Programa de pós-graduação em ciências aplicadas à hematologia - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.

Inclui bibliografia

Orientador: Marie, Adriana Malheiro Alle

Coorientador: Tarragô, Andréa Monteiro

1. SARS-COV-2. 2. COVID-19. 3. microvesículas. 4. plasma convalescente. I. Marie, Adriana Malheiro Alle (Orient.). II. Tarragô, Andréa Monteiro (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Caracterização do perfil de microvesículas circulantes na infecção por SARS-COV-2 em pacientes e indivíduos convalescentes



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À HEMATOLOGIA – UEA/HEMOAM



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 009/2023

Ao vigésimo primeiro dia do mês de agosto do ano de 2023, às 14h00min, realizou-se remotamente, via plataforma Google Meet, a Defesa de Dissertação da discente **Geyse Adriana da Silva Soares**, sob o título: “**Caracterização do perfil de microvesículas circulantes na infecção por SARS-COV-2 em pacientes e indivíduos convalescentes**”, tendo como orientadora a Prof.^a Dr.^a **Adriana Malheiro Alle Marie** e coorientadora a Prof.^a Dr.^a **Andréa Monteiro Tarragô**, segundo encaminhamento da Prof.^a Dr.^a **Andréa Monteiro Tarragô**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído a discente o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Prof. ^a Dr. ^a Adriana Malheiro Alle Marie – Presidente (UFAM / HEMOAM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> (x) Reprovado(a) <input type="checkbox"/> ()	Documento assinado digitalmente ADRIANA MALHEIRO ALLE MARIE Data: 23/08/2023 10:26:06-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
Prof. ^a Dr. ^a Leticia Gomes de Pontes – Membro (UFMG)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> (x) Reprovado(a) <input type="checkbox"/> ()	Documento assinado digitalmente LETICIA GOMES DE PONTES Data: 25/08/2023 10:24:12-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
Prof. Dr. Yury Oliveira Chaves – Membro -FIOCRUZ / AM	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> (x) Reprovado(a) <input type="checkbox"/> ()	Documento assinado digitalmente YURY OLIVEIRA CHAVES Data: 23/08/2023 17:18:17-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br

O parecer final da Defesa de Dissertação foi:

(x) Aprovado

() Não Aprovado

Documento assinado digitalmente
gov.br **ADRIANA MALHEIRO ALLE MARIE**
Data: 23/08/2023 10:23:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Presidente da Banca Examinadora

Coordenação PPGH-UEA/HEMOAM

- Endereço: Avenida Constantino Nery, 4397 – Chapada
- Manaus-AM – CEP 69050-001 / • Fone: (92) 3655-0123
- E-mail: mestrado@hemoam.am.gov.br
- Site: <http://www.pos.uea.edu.br/hematologia>
- www.instagram.com/ppgh_uea



DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha filha, Laura, você veio em um momento que eu realmente não esperava, sim eu quis muito você. Eu tinha acabado de entrar no mestrado, eu tive muito medo, mas eu decidi seguir em frente, foi difícil, foi cansativo, mas eu decidi continuar por você meu amor. Sei que um dia vamos conversar sobre isso, espero que se orgulhe da mãe que tem. Meu maior desejo é passar esse exemplo para você, e que você consiga entender que somos mulheres fortes, determinadas, batalhadoras, que quando queremos algo nada nos segura. Quero que você seja uma mulher maravilhosa, que não tenha medo de enfrentar as dificuldades da vida, e que tenha sempre em mente que estarei ao seu lado, segurando sua mão.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade da vida, pela saúde, pela sabedoria, por sempre segurar na minha mão, pois sou falha e reconheço que não tenho sido agradecida o suficiente.

Minha família por todo apoio e paciência, principalmente minha filha Laura por ser o amor da minha vida. A meu avô, que já não está entre nós, como sinto sua falta! Você é foi um exemplo de pai, de homem, de profissional, sei o quanto torcia por mim, o quanto era orgulhoso, e eu sempre fiz de tudo para não lhe decepcionar, eu sempre vou te amar, e um dia vamos nos encontrar.

Obrigada a turma 10/2021 do mestrado! Por todo carinho que tiveram comigo durante a gravidez, vocês realmente são uma turma nota 10, vai ficar para sempre na minha memória o dia em que fizeram um chá de bebê surpresa, vocês não têm noção do quanto me fizeram bem. Em especial agradeço as minhas amigas Iandara Maíra, Naamy Keely e Wivian Silva, por serem pessoas maravilhosas, sempre me ajudaram e apoiaram em todos os momentos, por todas as risadas, conselhos, pela ajuda. Essa dissertação tem uma contribuição de cada uma de vocês. Nossa amizade é um presente de Deus.

Agradeço a minha orientadora Adriana Malheiro Alle Marie, pela oportunidade, paciência e confiança, por acreditar em mim, quando muitas vezes eu mesma não acreditava, para mim a senhora é um exemplo de mulher, de pesquisadora, de professora, obrigada por todas as palavras de incentivo. Meus agradecimentos a minha coorientadora, Andrea Monteiro Tarragô, por acreditar no meu potencial e sempre me entusiasmar com suas palavras, pelo carinho. tenho muita admiração pela senhora, que para mim é exemplo de força e determinação. Me sinto muito privilegiada de estar rodeadas de mulheres tão extraordinárias.

Agradeço a UEA pela oportunidade de fazer o mestrado, a Fundação HEMOAM pela estrutura e laboratórios para a realização do projeto e as agências de fomento FAPEAM, CAPS e CNPq pelo apoio financeiro e bolsa.

EPÍGRAFE

Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o conforme as tuas forças, porque na sepultura, para onde tu vais, não há obra, nem indústria, nem ciência, nem sabedoria alguma.

(Eclesiastes 9:10)

RESUMO

Introdução: A COVID-19 é uma doença infecciosa do trato respiratório humano causada pelo SARS-CoV-2. A resposta inflamatória da COVID-19, é marcada pela liberação exacerbada de mediadores pró-inflamatórios, causando danos tecidual importante. Microvesículas são um tipo de vesícula extracelular liberadas por todos os tipos celulares, com funções tais como, de comunicação intercelular e transportadoras de biomoléculas, sendo capazes de induzir respostas inflamatórias e anti-inflamatórias. No entanto, pouco se sabe sobre o envolvimento das mesmas na resposta contra o SARS-Cov-2 durante a fase aguda e no período convalescente. **Objetivo:** Caracterizar o perfil das subpopulações de microvesículas circulantes durante o processo inflamatório desenvolvido nos pacientes da infecção pelo SARS-CoV-2 e indivíduos convalescente da COVID-19. **Material e métodos:** A caracterização imunofenotípica das microvesículas, obtida pela técnica de citometria de fluxo, foi realizada em 15 indivíduos saudáveis, 9 pacientes infectados por SARS-CoV-2 e 15 indivíduos convalescentes da COVID-19. **Resultados:** microvesículas de monócitos (CD14) e de plaquetas (CD41) estavam diminuídas significativamente em pacientes com COVID-19, assim como em indivíduos convalescentes em comparação aos controles, de outro modo houve um aumento significativo das microvesículas de linfócitos B (CD19) nos pacientes em comparação a controles e indivíduos convalescentes. Os indivíduos convalescentes apresentaram uma produção maior de microvesículas de células endoteliais (CD51/61) no D30, diferindo significativamente de controles saudáveis. **Conclusão:** nosso estudo mostra que o perfil de microvesículas em pacientes infectados com SARS-CoV-2 apresenta uma baixa liberação de microvesículas de monócitos e plaquetas, por outro lado as microvesículas de linfócitos B estão elevadas durante a fase aguda da doença. O perfil de microvesículas em indivíduos convalescentes mostrou que microvesículas de células endoteliais (CD51/61) estavam elevadas, isso nos mostra que a COVID-19, de fato, é uma doença que tem uma resposta inflamatória bastante extensa, que causa, mesmo em baixo grau, um dano tecidual bastante importante.

Palavras-chave: SARS-COV-2, COVID-19, microvesículas, plasma convalescente

ABSTRACT

Introduction: COVID-19 is an infectious disease of the human respiratory tract caused by SARS-CoV-2. The inflammatory response of COVID-19 is marked by the exacerbated release of pro-inflammatory mediators, causing significant tissue damage. Microvesicles are a type of extracellular vesicle released by all cell types, with functions such as intercellular communication and transporters of biomolecules, being able to induce inflammatory and anti-inflammatory responses. However, little is known about their involvement in the response against SARS-Cov-2 during the acute phase and the convalescent period. **Objective:** To characterize the profile of subpopulations of circulating microvesicles during the inflammatory process developed in patients infected with SARS-CoV-2 and individuals convalescing from COVID-19. **Material and methods:** The immunophenotypic characterization of microvesicles, obtained by the flow cytometry technique, was performed in 15 healthy individuals, 9 patients infected with SARS-CoV-2 and 15 convalescing individuals from COVID-19. **Results:** monocyte (CD14) and platelet (CD41) microvesicles were significantly decreased in patients with COVID-19, as well as in convalescent individuals compared to controls, otherwise there was a significant increase in B lymphocyte microvesicles (CD19) in the patients compared to controls and convalescent subjects. Convalescent individuals showed a higher production of endothelial cell microvesicles (CD51/61) on D30, significantly differing from healthy controls. **Conclusion:** our study shows that the profile of microvesicles in patients infected with SARS-CoV-2 presents a low release of monocyte and platelet microvesicles, on the other hand, B lymphocyte microvesicles are elevated during the acute phase of the disease. The profile of microvesicles in convalescent individuals showed that endothelial cell microvesicles (CD51/61) were elevated, this shows us that COVID-19, in fact, is a disease that has a very extensive inflammatory response, which causes, even at low degree, a very important tissue damage.

Keywords: SARS-COV-2, COVID-19, microvesicles, convalescent plasma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do envelope viral do SARS-CoV-2.....	20
Figura 2 – Organização do genoma viral.....	21
Figura 3 – Mecanismo de entrada viral do SARS-CoV-2.....	27
Figura 4 – Ciclo de replicação viral.....	28
Figura 5 – Visão geral dos sintomas da COVID-19.....	29
Figura 6 – Vesículas extracelulares.....	36
Figura 7 – Biogênese das microvesículas.....	39
Figura 8 – Conteúdo externo e interno das microvesículas.....	40
Figura 9 – Fluxograma da coleta de amostras.....	53
Figura 10 – Fluxograma da seleção de amostras.....	54
Figura 11 – Perfil de microvesículas dos pacientes com COVID-19.....	65
Figura 12 – Perfil das microvesículas em indivíduos convalescente.....	67
Figura 13 – Análise comparativa do perfil de microvesículas entre pacientes com COVID-19 e indivíduos convalescentes.....	69
Figura 14 – Padrão de microvesículas em pacientes graves e não graves da COVID-19.....	71
Figura 15 – Padrão de microvesículas de acordo com desfecho clínico dos pacientes da COVID-19.....	72
Figura 16 – Perfil cinético das microvesículas.....	74
Figura 17 – Redes de interação das subpopulações de microvesículas.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Painel de imunofenotipagem das populações de Mvs.....	55
Tabela 2 – Características sociodemográficas dos participantes do estudo.....	57
Tabela 3 – Perfil hematológico de pacientes da COVID-19 e indivíduos convalescentes.....	59
Tabela 4 – Características clínicas dos pacientes.....	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

+ssRNARNA fita simples polaridade positiva

3CLpro protease do tipo 3-quimiotripsina

ASC proteína adaptadora apoptótica

ATP adenosina trifosfato

CAAE certificado de apresentação de apreciação ética

CEP Comitê de Ética em Pesquisa

COVID-19 doença coronavírus 2019

CXCL-10 ligante 10 de quimiocinas com motivo CXC

DAMPs padrões moleculares associados a danos

DNA Ácido Desoxirribonucleico

ECA-2 enzima conversora de angiotensina 2

ESCRT Complexo de Triagem Endossomal Necessário para Transporte

FT fator tecidual

G1 grupo 1

G2 grupo 2

G3 grupo 3

HEMOAM Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

HUGV Hospital Universitário Getúlio Vargas

ICAM-1 molécula de adesão intercelular-1

IFN- λ interferon lambda

IL-12 interleucina 12

IL-1 β interleucina 1 beta

IL-2 interleucina 2

IL-24 interleucina 24

IL-6 interleucina 6

IL-8 interleucina 8

INF- γ interferon gamma

ISEV sociedade internacional de vesículas extracelulares

LBA lavagem broncoalveolar

LPS Lipopolissacarídeo

MAPK proteína quinase ativada por mitógeno

MCP-1 proteína quimioatraente de monócitos-1

MERS-CoV coronavírus da síndrome respiratória do oriente médio

MHCs complexos de histocompatibilidade

MIP-1 α proteína inflamatória de macrófagos 1-alfa

MVs microvesículas

MVs-CE Microvesículas de células endoteliais

MVs-CT Microvesículas de células T

MVs-E Microvesículas de eritrócitos

MVs-MON Microvesículas de monócitos

MVs-NEU Microvesículas de neutrófilos

MVs-P Microvesículas de plaquetas

NAAT teste de amplificação de ácido nucleico

NADPH fosfato de dinucleotídeos de nicotinamida e adenina

nsp12 proteína não estrutural 12

nsp3 proteína não estrutural 3

nsp5 proteína não estrutural 5

OMS organização mundial da saúde

ORFs quadros de leituras abertas

PLpro protease semelhante à papaína

PRRs receptores de reconhecimento de padrões

RBD domínio de ligação ao receptor

RdRp RNA polimerase dependente de RNA

RE reticulo endoplasmático

RNA Ácido ribonucleico

ROS espécies reativas a oxigênio

RT-PCR reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa

SARS-CoV *coronavírus da síndrome respiratória aguda grave*

SARS-CoV-2 *Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave*

SDRA *síndrome do desconforto respiratório agudo*

STAT3 *Signaling Transducer and Activator of Transcription 3*

TCD4 células T CD4

TCD8 células T CD8

TCLE termo de consentimento livre e esclarecido

TH1 perfil TH1

TMPRSS2 protease transmembrana tipo 2

TNF- α fator de necrose tumoral- α

UTI unidade de terapia intensiva

VEs Vesículas extracelulares

VOCs variantes de preocupação

VOIs variantes de interesse

VUMs variantes sob monitoramento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 Doença Coronavírus 2019 – etiologia	20
2.2 Epidemiologia.....	21
2.3 Ciclo de replicação viral	26
2.4 COVID-19: transmissão, sintomas, diagnósticos e vacina	28
2.5 Plasma Convalescente.....	30
2.6 Imunopatogênese da COVID-19	32
2.7 Vesículas Extracelulares	35
2.8 Microvesículas	38
3. OBJETIVOS.....	50
3.1 Objetivo Geral:	50
3.2 Objetivos Específicos:	50
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1 Tipo de Estudo	51
4.2 Aspectos Éticos.....	51
4.3 População do estudo	51
4.4 Critérios de Inclusão e Exclusão.....	51
4.5 Coleta das amostras	52
4.6 Seleção das amostras	54
4.7 Caracterização de Microvesícula por citometria de fluxo	54
4.8 Análises de dados.....	55
5. RESULTADOS.....	56
5.1 Caracterização da população do estudo	56
5.2 Perfil hematológicos de pacientes COVID-19 e indivíduos convalescentes e dados clínicos dos pacientes COVID-19.....	58
5.3 Perfil de microvesículas dos pacientes com COVID-19	64
5.4 Perfil das microvesículas em indivíduos convalescentes.....	66

5.5	Análise comparativa do perfil de microvesículas entre pacientes com COVID-19 e indivíduos convalescentes.....	68
5.6	Apresentação do padrão de microvesículas em pacientes graves e não graves da COVID-19	70
5.7	Padrão de microvesículas de acordo com desfecho dos pacientes da COVID-19.....	72
5.8	Perfil Cinético das microvesículas.....	73
5.9	Redes de interação das subpopulações de microvesículas.....	75
6	DISCUSSÃO.....	77
7	CONCLUSÃO	82
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
9	ANEXOS.....	101
9.1	PARECER DO CEP: PACIENTES E CONVALESCENTES.....	101
9.2	PARECER DO CEP: GRUPO CONTROLE	102
9.3	TCLE	103

1. INTRODUÇÃO

A COVID-19 é uma doença infecciosa do trato respiratório humano causada pelo agente etiológico denominado *CORONAVÍRUS 2 DA SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE* (SARS-CoV-2), que primeiramente foi relatado na cidade de Wuhan, província de Hubei, China, em 8 de dezembro de 2019, inicialmente causando sintomas que se assemelhavam à pneumonia. A COVID-19 logo se tornou uma pandemia devido sua crescente taxa de transmissibilidade e mortalidade, fazendo com que a organização mundial da saúde (OMS) declarasse emergência de saúde pública de preocupação global.¹⁻³

O SARS-Cov-2 invade as células do trato respiratório superior pelos receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2) presente nos pneumócitos do tipo II nos pulmões, onde é desencadeada uma cascata de inflamação. O complexo formado é processado proteoliticamente pela protease transmembrana tipo 2 (TMPRSS2), levando a clivagem de ECA-2 e ativação da proteína spike, o que facilita a entrada do vírus na célula-alvo.⁴⁻⁶

O SARS-CoV-2 é transmitido de pessoa para pessoa principalmente através de gotículas contaminadas pelo vírus por espirro ou tosse, ou através de fômites usados pelas pessoas infectadas como lençóis, objetos pessoais, utensílios, entre outros. O período de incubação do vírus varia de 5 a 6 dias, podendo chegar até 14 dias, o que torna a transmissibilidade ainda maior, pois nesse período, que é conhecido como assintomático, as pessoas infectadas podem transmitir o vírus a indivíduos saudáveis.^{7,8}

Sabe-se que a gravidade da COVID-19 está associada a idade, quanto mais velho, maior a morbidade entre esses indivíduos, assim como internação em UTI, uma progressão para SDRA, febre mais altas e maior taxa de mortalidade. Linfocitopenia, neutrofilia, indicadores de inflamação e coagulação são consistentemente vistos em pacientes acima de 65 anos. A nível celular é observado a capacidade diminuída das células TCD4⁺ e TCD8⁺ produzirem INF- γ e IL-2, assim como comprometimento na ativação de células T a partir das células dendríticas, podendo assim comprometer uma resposta imune adaptativa ideal.⁹⁻¹²

Em pacientes que apresentam sintomas graves da doença foram observados proporções mais altas de macrófagos pro-inflamatórios e neutrófilos, no líquido de lavagem broncoalveolar (LBA), conseqüentemente, as citocinas pro-inflamatórias como IL-6 e quimiocina CXCL-8 estão

em níveis elevados, atraindo células inflamatórias ao local da inflamação, que conseqüentemente liberam mais citocinas, esse ciclo de ativação resulta em uma “tempestade de citocinas”, comumente vista em pacientes com COVID-19.¹³⁻¹⁵

Além disso, outros componentes podem estar atuando na resposta inflamatória da COVID-19, como as vesículas extracelulares (VEs). Um estudo *in vitro* demonstrou que as VEs de algumas células podem conter em sua superfície a ECA-2, receptor que media a entrada do vírus na célula do hospedeiro, sugerindo a participação das VEs na infecção das células¹⁶. As VEs podem ser classificadas de acordo com seu tamanho, origem e biogênese, entre as VEs mais bem descritas estão exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos¹⁷.

Microvesículas são um tipo de vesícula extracelular liberadas por todos os tipos celulares, tanto em um estado fisiológico quanto em processos inflamatórios. Elas são formadas a partir do brotamento da membrana plasmática e possuem em sua superfície muitos marcadores das células que se originam, e sua carga interna também apresenta proteínas semelhantes às células de origem. Inicialmente as vesículas extracelulares não tinham funções conhecidas, sendo consideradas como “poeiras de plaquetas”, células das quais as microvesículas foram observadas pela primeira vez. Hoje há um extenso número de estudos sobre VEs, e é sabido que as microvesículas exercem papéis pleiotrópicos em várias doenças.¹⁸

De modo geral ainda se sabe pouco sobre o papel que as microvesículas exercem na resposta inflamatória da COVID-19. Alguns estudos apontam que as microvesículas estão mais elevadas nos pacientes e parece haver uma relação destas com o perfil pró-coagulante ao comparar os níveis de microvesículas com D-dímero e fator tecidual. Alguns estudos mostram que elas se correlacionam com a gravidade da doença e mortalidade, podendo ser um possível biomarcador de gravidade.¹⁹

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doença Coronavírus 2019 – etiologia

Coronavírus são vírus que causam doenças respiratórias, entéricas e do sistema nervoso central em humanos e animais. As espécies de importância clínica em humanos são: coronavírus humanos 229E, NL63, OC43 e HKU1 que infectam o trato respiratório superior, causando sintomas leves. Contudo existem 3 espécies que podem causar sintomas graves que são: *coronavírus da síndrome respiratória aguda grave* (SARS-CoV), *coronavírus da síndrome respiratória do oriente médio* (MERS-CoV) e SARS-CoV-2, estes se replicam no trato respiratório inferior, causando pneumonia e podendo levar a morte^{8,20,21}.

Os coronavirus pertencem a ordem *Nidovirales* que inclui as famílias *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Mesoniviridae* e *Roniviridae*. A família *Coronaviridae* é subdividida em *Coronavirinae* e *Torovirinae*. Os *Coronavirinae* são subdivididos em quatro gêneros: *alfa*, *beta*, *gama* e *delta*, sendo assim o SARS-CoV-2, pertence à família *Coronaviridae*, subfamília *coronavirinae*, do subgênero *betacoronavirus* (β)^{20,22}.

A partícula viral é envelopada, possuindo uma dupla camada lipídica, com morfologia esférica, tamanho aproximado de 100 a 160nm de diâmetro, por todo o envelope são observadas várias espículas, dando ao vírus um aspecto de coroa, uma característica ao qual recebeu a nomenclatura *Coronavirus*. As proteínas do envelope lhes atribuem as principais propriedades ligadas a infectividade, virulência e variabilidade (Figura 1) ^{21,23,24}.

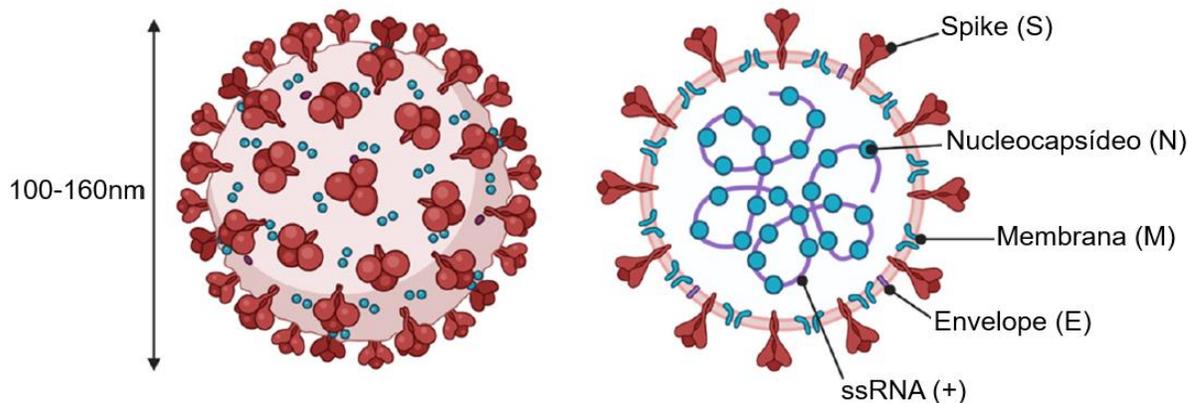


Figura 1: Estrutura do envelope viral do SARS-CoV-2. A figura apresenta as principais proteínas do envelope viral – Spike (S), Nucleocapsídeo (N), Membrana (M), Envelope (E) e seu genoma viral, o RNA de fita simples polaridade positiva – ssRNA (+)

Fonte: Traduzido de Kitchen, et al., 2022

O genoma é composto por RNA fita simples de polaridade positiva (+ssRNA), com aproximadamente 29,9 kb, possuindo 2 quadros de leituras abertas (Open read frame - ORFs), ORF1a e ORF1b, o que engloba 2/3 do genoma traduzido para proteínas pp1a e pp1b. O genoma viral codifica 2 proteases de cisteína, uma semelhante a papaína (PLpro) ou nsp3 e uma semelhante a 3c (3CLpro) ou nsp5. Essas proteases clivam os polipeptídios pp1a e pp1b em 16 proteínas não estruturais, a RNA polimerase RNA-dependente (RdRp) traduz-se em nsp12, sendo este importante para a replicação e transcrição do coronavírus. O restante do genoma é composto por ORFs sobrepostas que codificam 4 proteínas estruturais que incluem: S (glicoproteína spike), N (proteína do nucleocapsídeo), M (proteína da membrana) e E (proteína do envelope) e algumas proteínas acessórias. A Proteína S, é composta por duas subunidades funcionais S1 e S2. Sendo S1 responsável pela ligação ao receptor da célula hospedeira e S2 com função de fusão entre as membranas do vírus e células, juntamente com outros peptídeos (figura 2)²⁵.

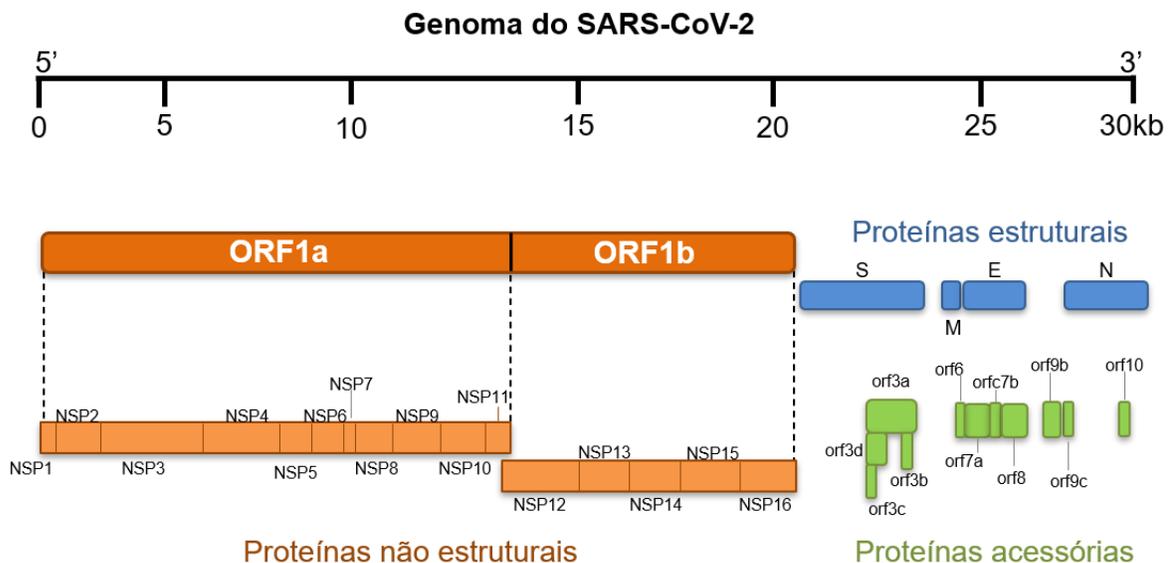


Figura 2: Organização do genoma viral. O vírus possui um genoma ~29,9kb. ORF1a e ORF1b (Open Read Fram) que codificam proteínas não estruturais 1-16 (NSP1-16). ORF3-10 que codificam 11 proteínas acessórias. Proteínas do envelope viral (S, M, E e N).

Fonte: A própria autora.

2.2 Epidemiologia

Os primeiros casos de doença coronavírus 2019 (COVID-19) provavelmente ocorreram a partir de uma transmissão zoonótica na cidade de Wuhan, China, em dezembro de 2019, ligada a um grande mercado de frutos do mar que também comercializava animais selvagens vivos. O vírus

causador da COVID-19 é capaz de ser transmitido de pessoa para pessoa e se espalhou rapidamente para outras partes da China e depois para outros países no mundo.^{26,27}

Seguindo uma linha do tempo, é possível destacar os principais eventos desde o surgimento da COVID-19 até o momento atual. Os casos de COVID-19, iniciaram em 8 de dezembro de 2019, no entanto ainda não era conhecida a doença e seu agente etiológico. Nessa data foram relatados casos de pessoas com sintomas semelhantes a pneumonia em Wuhan. Em 7 de janeiro de 2020, o centro chinês de controle e prevenção de doenças identificou o novo coronavírus em pessoas internadas. No dia 09 de janeiro de 2020 na china foi relatada a primeira morte causada pelo SARS-CoV-2. Em 13 de janeiro de 2020 foi confirmado o primeiro caso positivo fora da china, na Tailândia.²⁶

A organização mundial da saúde (OMS) em seu relatório de situação 1, relatou 282 casos confirmados laboratorialmente e 6 óbitos no dia 20 de janeiro de 2020. A OMS em 30 de janeiro de 2020 declarou o surto de SARS-CoV-2 como emergência de saúde pública de interesse internacional. No dia 2 de fevereiro de 2020 a primeira morte foi confirmada fora da china, nas Filipinas. A doença causada pelo SARS-CoV-2, em 11 de fevereiro de 2020, foi nomeada de COVID-19.²⁶

A confirmação do primeiro caso de COVID-19 na América Latina foi registrada na cidade de São Paulo, Brasil, no dia 26 de fevereiro de 2020, em um indivíduo que havia retornado de uma viagem ao norte da Itália. É relevante pontuar que os casos subsequentes identificados no país também tiveram origem em viajantes provenientes da Itália, porém, apresentaram sequências genômicas virais distintas quando comparados ao primeiro caso^{28,29}.

No dia 11 de março de 2020 a OMS declarou a COVID-19 como pandemia. A OMS em seu relatório de situação 9, divulgou em 19 de março de 2020 que, o número de casos confirmados já ultrapassava 200 mil, também divulgou que levou 3 meses para atingir 100 mil e apenas 12 dias para atingir mais 100 mil. No relatório de situação 209 da OMS, foi anunciado que a infecção por SARS-CoV-2, atingia a marca de 21.294.845 milhões de casos confirmados e 761.779 mil mortes em 16 de agosto de 2020²⁶.

A dinâmica dos casos de infecções e óbitos decorrentes da COVID-19 apresentou uma evolução contínua ao longo de toda a região da América Latina, apresentando variações

significativas entre os distintos países. A atribuição das diferenças observadas pode ser explicada, ao menos em parte, por aspectos relacionados a amplitude dos testes de COVID-19, liderança política, renda e equidade socioeconômica, bem como a presença de economias informais, as áreas e populações com limitações de acesso aos serviços de saúde^{30,31}.

Na região da América do Sul, durante o ano de 2021, foi observado um aumento no número de casos mensais entre janeiro e junho, havendo uma tendência geral de declínio a partir de julho. De forma similar, o ápice no registro de óbitos ocorreu em abril de 2021, tendo havido, em geral, uma tendência decrescente a partir daí. Um padrão semelhante também foi observado em outras regiões da América Latina^{32,33}.

Assim como ocorreu em diversas outras regiões do mundo, a segunda onda de infecções por SARS-CoV-2, em 2021, apresentou-se de forma mais severa quando ocorreu à primeira, levando a uma sobrecarga significativa para os sistemas de saúde públicas. No Brasil, em especial na cidade de Manaus, a segunda onda da pandemia acarretou uma das mais graves crises de saúde pública da história³⁴.

A cidade de Manaus, capital do estado do Amazonas, foi palco de altas taxas de incidência e mortalidade em decorrência da COVID-19 em maio de 2020, o que resultou em um colapso no sistema funerário durante a primeira onda da pandemia. Durante as últimas semanas de dezembro de 2020 e primeiras semanas de janeiro de 2021, uma nova onda de casos abalou a cidade, causando o colapso do sistema municipal de saúde devido à escassez de leitos de enfermagem, leitos de Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e suprimentos de oxigênio³⁵.

No mês de janeiro de 2021, o colapso ocorrido nos sistemas de saúde públicos e privados de Manaus, ocasionou um notável aumento da mortalidade por COVID-19. Visto que, durante um período de 270 dias, entre abril e dezembro de 2020, foram relatadas 3.380 mortes entre residentes de Manaus. No entanto, em janeiro de 2021, em um período de apenas 31 dias, foram registradas 2.195 mortes, indicando um novo e inevitável pico acentuado na mortalidade por Covid-19.³⁵

No dia 14 de janeiro, esse triste acontecimento, que comoveu a população brasileira e global: onde dezenas de pacientes na rede pública hospitalar de Manaus perderam suas vidas por asfixia devido à falta de oxigênio. O Ministério da Saúde e o governo do Estado do Amazonas acompanharam a aceleração crescente de casos, mas não tomaram medidas eficazes de forma

adequada e em tempo hábil. Infelizmente, dias depois, tragédias semelhantes se repetiram em outras cidades do interior do Amazonas³⁵.

Alguns fatores podem ter contribuído para o colapso ocorrido em Manaus, destacando-se, dentre eles, a adesão insuficiente da população às medidas não farmacológicas preconizadas, tais como o uso adequado de máscaras, a forma correta de higiene das mãos com água e sabão ou álcool em gel, e respeito ao distanciamento social. Além disso, é importante ressaltar que a demora ou a ausência de decisões assertivas por parte dos governos federal e estadual também podem ser consideradas como fatores relevantes³⁵.

Sabino et al., explicam alguns pontos no ressurgimento da COVID-19 Manaus, que podem também explicar o colapso ocorrido em janeiro de 2021, apesar da alta soroprevalência: a taxa de infecção de SARS-CoV-2 pode ter sido superestimada durante a primeira onda, e a população permaneceu abaixo do limiar de imunidade de rebanho até o início de dezembro de 2020, causando então, uma maior mistura de infectados e indivíduos suscetíveis durante o mês de dezembro^{34,36}.

Outras questões também devem ser consideradas no que se refere ao colapso em Manaus, como a diminuição da proteção imunológica geral contra o SARS-CoV-2 após a primeira exposição, que provavelmente começou em dezembro de 2020. Além disso, durante a crise em Manaus, duas linhagens distintas do vírus SARS-CoV-2 estavam circulando no Brasil: B.1.1.7 e P.1. Ambas as linhagens apresentaram uma notável divergência e uma constelação única de mutações com potencial importância biológica^{37,38}.

A linhagem P.1 foi identificada pela primeira vez em Manaus no dia 12 de janeiro de 2021. Conforme relatado em um estudo preliminar, esta linhagem apresentou alta frequência (42%, 13 de 31) entre as amostras genômicas coletadas de pacientes com COVID-19 no mês de dezembro de 2020. No entanto, ela não foi encontrada em 26 Coletas coletadas em Manaus entre março e novembro de 2020. É importante destacar que essa linhagem é mais transmissível em comparação com as linhagens pré-existentes que circularam em Manaus durante esse período. A combinação desses fatores contribuiu significativamente para a crise de saúde que se instalou em Manaus^{34,39,40}.

As várias mutações sofridas no genoma do SARS-CoV-2, conferem a ele características que resultam na evasão imune e adaptação ao sistema imunológico do hospedeiro. E ao comparar a linhagem ancestral nota-se que cada uma das variantes exibe características específicas. No final

de 2020 a OMS classificou as variantes como variantes de interesse (VOIs), variantes de preocupação (VOCs) e variantes sob monitoramento (VUMs) com base nas suas características e no risco apresentado à saúde pública global⁴¹.

A variante pode ser classificada como VOC quando apresenta uma ou mais das seguintes características.⁴²

- a. Aumento da transmissibilidade ou alterações prejudiciais na epidemiologia da covid-19.
- b. Aumento da virulência ou alterações prejudiciais nas manifestações clínicas da doença.
- c. Uma diminuição na eficácia das medidas existentes de diagnóstico, vacina e tratamento.

Até o momento existem 5 variantes que foram identificadas como VOC: a Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2) e Omicron (B.1.1.529).

Em resumo, as taxas de transmissão, morbidade e mortalidade dessas VOCs aumentaram drasticamente.^{42,43}

Foi em 3 de outubro de 2021 que foram identificadas as variantes, Lambda (C.37) e MU (B.1.621), VOIs (variantes de interesse), são variantes que afetam as características virais como infecciosidade, gravidade da doença, escape imunológico, diagnóstico ou tratamento e ainda, tiveram um aumento significativo de transmissão da COVID-19 comunitária em vários países, os casos aumentaram ao longo do tempo, a prevalência e outros efeitos epidemiológicos, indicando riscos emergentes para a saúde pública global, apesar disso os efeitos adversos das VOIs foram menores que das VOCs.^{41,42}

As variantes sob monitoramento, VUMs, são definidas como uma suspeita de alteração genética nas características viral podendo representar, no futuro, um risco a saúde. As evidências sobre seus efeitos fenotípicos ou epidemiológicos ainda não são claras e requerem um monitoramento aprimorado. Elas são variantes que a qualquer momento podem aumentar ou diminuir, por isso não estão classificadas como VOIs/VOCs, atualmente existem três variantes: B.1.1.318, C.1.2 e B.1.640.^{41,42}

Segundo a OMS, até o dia 12 de julho de 2023, no mundo, foram confirmados 767.972.961 milhões de casos e 6.950.655 milhões de óbitos por COVID-19. No Brasil os números acumulados são: 37.693.506 milhões de casos confirmados e 704.320 mil óbitos por COVID-19, segundo o

Ministério da Saúde, até o dia 14 de julho de 2023. No Amazonas segundo a Fundação de Vigilância em Saúde, até o dia 12 de julho de 2023, os números acumulados de casos confirmados eram 637.006 mil, destes, 622.432 mil se recuperaram, não haviam internados e 14.479 mil foram a óbito⁴⁴⁻⁴⁶.

2.3 Ciclo de replicação viral

O ciclo de replicação do SARS-Cov-2 é iniciado através da sua ligação a uma célula hospedeira, através do receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2), expressa em células epiteliais das vias respiratórias, células epiteliais alveolares, células endoteliais vasculares e macrófagos do pulmão.⁷

A entrada viral é mediada por um processo de clivagem e ativação. A proteína S tem um papel fundamental nesse processo, ela é homotrimérica, possui duas unidades e cada unidade consiste em dois domínios, S1 e S2. O domínio S1 contém o domínio de ligação ao receptor (RBD) e se liga ao receptor do hospedeiro, o domínio S2 medeia a fusão entre as membranas do vírus e do hospedeiro⁴⁷.

O processo de clivagem ocorre em dois locais e envolve a ação da protease TMPRSS2. A proteína S liga-se a ECA-2, e o primeiro local de clivagem está no limite S1/S2, levando a mudanças estruturais no domínio S2, colocando-o em uma conformação de pré-fusão, após a clivagem há a separação S2 de S1, ainda assim, os dois domínios permanecem associados de forma não covalente. O segundo local de clivagem ocorre no S2, a qual conduz a fusão das membranas viral e celular para que assim ocorra a liberação do genoma viral (RNA) no citoplasma (figura 3).^{21,47}

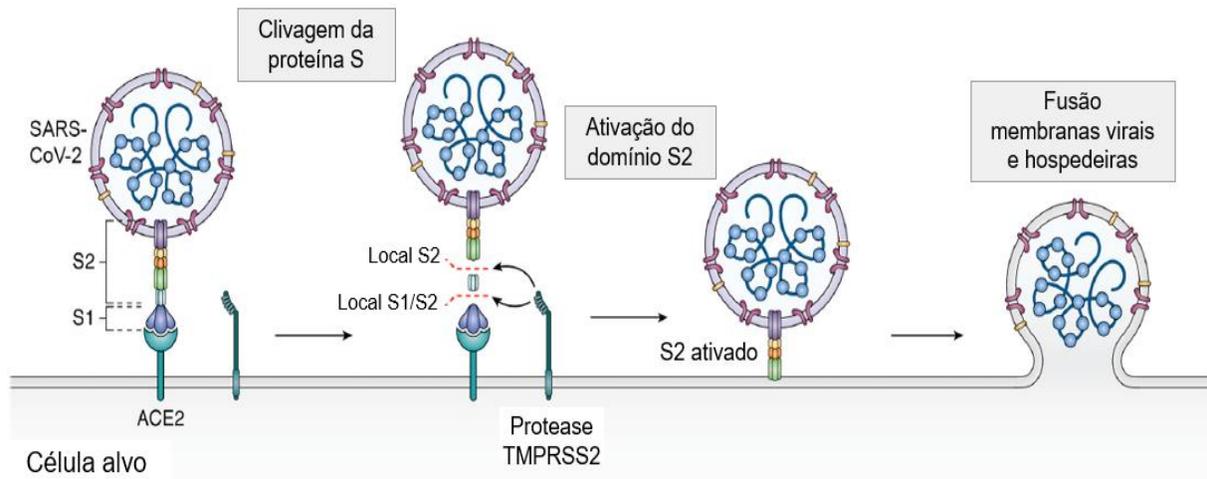


Figura 3: Mecanismo de entrada viral SARS-CoV-2. A proteína S do SARS-CoV-2 se liga com o receptor ECA-2 do hospedeiro e é subsequentemente clivada nos locais S1/S2 e S2 pela protease TMPRSS2. Levando à ativação do domínio S2 e conduzindo a fusão das membranas viral e do hospedeiro.

Fonte: Traduzido de Hartenian, et al., 2020

Após a fusão na membrana, o vírus tem acesso a célula alvo e o conteúdo viral é liberado para o interior da célula. O ribossomo da célula hospedeira faz a tradução do RNA viral em poliproteínas que replicam as fitas em RNA genômico negativo, usado como molde para formar RNA subgenômico ou genômico positivo. O RNA viral e a proteína estrutural do nucleocapsídeo (N) são replicados, transcritos e traduzidos no citoplasma, enquanto outras proteínas estruturais virais, incluindo S, M e E, são transcritas e depois traduzidas no retículo endoplasmático (RE) e transportadas para o Golgi. O complexo RNA + proteína N e as proteínas S, M e E são posteriormente montados no compartimento intermediário ER-Golgi (ERGIC) para formar virions maduros. Por fim, as partículas virais ficam prontas para invadir as células epiteliais adjacentes, iniciando um novo ciclo de replicação (figura 4)⁴⁸.

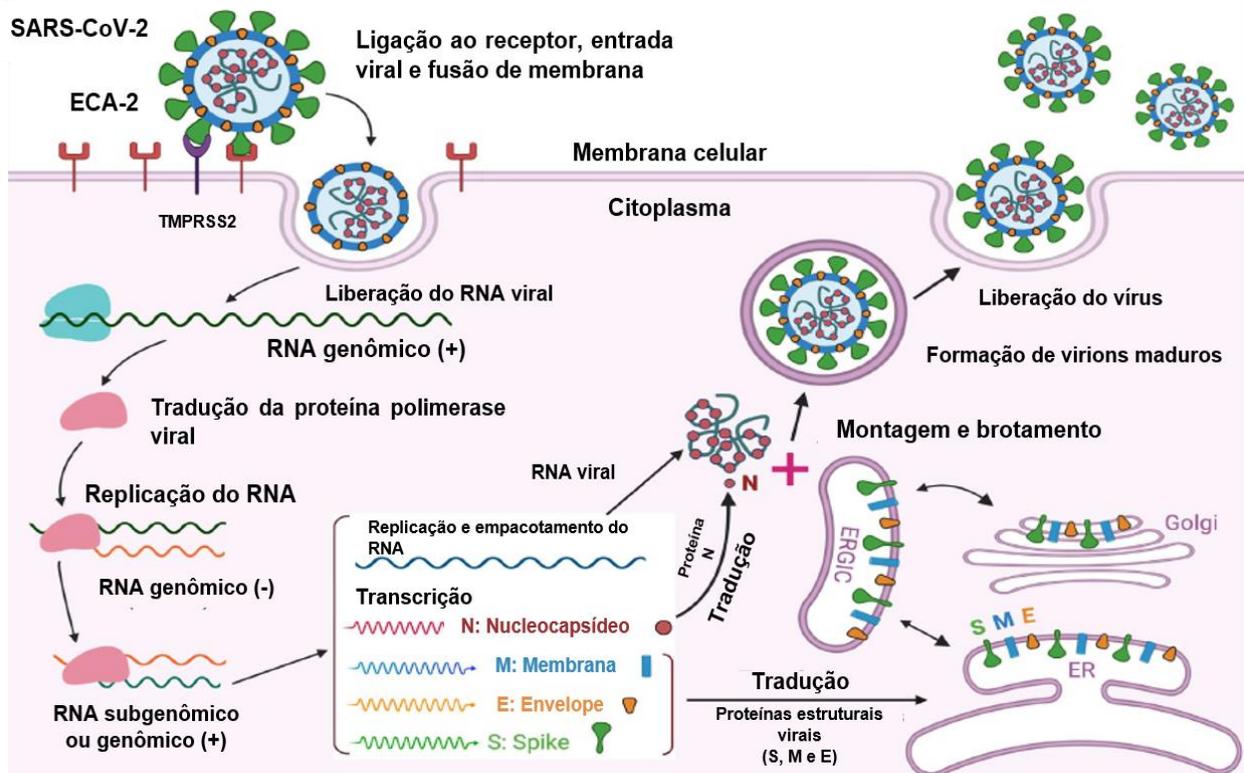


Figura 4: Ciclo de replicação viral. O ciclo de replicação do SARS-COV-2 inicia através da ligação de sua proteína de superfície (S) com a ECA-2. O RNA viral é liberado no citoplasma e traduzido, replicado e transcrito. Proteínas N, M, E, S e RNA viral são posteriormente montados no compartimento intermediário ER-Golgi (ERGIC) para formar virions maduros e liberados por exocitose para infectar outras células.

Fonte: Traduzido e adaptado de Jiang, et al., 2020

2.4 COVID-19: transmissão, sintomas, diagnósticos e vacina

A transmissão do vírus SARS-CoV-2, ocorre entre pessoas através de gotículas respiratórias, também pode ocorrer por meio do contato com objetos contaminados. O vírus invade as células epiteliais nasais do trato respiratório superior através do ECA-2, sofre replicação e se propaga no local, essa fase tem um período de incubação de aproximadamente 5 dias antes dos sintomas se manifestarem. No entanto algumas pessoas manifestam os sintomas após 14 dias. Durante essa fase a resposta imune gerada é limitada apesar da carga viral baixa, porém a taxa de transmissão do vírus é alta, o que acaba facilitando sua propagação entre as pessoas^{7,8,49-51}

Em função do acometimento das vias aéreas, a doença se manifesta com sintomas de febre, mal-estar e tosse seca em maior parte dos pacientes, em uma parte dos infectados aparecem sintomas menos comuns, resultante da resposta disfuncional, como: dificuldade de respirar, dores musculares e/ou articulares, dor de cabeça, tontura, diarreia, náusea e tosse com sangue. Casos mais graves da doença são vistos na população mais velha^{7,8,52}.

A SDRA, é caracterizada pela dificuldade respiratória e níveis baixos de oxigênio no sangue, podendo levar o paciente a adquirir infecções secundárias como bacterianas e fúngicas. A SDRA leva a insuficiência respiratória que é a causa de morte em 70% dos casos fatais, os altos níveis de citocinas podem levar os pacientes a um quadro de sepse sendo a causa de morte em 28% dos pacientes, a inflamação descontrolada nesses casos atinge múltiplos órgãos, levando a falência de órgãos, principalmente coração, fígado e rins (figura 5).^{8,53-55}

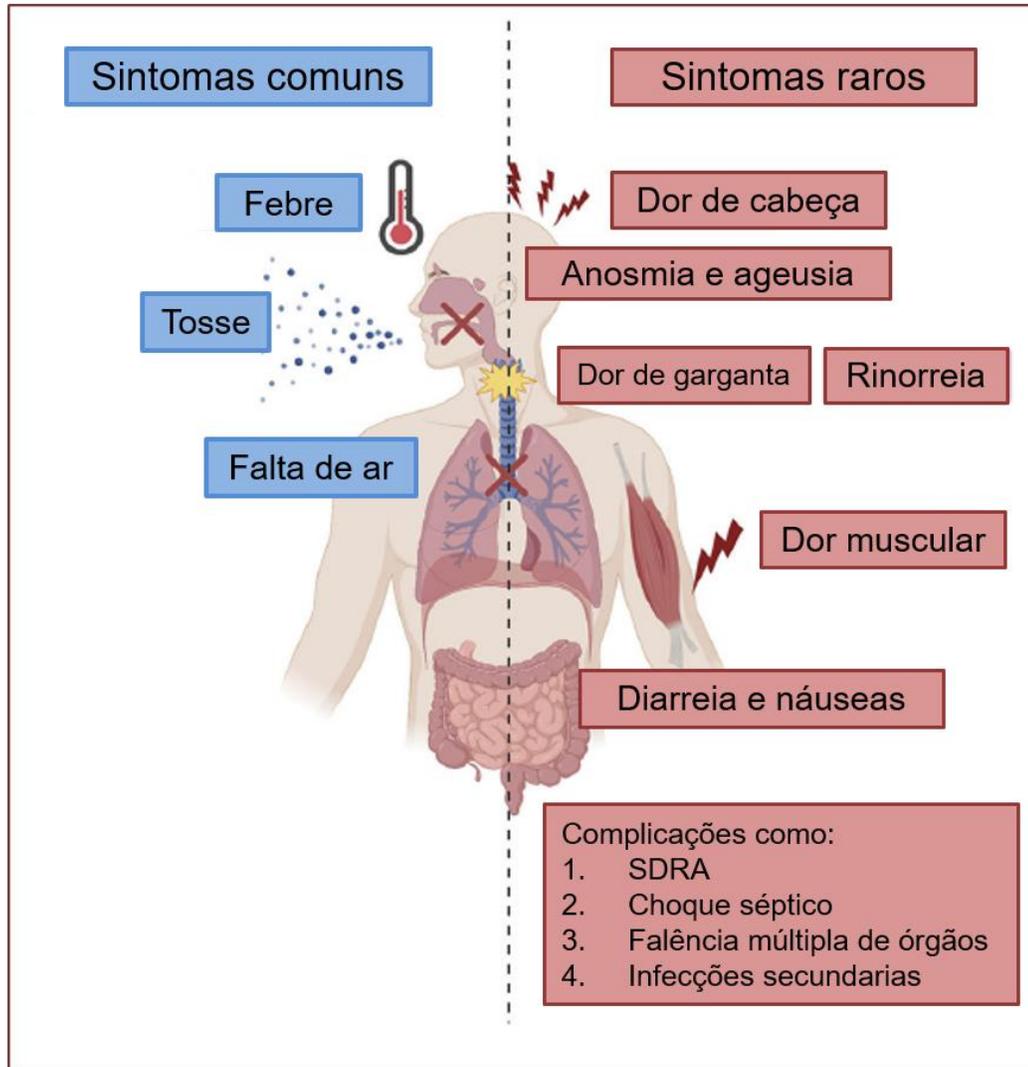


Figura 5: Visão geral dos sintomas mais comuns e raros da COVID-19. As caixas azuis representam os sintomas mais comuns e caixas rosas representam sintomas raros da doença
Fonte: Traduzido de Alturki, et al., 2020

Atualmente, o diagnóstico confirmatório da COVID-19 é realizado através do método RT-PCR (reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa, recomendado pela OMS como o teste “padrão ouro”, que detecta o RNA viral do SARS-CoV-2⁵⁶⁻⁵⁸. Os testes imunocromatográficos (teste rápido), são usados principalmente pelos postos de atendimentos, sendo um teste que detecta o antígeno viral (proteínas virais), com resultados em aproximadamente 15 minutos⁵⁹⁻⁶¹.

As vacinas contra a COVID-19 têm se mostrado uma ferramenta significativa na luta contra a doença, uma vez que proporcionam uma promissora imunidade protetiva contra a infecção pelo SARS-CoV-2. É importante destacar que existem dois grupos de vacinas disponíveis para a estratégia global de vacinação contra a COVID-19. O grupo clássico é composto por vacinas de subunidades, inativadas, vivas atenuadas e de partículas semelhantes a vírus. Além disso, novas abordagens incluem vacinas baseadas em mRNA, que consistem na entrega de proteínas virais alvo codificadoras de RNA em células humanas^{62,63}.

Todas as vacinas mencionadas são submetidas a um constante monitoramento por meio de testes rigorosos de segurança e eficácia. Com base nos dados disponíveis, é possível constatar que as vacinas apresentam uma elevada eficácia na prevenção de casos graves da doença, hospitalizações e óbitos decorrentes da infecção pelo vírus. Contudo, não é incomum observar casos de avanço da infecção em indivíduos totalmente vacinados^{64,65}.

Embora haja muitas questões ainda não respondidas sobre a duração da proteção conferida pelas vacinas e a eficácia diante de novas variantes do vírus, é inegável que as mesmas seguem sendo uma importante ferramenta no combate à COVID-19. Ressalta-se a relevância da vacinação em larga escala para o controle da disseminação do vírus e a preservação da saúde da população⁶⁶.

2.5 Plasma Convalescente

No decorrer do primeiro ano da pandemia da COVID-19, o uso do plasma convalescente foi cogitado como uma terapia adjuvante, tendo em vista que alguns estudos clínicos evidenciaram a melhora do quadro clínico dos pacientes atendidos ao tratamento. À época, a FDA forneceu orientações para o uso emergencial do plasma convalescente, entretanto, essa terapia não prosperou, uma vez que pode provocar efeitos adversos, tais como o aumento da infecção mediada por anticorpos, a lesão pulmonar associada a transfusões e as reações transfusionais alérgicas. Além

disso, o plasma de indivíduos convalescentes apresentava disponibilidade reduzida de anticorpos neutralizantes, o que limitava ainda mais a sua eficácia terapêutica⁶⁷⁻⁶⁹.

O período de convalescença subsequente à infecção por COVID-19 tem despertado considerável interesse, uma vez que é de fundamental importância para a compreensão das manifestações clínicas que se seguem à doença. Algumas pesquisas têm apontado que aproximadamente 10% dos pacientes podem apresentar manifestações clínicas após três semanas de infecção, as quais podem persistir por vários meses subsequentes, em menor grau^{70,71}.

As manifestações pós-COVID-19 podem ser divididas em duas categorias distintas: 1) subagudas, que incluem sintomas e anormalidades que se manifestam entre 4 a 12 semanas após a infecção; e 2) síndrome crônica ou pós-COVID-19, que engloba sintomas e anormalidades que persistem por 12 semanas ou mais após uma infecção e que não podem ser atribuídas a outras causas⁷².

Em um estudo realizado por Marsán-Suárez e colaboradores, que avaliou 20 pacientes recuperados da COVID-19, em um período de 1 a 3 meses após a infecção, foram analisados parâmetros laboratoriais como: hematológicos, bioquímicos e imunológicos. Os resultados de parâmetros hematológicos mostraram que os pacientes que tiveram a forma grave da doença ainda apresentavam alterações no hemograma como, contagem elevada de eosinófilos e monócitos, em contraste, pacientes críticos da doença tiveram contagem menores de linfócitos⁷³.

Os pacientes com asma brônquica apresentaram os valores de glicemia mais elevados, embora estes estivessem dentro dos parâmetros normais, porém, com diferença significativa de não asmáticos. Os pacientes que apresentaram dificuldade respiratória como complicação, apresentaram maiores concentrações Fosfatase Alcalina Leucocitária (LAP) e menores contagens de linfócitos, com diferença significativa daqueles que não apresentaram essa complicação⁷³.

A análise de parâmetros imunológicos de pacientes em período de convalescença mostrou que em 95% e 80% dos pacientes, as concentrações de C3 e IgG encontravam-se diminuídas, respectivamente. Além disso, pacientes que desenvolveram as formas mais graves da doença tendem a apresentar valores mais baixos de IgG e C3 na convalescença. 90% dos pacientes analisados apresentavam anticorpos IgG específicos contra a proteína RBD, destes, 27,8%

apresentaram títulos mais elevados, a análise de correlação entre títulos de IgG específicos para RBD e sua capacidade de inibição da interação com a proteína ECA-2, se mostrou positiva⁷³.

A avaliação da resposta imune celular foi realizada tanto nos pacientes convalescentes quanto em 20 controles saudáveis, por meio da técnica de citometria de fluxo. Os pacientes convalescentes tiveram porcentagens mais baixas de linfócitos T virgens (CD3+/CD4+; CD45RA+) e T de memória (CD45RO+), assim como linfócitos B (CD19+) e linfócitos B de memória (CD19+/IgD-/IgM-/CD27+) em relação aos controles, no entanto sem diferenças significativas. Por outro lado, células NK (CD3-/CD56+), células natural killer T (CD3+/CD56+) e células plasmáticas (CD3-/CD19+/CD27+/CD38+) foram diminuídas em pacientes quando comparados com controles saudáveis, diferindo significativamente⁷³.

Ao analisar as subpopulações de linfócitos ativados, TCD4+ (CD3+/CD4+CD38+/HLA-DR+) apresentaram porcentagens maiores em pacientes convalescentes em comparação aos controles, sem diferenças significativas. TCD8+ (CD3+/CD8+CD38+/HLA-DR+), também se apresentavam aumentados na maioria dos pacientes quando comparado aos controles, no entanto, com diferença significativa⁷³.

A existência de estados de imunossupressão em pacientes no período pós-COVID-19 indica a presença de ativação crônica que pode ser causada por diferentes fatores. Dentre eles, destacam-se a persistência viral, a permanência da inflamação, os fenômenos de autoimunidade decorrentes de antígenos de reação cruzada, bem como por reparação de danos teciduais. É importante ressaltar que uma resposta imune excessiva pode levar a uma imunossupressão acentuada, inflamação persistente e síndrome catabólica, sobretudo em pacientes com formas graves e críticas durante a infecção⁷⁴⁻⁷⁶.

2.6 Imunopatogênese da COVID-19

O processo de replicação viral induz nas células do epitélio pulmonar uma morte conhecida como piroptose. Após a morte, essas células liberam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como o RNA viral, e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), como ATP, DNA e oligômeros ASC, que são então reconhecidos por células dendríticas e macrófagos alveolares. Essas células fagocitam, processam e apresentam os antígenos via MHC às células T, que reconhecem esses antígenos através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs),

como os receptores do tipo Toll-like (TLRs), como por exemplo TLR3 e TLR7 que reconhecem RNA viral^{7,8}.

Esse processo inicia a ativação de células TCD8⁺ e TCD4⁺, liberando citocinas e quimiocinas que ativam e recrutam outras células para o local da inflamação. As células TCD8⁺ estão envolvidas principalmente na eliminação das células infectadas por mecanismos de citotoxicidade, enquanto as células TCD4⁺ são importantes para a ativação de células TCD8⁺ e linfócitos B, que liberam anticorpos neutralizantes para impedir que novas células sejam infectadas pelo vírus, além disso fazem a regulação da resposta imune. Na maior parte dos indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 o sistema imune funciona de forma ideal, onde há a eliminação do vírus pelas células, a resposta imune diminui, o dano tecidual é mínimo e os pacientes se recuperam^{8,77}.

Em aproximadamente 1/5 das pessoas que se infectam, é desenvolvido a forma grave da COVID-19, caracterizado por uma resposta imune disfuncional, nestes, são vistos níveis elevados de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IFN- λ e IFN- β , quimiocinas como CXCL-10 e CXCL-8, proteína inflamatória de macrófagos 1 α (MIP-1 α) e proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1)^{78,79}.

Todas essas citocinas funcionam como quimioatraente para neutrófilos, células TCD4⁺ e TCD8⁺, que são células importantes para combater o vírus, mas a resposta inflamatória nesses pacientes acaba sendo exacerbada, levando a lesão pulmonar, essa lesão persistente leva a perda de pneumócitos tipo 1 e 2 e dano alveolar difuso, o que causa a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA).^{7,77}

Há um acúmulo de evidências que indicam que os padrões imunológicos estão intrinsecamente ligados à progressão de doenças em indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2^{52,80}. Dessa forma, a linfopenia é uma característica essencial presente em pacientes diagnosticados com COVID-19, especialmente em casos severos. Constatou-se que pacientes com formas graves da doença apresentam maior probabilidade de desenvolver linfopenia na fase de admissão, o que se configura como um indicativo significativo para o prognóstico negativo do paciente. Ademais, também se observa uma acentuada redução no número de células CD4⁺ T, CD8⁺ T, NK e B em pacientes diagnosticados com a doença^{81,82}.

Verifica-se que o número de granulócitos, como neutrófilos e monócitos em pacientes com COVID-19 apresentam-se anormal. Os neutrófilos, assim como a relação neutrófilo-linfócito, comumente utilizados como importantes indicadores para identificação de casos graves e evolução clínica desfavorável, apresentam-se significativamente maiores em pacientes graves em comparação a pacientes não graves^{83,84}.

Portanto, a gravidade da doença é marcada por uma liberação exacerbada de citocinas, ativação, assim como disfunção, de células da imunidade. Não se limitando a isso, outros componentes contribuem para o estado de gravidade da COVID-19, como, por exemplo, vesículas extracelulares (VEs), que tem como uma de suas principais funções, a comunicação intercelular. Alguns estudos têm mostrado possíveis funções das VEs, como seu uso como biomarcador de gravidade da doença, assim como, a possibilidade de serem usadas como potenciais aplicações terapêuticas⁸⁵.

De fato, as vesículas extracelulares exercem várias funções em muitas doenças inflamatórias. No contexto da COVID-19, observou-se uma associação entre as vesículas extracelulares isoladas do plasma de pacientes e o estado imunológico, inflamatório e coagulação, indicando que tais eventos permanecem críticos e requerem uma cuidadosa monitorização mesmo após a recuperação⁸⁶. Ademais, as proteínas presentes nas vesículas extracelulares foram fortemente correlacionadas com a gravidade da doença e identificadas como potenciais biomarcadores, capazes de discriminar entre pacientes com COVID-19 e doadores saudáveis⁸⁵.

No estudo realizado por Moraes e colaboradores, foi constatado que as Vesículas Extracelulares circulantes apresentam um perfil pró-coagulante, o que denota profundas alterações proteômicas em indivíduos com COVID-19 grave. A análise proteômica e funcional realizada nas VEs permitiu a identificação de proteínas relacionadas principalmente à ativação das cascatas de coagulação, complemento e degranulação plaquetária, reforçando achados de estudos prévios e indicando que elas são impactadas durante a infecção pelo SARS-CoV-2. Além disso, um conjunto de proteínas foi atribuído aos grupos de sobreviventes e não sobreviventes, que poderiam representar possíveis marcadores de gravidade da COVID-19⁸⁷.

O estudo de Maugeri e colaboradores, mostraram níveis consideravelmente elevados de VEs derivados de plaquetas em pacientes COVID-19, além disso, eles observaram que VEs derivados de plaquetas expressando HMGB1, que desempenham um papel direto na ativação e

inflamação microvascular pulmonar, estavam significativamente mais concentrados no sangue dos pacientes em comparação a indivíduos saudáveis⁸⁸⁻⁹⁰.

As vesículas extracelulares podem estar envolvidas no dano tecidual causado pela COVID-19, visto que, um estudo demonstrou níveis elevados de VEs em pacientes graves comparado com moderados, esse estudo também analisou a diferença de proteínas inflamatórias em VEs no plasma de pacientes com diferentes estágios de gravidade. Os resultados mostraram que, essas VEs estavam significativamente enriquecidas com citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias, como, proteínas da família IL-6 e superfamília TNF entre os pacientes moderados e críticos. Outro resultado observado, foram níveis elevados de proteases, peptidases e moléculas envolvidas na lesão endotelial foram regulados positivamente em pacientes graves⁹¹.

As principais VEs estudadas e caracterizadas são os exossomos e microvesículas, mas especificamente falando da participação de microvesículas na COVID-19, um estudo relatou que níveis de microvesículas são 5,6 vezes maiores em pacientes COVID-19, quando comparados com pessoas saudáveis. Nesse mesmo estudo, analisaram microvesículas expressando fator tecidual e de forma semelhante, os níveis foram aumentos, 3,6 vezes mais, entre os pacientes. Esses resultados sugerem a participação das microvesículas na hipercoagulabilidade, uma vez que também foram relatos correlação positiva com níveis de D-dímero¹⁹.

2.7 Vesículas Extracelulares

Vesículas extracelulares (VEs) são nanopartículas derivadas do citoplasma ou liberadas da membrana celular e estão presentes em vários biofluidos, incluindo sangue, lavagem broncoalveolar (BAL), saliva, urina, leite, líquido cefalorraquidiano, ascético e amniótico. As vesículas extracelulares são liberadas de todos os tipos celular, e trazem das células de origem cargas que contém RNAs, proteínas, lipídeos, enzimas bioativas, moléculas e DNA. Trabalhos demonstram que as VEs possuem funções em condições normais e patológicas tais como, de comunicação intercelular, transportadoras de biomoléculas e são capazes de induzir respostas inflamatórias e anti-inflamatórias^{92,93}.

De acordo com as diretrizes da sociedade internacional de vesículas extracelulares (ISEV), utiliza-se a nomenclatura “vesícula extracelular” como “termo genérico para partículas liberadas naturalmente de células que são delimitadas por uma bicamada lipídica e não podem se replicar”.

As VEs são classificadas em diferentes tipos, com base em sua origem, tamanho, natureza, biogênese e funções, entre esses tipos estão os exossomos que tem o tamanho de 30 – 100nm, microvesículas (MVs) ou ectossomos de 100-1000nm e corpos apoptóticos 1-5 μ m (figura 6)⁹⁴⁻⁹⁶.

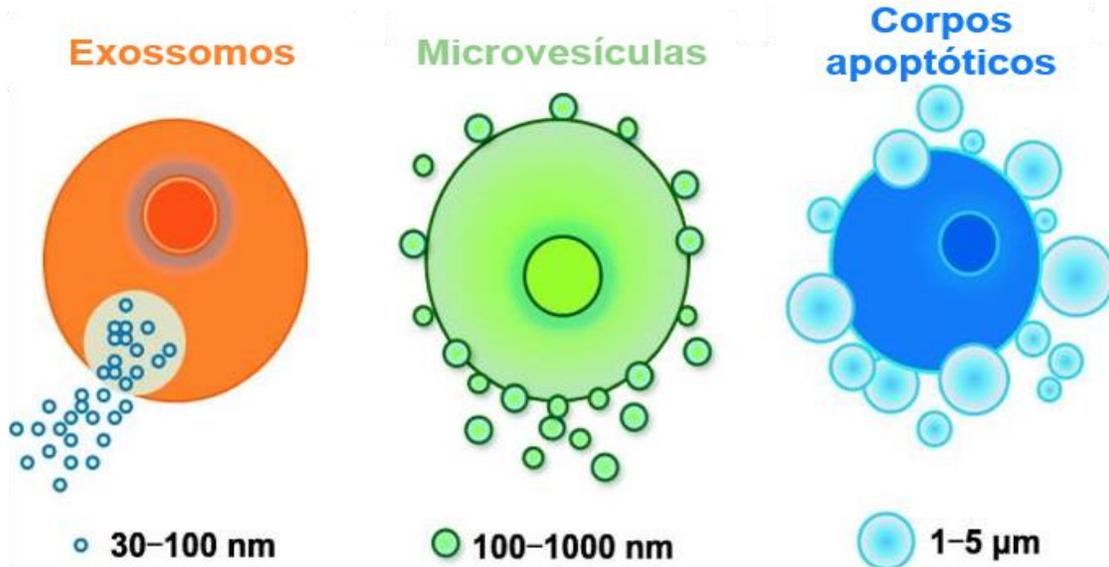


Figura 6: Vesículas extracelulares. Representação esquemática das vesículas extracelulares, incluindo exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. Os exossomos são vesículas luminais menores (30 a 100nm de diâmetro) originárias de endossomos intracelulares. As microvesículas são pequenas vesículas de membrana (100–1000nm de diâmetro) liberadas da superfície da membrana celular durante a ativação. Corpos apoptóticos (1–5 μ m de diâmetro) são liberados da superfície da membrana celular no estágio final da apoptose.

Fonte: Traduzido e adaptado de Chen, et al., 2018.

A biogênese das VEs depende de alguns mecanismos para sua formação como, a via dependente ou independente dos membros do Complexo de Triagem Endossomal Necessário para Transporte (ESCRT). Alguns estudos genéticos demonstram que a biogênese e liberação de VEs são controladas por proteínas específicas, como GTPases e lipídeos e podem ser inibidas ou estimuladas por processos celulares internos ou estímulos externos. Como exemplo, há estudos demonstrando que células cancerígenas produzem um número maior de VEs do que células saudáveis. O estresse celular pode ser um possível fator de aumento da produção por meio da modulação dos níveis de cálcio intracelular em células cancerígenas^{97,98}.

A quantidade de VEs na circulação sanguínea reflete seu equilíbrio entre a geração e liberação, a exemplo, as microvesículas têm meia-vida de alguns minutos a algumas horas, nesse período podem ser captadas por células vizinhas ou células mais distantes. A depuração das microvesículas vai depender do tipo celular ao qual ela se originou. Um estudo mostrou que MVs

de plaquetas foram eliminadas mais cedo do que a de eritrócitos. Existem vários mecanismos de captação celular das VEs, e vai depender da carga da vesícula, comunicação intercelular (interações receptor-ligante) e o microambiente da célula. Um dos mecanismos mais comuns é a endocitose, onde as VEs são englobadas pela célula receptora^{99,100}

A detecção das VEs ocorre através de algumas técnicas, dada a sua heterogeneidade, os métodos de detecção podem variar dependendo do tipo de vesícula que é estudada. Exossomos, por exemplo, tem um tamanho muito pequeno, portanto exige um método de alta sensibilidade, como a análise de rastreamento de nanopartículas e microscopia eletrônica. Para a detecção de microvesículas, a técnica mais comumente usada é a citometria de fluxo^{101,102}.

As VEs exercem papéis importantes em processos fisiológicos e patológicos, liberadas, participam da comunicação celular podendo afetar processos como coagulação e trombose, angiogênese, modulação imune e inflamação. Durante a comunicação celular as vesículas usam vários mecanismos para transferir suas informações para as células receptoras, isso ocorre através da ligação a receptores das células alvo, traduzindo assim um sinal, ou transferir receptores funcionais, proteínas, lipídeos, mRNA ou miRNA das células-mãe para as células receptoras nas quais podem induzir alterações fenotípicas¹⁰³

As funções que as VEs exercem na modulação imunológica são importantes tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Por exemplo, exossomos que são liberados de células dendríticas aumentam a atividade citotóxica de NKs, já as MVs de células dendríticas estimulam células epiteliais a liberar citocinas pró-inflamatórias. As vesículas também podem exercer a função de apresentadoras de antígenos, pois apresentam em sua superfície os complexos de histocompatibilidade (MHCs) Já foi demonstrado que vesículas de células dendríticas estimuladas expuseram MHC II, CD83 e a molécula coestimulatória CD40 em sua superfície iniciando uma resposta pro-inflamatória nas células epiteliais e ativação de células T¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

A VEs tem sido amplamente estudadas em muitas doenças, principalmente no câncer, devido ao seu papel no diagnóstico precoce e melhorando os resultados nos tratamentos. As evidências sugerem que elas podem ser usadas como biomarcadores devido suas cargas conterem biomoléculas específicas que ajudam a prever, diagnosticar e ajudar na escolha terapêutica adequada no tratamento do câncer. Na inflamação as vesículas extracelulares têm a capacidade de

induzir respostas inflamatórias e anti-inflamatórias, sendo uma característica que pode estar associada à transferência de mediadores pró e anti-inflamatórios e pela indução de citocinas das células-alvo¹⁰⁷⁻¹¹².

2.8 Microvesículas

A Biogênese das microvesículas ocorre após alguns estímulos fisiológicos, especialmente durante o crescimento celular, há um aumento da liberação quando as células são ativadas devido lesão celular, estímulos pró-inflamatórios, hipoxia, estresse oxidativo ou estresse de cisalhamento. As microvesículas são formadas por protusão ou brotamento da membrana plasmática, um processo iniciado quando os níveis de cálcio intracelular aumentam, ativando então a calpaína, uma protease sensível ao cálcio, que leva a separação das proteínas da membrana do citoesqueleto intracelular e a gelsolina ligada aos filamentos de actina, esse processo leva a remodelação do citoesqueleto, clivando a rede da proteína actina, o que permite a formação da microvesícula¹¹³⁻¹¹⁸

A membrana plasmática é composta por uma bicamada lipídica na qual a fosfatidilserina está localizada no folheto interno da célula quando em repouso, as enzimas flippase, floppase e scramblase controlam a assimetria fosfolipídica. Quando há ativação celular, o cálcio, que está no citosol, aumenta, ativa a floppase (movimento lipídico para a membrana externa) e a scramblase (movimento lipídico bidirecional), enquanto a flippase (movimento lipídico para a membrana interna) é inativada, o resultado desse processo é um flopping de fosfatidilserina carregada para o folheto externo da bicamada fosfolipídica (Figura 7)¹¹⁹⁻¹²¹.

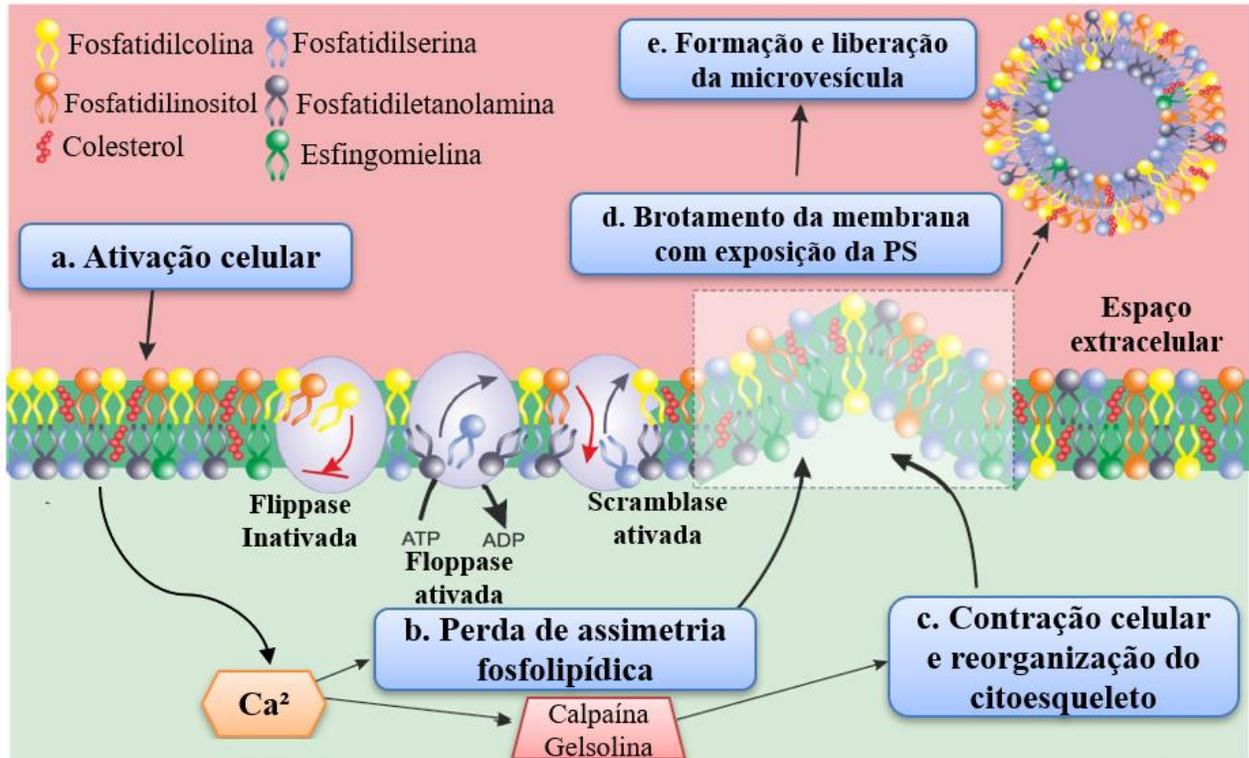


Figura 7: Biogênese das microvesículas. As microvesículas são produzidas após brotamento da membrana plasmática, embora sua composição de membrana difere da célula que a originou. As mudanças na distribuição dos fosfolipídios na membrana são controladas por proteínas chamadas translocases de aminofosfolipídios, incluindo flippase e floppase, além do cálcio. As microvesículas contêm níveis elevados de colesterol e têm fosfatidilserina (PS) exposta na superfície externa. A liberação de microvesículas causa reorganização do citoesqueleto da célula, através de ações da calpaína e gelsolina, embora outros mecanismos também tenham sido descritos.

Fonte: Traduzido e adaptado de Surman, et al., 2017.

Uma característica bem importante das MVs é a sua heterogeneidade, pois elas são induzidas por diferentes estímulos fazendo com que os componentes que elas carregam sejam diferentes das células que elas se originam, ainda assim as moléculas de superfícies que as microvesículas apresentam nos ajudam a identificar a sua origem celular⁹⁶.

A composição externa das microvesículas é caracterizada pela membrana de bicamada lipídica, expressam CD40, selectinas, integrinas e proteínas do citoesqueleto, suas membranas são altamente enriquecidas em colesterol, fosfatidilserina e diacilglicerol, podem também conter receptores de citocinas e expressar MHC. Internamente, seu conteúdo pode ser composto por mRNA, miRNA, RNAs não codificantes, proteínas (como, enzimas, componentes de sinalização, fatores de transcrição), lipídeos bioativos (como, esfingosina-1-fosfato – S1P), prostaglandinas, leucotrienos, nucleotídeos de sinalização e metabolitos (figura 8)^{18,122}.

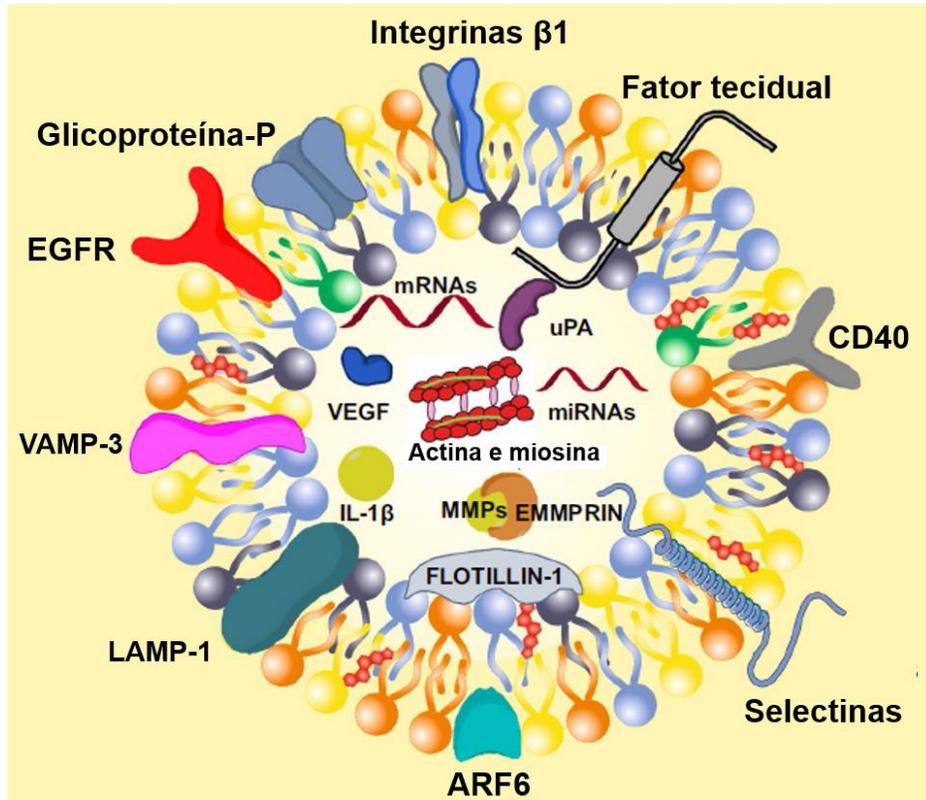


Figura 8: Conteúdo externo e interno das microvesículas. Exemplos de conteúdo das microvesículas - ARF6: Fator 6 de ribosilação de ADP, CD40: Cluster de diferenciação 40, EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico, EMMPRIN: Indutor de metaloproteinase de matriz extracelular, IL-1 β : interleucina 1 β , LAMP-1: Proteína de membrana associada aos lisossomo 1, MMP: metaloproteinase de matriz, uPA: Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase, VAMP-3: Proteína de membrana associada à vesícula 3, VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular.

Fonte: Traduzido de Surman, et al., 2017

Microvesículas de neutrófilos (MVs-NEU)

São produzidos constitutivamente. Em experimentos *in vitro* são produzidas em resposta a uma ampla gama de estímulos como na presença de TNF- α e LPS. São elevadas também em humanos e camundongos quando submetidos a uma dieta rica em gorduras. É possível notar que o ambiente no momento da biogênese das MVs-NEU, provavelmente atribui as suas capacidades, o que resulta em funções diferentes, visto que MVs-NEU que estão em repouso podem exercer efeitos anti-inflamatórios fazendo com que as citocinas e espécies reativas a oxigênio (ROS) sejam reduzidas, enquanto neutrófilos em apoptose e expostos a partículas opsonizadas produzem mais MVs-NEU pró-coagulante e inflamatórias.^{123,124}

Os níveis de microvesículas derivadas de neutrófilos podem estar aumentadas em várias doenças inflamatórias, podendo ser observadas tanto no local da inflamação quanto na circulação, já em condições fisiológicas estão presentes em pequenas quantidades. Conseqüentemente, elas podem atuar como biomarcadores sensíveis em doenças inflamatórias, sendo relatadas em doenças autoimunes, doenças infecciosas e aterosclerose¹²⁵.

Um estudo realizado por Soni e colaboradores, avaliou as MVs-NEU na Doença Obstrutiva Pulmonar Crônica (DOPC), as MVs-NEU estavam em maior número do que os outros tipos celulares. Verificou-se também que essas microvesículas se correlacionaram fortemente com índice de gravidade em doentes, podendo ser um marcador de gravidade e mortalidade da DOPC¹²⁶.

Microvesículas de neutrófilos contendo mieloperoxidase, podem estar associadas a lesão em células endoteliais, como mostrado no estudo de Pitanga et al., o sistema mieloperoxidase-peróxido de hidrogênio-cloreto associado a essas microvesículas, podem contribuir para um dano generalizado nas células endoteliais durante a ativação de neutrófilos, em vasculite e sepse¹²⁷.

A participação das MVs-NEU na síndrome do desconforto agudo respiratório (SDAR) vem sendo estudada a muito tempo, os neutrófilos aderem no endotélio vascular e liberam microvesículas, elas podem contribuir para a lesão, além de participar da comunicação intercelulares, contribuindo para alteração da superfície vascular, bem como alterando as funções do próprio neutrófilo¹²⁸.

Um estudo *in vitro* demonstrou o papel de microvesículas de neutrófilos em um modelo animal de artrite e cultura com células semelhantes a fibroblastos (sinoviócitos), eles identificaram que essas microvesículas podem neutralizar a ativação clássica de macrófagos e promover a liberação de TGF- β , essa inibição é principalmente mediada pela fosfatidilserina e Anexina-A1, expostas pelas microvesículas. Além disso, camundongos artríticos que receberam administração de MVs-NEU tiveram o fenótipo dos macrófagos afetados, tendo uma menor expressão de MHCII e CD86, e maior de CD206¹²⁹.

Microvesículas de células endoteliais (MVs-CE)

As MVs-CE parecem ser capazes de aumentar a produção de ROS em células, é possível que também possa ativar a NADPH oxidase na hiperglicemia. Esse processo pode estar envolvido na lesão do endotélio durante a aterosclerose em pacientes com diabetes. MVs-CE podem conter

enzimas proteolíticas que podem modificar a integridade da matriz extracelular perivascular e se ligar e degradar a fibronectina *in vitro*¹³⁰.

Essas também podem participar da coagulação e trombose visto que a fosfatidilserina exposta por MVs-CE resulta na capacidade dessas microvesículas de ligarem-se e ativar fatores de coagulação, além disso apresentam em sua superfície o fator tecidual, um potente iniciador da via extrínseca¹³¹.

As microvesículas de células dendríticas tem entre suas principais funções a capacidade de ativar células T. Se tornando interessante estudar as MVs-CE, pois elas carregam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) I e II. *In vitro*, já foi mostrado que células dendríticas plasmocitoides estimulados com MVs-CE estimulam células T virgens a secretar citocinas TH1, como IFN- γ e TNF- α ¹³².

Um estudo *in vitro* mostrou que MVs-CE, podem aumentar a expressão de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD40) e de ativação (HLA-DR, CD83, CCR7) em células dendríticas plasmocitoides, mostrando a capacidade das microvesículas na maturação das células dendríticas plasmocitoides. Ademais, foi mostrado que as células dendríticas plasmocitoides são funcionais e secretam citocinas inflamatórias como IL-6 e CXCL-8, e também induzem a proliferação de células TCD4¹³³.

A estimulação de microvesículas de células endoteliais (MVs-CE) por mediadores inflamatórios, em especial o TNF- α , tem sido comprovadamente associada à indução da expressão de um conjunto específico de proteínas de superfície, tais como a E-selectina, ICAM-1, PECAM-1 e $\alpha\beta 3$, que, por sua vez, promovem inflamação local e sistêmica. Este fenômeno sugere a existência de um eixo TNF-MVs-CE, no qual o TNF- α desencadeia a geração de MVs-CE, causado em um aumento na expressão de origem de adesão em células endoteliais, o que intensifica a interação entre as CEs e os leucócitos¹³⁴.

Microvesículas de eritrócitos (MVs-E)

Um estudo mostrou que pacientes recém-diagnosticados com diabetes mellitus tipo 2, apresentam maiores níveis circulantes de MVs-E e que parece haver uma correlação com hiperglicemia e uma tendencia trombótica nesses pacientes, sugerindo que essas microvesículas

possam ser usadas como biomarcadores para detecção precoce do início da trombose e hiperglicemia¹³⁵.

Microvesículas derivadas de eritrócitos infectados com *Plasmodium*, ativam células NK através do MDA5 um RLR Citosólico, que reconhece RNA. Já foi demonstrado que eritrócitos infectados liberam microvesículas ativamente, principalmente no final dos estágios de esquizonte. Além de carregarem proteínas do parasita, também contém DNA e RNA¹³⁶.

Um estudo in vitro mostrou de MVs-E infectados contém grandes espécies de RNA que podem ser reconhecidos pelo MDA5 em células NK. Foi observado que a expressão de CD69 foi significativamente mais alta em células cultivadas com MVs-E infectados ao comparar com MVs-E não infectados. No entanto, MVs-E infectados não conseguiram induzir produção significativa de INF- γ pelas células NK, mesmo em concentrações mais altas. Portanto esses resultados sugerem que as MVs-E infectados podem estimular as células NK via MDA5, porém não as ativam totalmente¹³⁷.

A alfa hemolisina (HlyA), uma toxina, é o principal fator de virulência da *Escherichia coli uropatogênica*. Na circulação essa toxina induz o aumento de cálcio intracelular, que ativa as calpaínas, proteolizam as proteínas do citoesqueleto e favorecem a exposição da fosfatidilserina (PS) nas membranas dos eritrócitos, processos envolvidos na formação de microvesículas¹³⁸.

Nesse sentido, foi observado por Strack e colaboradores, que eritrócitos tratados com HlyA secretam MVs contendo a toxina. Porém, apesar da presença da toxina em sua membrana, as MVs-HlyA não são hemoliticamente ativas e não induzem a liberação de ATP em eritrócitos não tratados, o que nos sugere, que a entrega de MVs-HlyA pode atuar como um mecanismo protetor por parte dos eritrócitos, que removem a toxina da membrana para então prevenir a disseminação da infecção¹³⁹.

Noubouossie et al., demonstraram mecanismos para complicações tromboinflamatórias associadas a transfusão de eritrócitos. Para tal, eles usaram unidades de hemácias leucorreduzidas com o objetivo de isolar MVs-E, então, eles documentam que as MVs-E ativam o fator IX (FIX) por meio de duas vias distintas: primeira é a via intrínseca canônica na qual o FXII ativado (FXIIa)

ativa o FIX de forma dependente do FXI, a segunda via é a não canônica na qual a caliceína plasmática ativa diretamente o FIX, resultando na geração de trombina¹⁴⁰.

Microvesículas de células T (MVs-CT)

As MVs-CT podem ativar os mastócitos, célula que tem papel importante nas respostas imune inata e adaptativas e funções efetoras centrais nas respostas a alergias. Foi observado que essas microvesículas induzem a degranulação e a liberação de citocinas tanto em mastócitos derivados do sangue de cordão umbilical quanto do sangue periférico, sugerindo que ao liberar MVs de células T, elas transportam moléculas de superfície que são capazes de ativar os mastócitos¹⁴¹.

O estudo de Shefler e colaboradores mostrou que as MVs-CT induziram a regulação positiva de vários genes, incluindo genes que regulam a produção de IL-24 em mastócitos e usando inibidores específicos mostraram dados que implicam que a via MAPK e a fosforilação de STAT3 estão igualmente envolvidas na produção e liberação de IL-24 quando os mastócitos são tratados com microvesículas¹⁴².

As microvesículas de células T apresentam um aumento da sua quantidade em pacientes com Hepatite C, quando comparados a indivíduos saudáveis. *in vitro*, as MVs-CT são liberadas a partir de células T humanas, após sua ativação e apoptose. Tais microvesículas fundem-se com as membranas celulares de células estreladas hepáticas (HSC) e moléculas de membrana de transferência (CD147), deflagrando uma regulação positiva de MMP-1 fibrótica, MMP-3, MMP-9 e MMP-13. É importante ressaltar que as microvesículas de células T CD4+ e CD8+ que circulam no plasma dos pacientes derivam, em sua maioria, de células T ativadas¹⁴³.

Após ativadas as células T liberam microvesículas, essas microvesículas foram analisadas em um estudo *in vitro*, e verificou-se a presença de 2.279 proteínas no seu conteúdo interno, muitas dessas proteínas identificadas estão relacionadas ao sistema imunológico, transdução de sinais, transporte de proteínas e vesículas, processamento ou splicing de RNA e TNF ou apoptose. Além disso, foi possível observar que em células endoteliais microvasculares derivadas do coração humano (HMVECs), as MVs-CT, exercem funções como: indução do rearranjo no citoesqueleto de HMVECs, inibição da cicatrização de feridas endoteliais, geração de superóxido e apoptose, e quebra da função barreira endotelial¹⁴⁴.

Microvesículas de células B (MVs-CB)

Microvesículas derivadas de células B (MVs-CB) circulantes na leucemia linfocítica crônica de células B podem implicar a progressão da doença, o estudo de Ghosh e colaboradores, mostraram que elas estão em níveis relativamente altos nos estágios intermediários da doença e significativamente maiores em estágios avançados quando comparados com estágio inicial¹⁴⁵.

Contudo, não houve uma associação clara entre contagem absoluta de linfócitos e níveis plasmáticos dessas microvesículas, o que sugere que a geração de MVs-CB derivados das células B leucêmicas pode depender mais do estágio da doença em vez da contagem de linfócitos totais no sangue, em conclusão esse estudo aponta para uma possível ligação entre os fenótipos das MVs e a progressão da doença¹⁴⁵.

Em um com cultura de células WEHI-231 estimuladas com CD24, foi observado que as células B liberam microvesículas constitutivamente, com tamanho aproximado de 120nm, e que o CD24 induz um aumento na liberação de microvesículas positivas para fosfatidilserina. A carga de RNA é predominantemente composta por 5S rRNA, independentemente da estimulação. No entanto, o CD24 causa uma diminuição na incorporação de transcritos codificadores de proteínas. O proteoma das microvesículas é enriquecido com proteínas mitocondriais e relacionadas ao metabolismo após a estimulação com CD24¹⁴⁶.

A estimulação de CD24 também induz mudanças na expressão de CD63 e IgM em MVs que não são espelhadas pelas mudanças na expressão da superfície celular. No geral, a composição dessas MVs sugere que elas podem estar envolvidas na liberação de componentes mitocondriais em resposta ao estresse pró-apoptótico com alterações nos receptores de superfície potencialmente alterando os tipos de células que interagem com elas¹⁴⁶.

Uma análise proteômica de microvesículas derivadas de células B malignas revelaram CD148 como um biomarcador antigênico potencialmente útil para o diagnóstico de linfoma de células do manto (LCM). Para identificar novos biomarcadores de superfície, Miguet et al., desenvolveram uma abordagem proteômica original baseada na análise de espectrometria de massa de microvesículas derivadas de linfoproliferações crônicas de células B de pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC), linfoma linfocítico de pequenas células (LLPC) e linfoma de células do manto (LCM)¹⁴⁷.

A comparação das listas de proteínas identificadas em cada patologia combinada com critérios de validação altamente exigentes para a identificação de proteínas por espectrometria de massa, permitiu propor o CD148, um receptor de membrana com atividade de fosfatase, como candidato a biomarcador discriminador. As análises de citometria de fluxo, realizadas em 158 pacientes e 30 controles, mostraram que o anticorpo anti-CD148 marcou significativamente mais as células de LCM do que células circulantes LLC e LLPC ($p < 0,0001$), o que valida a super expressão de CD148 em LCM¹⁴⁷.

Portanto, os resultados indicaram que um nível médio ou alto de expressão de CD148 pode excluir o diagnóstico de LLC e altos níveis de expressão de CD148 (igual ou superior a 2 vezes o valor obtido com LLC ou LLPC) permite suspeitar do diagnóstico de LCM com especificidade de 91% (versus LLC e LLPC) e sensibilidade de 78%¹⁴⁷.

Microvesículas de plaquetas (MVs-P)

As microvesículas de plaquetas se assemelham bastante com as plaquetas ativadas. Elas possuem as moléculas de ativação tanto na superfície quanto em seu conteúdo interno, nesse sentido as MVs-P podem ser consideradas como mediadoras de muitas funções plaquetárias¹⁴⁸.

Níveis elevados de MVs-P circulantes são comumente vistos em câncer, o que pode se justificar devido ao aumento da atividade plaquetária, por múltiplos mecanismos. Sendo assim, as MVs-P constituem uma classe de biomarcadores do câncer, pois é possível correlacionar os níveis de MVs-P com estágios do câncer, como na metástase e angiogênese do câncer, células imunes, inflamação e trombose.¹⁴⁹

A lesão da camada íntima é considerada um estágio inicial de diversas doenças cardiovasculares. Nesse contexto, as células progenitoras endoteliais (EPCs) desempenham um papel crucial no processo de reparo endotelial após lesão vascular. No momento em que ocorre uma lesão na íntima, as EPCs são mobilizadas a partir da medula óssea para o local danificado¹⁵⁰.

Simultaneamente, a lesão na superfície da íntima provoca a degranulação, agregação e adesão das plaquetas ao endotélio lesionado. O colágeno exposto, por sua vez, estimula as plaquetas a secretarem microvesículas. Em um estudo *In vitro*, foi observado que a estimulação de colágeno induziu a liberação de MVs-P, e as MVs-P ativadas por colágeno (ac.MVs-P)

promoveram significativamente a proliferação de EPCs, mostrando também um conteúdo rico em TGF- β 1¹⁵⁰.

Com o objetivo de caracterizar fenotipicamente microvesículas liberadas por plaquetas e diferenciar aquelas liberadas espontaneamente das que são ativadas através da indução de trombina, para entender melhor o papel delas na disseminação de doenças. O estudo de Suades e colaboradores, caracterizou as microvesículas de plaquetas de pessoas saudáveis, por citometria de fluxo¹⁵¹.

Em resumo, MVs-P ativadas por trombina mostraram níveis mais altos de P-selectina, assim como forma ativa de glicoproteína IIb/IIIa do as MVs-p não ativadas. Uma análise proteômica diferencial baseada em espectrometria de massa, evidenciou mudanças significativas na variedade e abundância de proteínas encontradas em MVs-P ativadas. Tais proteínas estavam envolvidas na coagulação, adesão, citoesqueleto, transdução de sinal, metabolismo e transporte mediados por microvesículas¹⁵¹.

Curiosamente, proteínas importantes para adesão celular, coagulação da via intrínseca e sinalização de ativação plaquetaria, foram significativamente modificadas pela estimulação da trombina, a protocaderina- α 4, estava significativamente reduzida em MVs-P ativadas, mostrando uma expressão aumentada nas membranas de plaquetas ativadas. Portanto, a ativação plaquetaria induzida pela trombina desencadeia a liberação de microvesículas com um perfil complexo e rico em proteínas pró-coagulantes e pró-adesivas¹⁵¹.

Microvesículas de monócitos (MVs-MON)

Embora os estudos sobre MVs-MON sejam limitados, existem evidências que apontam sua participação em eventos aterotrombótico expressando altos níveis de fator tecidual (FT) e ligante-1 da glicoproteína P-selectina. Estudos demonstram que possuem um papel crítico na inflamação fazendo com que os próprios monócitos produzam citocinas infamatórias e ROS, e potencialmente ativando plaquetas. Uma função bem interessante de MVs-MON é a transferência de ICAM-1 para células endoteliais, que acaba promovendo a adesão de leucócitos e expressão de altos níveis de IL-1 β , que por sua vez, estimulam células endoteliais¹⁵²⁻¹⁵⁴.

O Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) é uma síndrome clínica resultante, predominantemente, da ruptura de uma placa aterosclerótica presente em uma artéria coronária epicárdica. Este evento pode culminar na ativação da cascata de coagulação, com subsequente formação de trombo e consequente oclusão do fluxo sanguíneo na artéria¹⁵⁵.

Microvesículas de monócitos parecem ter um papel importante na resposta inflamatória durante o IAM, elas têm sido relacionadas ao processo aterosclerótico, incluindo inflamação crônica, e também têm sido relacionadas à trombose intracoronária. As MVs-MON expõem a fosfatidilserina (PS) na camada superficial externa como consequência de sua formação e liberação, e contêm diferentes moléculas de suas células parentais que podem determinar sua capacidade de promover a coagulação sanguínea e a ativação celular¹⁵⁶.

Além disso, é importante ressaltar que o fator tecidual, responsável por iniciar a cascata de coagulação extrínseca e desempenhar um papel crucial na formação do trombo intravascular, encontra-se presente nas microvesículas de monócitos. De fato, MVs-MON carregando o fator tecidual são considerados o principal reservatório da atividade plasmática deste fator. Altos níveis de MVs-MON e MVs-MON carregando o fator tecidual foram identificados em pacientes com Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) em comparação a indivíduos controles^{157,158}.

Microvesículas na COVID-19

Alguns estudos já têm mostrado níveis elevados de VEs em pacientes da COVID-19 e que elas podem mostrar a gravidade da doença nesses pacientes e tendência a trombose. Uma pesquisa realizada na Arábia Saudita relatou níveis elevados de microvesículas derivadas de células endoteliais e plaquetas em pacientes com COVID-19. A hipercoagulabilidade desses pacientes são impulsionadas por vários fatores incluindo a geração de MVs-P, tendo em sua superfície moléculas pró-coagulantes muito semelhantes as plaquetas, podendo iniciar a coagulação e favorecer a geração de trombina. É importante observar que as MVs-P são 50-100 vezes mais pró-coagulantes do que a própria plaqueta.¹⁹

A transferência de mediadores ativos pelas MVs é considerada um marcador de dano vascular, elas modulam as respostas inflamatórias, induzindo células endoteliais a liberar o fator tecidual, IL-6 e outras citocinas, levando ao aumento da adesividade de outras células ao endotélio

lesado. Níveis elevados de MVs derivadas do endotélio tem sido sugerido como um marcador precoce de doenças pulmonares¹⁵⁹.

Tem sido mostrado que MVs que são derivadas do endotélio carregam em sua superfície a enzima conversora de angiotensina (ECA), inclusive em casos de lesão pulmonar, que tem sido associada à trombose na COVID-19. As observações de níveis elevados de MVs com D-dímero, FT e outros marcadores, sugerem que as MVs podem ser um biomarcador de trombose, gravidade e mortalidade na COVID-19^{19,160,161}.

Garnier e colaboradores, observaram que microvesículas derivadas de plaquetas e células endoteliais estão aumentadas em pacientes mais graves em comparação com indivíduos saudáveis. Microvesículas de pacientes que foram intubados, em cultura, desencadearam a morte de células endoteliais e super expressão de duas moléculas de adesão: P-selectina e molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1)¹⁶².

É válido destacar que o estudo apontou para uma importante relação das microvesículas no contexto da COVID-19. A pré-incubação dessas MVs com a proteína endógena de capeamento de fosfatidilserina, Anexina A5, resultou na abolição da citotoxicidade, bem como no aumento da expressão de P-selectina e da indução de VCAM-1, o que, por sua vez, resultou em um aumento na adesão de neutrófilos e formação de NETs. Em conjunto, os resultados sugerem um papel fundamental das MVs na fisiopatologia do COVID-19 e indicam um potencial terapêutico por meio da utilização da Anexina A5¹⁶².

Devido a capacidade de transferência de cargas das MVs às células de outros tecidos, avaliar seu perfil em doenças inflamatórias tornou-se bastante relevante. Estudos mostram que MVs estão associadas a desenvolvimento e progressão em várias patologias e seus efeitos no sistema imunológico abrangem uma ampla gama de mecanismos que vão desde ativação da resposta imune à modulação. Estudos recentes mostram níveis elevados de MVs em pacientes com COVID-19, indicando seu uso como um potencial biomarcador de gravidade da doença. No que se refere ao período convalescente da COVID-19, ainda não há estudos sobre esses aspectos com microvesículas, sendo este o primeiro estudo a caracterizar o perfil das mesmas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Caracterizar o perfil das subpopulações de microvesículas circulantes durante o processo inflamatório desenvolvido nos pacientes da infecção pelo SARS-CoV-2 e indivíduos convalescente da COVID-19.

3.2 Objetivos Específicos:

- Descrever o perfil das subpopulações de microvesículas (MVs) circulantes em controles saudáveis, paciente e indivíduos convalescentes da infecção pelo SARS-Cov-2;
- Apresentar o padrão de microvesículas circulantes nos pacientes de acordo com a gravidade da doença;
- Apresentar o perfil de microvesículas circulantes nos pacientes de acordo com o desfecho clínico da doença;
- Avaliar o perfil cinético das microvesículas circulantes dos indivíduos durante o período de convalescença.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

O modelo do estudo é do tipo observacional, descritivo, exploratório em indivíduos doadores de sangue saudáveis da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM. Indivíduos Convalescentes da COVID-19, também doadores de sangue do HEMOAM. Pacientes infectados por SARS-CoV-2 que foram internados em enfermaria ou UTI do Hospital Universitário Getúlio Vargas - HUGV.

4.2 Aspectos Éticos

Esse estudo faz parte de um projeto maior intitulado "*Estudo de Biomarcadores Imunológicos em pacientes Convalescentes da infecção pelo Vírus SARS-CoV-2 (COVID-19)*" aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação HEMOAM, sob número de parecer 4.126.784, CAAE: 30975020.9.0000.0009, coordenado pela Dra Adriana Malheiro Alle Marie. Os indivíduos controles fazem parte do projeto intitulado "*Caracterização de microvesículas e seu potencial uso como biomarcador no diagnóstico e tratamento de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica*" aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação HEMOAM, sob número de parecer 5.520.298 e nº de CAAE: 48463121.3.0000.0009, coordenado pela Dra Andréa Monteiro Tarragô e Iandara Maira Lopes de Souza.

4.3 População do estudo

Este estudo é composto por 3 grupos:

- Grupo 1 (G1): doadores de sangue saudáveis da Fundação HEMOAM, coletados de julho a agosto de 2022;
- Grupo 2 (G2): pacientes que estavam internados em enfermaria ou UTI do HUGV, coletados de junho a novembro de 2020;
- Grupo 3 (G3): indivíduos convalescentes da COVID-19, doadores de sangue da Fundação HEMOAM, que foram coletados de julho de 2020 a julho de 2021, em 3 períodos: em média, 30, 60 e 90 dias após infecção.

4.4 Critérios de Inclusão e Exclusão

Critérios de inclusão G1: foram incluídos doadores de sangue saudáveis, com mais de 3 doações, aptos na triagem clínica, hematológica e sorológica, a partir do estudo intitulado:

"Caracterização de microvesículas e seu potencial uso como biomarcador no diagnóstico e tratamento de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica" com nº de CAAE: 48463121.3.0000.0009.

Critérios de exclusão G1: que após doação apresentassem sorologia positiva, problemas com amostras.

Critérios de inclusão G2: Foram incluídos indivíduos doentes, do sexo masculino ou feminino, com infecção confirmada por SARS-CoV-2, através do diagnóstico molecular, maiores de 18 anos, que foram atendidos no HUGV e que estavam em tratamento da COVID-19, internados na enfermaria ou UTI.

Critérios de exclusão G2: Para os pacientes atendidos no HUGV, o critério de exclusão foi o resultado negativo para o diagnóstico molecular pelo SARS-CoV-2, pacientes com dados incompletos e falta de amostra.

Critérios de inclusão G3: Os critérios de inclusão para indivíduos convalescentes foram: indivíduos que tiveram resultado de RT-PCR positivo para SARS-CoV-2, que estavam assintomáticos há pelo menos 14 dias, do sexo masculino ou feminino, com idade entre 18 e 60 anos, que durante a infecção por COVID-19, apresentaram comprometimento clínico com internação ou não, aptos nas triagens clínica, hematológica, sorológica e molecular conforme portaria de consolidação 5 do Ministério da Saúde de 2017, que não utilizaram medicamentos inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), que possuísem ou não anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2 detectáveis, com teste RT-PCR para SARS-CoV-2 de controle negativo e que não apresentassem anticorpos anti-eritrocitários.

Critérios de exclusão G3: indivíduos que ainda apresentassem teste RT-PCR para SARS-CoV-2 positivo, com sorologia positiva após doação de sangue, dados incompletos e falta de amostra.

4.5 Coleta das amostras

Todos os participantes foram incluídos após terem aceitado participar do estudo e assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Em seguida, as amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo anticoagulante citrato de sódio. As coletas foram realizadas uma única vez para o grupo G1 e G2. Já para o grupo G3, as amostras de sangue foram coletadas três vezes,

em períodos médios de 30, 60 e 90 dias após a infecção pelo SARS-CoV-2. As amostras de sangue foram centrifugadas a 400xg por 15 minutos para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP), que foi armazenado em microtubos e conservados no freezer a -80°C do laboratório multidisciplinar para análises futuras (Figura 9).

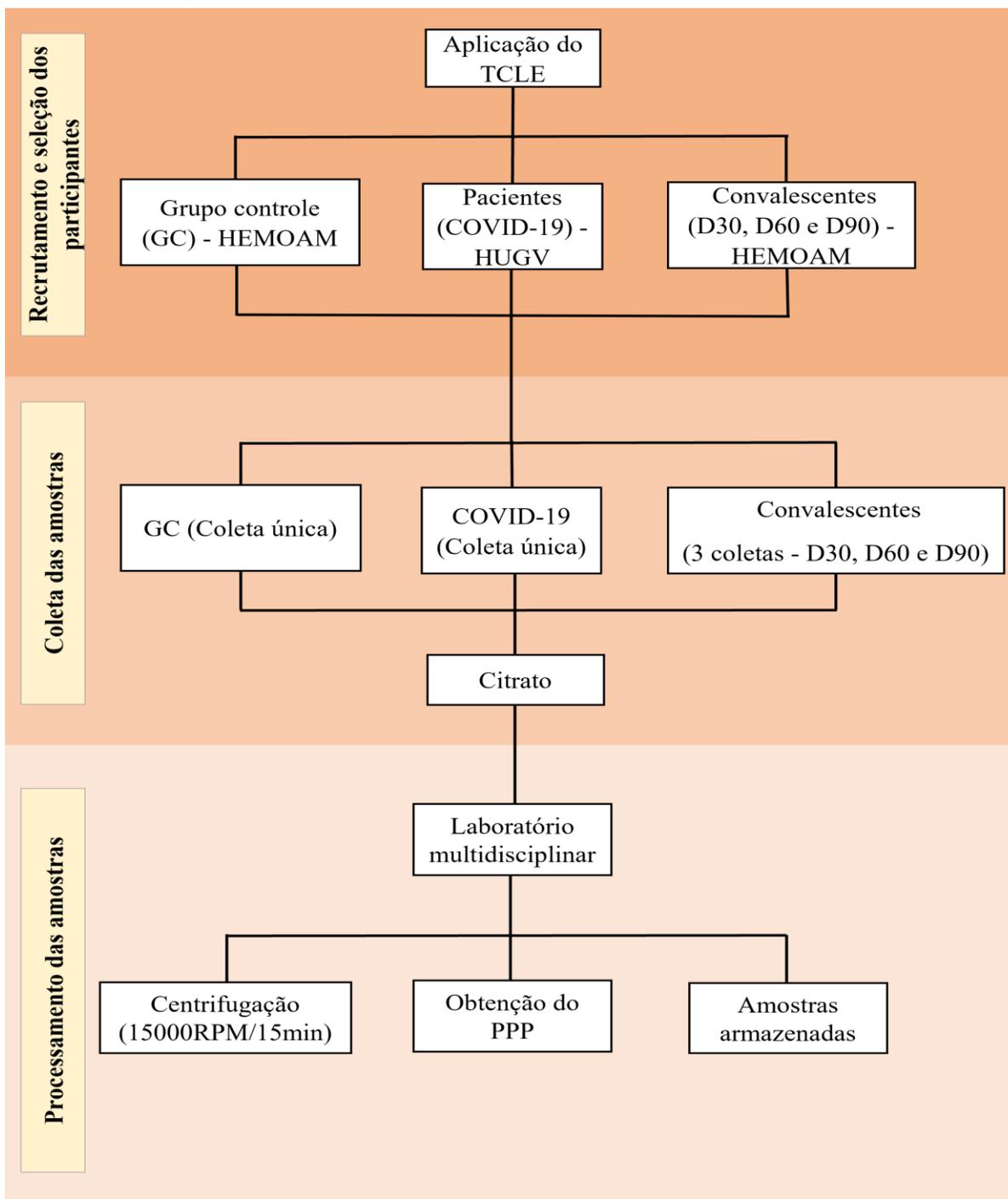


Figura 9: Fluxograma da coleta de amostras. Esquema detalhado das etapas de obtenção e processamento das amostras utilizadas no estudo.

4.6 Seleção das amostras

A amostragem é composta por um N total de 39 indivíduos. A partir das amostras coletadas, foram selecionadas as amostras de 15 indivíduos saudáveis como grupo de controle, 9 pacientes e 15 indivíduos convalescentes (Figura 10). As amostras selecionadas, foram utilizadas para a caracterização de MVs, realizada no Instituto Rene Rachou (IRR) - Fiocruz Minas, seguindo o Protocolo de Imunofenotipagem de MVs do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) coordenado pelo Dr. Olindo Assis Martins Filho e Dra. Andréa Teixeira Carvalho.

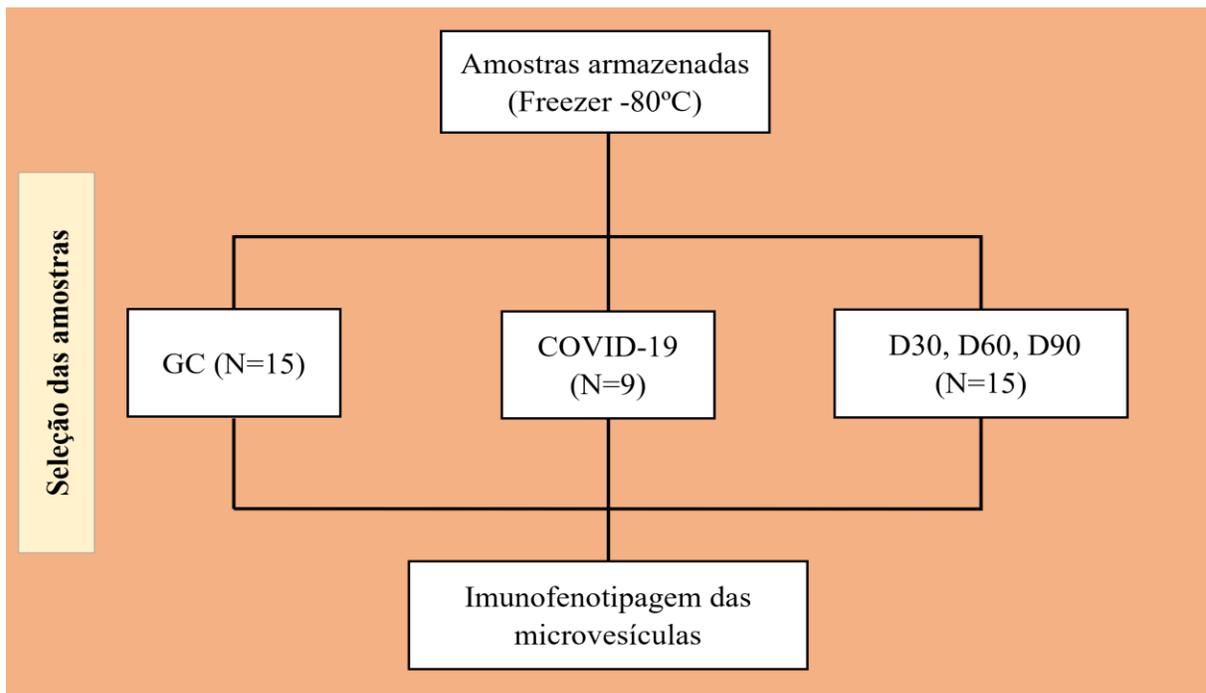


Figura 10: Fluxograma da seleção de amostras. Esquema detalhado da etapa de seleção das amostras utilizadas no estudo, para imunofenotipagem das microvesículas.

4.7 Caracterização de Microvesícula por citometria de fluxo

No início do experimento, as amostras de sobrenadante/PPP foram descongeladas em banho-maria a 36°C e, em seguida, aliquotadas em microtubos. Esses microtubos foram centrifugados a 21.475xg por 15 minutos em temperatura ambiente para obtenção do Plasma Livre de Plaquetas (PLP).

Em seguida, as amostras foram tratadas com tampão citrato-heparina e novamente centrifugadas a 21.475xg por 90 minutos a 15°C. O sobrenadante foi removido e os pellets foram ressuspensos em 100µl de tampão Anexina. Posteriormente, as amostras foram distribuídas em poços (placa) contendo anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos específicos para os

marcadores de superfície presentes nas populações de MVs (conforme tabela 1) e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente, protegidas da luz. Após a incubação, foi aplicado 300µl de tampão de ligação de Anexina nos poços e, em seguida, os conteúdos foram transferidos para os tubos de citometria de fluxo.

Tabela 1: Painel de imunofenotipagem para populações de Mvs.

Tubo	MVs	FITC	PE	PerCP	APC	PE-Cy5
1	Controle (Anexina V)	Anex V				
2	Leucócitos/ Neutrófilos/ Linf. NK	Anex V	CD66b		CD45	CD56
3	Cel. Endoteliais/ Eritrócitos	Anex V	CD51/61			CD235a
4	Linf. T/Plaquetas/ Linf. B	Anex V	CD3	CD41	CD19	
5	Neutrófilos/ Monócitos	Anex V	CD16	CD14		

A aquisição das amostras foi realizada utilizando o citômetro de fluxo CytoFLEX S (Beckman Coulter), um equipamento altamente sensível capaz de detectar e caracterizar microvesículas na escala de 100-900nm. Esse processo foi feito com o auxílio de microesferas sintéticas de calibração denominadas Gigamix, que possuem tamanhos definidos (100nm; 160nm; 200nm; 240nm; 300nm; 500nm; 900nm) e foram usadas como referência para caracterização das microvesículas. A identificação morfométrica e imunofenotípica das populações celulares de interesse foi realizada utilizando o programa FlowJo (v9.4) com a ajuda de "gates" para seleção das microvesículas de interesse.

4.8 Análises de dados

Os resultados obtidos na imunofenotipagem foram analisados por meio do software FlowJo (v.10). Para a realização das análises estatísticas convencionais, utilizou-se o software GraphPad Prism (v.9.0). A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste Shapiro-Wilk para cada variável, revelando uma distribuição não paramétrica. A comparação dos valores entre dois grupos foi conduzida pelo teste de Mann-Whitney, enquanto para a comparação das variáveis com três ou mais grupos, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn's para comparações múltiplas entre grupos. Em ambos os casos, os níveis de significância estatísticos foram definidos como $p < 0,05$. Além disso, foi realizada uma análise de redes biológicas para ilustrar a interação entre as subpopulações de microvesículas investigadas no estudo, com base na associação das mesmas, utilizando o software Cytoscape (v.3.0.3). As correlações positivas e

negativas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O índice de correlação (r) foi utilizado para categorizar a força de correlação como fraca ($r \leq 0,35$), moderada ($r \geq 0,36$ a $r \leq 0,67$) ou forte ($r \geq 0,68$).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da população do estudo

Nosso estudo foi composto por 39 indivíduos divididos em 3 grupos. O grupo controle foi composto por 15 doadores de sangue recrutados no HEMOAM. Destes, 3 eram do sexo feminino e 12 do sexo masculino. A mediana de idade deste grupo foi 51,00 (IQR, 50-52). Ainda, 9 pacientes da COVID-19 foram recrutados no HUGV, no período de junho a julho de 2020, 5 eram do sexo masculino e 4 do sexo feminino e apresentaram idade mediana de 39,00 (IQR, 29,50-67,00). O grupo dos convalescentes foi composto por 15 indivíduos, que também foram recrutados no HEMOAM no período de julho de 2020 a julho de 2021. Destes, 12 eram do sexo masculino e 3 do sexo feminino, a mediana da idade foi de 36,00 (IQR, 26,00-50,00), mostrando uma diferença significativa ($p = 0.0055$) em relação ao grupo controle (tabela 2).

Tabela 2: Características sociodemográficas dos participantes do estudo.

	Controles N=15	COVID-19 N=9	Convalescentes N=15	P value
Características demográficas				
Idade, mediana, (IQR)	51,00 (50,00-52,00)	39,00 (29,50-67,00)	36,00 (26,00-50,00)	^a 0,2456 ^b0.0055 ^c >0,9999
Sexo, N (%)				
Masculino	12 (80,00%)	5(55,56%)	12 (80,00%)	0,3380
Feminino	3 (20,00%)	4 (44,44%)	3 (20,00%)	

Abreviações: IQR: Intervalo interquartil; os dados estão apresentados como mediana com IQR, (%), ou N. ^aControle vs COVID-19; ^bControle Vs Convalescentes; ^cCOVID-19 Vs Convalescentes; Para variáveis contínuas (idade) os dados foram comparados usando a análise de variância (ANOVA) pelo teste de *Kruskall Wallis*, seguido do teste de *Dunn's* para múltiplas comparações. Para a variável categórica (sexo) foi usado o teste qui-quadrado. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5.2 Perfil hematológicos de pacientes COVID-19 e indivíduos convalescentes e dados clínicos dos pacientes COVID-19.

O perfil hematológico dos indivíduos foi analisado nos grupos de pacientes COVID-19 e indivíduos convalescentes (tabela 3). A contagem de eritrócitos foi significativamente menor no grupo COVID-19 quando comparados aos convalescentes D30, D60 e D90 ($P= 0,0002 - 0,0016 - 0,0021$, respectivamente), da mesma forma a hemoglobina mostrou níveis significativamente menores nos pacientes COVID-19 em relação aos convalescentes D30, D60 e D90 ($P= 0,0002 - 0,0037 - 0,0032$, respectivamente). O hematócrito dos pacientes COVID-19 também mostrou níveis significativamente menores em comparação aos convalescentes D30, D60 e D90 ($P= 0,0001 - 0,0030 - 0,0049$, respectivamente).

Nos pacientes COVID-19 foi observado que a contagem de neutrófilos estava significativamente elevada em comparação ao grupo convalescente no D60 ($P= 0,0274$). Em contraste, os linfócitos de pacientes COVID-19, mostraram contagem significativamente diminuída em comparação ao grupo convalescente D30, D60 e D90 ($P= 0,0008 - 0,0032 - 0,0059$, respectivamente). Os demais parâmetros hematológicos não mostraram diferença significativa entre os grupos analisados e podem ser observados na tabela 3.

As principais características clínicas observadas nos pacientes COVID-19 estão descritas na Tabela 4. Do total de pacientes estudados neste grupo 88,89% apresentaram comorbidades como: 33,33% diabetes do tipo 2, 33,33% hipertensão e 22,22% lúpus eritematoso.

Devido à ausência de critérios clínicos e laboratoriais que permitem uma classificação mais precisa da gravidade clínica dos pacientes, eles foram categorizados como graves e não graves com base em dados e informações (como o uso de respiração mecânica, internação em UTI ou enfermaria e sintomas clínicos) registrados nos prontuários eletrônicos e obtidos pela equipe médica do HUGV. Segundo a gravidade clínica 66,67% foram considerados graves e 33,33% não graves. No momento da coleta, 100% dos pacientes estavam hospitalizados, sendo que 33,33% estavam em enfermaria e 66,67% na UTI. Destes, 77,78% pacientes receberam alta e 22,22% foram a óbito.

Tabela 3: Perfil hematológico de pacientes da COVID-19 e indivíduos Convalescentes

	COVID-19	Convalescentes			<i>P value</i>
	N=9	D30	D60	D90	
Dados hematológicos, mediana, (IQR)					
RBC (x 10⁶/μL)	2,960 (2.743-3,558)	4,880 (4,510-5,240)	4,850 (4,350-5,020)	4,810 (4,490-5,110)	^a0,0002 ^b0,0016 ^c0,0021 ^d >0,9999 ^e >0,9999 ^f >0,9999
Hemoglobina (g/dL)	8,200 (7,950-9,350)	14,40 (13,70-15,00)	14,10 (12,40-14,80)	14,28 (13,00-14,60)	^a0,0002 ^b0,0037 ^c0,0032 ^d >0,9999 ^e >0,9999 ^f >0,9999
Hematócrito (%)	25,50 (24,70-28,95)	44,50 (42,20-46,00)	42,32 (36,70-45,30)	43,13 (41,40-44,50)	^a0,0001 ^b0,0030 ^c0,0049

					^d >0,9999
					^e >0,9999
					^f >0,9999
VCM (fL)	85,50	88,50	88,70	89,10	^a >0,9999
	(82,75-89,85)	(86,20-91,70)	(87,50-91,50)	(85,40-91,20)	^b >0,9999
					^c >0,9999
					^d >0,9999
					^e >0,9999
					^f >0,9999
HCM (pg)	28,30	29,80	29,42	29,80	^a >0,9999
	(26,50-30,10)	(28,70-30,70)	(28,40-30,60)	(28,50-30,90)	^b >0,9999
					^c 0,9608
					^d >0,9999
					^e >0,9999
					^f >0,9999
CHCM (g/dL)	32,30	33,00	33,58	33,58	^a 0,9432
	(31,90-33,35)	(32,10-34,60)	(32,60-34,10)	(32,90-34,30)	^b 0,5864
					^c 0,3630
					^d >0,9999
					^e >0,9999

					^f >0,9999
WBC (x10³/μL)	9,300	7,260	6,350	6,770	^a >0,9999
	(6,175-12,18)	(5,200-7,900)	(6,060-6,970)	(5,940-8,000)	^b 0,2278
					^c 0,8543
					^d >0,9999
					^e >0,9999
					^f >0,9999
Neutrófilos (x10³/μL)	7,225	4,260	3,830	4,100	^a 0,0996
	(4,880-10,10)	(2,850-5,130)	(3,210-4,120)	(3,200-5,270)	^b 0,0274
					^c 0,2104
					^d >0,9999
					^e >0,9999
					^f >0,9999
Linfócitos (x10³/μL)	0,5100	1,990	1,970	2,030	^a 0,0008
	(0,1250-1,180)	(1,650-2,370)	(1,650-2,300)	(1,630-2,100)	^b 0,0032
					^c 0,0059
					^d >0,9999
					^e >0,9999
					^f >0,9999
Monócitos (x10³/μL)	0,4700	0,4400	0,3800	0,3800	^a >0,9999

	(0,3300-0,6450)	(0,3500-0,4700)	(0,3300-0,4100)	(0,3200-0,4500)	^b 0,6143
					^c >0,9999
					^d 0,5526
					^e >0,9999
					^f >0,9999
Plaquetas (x10³/μL)	256,7	250,0	250,0	241,0	^a >0,9999
	(101,5-358,8)	(217,0-285,0)	(227,0-278,0)	(212,0-254,0)	^b >0,9999
					^c >0,9999
					^d >0,9999
					^e >0,9999
					^f >0,9999

Abreviações: IQR: Intervalo interquartil; os dados estão apresentados como mediana com IQR. ^aCOVID-19 Vs Convalescente D30; ^bCOVID-19 Vs Convalescentes D60; ^cCOVID-19 Vs Convalescentes D90; ^dConvalescentes D30 vs Convalescentes D60; ^eConvalescente D30 Vs Convalescentes D90; ^fConvalescentes D60 Vs Convalescentes D90; Os dados foram comparados usando a análise de variância (ANOVA) pelo teste de *Kruskall Wallis*, seguido do teste de *Dunn's* para múltiplas comparações. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo

Tabela 4: Características clínicas dos Pacientes

COVID-19 (N=9)	
Comorbidades, N (%)	
Sim	8 (88,89%)
Diabetes Tipo 2	3 (33,33%)
Hipertensão	3 (33,33%)
Lúpus Eritematoso Sistêmico	2 (22,22%)
Outras	7 (77,78%)
Não	1 (11,11%)
Medicamentos, N (%)	
Sim	2 (22,22%)
Não	7 (77,78%)
Gravidade Clínica, N (%)	
Grave	6 (66,67%)
Não Grave	3 (33,33%)
Hospitalização, N (%)	
Sim	9 (100%)
Não	-
Tipo de internação, N (%)	
Enfermaria	3 (33,33%)
UTI	6 (66,67%)
Uso de suporte respiratório, N (%)	
Sim	5 (55,56%)
Não	4 (44,44%)
Desfecho, N (%)	
Alta	7 (77,78%)
Óbito	2 (22,22%)

Dados apresentados por N e percentagem (%).

5.3 Perfil de microvesículas dos pacientes com COVID-19

A comparação do perfil de microvesículas entre controles saudáveis e pacientes com COVID-19 é observada na figura 11. A análise de dados mostrou uma diminuição estatisticamente significativa na contagem das microvesículas de monócitos (CD14) e de plaquetas (CD41) em pacientes com COVID-19 em relação ao grupo controle, $p= 0,0148$ e $0,0251$ respectivamente. É possível observar uma tendência na diminuição de microvesículas totais (Anexina+), de leucócitos (CD45), células NK (CD56) e de eritrócitos (CD235a), em pacientes em comparação aos indivíduos saudáveis, embora sem diferença significativa.

Houve um aumento significativo das microvesículas de linfócitos B (CD19) nos pacientes em comparação aos controles, $p= 0,0067$. Microvesículas de neutrófilos (CD16 e CD66), linfócitos T (CD3) e células endoteliais (CD51/61) também estão aumentadas nesses pacientes, embora não tenham diferença significativa.

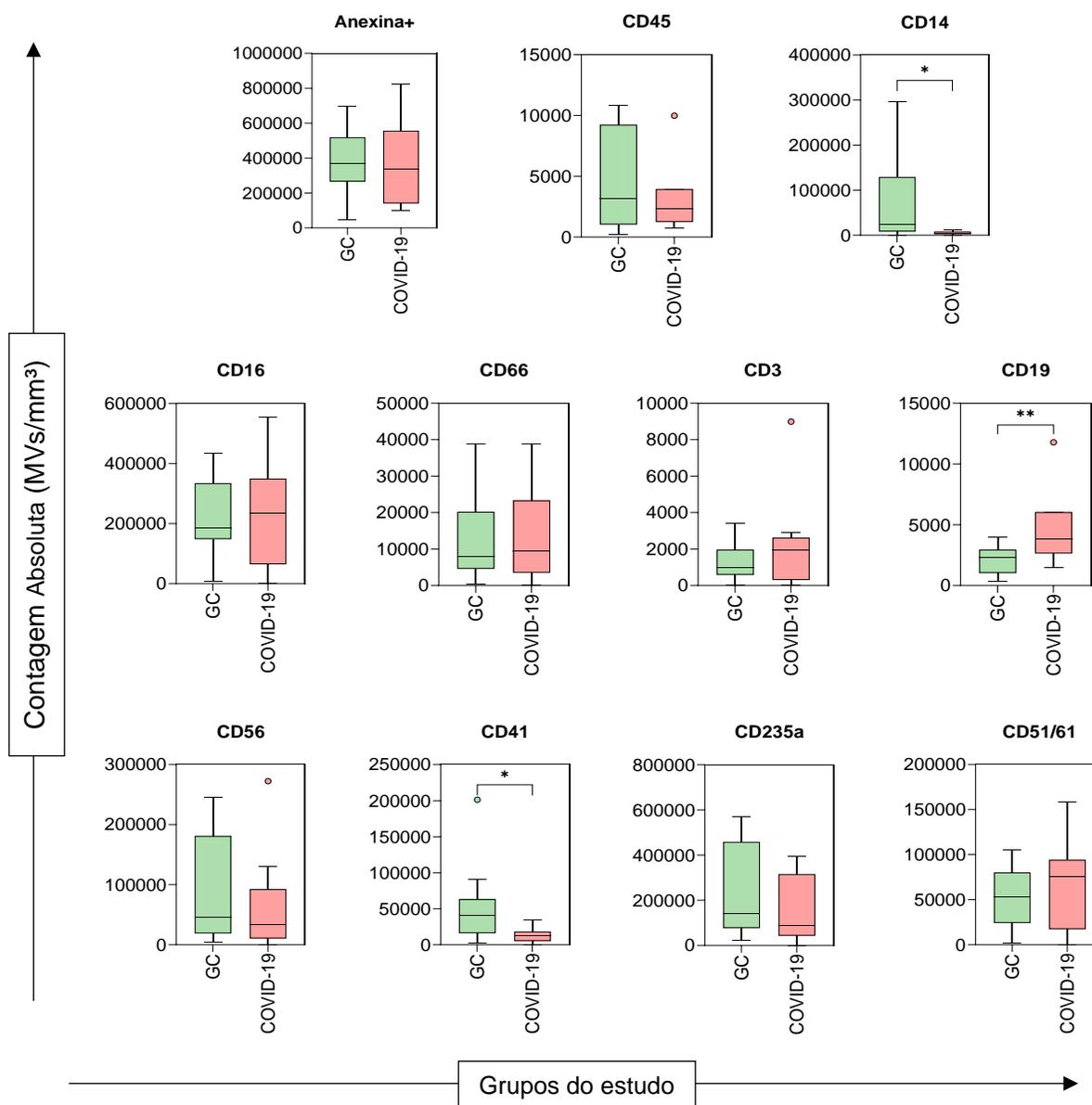


Figura 11: Perfil de microvesículas dos pacientes com COVID-19. Comparação entre a contagem absoluta de microvesículas totais – Anexina+; microvesículas derivadas de Leucócitos – CD45; Monócitos – CD14; Neutrófilos – CD16 e CD66; Linfócitos T – CD3; Linfócitos B – CD19; Células NK – CD56; Plaquetas – CD41; Eritrócitos – CD235a; Células endoteliais – CD51/61; nos grupos: Grupo controle – GC (■) e pacientes COVID-19 (■). Os gráficos ilustram os valores da mediana (+/-) IQR. As análises estatísticas foram realizadas usando *Mann Whitney test*. Diferenças significativas são indicadas por linhas de conexão e asteriscos para $p < 0,02$ (*) e $p < 0,006$ (**).

5.4 Perfil das microvesículas em indivíduos convalescentes

A análise do perfil de microvesículas de indivíduos convalescentes versus controle saudáveis, é ilustrada na figura 12. As microvesículas de monócitos (CD14) se mostraram diminuídas no D30 e caindo drasticamente no D90, com uma diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo controle, $p= 0,0212$. É observado um padrão semelhante nas microvesículas de leucócitos (CD45), células NK (CD56) e plaquetas (CD41), embora estas tenham tido um discreto aumento no D60, no entanto essas diferenças não foram estatisticamente significantes.

Os indivíduos convalescentes apresentaram uma produção maior de microvesículas de células endoteliais (CD51/61) no D30, diferindo significativamente de controles saudáveis, $p= 0,0461$. Embora não tenha sido significativa, é possível notar uma tendência semelhante nas microvesículas totais (Anexina+), microvesículas de neutrófilos (CD16 e CD66), linfócitos T (CD3), linfócitos B (CD19) e discretamente microvesículas de eritrócitos (CD235a).

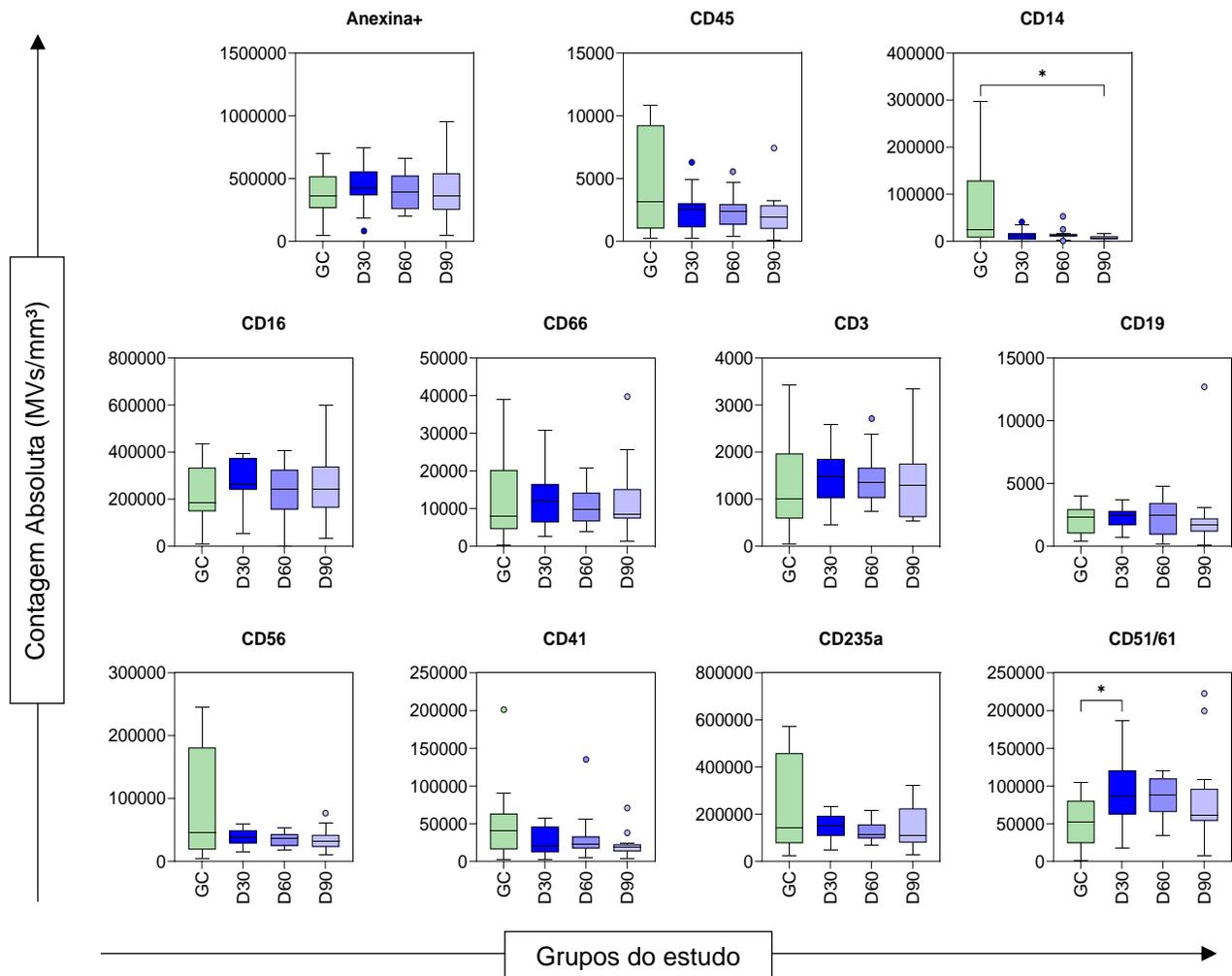


Figura 12: Perfil das microvesículas em indivíduos convalescentes. Comparação entre a contagem absoluta de das subpopulações de microvesículas; nos grupos: Grupo controle – GC (■) e convalescentes D30 (■), D60(■) e D90 (■). Os gráficos ilustram os valores da mediana (+/-) IQR. Os dados foram comparados usando a análise de variância (ANOVA) pelo teste de *Kruskall Wallis*, seguido do teste de *Dunn's* para múltiplas comparações. Diferenças significativas são indicadas por linhas de conexão e asteriscos para $p < 0,04$ (*).

5.5 Análise comparativa do perfil de microvesículas entre pacientes com COVID-19 e indivíduos convalescentes

A análise comparativa entre pacientes com COVID-19 e indivíduos que estavam em período de convalescença, foi realizada para observar o padrão das mesmas durante a infecção e pós-infecção, embora sejam grupos independentes. Essa representação pode ser vista na figura 13. Nossos resultados mostram que durante a COVID-19 os pacientes apresentam uma diminuição de microvesículas de monócitos (CD14) em comparação aos convalescentes, principalmente no D60, com uma diferença estatística significativa, $p= 0.0093$. Da mesma forma, embora não haja diferença significativa, percebe-se que há uma tendência na diminuição das microvesículas totais (Anexina+), de leucócitos (CD45), neutrófilos (CD16 e CD66), células NK (CD56), eritrócitos (CD235a), plaquetas (CD41) e células endoteliais (CD51/61) em relação aos convalescentes que estão com microvesículas aumentadas no D30 seguida da diminuição ao longo do tempo observado.

Pacientes com COVID-19 apresentaram um aumento significativo das microvesículas de linfócitos B (CD19), principalmente em relação aos convalescentes no período D90, $p= 0,0086$. Microvesículas de linfócitos T (CD3) também estão aumentadas em pacientes com COVID-19 em comparação a indivíduos convalescentes, porém não houve diferença significativa.

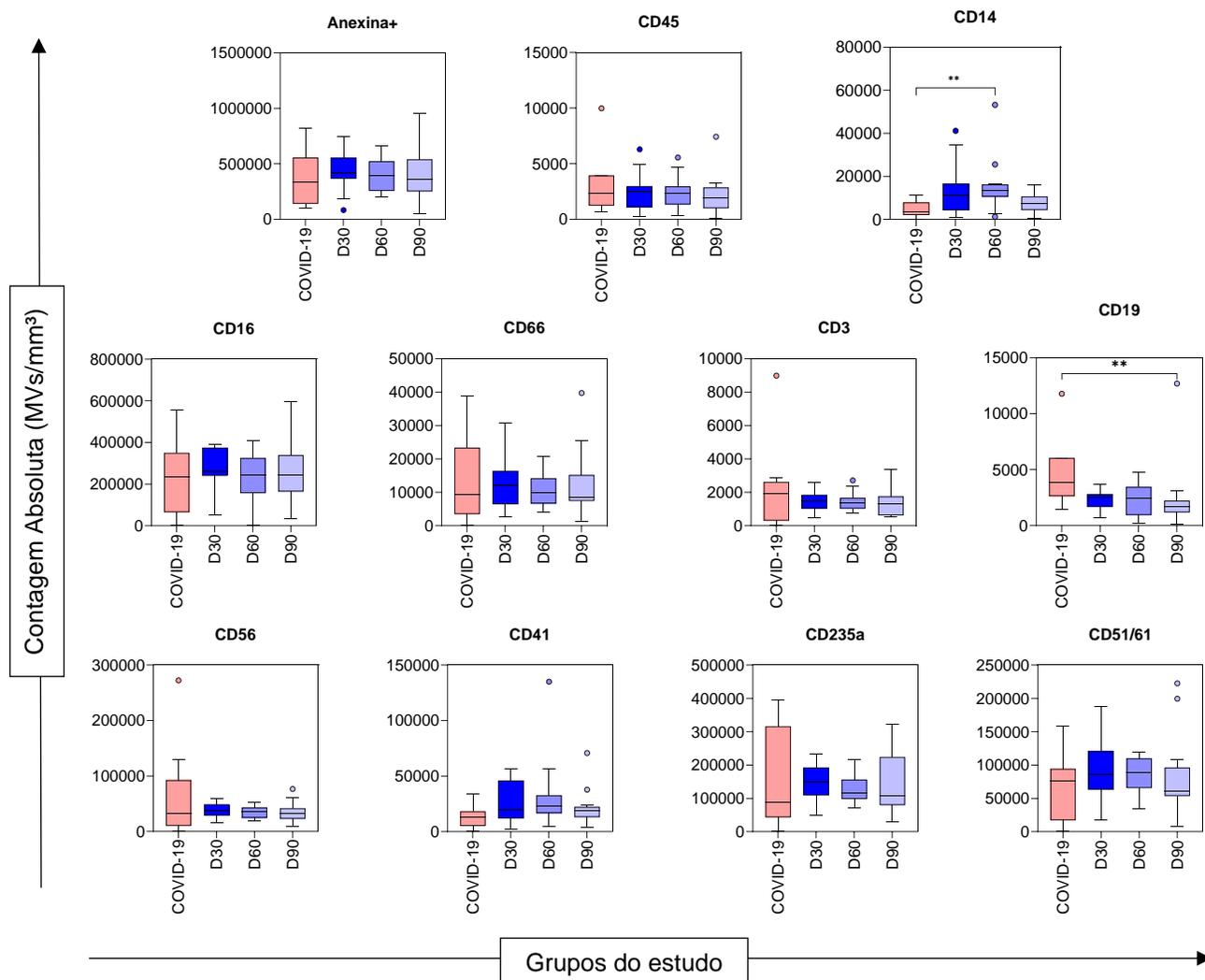


Figura 13: Análise comparativa do perfil de microvesículas entre pacientes com COVID-19 e indivíduos convalescentes. Comparação entre a contagem absoluta das subpopulações de microvesículas; nos grupos: Grupo COVID-19 (■) e convalescentes D30 (■), D60 (■) e D90 (■). Os gráficos ilustram os valores da mediana (+/-) IQR. Os dados foram comparados usando a análise de variância (ANOVA) pelo teste de *Kruskall Wallis*, seguido do teste de *Dunn's* para múltiplas comparações. Diferenças significativas são indicadas por linhas de conexão e asteriscos para $p < 0,009$ (**).

5.6 Apresentação do padrão de microvesículas em pacientes graves e não graves da COVID-19

Ao analisarmos o padrão de microvesículas em pacientes da COVID-19 para observar a diferença de graves e não graves, utilizamos os valores medianos do grupo controle para referência. No entanto, nossos resultados não mostraram diferenças estatísticas significantes (figura 14). Percebe-se que pacientes graves tendem a exibir um padrão de maior produção das microvesículas totais (Anexina+), microvesículas de neutrófilos (CD16 e CD66), linfócitos T (CD3), células NK (CD56), eritrócitos (CD235a) e células endoteliais (CD51/61), entre os pacientes não graves as subpopulações de microvesículas mais produzidas foram as de leucócitos (CD45) e de monócitos (CD14).

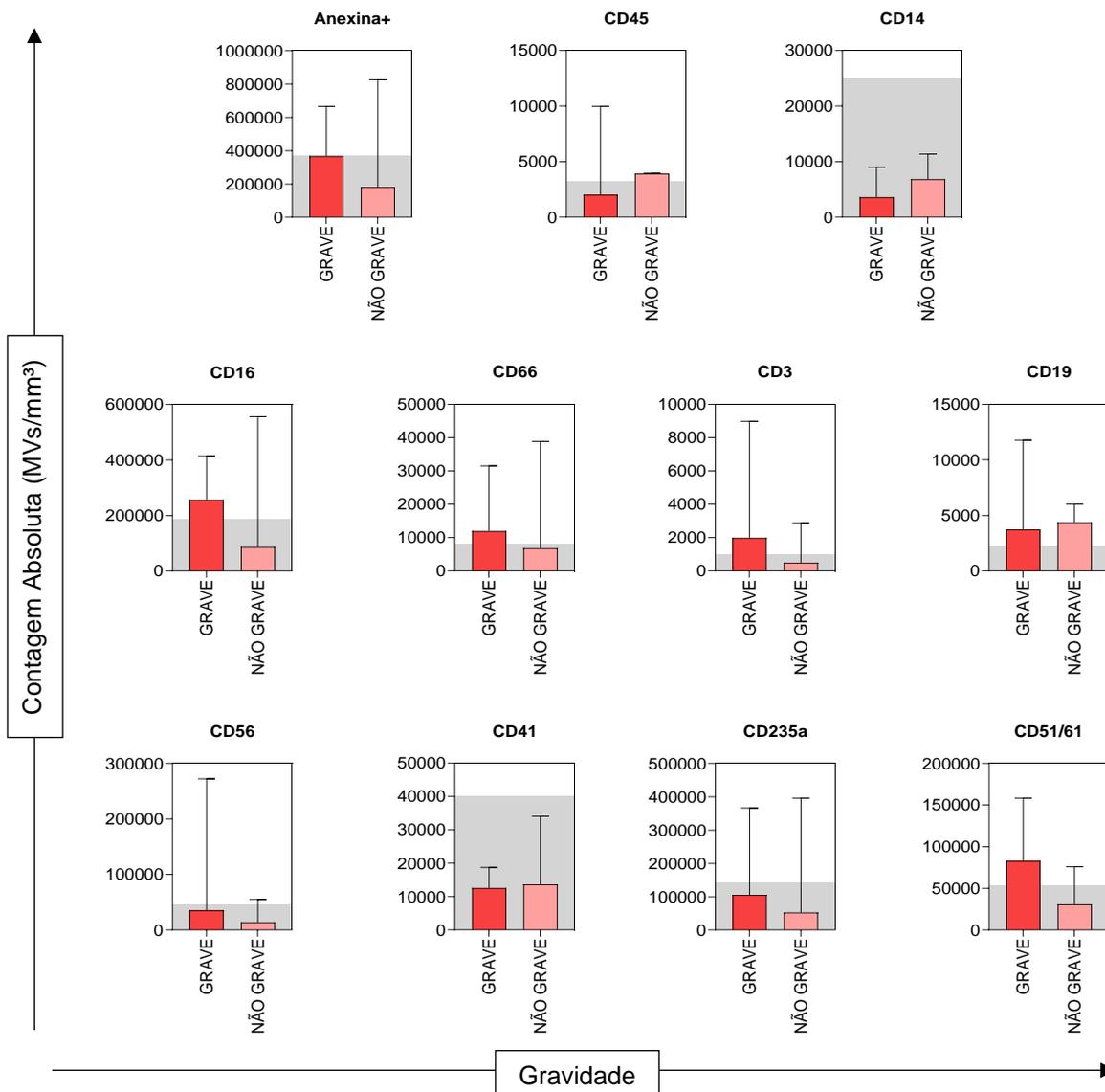


Figura 14: Padrão de microvesículas em pacientes graves e não graves da COVID-19 Comparação entre a contagem absoluta de microvesículas derivadas de células, no grupo de pacientes da COVID-19. Os indivíduos foram classificados em graves (■) e não graves (□). Utilizamos os valores da mediana para o grupo controle (zona cinza). Os gráficos mostram os valores da mediana com intervalo de confiança de 95%. As análises estatísticas foram realizadas usando *Mann Whitney test*.

5.7 Padrão de microvesículas de acordo com desfecho dos pacientes da COVID-19

Analisamos as subpopulações de microvesículas dos pacientes da COVID-19 de acordo com desfecho, alta e óbito. Embora não tenhamos diferenças estatisticamente significativas, mostramos nossos resultados na figura 15. Podemos observar que, com exceção das microvesículas de plaquetas (CD41), todas as microvesículas foram produzidas em maior quantidade em indivíduos que foram a óbito. É importante destacar que nessa análise temos somente 2 indivíduos que foram a óbito e 7 indivíduos no desfecho alta.

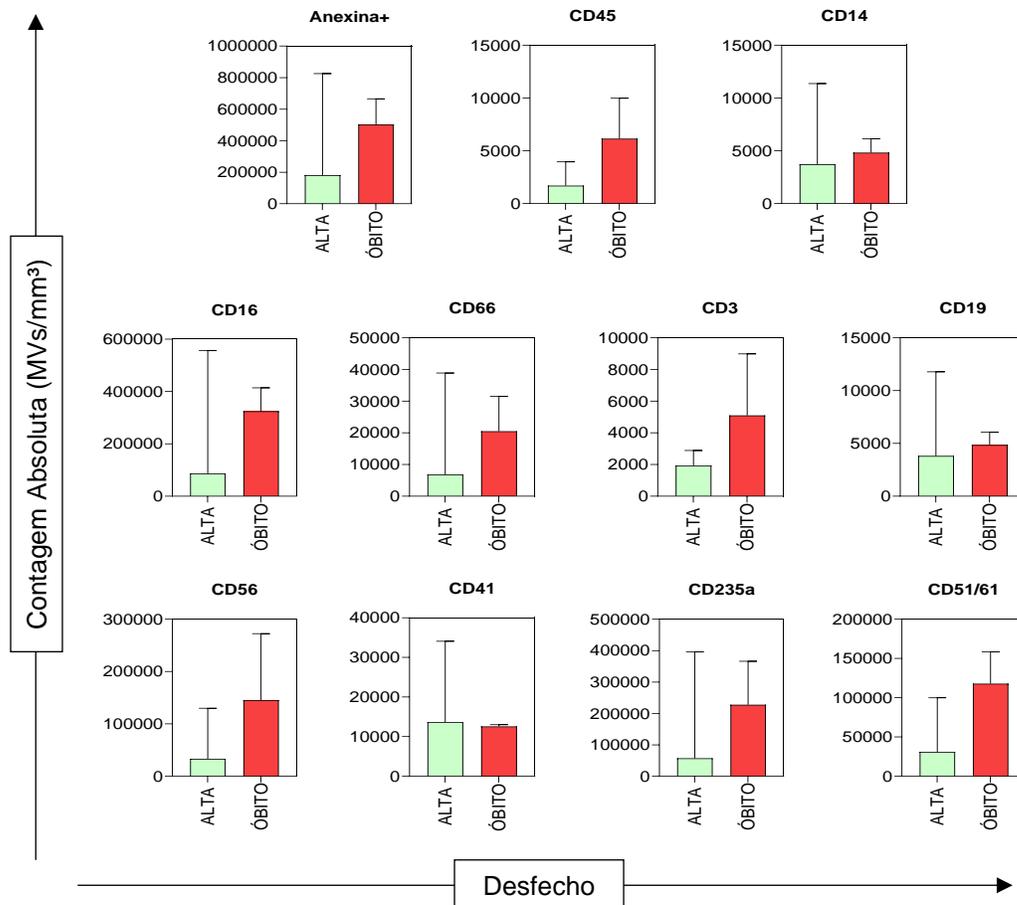


Figura 15: Padrão de microvesículas de acordo com desfecho dos pacientes da COVID-19. Comparação entre a contagem absoluta de microvesículas derivadas de células, no grupo de pacientes da COVID-19, de acordo com o desfecho - Alta (■) e Óbito (■). Os gráficos mostram os valores da mediana com intervalo de confiança de 95%. As análises estatísticas foram realizadas usando *Mann Whitney test*.

5.8 Perfil Cinético das microvesículas

Analisamos o perfil cinético das microvesículas para observar o comportamento das mesmas durante o período de convalescença, a fim de ter uma visão mais ampla de cada microvesícula estudada, essa análise pode ser observada na figura 16. Embora a análise seja composta por grupos independentes, utilizamos os indivíduos saudáveis como controle negativo, para termos uma referência do perfil dessas microvesículas em pessoas saudáveis. Para compreendermos o comportamento das microvesículas durante a infecção por SARS-CoV-2, utilizamos os pacientes com doença ativa para nos esclarecer como é o comportamento das microvesículas durante a infecção, para então avaliarmos o perfil de microvesículas pós infecção por SARS-CoV-2 (30/60/90 dias). Assim, para traçarmos um perfil cinético, utilizamos a mediana dos resultados de cada grupo estudado.

Dessa forma, demonstramos que os indivíduos convalescentes exibem um padrão de alta produção das microvesículas totais (Anexina+), principalmente no D30. A produção tende a cair ao longo dos 60 e 90 dias, voltando a um padrão semelhante aos dos indivíduos saudáveis, ao passo que as microvesículas estão diminuídas em pacientes da COVID-19. Um padrão semelhante é visto nas microvesículas de neutrófilos (CD16 e CD66), linfócitos (CD3) e células endoteliais (CD51/61) em indivíduos convalescentes. Ao observarmos o padrão dessas microvesículas em pacientes da COVID-19, notamos que esses têm uma alta produção, em relação ao grupo controle, mas não comparado aos convalescentes. Notavelmente, as microvesículas de linfócitos T (CD3), parecem mais elevadas nesses pacientes com doença ativa quando comparados com os demais grupos.

Os convalescentes exibiram um padrão de menor produção das microvesículas de leucócitos (CD45), monócitos (CD14), células NK (CD56) e plaquetas (CD41), em relação aos indivíduos saudáveis. Esse padrão se mostrou ainda menor nos pacientes da COVID-19, principalmente das microvesículas de monócitos (CD14). Os indivíduos convalescentes no D30, mostraram uma produção de microvesículas de linfócitos B (CD19) similar a indivíduos controles, com uma queda bem importante no D90, é notável que essas microvesículas são altamente produzidas em pacientes da COVID-19. No entanto as microvesículas de eritrócitos em pacientes COVID-19 mostraram uma produção bem menor em relação aos controles e convalescentes, que estavam altas no D30, semelhante ao controle, com queda nos períodos 60 e 90 dias.

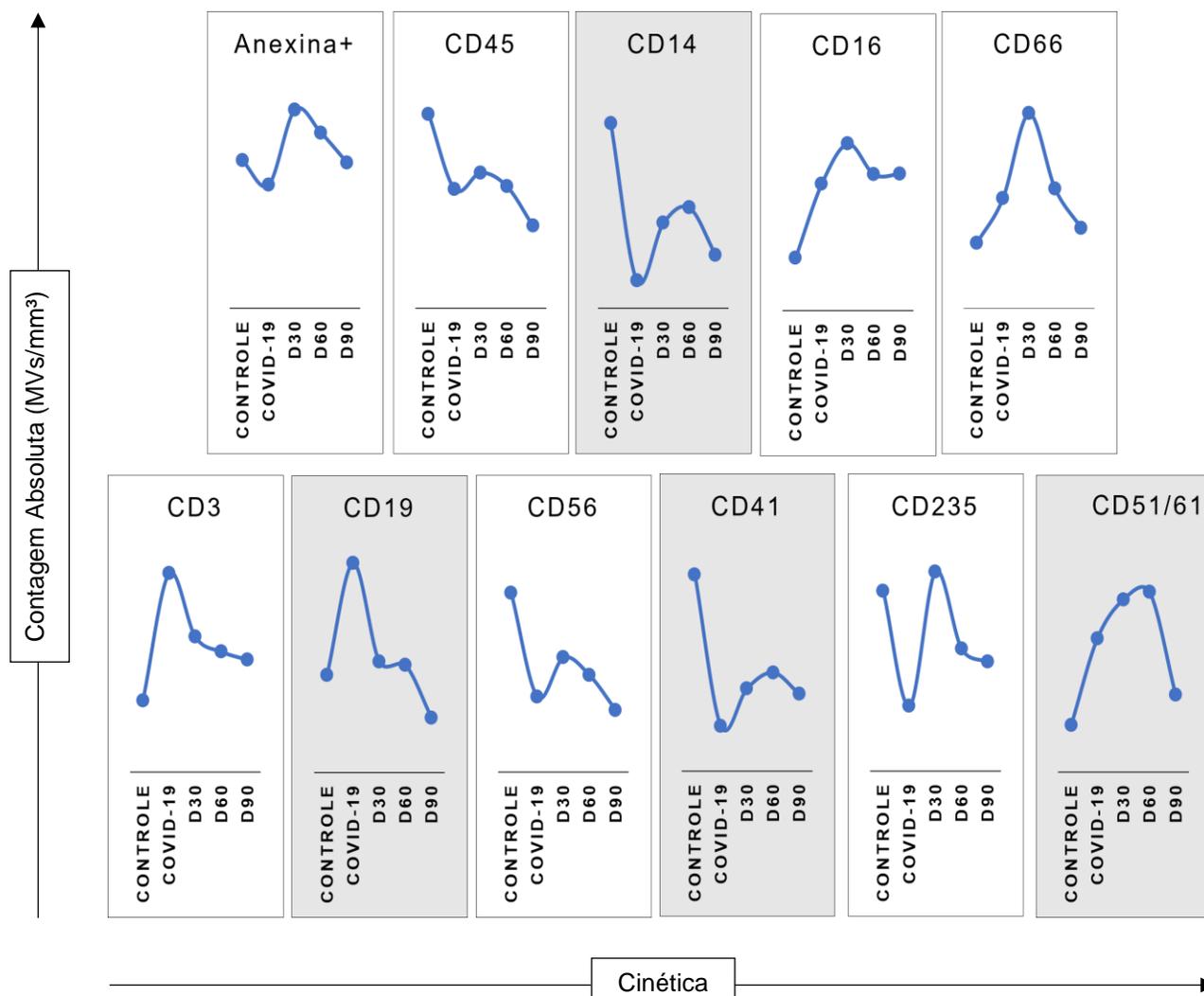


Figura 16: Perfil Cinético das microvesículas. Os resultados são apresentados em gráficos de linha, mostrando os valores medianos do número absoluto de microvesículas dos grupos Controle, pacientes da COVID-19 e indivíduos convalescentes (D30, D60 e D90). Os resultados que apresentaram valores estatisticamente significativos em análises anteriores estão destacados com fundo cinza.

5.9 Redes de interação das subpopulações de microvesículas

As redes foram construídas com intuito de observar as interações entre as subpopulações de microvesículas, em indivíduos saudáveis, pacientes com doença ativa e indivíduos em período de convalescença. Observamos que as redes dos grupos estudados exibiram interações positivas, de maneira moderada e forte. Ao analisar o grupo controle nota-se que todas as microvesículas se correlacionaram entre. E as microvesículas que mais tiveram correlações foram as de linfócitos T (CD3), neutrófilos (CD16 e CD66), eritrócitos (CD235a), células NK (CD56) e linfócitos B (CD19), monócitos (CD14), plaquetas (CD41) e leucócitos (CD45).

Analisando rede dos pacientes da COVID-19, observa-se que as correlações são bastante diferentes em comparação ao grupo controle. É possível observar que muitas das correlações foram perdidas durante a infecção por SARS-CoV-2, microvesículas de leucócitos (CD45) e linfócitos B (CD19) não se correlacionaram com nenhuma outra microvesícula, ainda que poucas, as microvesículas que tiveram mais correlações foram as de neutrófilos (CD16 e CD66), eritrócitos (CD235a) e células NK (CD56).

Em indivíduos no período de convalescença, o perfil de correlações interações apresentam-se semelhantes as correlações do grupo controle. Baseada nessa observação, no D30, nota-se que, essas correlações parecem estar voltando aos padrões vistos no controle. As microvesículas de linfócitos T (CD3), neutrófilos (CD16 e CD66), eritrócitos (CD235a), células NK (CD56), plaquetas (CD41), leucócitos (CD45) e células endoteliais (CD51/61) apresentaram mais correlações. No entanto, não houve nenhuma correlação de microvesículas de linfócitos B (CD19), nesse período. Por alguma razão essas correlações são perdidas no D60 e D90, vemos que nesses períodos as microvesículas de neutrófilos (CD16 e CD66), eritrócitos (CD235a), células NK (CD56), linfócitos T (CD3) e células endoteliais (CD51/61) foram as que tiveram mais correlações, além de microvesículas de leucócitos (CD45) no D90. As microvesículas de leucócitos (CD45) e linfócitos B (CD19) não apresentaram correlações no D60, assim como microvesículas de monócitos (CD14) no D90 (figura 17).

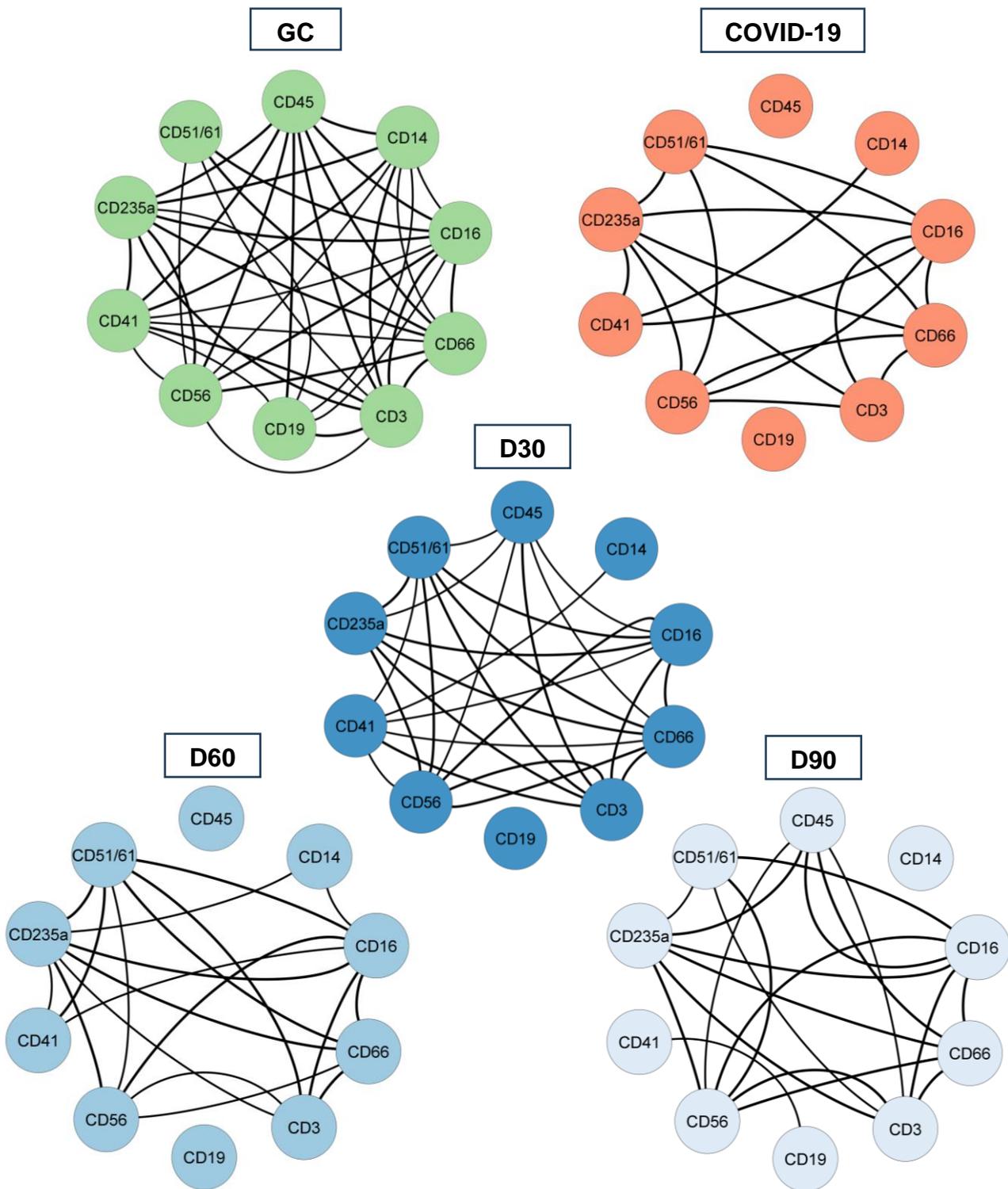


Figura 17: Redes de interação das subpopulações de microvesículas. As redes mostram o padrão de interação entre as subpopulações de microvesículas circulantes no grupo controle (GC), pacientes COVID-19 e indivíduos convalescentes (D30, D60 e D90). Microvesículas derivadas de Leucócitos – CD45; Monócitos – CD14; Neutrófilos – CD16 e CD66; Linfócitos T – CD3; Linfócitos B - CD19; Células NK – CD56; Plaquetas – CD41; Eritrócitos – CD235a; Células endoteliais – CD51/61. As correlações de Spearman significativas em $p < 0,05$ são representadas por linhas contínuas que indicam uma correlação positiva forte ($r \geq 0,68$ = linha contínua espessa) e moderada ($0,36 \geq r \leq 0,68$ = linha contínua mais fina) conforme proposto por Taylor¹⁶³.

6 DISCUSSÃO

As microvesículas desempenham um papel significativo em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos. Além disso, elas influenciam as funções de outras células através da comunicação intercelular. Essas microvesículas atuam como unidades de sinal, impactando as funções celulares através de suas proteínas de superfície e conteúdo interno, que incluem proteínas, RNAs, miRNA e citocinas, por exemplo¹⁶⁴.

Como podemos observar os pacientes infectados por SARS-CoV-2 demonstraram uma diminuição da produção de microvesículas de monócitos (CD14) e de plaquetas (CD41), algo bastante curioso, já que na grande maioria dos estudos que avaliam microvesículas em processos inflamatórios, elas são vistas em grandes quantidades^{165,166}.

Uma explicação hipotética para a baixa liberação de microvesículas de monócitos e plaquetas, seria sobre a sua meia-vida curta na circulação, o fato de a biodisponibilidade das microvesículas na circulação ser diminuída pode ser explicada em partes pela provável retenção ou captação das mesmas em órgãos-alvo. É provável que a quantidade das microvesículas na circulação dependa da origem celular, bem como da disponibilidade de diferentes tipos de células-alvo receptoras internalizá-las^{167,168}. Estudos anteriores em modelos animais demonstraram que microvesículas derivadas de eritrócitos, por exemplo, foram absorvidas em maiores quantidades pelo fígado. Ainda, em outro estudo, microvesículas derivadas de melanoma foram absorvidas principalmente pelos pulmões e baço¹⁶⁹.

Curiosamente, as microvesículas de linfócitos B (CD19) foram significativamente elevadas nos pacientes da COVID-19. Os artigos referentes a microvesículas de linfócitos B são bastante limitados, o que torna difícil a discussão referente a esse achado. Ghosh et al, estudaram o perfil de microvesículas em leucemia linfocítica crônica (LLC), com 60 pacientes, eles identificaram alta produção de microvesículas de linfócitos B nos pacientes em estágio intermediário da doença, esses níveis eram ainda maiores no estágio avançado em comparação ao estágio inicial. Eles observaram ainda que, não havia uma associação clara entre contagem de linfócitos e microvesículas, podendo sugerir que a liberação de microvesículas derivadas de células leucêmicas pode depender mais do estágio da doença¹⁴⁵.

Garnier et al, na França, ao estudar 53 pacientes infectados por SARS-CoV-2 (21 não intubados, 27 intubados e 5 extubados) mostraram que microvesículas de plaquetas estão

aumentadas em pacientes da COVID-19 em comparação a indivíduos saudáveis. Eles observaram que em pacientes intubados essa produção foi ainda maior, microvesículas de células endoteliais também foram produzidas de forma abundante, principalmente em pacientes intubados, apesar de não ter significância essas microvesículas também estão aumentadas em nossos pacientes. De forma semelhante ao nosso estudo, microvesículas de eritrócitos estavam em níveis menores quando comparados aos controles. Esse estudo também mostrou, que as microvesículas do plasma dos pacientes intubados foram capazes de causar a morte de células endoteliais em cultura, assim como aumento da adesão de neutrófilos nas células endoteliais, revelando um provável mediador do dano endotelial comumente visto na COVID-19¹⁶².

O estudo realizado por Zahran et al, ao avaliarem microvesículas em pacientes infectados por SARS-CoV-2, com e sem câncer, no Instituto de Cancer do Sul do Egito observaram que as microvesículas totais (Anexina+) estavam aumentadas nos dois grupos de pacientes em comparação ao grupo controle. Contudo, as microvesículas de plaquetas não apresentaram diferença entre os grupos e as microvesículas de células endoteliais estavam aumentadas em pacientes com infecção ativa e câncer. Eles apontaram que essas microvesículas seriam importantes biomarcadores para identificar pacientes potencialmente graves que requerem cuidados imediatos, especialmente pacientes com cancer¹⁷⁰.

Um estudo realizado com 40 pacientes infectados por SARS-CoV-2 mostra que as microvesículas estão aumentadas nos pacientes em comparação com o grupo controle. Eles também analisaram microvesículas que expressavam fator tecidual e observaram que as mesmas apresentavam-se aumentadas nesses pacientes, isso poderia então contribuir para estado de hipercoagulabilidade observados em pacientes graves da doença, já que eles observaram uma correlação positiva entre microvesículas e níveis de D-dímero¹⁹.

Um estudo com sepse e trauma, realizado por Puga e colaboradores, avaliou o perfil de microvesículas circulantes, o qual continha 10 pacientes com sepse, 19 pacientes com trauma e 10 controles saudáveis. Diferentemente de nossos resultados, COVID-19 versus grupo controle, microvesículas totais estavam elevadas na sepse e trauma apresentou maior número de microvesículas de monócitos e microvesículas de plaquetas estavam mais elevadas em trauma. um achado semelhante ao nosso estudo, mesmo que sem significância estatística, foi uma elevação de microvesículas de célula T tanto em trauma como em sepse, eles concluíram que esses achados

indicam que microvesículas totais seria um bom biomarcador para identificar sepse, de outro modo, microvesículas de monócitos foi um biomarcador hipotético para identificar os pacientes com trauma, já microvesículas de linfócitos T e plaquetas foram qualificados para diferenciar trauma de sepse¹⁷¹.

A resposta imunológica contra o SARS-CoV-2, é marcada por uma disfunção imune importante. Hoje, os estudos sobre o período convalescente são focados em entender os mecanismos que levam os indivíduos a cura, assim como entender fatores que favorecem a COVID-19 longa ou persistente. De fato, é possível notar que indivíduos que tiveram COVID-19, mantem características imunológicas por longos períodos, esse mecanismo é ainda pouco compreendido, porém vem sendo explorado.

A resposta imunológica da COVID-19, contribui tanto para a resolução da infecção quanto para a patogênese da doença, uma característica bastante importante da fase aguda é a desregulação imune, que é marcada por linfopenia e aumento exacerbado de mediadores pro-inflamatórios. O estudo de Phetsouphanh et al, por exemplo, analisou 147 pacientes por um período de até 8 meses, dentre os quais 31 (21,08%) foram diagnosticados com COVID-19 longa, com base na ocorrência de 3 principais sintomas (fadiga, dispneia ou dor torácica), nesses pacientes foram vistos níveis elevados de citocinas pro-inflamatórias como interferon β (IFN- β), IFN- λ 1, IFN- γ , CXCL9, CXCL10, interleucina-8 (IL-8) e imunoglobulina solúvel de células T mucina domínio 3 (sTIM-3), após 4 meses da infecção, em comparação a indivíduos saudáveis¹⁷².

As análises do perfil de microvesículas de convalescentes versus grupo controle, revelam que as microvesículas de células endoteliais (CD51/61), por exemplo estão mais elevadas nos convalescentes, principalmente no D30, de maneira estatisticamente significativa, quando comparado ao grupo controle. A COVID-19 é uma doença sistêmica que causa uma lesão aguda no pulmão, com impacto predominante no endotélio vascular. A pneumonia relacionada à COVID-19 é marcada pela infiltração dos pulmões por macrófagos e neutrófilos, resultando em dano alveolar pulmonar difuso. O SARS-CoV-2 infecta diretamente as células endoteliais vasculares levando ao dano celular e à apoptose, com isso a atividade antitrombótica normal do endotélio é diminuída, nesse sentido, durante processos inflamatórios microvesículas são liberadas em grandes quantidades¹⁷³.

A análise COVID-19 com indivíduos convalescentes, nos mostra, um perfil bastante diferente das subpopulações de microvesículas. As microvesículas de monócitos (CD14) estão mais aumentadas no período convalescente e não durante a fase aguda da doença, semelhante a análise COVID-19 versus controle, isso nos mostra que as microvesículas de monócitos podem não ser tão atuantes durante a resposta inflamatória da COVID-19 em nossa população. Por outro lado, as microvesículas de linfócitos B (CD19) apresentaram-se aumentados na COVID-19, no entanto para determinar suas funções são necessárias análises associadas a outros parâmetros inflamatórios, além de um número maior de indivíduos a serem estudados.

Fizemos a análise de acordo com a gravidade da COVID-19, nossa limitação nessa análise é o número de indivíduos, apenas 9 pacientes, dos quais 6 eram graves e 3 não graves, não obtivemos nenhum resultado estatisticamente significativo, porém é possível perceber que algumas microvesículas parecem diferenciar pacientes graves de não graves, como, microvesículas totais (Anexina+), neutrófilos (CD16 e CD66) e de células endoteliais (CD51/61) que estão aumentados em pacientes graves. Guervilly e colaboradores, analisaram o perfil de vesículas extracelulares em 111 pacientes da COVID-19, assim como em nosso estudo, eles não encontraram diferenças significativas na liberação de vesículas extracelulares entre pacientes moderados ou graves. No entanto ao analisar VEs que expressam fator tecidual eles observaram um aumento significativo em pacientes da forma grave. Além disso, observou-se correlação positiva entre VEs-FT com leucócitos, neutrófilos e monócitos além de parâmetros inflamatórios como, fibrinogênio, proteína C reativa e citocina IL-6, sugerindo que VEs-FT tem uma função altamente inflamatória em pacientes da COVI-19. Eles também mostram que VEs-FT se correlacionaram positivamente com D-dímero e negativamente com plaquetas, sugerindo uma ligação com marcadores de coagulopatias induzida por COVID-19. Guervilly e colaboradores sugerem ainda que a transferência intercelular de FT via VEs ou a contribuição direta de VEs-FT para o surgimento do trombo, pode contribuir para a ligação entre inflamação e trombose¹⁷⁴.

Rosell e colaboradores, avaliaram a contribuição das vesículas extracelulares (VEs) para a gravidade e mortalidade da COVID-19. O estudo foi composto por 100 pacientes da COVID-19, onde foi avaliado VEs que expressam fator tecidual, os resultados mostram que VEs-FT, foram significativamente maiores em pacientes em comparação a controle saudáveis. Neste estudo 10

pacientes foram a óbito e os níveis de VEs-FT estavam mais altos em comparação aqueles que tiveram alta, sendo então associadas a mortalidade¹⁷⁵.

A análise das redes entre as subpopulações de microvesículas nos mostra um padrão de interação bem diferente entre os grupos estudados. Sabemos que a COVID-19 é uma doença inflamatória e debilitante. O espectro clínico da doença é amplo, onde, cerca de 45% dos infectados são assintomáticos, 40% apresentam manifestações clínicas leves, 10% desenvolvem a forma grave da doença e 5% apresentam um estado crítico, em vista disso os pacientes precisam de internação, muitas vezes por longos períodos¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. É uma doença que pode deixar sequelas, já que vários estudos vêm relatando alterações morfológicas e funcionais por semanas e até mesmo meses após a infecção, esses sinais e sintomas persistente após infecção, podem afetar vários órgão e sistemas, que depende de fatores como: mecanismo fisiopatológico do vírus, magnitude da resposta imune desencadeada e drogas e técnicas utilizadas durante a tratamento da doença¹⁷⁹. É perceptível o quanto as interações entre as microvesículas são modificadas durante a infecção, como mostra a rede de interação do grupo de pacientes, essa modificação parece permanecer por muito tempo, já que no período convalescente D90 ainda permanecem as mudanças.

Temos como limitação no nosso estudo o N, é possível que muitas das análises feitas tenham sofrido interferência do tamanho amostral. Além disso, não fizemos análises com outros parâmetros inflamatórios, em vista disso, análises futuras com microvesículas na COVID-19, precisam focar na correlação com outros parâmetros, como, hematológico, mediadores inflamatórios, perfil celular e mediadores hemostáticos.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso estudo mostra que o perfil de microvesículas em pacientes infectados com SARS-CoV-2 apresenta uma baixa liberação de microvesículas de monócitos e plaquetas, por outro lado as microvesículas de linfócitos B estão elevadas durante a fase aguda da doença, é interessante em estudos futuros analisarmos com outras variáveis para estabelecermos uma função. O perfil de microvesículas em indivíduos convalescentes mostrou que microvesículas de células endoteliais (CD51/61) estavam elevadas, isso nos mostra que a COVID-19, de fato, é uma doença que tem uma resposta inflamatória bastante extensa, que causa, mesmo em baixo grau, um dano tecidual bastante importante. Mesmo sem resultados significativos, as microvesículas podem ser usadas para diferenciar a gravidade da doença, já que percebe-se uma tendência de alta produção de algumas microvesículas em paciente graves da doença e de igual forma elas podem ser um biomarcador para prever a mortalidade, enfatizamos que um número maior de indivíduos precisa ser estudado para esclarecer melhor as funções das microvesículas na infecção por SARS-CoV-2 em nossa população.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Muralidar S, Ambi SV, Sekaran S, Krishnan UM. The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. Vol. 179, *Biochimie*. Elsevier B.V.; 2020. p. 85–100.
2. Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Autoimmun* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2022 Aug 11];109:102433. Available from: [/pmc/articles/PMC7127067/](#)
3. Sahin AR, Erdogan A, Agaoglu PM, Dineri Y, Cakirci AY, Senel ME, et al. 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Outbreak: A Review of the Current Literature. *Eurasian J Med Oncol* [Internet]. 2020 [cited 2022 Aug 11];4(1):1–7. Available from: <https://www.ejmo.org/10.14744/ejmo.2020.12220/>
4. Rabi FA, al Zoubi MS, Al-Nasser AD, Kasasbeh GA, Salameh DM. Sars-cov-2 and coronavirus disease 2019: What we know so far. Vol. 9, *Pathogens*. MDPI AG; 2020.
5. Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus–induced lung injury. *Nat Med* [Internet]. 2005 Aug [cited 2022 Aug 11];11(8):875. Available from: [/pmc/articles/PMC7095783/](#)
6. Heurich A, Hofmann-Winkler H, Gierer S, Liepold T, Jahn O, Pöhlmann S. TMPRSS2 and ADAM17 Cleave ACE2 Differentially and Only Proteolysis by TMPRSS2 Augments Entry Driven by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein. *J Virol* [Internet]. 2014 Jan 15 [cited 2022 Aug 11];88(2):1293. Available from: [/pmc/articles/PMC3911672/](#)
7. Parasher A. COVID-19: Current understanding of its Pathophysiology, Clinical presentation and Treatment. Vol. 97, *Postgraduate Medical Journal*. BMJ Publishing Group; 2021. p. 312–20.
8. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020 Jun 28;20(6):363–74. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC7187672>
9. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. Vol. 41, *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd; 2020. p. 1100–15.
10. Zhou R, To KKW, Wong YC, Liu L, Zhou B, Li X, et al. Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses. *Immunity* [Internet]. 2020 Oct 10 [cited 2022 Aug 11];53(4):864. Available from: [/pmc/articles/PMC7402670/](#)
11. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-

- centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2022 Aug 11];8(5):475. Available from: [/pmc/articles/PMC7102538/](#)
12. Wu JT, Leung K, Bushman M, Kishore N, Niehus R, de Salazar PM, et al. Estimating clinical severity of COVID-19 from the transmission dynamics in Wuhan, China. *Nat Med* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 Aug 11];26(4):506. Available from: [/pmc/articles/PMC7094929/](#)
 13. Chen H, Liu W, Liu D, Zhao L, Yu J, Kong H, et al. SARS-CoV-2 activates lung epithelia cell proinflammatory signaling and leads to immune dysregulation in COVID-19 patients by single-cell sequencing. *medRxiv* [Internet]. 2020 May 13 [cited 2022 Aug 11];2020.05.08.20096024. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.05.08.20096024v1>
 14. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* [Internet]. 2020 May 5 [cited 2022 Aug 11];181(5):1036. Available from: [/pmc/articles/PMC7227586/](#)
 15. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2022 Aug 11];71(15):762–8. Available from: [/pmc/articles/PMC7108125/?report=abstract](#)
 16. Wang J, Chen S, Bihl J. Exosome-Mediated Transfer of ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2) from Endothelial Progenitor Cells Promotes Survival and Function of Endothelial Cell. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2020 [cited 2023 Mar 30];2020. Available from: [/pmc/articles/PMC6995312/](#)
 17. Zhu S, Li S, Yi M, Li N, Wu K. Roles of Microvesicles in Tumor Progression and Clinical Applications. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2021 [cited 2023 Apr 26];16:7071. Available from: [/pmc/articles/PMC8536885/](#)
 18. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* [Internet]. 2006 [cited 2022 Aug 21];20(9):1487–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16791265/>
 19. Hamali HA, Saboor M, Dobie G, Madkhali AM, Akhter MS, Hakamy A, et al. Procoagulant Microvesicles in COVID-19 Patients: Possible Modulators of Inflammation and Prothrombotic Tendency. *Infect Drug Resist*. 2022;15:2359–68.
 20. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*. 2020;26(April):450–2.
 21. Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) [Internet]. Springer New York; 2015. p. 1–23. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2438-7_1

22. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res*. 2020 Jul;24:91–8.
23. Weiss SR, Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2005 Dec;69(4):635–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339739>
24. Kitchen LC, Berman M, Halper J, Chazot P. Rationale for 1068 nm Photobiomodulation Therapy (PBMT) as a Novel, Non-Invasive Treatment for COVID-19 and Other Coronaviruses: Roles of NO and Hsp70. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 5221 [Internet]. 2022 May 7 [cited 2023 Apr 11];23(9):5221. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/9/5221/htm>
25. Zhang Q, Xiang R, Huo S, Zhou Y, Jiang S, Wang Q, et al. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. Vol. 6, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2021.
26. Muralidar S, Ambi SV, Sekaran S, Krishnan UM. The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. Vol. 179, *Biochimie*. Elsevier B.V.; 2020. p. 85–100.
27. Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Autoimmun* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2022 Aug 14];109:102433. Available from: </pmc/articles/PMC7127067/>
28. LaRotta J, Escobar O, Ávila-Aguero ML, Torres JP, Sini de Almeida R, Morales G del C, et al. COVID-19 in Latin America: A Snapshot in Time and the Road Ahead. *Infect Dis Ther* [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2023 Apr 13];12(2):389–410. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40121-022-00748-z>
29. de Jesus JG, Sacchi C, Candido D da S, Claro IM, Sales FCS, Manuli ER, et al. Importation and early local transmission of COVID-19 in Brazil, 2020. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2020 [cited 2023 Apr 13];62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32401959/>
30. Taylor L. How Latin America is fighting covid-19, for better and worse. *BMJ* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2023 Apr 13];370. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32873574/>
31. Pablos-Méndez A, Vega J, Aranguren FP, Tabish H, Raviglione MC. Covid-19 in Latin America. *BMJ* [Internet]. 2020 Jul 27 [cited 2023 Apr 13];370. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32718938/>

32. Taylor L. Covid-19: WHO pleads for vaccines as South American countries register record deaths. *BMJ* [Internet]. 2021 Jun 18 [cited 2023 Apr 13];373:n1587. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34144947/>
33. Silva SJR da, Pena L. Collapse of the public health system and the emergence of new variants during the second wave of the COVID-19 pandemic in Brazil. *One Health* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Apr 13];13:100287. Available from: </pmc/articles/PMC8240439/>
34. Sabino EC, Buss LF, Carvalho MPS, Prete CA, Crispim MAE, Fraiji NA, et al. Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. *Lancet* [Internet]. 2021 Feb 6 [cited 2023 Apr 13];397(10273):452. Available from: </pmc/articles/PMC7906746/>
35. Barreto IC de HC, Costa Filho RV, Ramos RF, Oliveira LG de, Martins NRAV, Cavalcante FV, et al. Colapso na saúde em Manaus: o fardo de não aderir às medidas não farmacológicas de redução da transmissão da Covid-19. *Saúde em Debate* [Internet]. 2021 Dec 8 [cited 2023 Apr 16];45(131):1126–39. Available from: <http://www.scielo.br/j/sdeb/a/ktbLC8Qcncmt4nKgKgJr6TS/?lang=pt>
36. Buss LF, Prete CA, Abraham CMM, Mendrone A, Salomon T, De Almeida-Neto C, et al. Three-quarters attack rate of SARS-CoV-2 in the Brazilian Amazon during a largely unmitigated epidemic. *Science* [Internet]. 2021 Jan 15 [cited 2023 Apr 16];371(6526):288–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33293339/>
37. Lumley SF, O'Donnell D, Stoesser NE, Matthews PC, Howarth A, Hatch SB, et al. Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2021 Feb 11 [cited 2023 Apr 16];384(6):533–40. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2034545>
38. Dríade | Dados - Prevalência de coronavírus na Amazônia brasileira e na cidade de São Paulo [Internet]. [cited 2023 Apr 16]. Available from: <https://datadryad.org/stash/dataset/doi:10.5061/dryad.c59zw3r5n>
39. SARS-CoV-2 reinfection by the new Variant of Concern (VOC) P.1 in Amazonas, Brazil - SARS-CoV-2 coronavirus / nCoV-2019 Genomic Epidemiology - Virological [Internet]. [cited 2023 Apr 16]. Available from: <https://virological.org/t/sars-cov-2-reinfection-by-the-new-variant-of-concern-voc-p-1-in-amazonas-brazil/596>
40. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings - SARS-CoV-2 coronavirus / nCoV-2019 Genomic Epidemiology - Virological [Internet]. [cited 2023 Apr 16]. Available from: <https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manaus-preliminary-findings/586>

41. Zhou Z, Zhu Y, Chu M. Role of COVID-19 Vaccines in SARS-CoV-2 Variants. *Front Immunol*. 2022 May 20;13.
42. WHO. Tracking SARS-CoV-2 variants [Internet]. [cited 2022 Aug 21]. Available from: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>
43. Galloway SE, Paul P, MacCannell DR, Johansson MA, Brooks JT, MacNeil A, et al. Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage — United States, December 29, 2020–January 12, 2021. *Morbidity and Mortality Weekly Report* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Aug 21];70(3):95. Available from: </pmc/articles/PMC7821772/>
44. WHO. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard [Internet]. 2020 [cited 2020 Oct 25]. p. 1. Available from: <https://covid19.who.int/>
45. Ministério da Saúde. Painel Coronavírus [Internet]. 2020 [cited 2020 Oct 25]. p. 1. Available from: <https://covid.saude.gov.br/>
46. SUSAM/FVS - Relatório COVID-19 [Internet]. [cited 2022 Sep 3]. Available from: <http://www.saude.am.gov.br/painel/corona/>
47. Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA. The molecular virology of coronaviruses. Vol. 295, *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.; 2020. p. 12910–34.
48. Jiang S, Hillyer C, Du L. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses. *Trends Immunol* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2023 Apr 4];41(5):355–9. Available from: <http://www.cell.com/article/S1471490620300570/fulltext>
49. Guan W jie, Ni Z yi, Hu Y, Liang W hua, Ou C quan, He J xing, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*. 2020 Apr 30;382(18):1708–20.
50. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *New England Journal of Medicine*. 2020 Mar 26;382(13):1199–207.
51. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR, et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (CoVID-19) from publicly reported confirmed cases: Estimation and application. *Ann Intern Med*. 2020 May 5;172(9):577–82.
52. Yang L, Liu S, Liu J, Zhang Z, Wan X, Huang B, et al. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020 5:1 [Internet]. 2020 Jul 25 [cited 2023 Apr 12];5(1):1–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-00243-2>
53. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):497–506.

54. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *Journal of Clinical Investigation*. 2020 May 1;130(5):2620–9.
55. Alturki SO, Alturki SO, Connors J, Cusimano G, Kutzler MA, Izmirly AM, et al. The 2020 Pandemic: Current SARS-CoV-2 Vaccine Development. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Aug 19 [cited 2023 Jun 21];11:1880. Available from: [/pmc/articles/PMC7466534/](#)
56. Kucirka LM, Lauer SA, Laeyendecker O, Boon D, Lessler J. Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction–Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. *Ann Intern Med* [Internet]. 2020 Aug 18 [cited 2022 Aug 31];173(4):262–8. Available from: [/pmc/articles/PMC7240870/](#)
57. Carpenter CR, Mudd PA, West CP, Wilber E, Wilber ST. Diagnosing COVID-19 in the Emergency Department: A Scoping Review of Clinical Examinations, Laboratory Tests, Imaging Accuracy, and Biases. *Academic Emergency Medicine* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2022 Aug 31];27(8):653–70. Available from: [/pmc/articles/PMC7323136/](#)
58. Khandker SS, Hashim NHHN, Deris ZZ, Shueb RH, Islam MA. Diagnostic accuracy of rapid antigen test kits for detecting SARS-CoV-2: A systematic review and meta-analysis of 17,171 suspected COVID-19 patients. *J Clin Med* [Internet]. 2021 Aug 2 [cited 2022 Aug 31];10(16). Available from: [/pmc/articles/PMC8397079/](#)
59. Brümmer LE, Katzenschlager S, Gaeddert M, Erdmann C, Schmitz S, Bota M, et al. Accuracy of novel antigen rapid diagnostics for SARS-CoV-2: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2022 Aug 31];18(8). Available from: [/pmc/articles/PMC8389849/](#)
60. Strömer A, Rose R, Schäfer M, Schön F, Vollersen A, Lorentz T, et al. Performance of a Point-of-Care Test for the Rapid Detection of SARS-CoV-2 Antigen. *Microorganisms* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Aug 31];9(1):1–11. Available from: [/pmc/articles/PMC7823488/](#)
61. Long B, Carius BM, Chavez S, Liang SY, Brady WJ, Koyfman A, et al. Clinical update on COVID-19 for the emergency clinician: Presentation and evaluation. Vol. 54, *American Journal of Emergency Medicine*. W.B. Saunders; 2022. p. 46–57.
62. Li M, Wang H, Tian L, Pang Z, Yang Q, Huang T, et al. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2023 Apr 12];7(1). Available from: [/pmc/articles/PMC9062866/](#)
63. Zhang H ping, Sun Y li, Wang Y fen, Yazici D, Azkur D, Ogulur I, et al. Recent developments in the immunopathology of COVID-19. *Allergy* [Internet]. 2023 Feb

- 1 [cited 2023 Apr 12];78(2):369–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36420736/>
64. Wang GL, Wang ZY, Duan LJ, Meng QC, Jiang MD, Cao J, et al. Susceptibility of Circulating SARS-CoV-2 Variants to Neutralization. *N Engl J Med* [Internet]. 2021 Jun 17 [cited 2023 Apr 12];384(24):2354–6. Available from: </pmc/articles/PMC8063885/>
 65. Zhang Y, Wei Y, Yang S, Li Y, Wang J, Nie Z, et al. Rapid and accurate identification of SARS-CoV-2 variants containing E484 mutation. *The Innovation* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2023 Apr 12];3(1):100183. Available from: </pmc/articles/PMC8577878/>
 66. Goel RR, Apostolidis SA, Painter MM, Mathew D, Pattekar A, Kuthuru O, et al. Distinct antibody and memory B cell responses in SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals following mRNA vaccination. *Sci Immunol* [Internet]. 2021 Apr 4 [cited 2023 Apr 12];6(58):1–19. Available from: </pmc/articles/PMC8158969/>
 67. Duan K, Liu B, Li C, Zhang H, Yu T, Qu J, et al. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2020 Apr 28 [cited 2023 Apr 24];117(17):9490–6. Available from: </pmc/articles/PMC7196837/>
 68. Shen C, Wang Z, Zhao F, Yang Y, Li J, Yuan J, et al. Treatment of 5 Critically Ill Patients With COVID-19 With Convalescent Plasma. *JAMA* [Internet]. 2020 Apr 4 [cited 2023 Apr 24];323(16):1582. Available from: </pmc/articles/PMC7101507/>
 69. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2023 Apr 24];19(3):141. Available from: </pmc/articles/PMC7537588/>
 70. Rimmer A. Covid-19: Impact of long term symptoms will be profound, warns BMA. *BMJ* [Internet]. 2020 Aug 13 [cited 2023 Apr 24];370:m3218. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32816748/>
 71. Greenhalgh T, Knight M, A’Court C, Buxton M, Husain L. Management of post-acute covid-19 in primary care. *BMJ* [Internet]. 2020 Aug 11 [cited 2023 Apr 24];370. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32784198/>
 72. Tarazona-Fernández A, Rauch-Sánchez E, Herrera-Alania O, Galán-Rodas E, Tarazona-Fernández A, Rauch-Sánchez E, et al. ¿Enfermedad prolongada o secuela pos-COVID-19? *Acta Médica Peruana* [Internet]. 2020 [cited 2023 Apr 24];37(4):565–70. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172020000400565&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 73. Marsán-Suárez V, Casado-Hernández I, Hernández-Ramos E, Díaz-Domínguez G, Triana-Marrero Y, Duarte-Pérez Y, et al. Biomarkers of sequela in adult patients

- convalescing from COVID-19. *Adv Biomark Sci Technol* [Internet]. 2022 [cited 2023 Apr 25];4:36. Available from: [/pmc/articles/PMC9645947/](#)
74. Kang CK, Kim M, Hong J, Kim G, Lee S, Chang E, et al. Distinct Immune Response at 1 Year Post-COVID-19 According to Disease Severity. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Mar 21 [cited 2023 Apr 25];13:1. Available from: [/pmc/articles/PMC8980227/](#)
 75. Mehandru S, Merad M. Pathological sequelae of long-haul COVID. *Nat Immunol* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Apr 25];23(2):194. Available from: [/pmc/articles/PMC9127978/](#)
 76. Phetsouphanh C, Darley DR, Wilson DB, Howe A, Munier CML, Patel SK, et al. Immunological dysfunction persists for 8 months following initial mild-to-moderate SARS-CoV-2 infection. *Nat Immunol* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Apr 25];23(2):210–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35027728/>
 77. Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*. 2020 Apr;8(4):420–2.
 78. Zhang B, Zhou X, Qiu Y, Song Y, Feng F, Feng J, et al. Clinical characteristics of 82 cases of death from COVID-19. Jin X, editor. *PLoS One*. 2020 Jul 9;15(7):e0235458.
 79. Wong CK, Lam CWK, Wu AKL, Ip WK, Lee NLS, Chan IHS, et al. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2004 Apr;136(1):95–103.
 80. Li T, Qiu Z, Zhang L, Han Y, He W, Liu Z, et al. Significant changes of peripheral T lymphocyte subsets in patients with severe acute respiratory syndrome. *J Infect Dis* [Internet]. 2004 Feb 15 [cited 2023 Apr 12];189(4):648–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14767818/>
 81. Tan M, Liu Y, Zhou R, Deng X, Li F, Liang K, et al. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. *Immunology* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2023 Apr 12];160(3):261. Available from: [/pmc/articles/PMC7283723/](#)
 82. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2020 Jul 28 [cited 2023 Apr 12];71(15):762–8. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/71/15/762/5803306>
 83. Zhang B, Zhou X, Zhu C, Feng F, Qiu Y, Feng J, et al. Immune phenotyping based on neutrophil-to-lymphocyte ratio and IgG predicts disease severity and outcome for patients with COVID-19. *medRxiv* [Internet]. 2020 Mar 16 [cited 2023 Apr 12];2020.03.12.20035048. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.12.20035048v1>

84. Liu Y, Sun W, Li J, Chen L, Wang Y, Zhang L, et al. Clinical features and progression of acute respiratory distress syndrome in coronavirus disease 2019. medRxiv [Internet]. 2020 Feb 27 [cited 2023 Apr 12];2020.02.17.20024166. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.17.20024166v3>
85. Barberis E, Vanella V V., Falasca M, Caneapero V, Cappellano G, Raineri D, et al. Circulating Exosomes Are Strongly Involved in SARS-CoV-2 Infection. *Front Mol Biosci*. 2021 Feb 22;8:29.
86. Mao K, Tan Q, Ma Y, Wang S, Zhong H, Liao Y, et al. Proteomics of extracellular vesicles in plasma reveals the characteristics and residual traces of COVID-19 patients without underlying diseases after 3 months of recovery. *Cell Death & Disease* 2021 12:6 [Internet]. 2021 May 25 [cited 2023 Apr 12];12(6):1–18. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-021-03816-3>
87. Moraes EC dos S, Martins-Gonçalves R, Silva LR da, Mandacaru SC, Melo RM, Azevedo-Quintanilha I, et al. Proteomic Profile of Procoagulant Extracellular Vesicles Reflects Complement System Activation and Platelet Hyperreactivity of Patients with Severe COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jul 22;12:981.
88. Maugeri N, De Lorenzo R, Clementi N, Antonia Diotti R, Criscuolo E, Godino C, et al. Unconventional CD147-dependent platelet activation elicited by SARS-CoV-2 in COVID-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Apr 10];20(2):434. Available from: </pmc/articles/PMC8646617/>
89. Manfredi AA, Ramirez GA, Godino C, Capobianco A, Monno A, Franchini S, et al. Platelet Phagocytosis via P-selectin Glycoprotein Ligand 1 and Accumulation of Microparticles in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Apr 10];74(2):318–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34279048/>
90. Maugeri N, Capobianco A, Rovere-Querini P, Ramirez GA, Tombetti E, Della Valle P, et al. Platelet microparticles sustain autophagy-associated activation of neutrophils in systemic sclerosis. *Sci Transl Med* [Internet]. 2018 Jul 25 [cited 2023 Apr 10];10(451). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30045975/>
91. Krishnamachary B, Cook C, Spikes L, Chalise P, Dhillon NK. The Potential Role of Extracellular Vesicles in COVID-19 Associated Endothelial injury and Pro-inflammation. medRxiv [Internet]. 2020 Sep 1; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32909001>
92. Kowal J, Tkach M, Théry C, Kowal J, Tkach M, Biogenesis CT. Biogenesis and secretion of exosomes. *elsevier*. 2020;116–25.
93. Gurunathan S, Kang MH, Qasim M, Khan K, Kim JH. Biogenesis, membrane trafficking, functions, and next generation nanotherapeutics medicine of extracellular vesicles. *Int J Nanomedicine*. 2021;16:3357–83.

94. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018 Dec 1;7(1):1535750.
95. Witwer KW, Théry C. Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature. Vol. 8, *Journal of Extracellular Vesicles*. Taylor and Francis Ltd.; 2019.
96. Chen Y, Li G, Liu ML. Microvesicles as Emerging Biomarkers and Therapeutic Targets in Cardiometabolic Diseases. Vol. 16, *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. Beijing Genomics Institute; 2018. p. 50–62.
97. van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P, et al. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell* [Internet]. 2011 Oct 10 [cited 2022 Jul 17];21(4):708. Available from: /pmc/articles/PMC3199340/
98. Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura SI, Manrique-Hoyos N, Jung SY, Lauterbach MA, et al. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *Journal of Cell Biology*. 2010 Apr 19;189(2):223–32.
99. Ståhl A lie, Johansson K, Mossberg M, Kahn R, Karpman D. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. Vol. 34, *Pediatric Nephrology*. Springer Verlag; 2019. p. 11–30.
100. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2015 [cited 2022 Jul 20];4(2015):1–60. Available from: /pmc/articles/PMC4433489/
101. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJP, Hole P, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine* [Internet]. 2011 Dec [cited 2022 Jul 20];7(6):780. Available from: /pmc/articles/PMC3280380/
102. van der Pol E, Coumans FAW, Grootemaat AE, Gardiner C, Sargent IL, Harrison P, et al. Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jul 20];12(7):1182–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24818656/>
103. Ståhl A lie, Johansson K, Mossberg M, Kahn R, Karpman D. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases Anne-lie. *Pediatric Nephrology*. 2019;11–30.
104. Segura E, Amigorena S, Théry C. Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood Cells*

- Mol Dis [Internet]. 2005 Sep [cited 2022 Jul 20];35(2):89–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15990342/>
105. Obregon C, Rothen-Rutishauser B, Gerber P, Gehr P, Nicod LP. Active Uptake of Dendritic Cell-Derived Exovesicles by Epithelial Cells Induces the Release of Inflammatory Mediators through a TNF- α -Mediated Pathway. *Am J Pathol* [Internet]. 2009 [cited 2022 Jul 20];175(2):696. Available from: </pmc/articles/PMC2715287/>
 106. Munich S, Sobo-Vujanovic A, Buchser WJ, Beer-Stolz D, Vujanovic NL. Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncoimmunology* [Internet]. 2012 Oct 10 [cited 2022 Jul 20];1(7):1074. Available from: </pmc/articles/PMC3494621/>
 107. Vanni I, Alama A, Grossi F, Dal Bello MG, Coco S. Exosomes: a new horizon in lung cancer. *Drug Discov Today*. 2017 Jun 1;22(6):927–36.
 108. Kadota T, Yoshioka Y, Fujita Y, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular vesicles in lung cancer—From bench to bedside. *Semin Cell Dev Biol*. 2017 Jul 1;67:39–47.
 109. Mesri M, Altieri DC. Leukocyte Microparticles Stimulate Endothelial Cell Cytokine Release and Tissue Factor Induction in a JNK1 Signaling Pathway* [Internet]. 1999. Available from: <http://www.jbc.org/>
 110. Distler JHW, Huber LC, Gay S, Distler O, Pisetsky DS. Microparticles as mediators of cellular cross-talk in inflammatory disease. *Autoimmunity* [Internet]. 2006 Dec [cited 2022 Jul 20];39(8):683–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17178565/>
 111. Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* [Internet]. 2004 Oct 15 [cited 2022 Jul 20];104(8):2543–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15213101/>
 112. Mesri M, Altieri DC. Microparticles Endothelial Cell Activation by Leukocyte [Internet]. Vol. 4382, *J Immunol References*. 1998. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/161/8/http://www.jimmunol.org/content/161/8/4382.full#ref-list-1>
 113. del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* [Internet]. 2005 Sep 1 [cited 2022 Jul 20];106(5):1604–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15741221/>
 114. Hartwig JH, Chambers KA, Stossel TP. Association of gelsolin with actin filaments and cell membranes of macrophages and platelets. *J Cell Biol* [Internet]. 1989 Feb 2 [cited 2022 Jul 20];108(2):467. Available from: </pmc/articles/PMC2115434/?report=abstract>

115. Pasquet JM, Dachary-Prigent J, Nurden AT. Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticle formation in platelets. *Eur J Biochem* [Internet]. 1996 [cited 2022 Jul 20];239(3):647–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8774708/>
116. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2003 Aug 1 [cited 2022 Jul 20];59(2):277–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12909311/>
117. Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* [Internet]. 2005 [cited 2022 Jul 20];20(1):22–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15653836/>
118. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* [Internet]. 2006 [cited 2022 Jul 20];20(9):1487–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16791265/>
119. Connor DE, Exner T, Ma DDF, Joseph JE. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost* [Internet]. 2010 [cited 2022 Jul 21];103(5):1044–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20390225/>
120. Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G, Geraci F. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2022 Jul 21];306(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24452373/>
121. Surman M, Stępień E, Hoja-Łukowicz D, Przybyło M. Deciphering the role of ectosomes in cancer development and progression: focus on the proteome. *Clin Exp Metastasis* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2023 Apr 27];34(3–4):273–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28317069/>
122. Ratajczak MZ, Ratajczak J. Extracellular microvesicles/exosomes: discovery, disbelief, acceptance, and the future? Vol. 34, *Leukemia*. Springer Nature; 2020. p. 3126–35.
123. Dow R, Ridger V. Neutrophil microvesicles and their role in disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2021 Dec 1;141.
124. Kolonics F, Kajdácsi E, Farkas VJ, Veres DS, Khamari D, Kittel Á, et al. Neutrophils produce proinflammatory or anti-inflammatory extracellular vesicles depending on the environmental conditions. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2022 Aug 21];109(4):793–806. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/JLB.3A0320-210R>
125. Bonaventura A, Montecucco F, Dallegri F, Carbone F, Lüscher TF, Camici GG, et al. Novel findings in neutrophil biology and their impact on cardiovascular disease.

- Cardiovasc Res [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2023 Apr 16];115(8):1266–85. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article/115/8/1266/5421166>
126. Soni S, Garner JL, O’Dea KP, Koh M, Finney L, Tirlapur N, et al. Intra-alveolar neutrophil-derived microvesicles are associated with disease severity in COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2021 [cited 2023 Apr 17];320(1):L73–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33146567/>
 127. Pitanga TN, de Aragão França L, Rocha VCJ, Meirelles T, Matos Borges V, Gonçalves MS, et al. Neutrophil-derived microparticles induce myeloperoxidase-mediated damage of vascular endothelial cells. *BMC Cell Biol* [Internet]. 2014 Jun 11 [cited 2023 Apr 17];15(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24915973/>
 128. Dengler V, Downey GP, Tudor RM, Eltzschig HK, Schmidt EP. Neutrophil intercellular communication in acute lung injury. Emerging roles of microparticles and gap junctions. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2013 Jul [cited 2023 Apr 17];49(1):1–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23815257/>
 129. Rhys HI, Dell’Accio F, Pitzalis C, Moore A, Norling L V., Perretti M. Neutrophil Microvesicles from Healthy Control and Rheumatoid Arthritis Patients Prevent the Inflammatory Activation of Macrophages. *EBioMedicine* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2023 Apr 17];29:60–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29449195/>
 130. Jansen F, Yang X, Franklin BS, Hoelscher M, Schmitz T, Bedorf J, et al. High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2022 Aug 21];98(1):94–106. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article/98/1/94/313999>
 131. Vítková V, Živný J, Janota J. Endothelial cell-derived microvesicles: Potential mediators and biomarkers of pathologic processes. Vol. 12, *Biomarkers in Medicine*. Future Medicine Ltd.; 2018. p. 161–75.
 132. Kowal J, Tkach M. Dendritic cell extracellular vesicles. *Int Rev Cell Mol Biol* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2023 Apr 19];349:213–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31759432/>
 133. Angelot F, Seillès E, Biichlé S, Berda Y, Gaugler B, Plumas J, et al. Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases. *Haematologica* [Internet]. 2009 Nov [cited 2023 Apr 19];94(11):1502–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19648164/>

134. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest*. 1999 Jul 1;104(1):93–102.
135. Gkaliagkousi E, Nikolaidou B, Gavriilaki E, Lazaridis A, Yiannaki E, Anyfanti P, et al. Increased erythrocyte- and platelet-derived microvesicles in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res*. 2019 Sep 1;16(5):458–65.
136. Ye W, Chew M, Hou J, Lai F, Leopold SJ, Loo HL, et al. Microvesicles from malaria-infected red blood cells activate natural killer cells via MDA5 pathway. *PLoS Pathog* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2023 Apr 19];14(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30286211/>
137. Ye W, Chew M, Hou J, Lai F, Leopold SJ, Loo HL, et al. Microvesicles from malaria-infected red blood cells activate natural killer cells via MDA5 pathway. *PLoS Pathog* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2023 Apr 19];14(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30286211/>
138. Stavrou EX. Thromboinflammatory effects of RBC microvesicles. *Blood* [Internet]. 2020 Mar 5 [cited 2023 Apr 19];135(10):708–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32135018/>
139. Strack K, Lauri N, Maté SM, Saralegui A, Muñoz-Garay C, Schwarzbaum PJ, et al. Induction of erythrocyte microvesicles by Escherichia Coli Alpha hemolysin. *Biochem J* [Internet]. 2019 [cited 2023 Apr 19];476(22):3455–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31661116/>
140. Noubouossie DF, Henderson MW, Mooberry M, Ilich A, Ellsworth P, Piegore M, et al. Red blood cell microvesicles activate the contact system, leading to factor IX activation via 2 independent pathways. *Blood* [Internet]. 2020 Mar 5 [cited 2023 Apr 19];135(10):755–65. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/135/10/755/431281/Red-blood-cell-microvesicles-activate-the-contact>
141. Shefler I, Salamon P, Reshef T, Mor A, Mekori YA. T cell-induced mast cell activation: a role for microparticles released from activated T cells. *J Immunol* [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2022 Aug 21];185(7):4206–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20810987/>
142. Shefler I, Pasmanik-Chor M, Kidron D, Mekori YA, Hershko AY. T cell-derived microvesicles induce mast cell production of IL-24: Relevance to inflammatory skin diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2014;133(1).
143. Kornek M, Popov Y, Libermann TA, Afdhal NH, Schuppan D. Human T cell microparticles circulate in blood of hepatitis patients and induce fibrolytic activation of hepatic stellate cells. *Hepatology* [Internet]. 2011 Jan [cited 2023 Apr 19];53(1):230–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20979056/>

144. Vdovenko D, Balbi C, Di Silvestre D, Passignani G, Puspitasari YM, Zarak-Crnkovic M, et al. Microvesicles released from activated CD4+ T cells alter microvascular endothelial cell function. *Eur J Clin Invest* [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2023 Apr 19];52(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35316536/>
145. Ghosh AK, Secreto CR, Knox TR, Ding W, Mukhopadhyay D, Kay NE. Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. *Blood* [Internet]. 2010 Mar 4 [cited 2023 Apr 23];115(9):1755–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20018914/>
146. Ayre DC, Chute IC, Joy AP, Barnett DA, Hogan AM, Grull MP, et al. CD24 induces changes to the surface receptors of B cell microvesicles with variable effects on their RNA and protein cargo. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2023 Apr 23];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28819186/>
147. Miguet L, Béchade G, Fornecker L, Zink E, Felden C, Gervais C, et al. Proteomic analysis of malignant B-cell derived microparticles reveals CD148 as a potentially useful antigenic biomarker for mantle cell lymphoma diagnosis. *J Proteome Res* [Internet]. 2009 Jul 6 [cited 2023 Apr 23];8(7):3346–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19413345/>
148. Goubran H, Sabry W, Kotb R, Seghatchian J, Burnouf T. Platelet microparticles and cancer: An intimate cross-talk. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2022 Aug 21];53(2):168–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26542350/>
149. Lazar S, Goldfinger LE. Platelets and extracellular vesicles and their cross talk with cancer. *Blood* [Internet]. 2021 Jun 10;137(23):3192–200. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/137/23/3192/475897/Platelets-and-extracellular-vesicles-and-their>
150. Yan J, Bao H, Fan YJ, Jiang ZL, Qi YX, Han Y. Platelet-derived microvesicles promote endothelial progenitor cell proliferation in intimal injury by delivering TGF- β 1. *FEBS J* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Apr 19];287(23):5196–217. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.15293>
151. Suades R, Padró T, Vilahur G, Badimon L. Platelet-released extracellular vesicles: the effects of thrombin activation. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2023 Apr 19];79(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35288766/>
152. Rautou PE, Leroyer AS, Ramkhalawon B, Devue C, Duflaut D, Vion AC, et al. Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. *Circ Res* [Internet]. 2011 Feb 4 [cited 2022 Aug 21];108(3):335–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21164106/>

153. Wang JG, Williams JC, Davis BK, Jacobson K, Doerschuk CM, Ting JPY, et al. Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1 β -dependent manner. *Blood* [Internet]. 2011 Aug 8 [cited 2022 Aug 21];118(8):2366. Available from: [/pmc/articles/PMC3162361/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23660000/)
154. Brambilla M, Talmon M, Canzano P, Fresu LG, Brunelleschi S, Tremoli E, et al. Different Contribution of Monocyte-and Platelet-Derived Microvesicles to Endothelial Behavior. *Int J Mol Sci*. 2022 May 1;23(9).
155. Chung SY, Tong MS, Sheu JJ, Lee FY, Sung PH, Chen CJ, et al. Short-term and long-term prognostic outcomes of patients with ST-segment elevation myocardial infarction complicated by profound cardiogenic shock undergoing early extracorporeal membrane oxygenator-assisted primary percutaneous coronary intervention. *Int J Cardiol* [Internet]. 2016 Nov 15 [cited 2023 Apr 23];223:412–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27544596/>
156. Nomura S, Ozaki Y, Ikeda Y. Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thromb Res* [Internet]. 2008 [cited 2023 Apr 23];123(1):8–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18667228/>
157. Steppich BA, Braun SL, Stein A, Demetz G, Groha P, Schömig A, et al. Plasma TF activity predicts cardiovascular mortality in patients with acute myocardial infarction. *Thromb J* [Internet]. 2009 Jul 2 [cited 2023 Apr 23];7:11. Available from: [/pmc/articles/PMC2714503/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18667228/)
158. Chiva-Blanch G, Laake K, Myhre P, Bratseth V, Arnesen H, Solheim S, et al. Platelet-, monocyte-derived and tissue factor-carrying circulating microparticles are related to acute myocardial infarction severity. *PLoS One* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2023 Apr 23];12(2). Available from: [/pmc/articles/PMC5313202/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27544596/)
159. Guervilly C, Bonifay A, Burtey S, Sabatier F, Cauchois R, Abdili E, et al. Dissemination of extreme levels of extracellular vesicles: tissue factor activity in patients with severe COVID-19. *Blood Adv* [Internet]. 2021 Feb 2 [cited 2022 Aug 24];5(3):628. Available from: [/pmc/articles/PMC7846479/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27544596/)
160. Nieri D, Neri T, Petrini S, Vagaggini B, Paggiaro P, Celi A. Cell-derived microparticles and the lung. *Eur Respir Rev* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2022 Aug 24];25(141):266–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27581826/>
161. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin A v., Panteleev MA, Krymskaya O v., et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost* [Internet]. 2007 Mar [cited 2022 Aug 24];97(3):425–34. Available from: <http://www.thieme-connect.de/products/ejournals/html/10.1160/TH06-06-0313>
162. Garnier Y, Claude L, Hermant P, Sachou E, Claes A, Desplan K, et al. Plasma microparticles of intubated COVID-19 patients cause endothelial cell death, neutrophil adhesion and netosis, in a phosphatidylserine-dependent manner. *Br J*

- Haematol [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2023 Apr 19];196(5):1159–69. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bjh.18019>
163. Taylor R. Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review. *Journal of Diagnostic Medical Sonography*. 1990;6(1):35–9.
 164. Buzas EI. The roles of extracellular vesicles in the immune system. *Nature Reviews Immunology*. Nature Research; 2022.
 165. Tóké-Füzesi M, Ruzsics I, Rideg O, Kustán P, Kovács GL, Molnár T. Role of microparticles derived from monocytes, endothelial cells and platelets in the exacerbation of COPD. *International Journal of COPD*. 2018;13:3749–57.
 166. Mohan A, Agarwal S, Clauss M, Britt NS, Dhillon NK. Extracellular vesicles: Novel communicators in lung diseases. Vol. 21, *Respiratory Research*. BioMed Central; 2020.
 167. Rand ML, Wang H, Bang KWA, Packham MA, Freedman J. Rapid clearance of procoagulant platelet-derived microparticles from the circulation of rabbits. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2006 Jul [cited 2023 Jul 2];4(7):1621–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16839364/>
 168. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2015 [cited 2023 Jul 2];4(2015):1–60. Available from: </pmc/articles/PMC4433489/>
 169. Willekens FLA, Werre JM, Kruijt JK, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Groenen-Döpp YAM, Van Den Bos AG, et al. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood* [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2023 Jul 2];105(5):2141–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15550489/>
 170. Zahran AM, El-Badawy O, Ali WA, Mahran ZG, Mahran EEMO, Rayan A. Circulating microparticles and activated platelets as novel prognostic biomarkers in COVID-19; relation to cancer. *PLoS One* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2023 Jun 6];16(2). Available from: </pmc/articles/PMC7899358/>
 171. Puga ML, Meneguetti MG, Silvestrini MMA, de Souza Santos LJ, Ferreira-Nogueira R, Basile-Filho A, et al. Performance of microvesicles as biomarkers of clinical outcome in sepsis and trauma: A pilot study. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2022 Feb 1;146.
 172. Phetsouphanh C, Darley DR, Wilson DB, Howe A, Munier CML, Patel SK, et al. Immunological dysfunction persists for 8 months following initial mild-to-moderate SARS-CoV-2 infection. *Nature Immunology* 2022 23:2 [Internet]. 2022 Jan 13 [cited 2023 Jun 14];23(2):210–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41590-021-01113-x>

173. Bonaventura A, Vecchié A, Dagna L, Martinod K, Dixon DL, Van Tassell BW, et al. Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nature Reviews Immunology* 2021 21:5 [Internet]. 2021 Apr 6 [cited 2023 Jun 14];21(5):319–29. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41577-021-00536-9>
174. Guervilly C, Bonifay A, Burtey S, Sabatier F, Cauchois R, Abdili E, et al. Dissemination of extreme levels of extracellular vesicles: tissue factor activity in patients with severe COVID-19. *Blood Adv* [Internet]. 2021 Feb 2 [cited 2023 Jun 18];5(3):628. Available from: </pmc/articles/PMC7846479/>
175. Rosell A, Havervall S, Von Meijenfeldt F, Hisada Y, Aguilera K, Grover SP, et al. Patients With COVID-19 Have Elevated Levels of Circulating Extracellular Vesicle Tissue Factor Activity That Is Associated With Severity and Mortality—Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2023 Jun 18];41(2):878. Available from: </pmc/articles/PMC7837685/>
176. Ware LB. Physiological and biological heterogeneity in COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Jun 19];8(12):1163. Available from: </pmc/articles/PMC7836300/>
177. Gupta A, Madhavan M V., Sehgal K, Nair N, Mahajan S, Sehrawat TS, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2023 Jun 19];26(7):1017–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32651579/>
178. Oran DP, Topol EJ. Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection: A Narrative Review. *Ann Intern Med* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2023 Jun 19];173(5):362–8. Available from: </pmc/articles/PMC7281624/>
179. Tarazona-Fernández A, Rauch-Sánchez E, Herrera-Alania O, Galán-Rodas E, Tarazona-Fernández A, Rauch-Sánchez E, et al. ¿Enfermedad prolongada o secuela pos-COVID-19? *Acta Médica Peruana* [Internet]. 2020 [cited 2023 Jun 20];37(4):565–70. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172020000400565&lng=es&nrm=iso&tlng=es

9 ANEXOS

9.1 PARECER DO CEP: PACIENTES E CONVALESCENTES

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de Biomarcadores Imunológicos em pacientes Convalescentes da infecção pelo Vírus SARS-CoV-2 (COVID-19).

Pesquisador: Adriana Malheiro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30975020.9.0000.0009

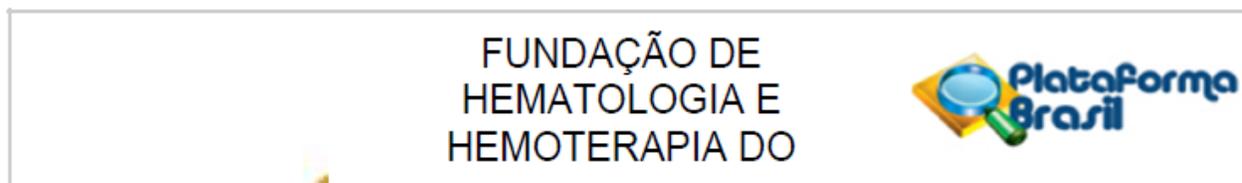
Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.126.784

9.2 PARECER DO CEP: GRUPO CONTROLE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização de microvesículas e seu potencial uso como biomarcador no diagnóstico e tratamento de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica.

Pesquisador: IANDARA MAIRA LOPES DE SOUZA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 48463121.3.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.520.298

9.3 TCLE

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO –
DOADOR DE PLASMA CONVALESCENTE – Grupo 1
CAAE: 30975020.9.0000.0009**

Centro de Pesquisa: Universidade Federal do Amazonas (UFAM)/ Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

Projeto: Estudo de Biomarcadores Imunológicos em pacientes Convalescentes da infecção pelo Vírus SARS-CoV-2 (COVID-19).

Pesquisador Principal: Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

Telefone de contato: (92) 99114-9478

Convidamos o Sr. a participar da pesquisa sobre o estudo de biomarcadores imunológicos (proteínas presentes no sangue) em pacientes que se recuperaram da infecção pelo Coronavírus. O objetivo desta pesquisa é descrever potenciais biomarcadores imunológicos e inflamatórios em Doadores de Plasma obtidos de pacientes que se recuperaram da infecção pelo Vírus SARS-CoV-2 (COVID-19) e associar com a cura e produção de anticorpos nestes indivíduos.

A sua participação é voluntária e se não concordarem participar ou alterar a sua decisão e retirar o consentimento a qualquer momento do estudo, o seu tratamento não será prejudicado. Será possível fazer todas as perguntas que quiser em qualquer momento do estudo. Você tem todo o tempo que quiser para decidir e discutir a situação com pessoas de sua confiança.

Para sua participação há necessidade do preenchimento do questionário de rotina para doação de amostras de sangue (equivalente a duas colheres cheias), verificação de peso e pressão arterial. Além disso, somente serão aceitos indivíduos que possuam resultado de PCR positivo para Coronavírus ou teste rápido IgM/IgG positivos, que estejam assintomáticos por pelo menos 14 dias antes da coleta. Que não tenha recebido transfusão nos últimos 12 meses. Que durante a infecção, apresentaram sintomas clínicos leves ou com necessidade de internação. Que estejam aptos nas triagens clínica, hematológica e laboratoriais de rotina para doação de sangue.

O senhor será entrevistado por um médico/enfermeiro para registro de informações sobre o tempo e sinais clínicos apresentados durante a infecção. Se o senhor estiver apto nas triagens anteriores, será coletada uma amostra de seu sangue para a verificação da presença de anticorpos que protegem contra o Coronavírus e ainda uma amostra do interior de suas narinas e garganta para verificar se o seu organismo eliminou completamente o Coronavírus. Se o senhor estiver apto nas triagens acima, serão realizados os

exames de outras doenças como Hepatite B, Hepatite C, HIV, Sífilis, Chagas e tipagem sanguínea. Com a aptidão nestes exames, será agendada uma coleta de sangue para o estudo e posteriormente, será realizado a coleta de mais duas amostras de seu sangue, 60 e 90 dias após a primeira coleta de amostra para verificar a concentração de anticorpos contra o Coronavírus e das proteínas presentes no seu corpo.

Você não terá qualquer custo ou qualquer forma de pagamento/remuneração por sua participação neste estudo. Solicitamos sua autorização para armazenarmos uma amostra de seu sangue e plasma para uma nova testagem se for necessário e outros exames que não estejam previstos aqui, mas que sejam necessários para o estudo. O sangue coletado ficará armazenado no biorrepositório da Fundação HEMOAM para futuras análises e avaliações ligadas ao projeto. No caso de amostra insuficiente, quebra do tubo, hemólise, o senhor será avisado para que retorne ao HEMOAM para realizar nova coleta de sangue para a realização dos exames.

Se você sofrer algum dano ou intercorrência, deverá falar para alguém da equipe da pesquisa imediatamente ou em caso de emergência, poderá contatar diretamente Dra. Adriana Malheiro Alle Marie, pesquisadora do estudo, através do telefone (92) 99114-9478. Nós lhe daremos toda assistência integral e gratuita e que for necessária para garantir seu bem-estar. Os membros da equipe do projeto de pesquisa irão garantir que você receba assistência imediata caso tenha quaisquer tipos de danos, diretos ou indiretos, imediatos ou tardios, sofridos no decorrer de sua participação na pesquisa, previsto ou não neste documento.

Os riscos de participação neste projeto estão relacionados ao desconforto da punção da veia para coleta das amostras. Durante a coleta de sangue o senhor poderá sentir tremores e dormências nos lábios, desconforto no local da coleta e uma mancha vermelha poderá aparecer no local, mas é uma reação normal a coleta de amostras.

Os benefícios de sua participação estão direcionados ao auxílio no entendimento da doença (COVID-19) e o que ela produz no corpo dos pacientes, além de ser possível identificar proteínas que possam demonstrar os pacientes que irão produzir uma resposta eficiente do organismo ao vírus. Essa pesquisa não trará nenhum tipo de benefício direto ou remuneração de nenhuma espécie para os participantes deste projeto, mas irão ajudar a entender a doença e os pacientes que forem infectados no futuro.

Os exames e procedimentos realizados exclusivamente com fins de pesquisa não implicarão qualquer custo para você. Os acompanhamentos médicos após a doação serão realizados por telefone; se necessário, você receberá um ressarcimento pelos gastos relacionados à sua participação no estudo. Apesar de não haver compensação financeira, ao assinar este termo de consentimento você não renunciará a nenhum dos seus direitos legais, garantidos na regulamentação brasileira de pesquisa envolvendo seres humanos, sendo um de seus direitos a solicitação de indenização.

Você pode ser excluído do estudo se os pesquisadores considerarem oportuno ou se você solicitar, tanto por razões de segurança, por qualquer desconforto que ocorra ou por considerar que você não está

cumprindo os procedimentos solicitados pela equipe do estudo. Em todos os casos, você receberá uma explicação adequada do motivo que ocasionou a sua retirada do estudo. Além disso, o estudo também pode ser cancelado por razões administrativas. Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você se compromete a cumprir com os procedimentos do estudo que foram explicados.

Para obter mais informações sobre este estudo ou para qualquer informação adicional sobre os seus direitos como participante, ou se você quiser fazer uma reclamação, por favor, entre em contato com o pesquisador responsável do estudo: Dra. Adriana Malheiro Alle Marie, no endereço Av. Constantino Nery, 4397, Bloco E, 1º andar, Chapada, Manaus - AM; telefone (92) 99114-9478; e-mail malheiroadriana@yahoo.com.br.

Em caso de dúvidas, denúncias ou reclamações sobre a sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM); e-mail: cephemoam@gmail.com; endereço: na Av. Constantino Nery, 4397-Chapada, Bloco A, 2º andar, Sala 13 (CEP-HEMOAM), Chapada, Manaus - AM; telefone: (92) 3655-0114. O horário de funcionamento do CEP é de 8 às 14 horas, de segunda à sexta-feira.

Eu li este documento ou ele foi lido para mim, fico ciente e concordo em fazer a doação.

Eu (nome completo), _____

- Tive a oportunidade de tirar dúvidas sobre o estudo.
- Recebi informações suficientes sobre o estudo.
- Serei informado regularmente sobre qualquer informação que possa afetar a minha disponibilidade em continuar a minha participação no estudo.
- Autorizo o acesso às minhas informações confidenciais.
- Autorizo o processamento de minhas informações e amostras.
- Entendo que receberei uma via deste termo.
- Entendo que a minha participação é voluntária.
- Entendo que posso retirar o meu consentimento e concluir a minha participação:
 1. Em qualquer momento
 2. Sem dar qualquer explicação
 3. Sem que prejudique meu tratamento posterior

Ofereço livremente o meu acordo para participar deste estudo e dou o meu consentimento para acessar e usar os meus dados nas condições descritas neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

() SIM () NÃO

