

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**RODRIGO BARBOSA AIRES**

**TROMBOELASTOMETRIA ROTACIONAL COMO BIOMARCADOR DE  
FORMAS GRAVES DE COVID-19 E SUA POSSÍVEL APLICABILIDADE  
EM ALGORITMO DE DECISÃO PARA INTERVENÇÕES  
TERAPÊUTICAS**

**BRASÍLIA**

**2022**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

RODRIGO BARBOSA AIRES

**TROMBOELASTOMETRIA ROTACIONAL COMO BIOMARCADOR DE  
FORMAS GRAVES DE COVID-19 E SUA POSSÍVEL APLICABILIDADE  
EM ALGORITMO DE DECISÃO PARA INTERVENÇÕES  
TERAPÊUTICAS**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília

Orientadora: Profa. Dra. Licia Maria Henrique da Mota

Coorientador: Prof. Dr. Olindo Assis Martins-Filho.

BRASÍLIA

2022

BA298t      Barbosa Aires, Rodrigo  
Tromboelastometria rotacional como biomarcador de formas graves de COVID-19 e sua possível aplicabilidade em algoritmo de decisão para intervenções terapêuticas / Rodrigo Barbosa Aires; orientador Lícia Maria Henrique da Mota; co-orientador Olindo Assis Martins-Filho. -- Brasília, 2022.

209 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Médicas) -- Universidade de Brasília, 2022.

1. tromboelastometria. 2. COVID-19. 3. coagulopatia. 4. hemostasia. 5. SARS-CoV-2. I. Henrique da Mota, Lícia Maria, orient. II. Assis Martins-Filho, Olindo, co-orient. III. Título.

RODRIGO BARBOSA AIRES

**TROMBOELASTOMETRIA ROTACIONAL COMO BIOMARCADOR DE  
FORMAS GRAVES DE COVID-19 E SUA POSSÍVEL APLICABILIDADE  
EM ALGORITMO DE DECISÃO PARA INTERVENÇÕES  
TERAPÊUTICAS**

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas  
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Médicas da Universidade de Brasília

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Licia Maria Henrique da Mota** (Presidente)

Professora orientadora do programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de  
Medicina da Universidade de Brasília

**Profa. Dra. Elza Ferreira Noronha**

Professora orientadora do Programa de Pós-graduação do Núcleo de Medicina Tropical da  
Universidade de Brasília

**Profa. Dra. Maria José Carvalho Carmona**

Professora coordenadora do Programa de Pós-graduação em Anestesiologia da Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo

**Prof. Dr. Leopoldo Luiz dos Santos Neto**

Professor orientador do programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de  
Medicina da Universidade de Brasília

**Prof. Dr. Lauro Afonso Côrtes Bogniotti** (Suplente)

Médico Anestesiologista dos Hospitais Sírio-Libanês – Unidade Brasília e Rede D'Or DF Star

Dedico esse trabalho à minha família, que sempre me apoiou e estimulou.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Licia Maria Henrique da Mota, que me estimulou desde o início e que com muita paciência e dedicação permitiu que esse trabalho chegasse ao fim.

Agradeço ao Prof. Dr. Olindo Assis Martins-Filho pela interminável paciência nas diversas sessões de trabalho de análise estatística e tratamento dos dados obtidos.

Agradeço aos Prof. Drs. Laurence Rodrigues do Amaral e Matheus de Souza Gomes pelo tratamento matemático dos dados e construção das Árvores de Decisão.

Agradeço ao Dr. Cleandro Pires de Albuquerque pelo auxílio no delineamento do projeto e análise estatística.

Agradeço à Profa. Dra. Patrícia Shu Kurizky por todas as contribuições para o delineamento do estudo e pela incansável organização do Projeto TARGET.

Agradeço à Profa. Dra. Laila Salmen Espíndola pelo incondicional apoio institucional e financeiro na execução do estudo.

Agradeço às Dras. Maíra Rocha Machado de Carvalho, Gabriela Porfírio Jardim, Francielle Pulcinelli Martins e Eliana Teles de Góis pela participação ativa na inclusão de pacientes e coleta de amostras.

Agradeço aos professores membros da banca examinadora Profa. Dra Licia Maria, Profa. Dra. Elza, Profa. Dra. Maria José, Prof. Dr. Leopoldo e Prof. Dr. Lauro pelas valiosas contribuições ao trabalho.

Agradeço ao Luis Henrique Cardoso Oliveira pela sua inestimável ajuda na adaptação das imagens utilizadas como ilustração desse documento.

Agradeço ao laboratório DASA pelo auxílio para execução dos exames, particularmente ao Nilson, Larissa e todas as analistas que prontamente executaram os testes.

Agradeço à Werfen do Brasil pelo auxílio no fornecimento de insumos para os testes da tromboelastometria.

Agradeço aos pacientes que, mesmo em um momento de medo e incertezas, se dispuseram a contribuir para a geração de conhecimento durante a pandemia.

“Você não pode mudar o vento, mas pode ajustar as velas do barco para chegar onde quer.”

(Autor incerto)



## RESUMO

**Fundamentos:** Desde o início da pandemia da Doença pelo Corona Vírus de 2019 (COVID-19), observou-se aumento da incidência de fenômenos tromboembólicos em todos os territórios vasculares, com alta prevalência de tromboembolismo pulmonar. Apesar da evidente alteração da hemostasia, os exames de avaliação da coagulação rotineiramente utilizados (D-dímeros, Tempo de Atividade da Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada) não são capazes de diferenciar as distintas fases de formação e dissolução do coágulo, nem de quantificar o excesso ou deficiência dos participantes desse complexo sistema biológico. A tromboelastometria como método de avaliação da coagulação, tem potencial para suprir muitas dessas lacunas e parâmetros tromboelastométricos poderiam possivelmente ser utilizados como ferramentas para tomada de decisões clínicas terapêuticas.

**Objetivo:** Nosso objetivo foi descrever o perfil tromboelastométrico de pacientes diagnosticados com COVID-19, tanto na forma grave quanto na forma não-grave e avaliar a possibilidade de utilização de parâmetros tromboelastométricos como biomarcadores de formas graves.

**Pacientes e Métodos:** Foi realizado um estudo transversal, com a inclusão sucessiva de pacientes que procuraram assistência hospitalar com confirmação de COVID-19 por reação em cadeia de polimerase (PCR). Todos os pacientes e os controles normais tiveram sangue venoso coletado para avaliação pela tromboelastometria rotacional (ROTEM®). Foram avaliados os testes da via extrínseca da coagulação (EXTEM), da via intrínseca (INTEM), avaliação funcional do fibrinogênio (FIBTEM) e estudo sem ativadores (NATEM).

**Resultados:** Foram incluídos 41 pacientes com diagnóstico de COVID-19, sendo 21 graves, 20 não-graves, além de 09 controles normais. Os pacientes graves mostraram perfil tromboelastométrico hipercoagulável, caracterizado pelo aumento da amplitude máxima do coágulo (MCF), do ângulo alfa (ALPHA) e do Índice do Potencial Trombodinâmico (TPI). O marcador de fibrinólise, a lise máxima (ML), não foi diferente entre os grupos. Pacientes não-graves apresentaram comportamento mais parecido com os controles normais, exceto para o teste sem ativadores (NATEM) que, assim como nos graves, mostrou valores do Tempo de Coagulação (CT) estatisticamente reduzidos em relação aos controles normais, demonstrando a presença de ativadores endógenos da hemostasia. Construímos Árvores de Decisão com parâmetros tromboelastométricos para separar pacientes graves de não-graves, graves de controles normais, não-graves de controles normais e controles normais de pacientes COVID-

19. O parâmetro que melhor mostrou capacidade de diferenciação foi o MCF da avaliação funcional do fibrinogênio (FIBTEM).

**Conclusão:** Pacientes COVID-19 graves apresentaram nítido padrão hipercoagulável no ROTEM®. Pacientes não-graves, assim como os graves, mostraram ativação endógena da hemostasia no teste NATEM. Nossa amostra não mostrou diferenças quanto à ocorrência de fibrinólise. Foi possível a utilização de parâmetros tromboelastométricos para gerar Árvores de Decisão com intuito de tomada de decisões terapêuticas, diferenciando pacientes graves de não-graves.

**Palavras-chave:** tromboelastometria; COVID-19; coagulopatia; SARS-CoV-2; hemostasia; Árvore de Decisão

## ABSTRACT

**Background:** Since the beginning of the 2019 Corona Virus Disease (COVID-19) pandemic, increased incidences of thromboembolic phenomena have been observed in all vascular territories with a high prevalence of pulmonary thromboembolism. Despite the evident alteration of hemostasis, the tests routinely used to evaluate the coagulation (D-dimers, Prothrombin Activity Time and Activated Partial Thromboplastin Time) are not capable of differentiating the different stages of clot formation and dissolution, nor of quantifying the excess or deficiency of the participants of this complex biological system. Thromboelastometry as a coagulation assessment method has the potential to fill many of these gaps and thromboelastometric parameters could possibly be used as tools for therapeutic clinical decisions.

**Objective:** Our objective was to describe the thromboelastometric profile of patients with severe and non-severe forms of COVID-19 and to evaluate the possibility of using thromboelastometric parameters as biomarkers of severe forms.

**Patients and Methods:** A cross-sectional study was carried out with successive inclusion of patients seeking hospital care with confirmation of COVID-19 by polymerase chain reaction (PCR). All patients and normal controls had venous blood drawn for evaluation of rotational thromboelastometry (ROTEM®). The tests of the extrinsic pathway of coagulation (EXTEM), the intrinsic pathway (INTEM), functional assessment of fibrinogen (FIBTEM) and study without activators (NATEM) were evaluated.

**Results:** 41 patients were included, classified as 21 critically ill and 20 non-severe, besides 9 normal controls. Severe patients were characterized by a hypercoagulable profile, with increased Maximum Clot Firmness (MCF), alfa angle (ALPHA), and Thrombodynamic Potential Index (TPI). The fibrinolysis marker, maximum lysis (ML), was not different between groups. Non-severe patients behave more similarly to normal controls, except for the Clotting Time (CT) in the non-activated test (NATEM), which was statistically reduced as was observed for severe patients, demonstrating the presence of endogenous activators of hemostasis. We constructed Decision Trees with thromboelastometric parameters to separate severe from non-severe patients, severe from normal controls, non-severe from normal controls and controls from COVID-19 patients. The parameter that best showed the ability to differentiate both forms of the disease was the MCF of FIBTEM.

**Conclusion:** Severe COVID-19 patients have a clear hypercoagulable pattern in ROTEM®. Severe and non-severe patients showed endogenous activation of coagulation. Our sample did

not show differences regarding the occurrence of fibrinolysis. It was possible to use thromboelastometric parameters to generate Decision Trees for therapeutic decision-making differentiating critically ill patients from non-serious patients.

**Keywords:** thromboelastometry; COVID-19; coagulopathy; SARS-CoV-2; hemostasis; Decision Tree

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Epidemias de Coronavírus ao longo do tempo .....	25
Figura 2: A estrutura do SARS-CoV-2 .....	27
Figura 3: Ciclo viral do SARS-CoV-2 .....	29
Figura 4: Fases de evolução da COVID-19 e potenciais terapias .....	39
Figura 5: Método tromboelastométrico para avaliação do coágulo .....	53
Figura 6: Exemplo de resultado do teste EXTEM .....	56
Figura 7: Exemplo de resultado do teste INTEM .....	57
Figura 8: Exemplo de resultado do teste FIBTEM .....	58
Figura 9: Exemplo de resultado do teste NATEM .....	59
Figura 10: Exemplo de resultado do teste HEPTTEM .....	60
Figura 11: Exemplo de resultado do teste APTEM .....	61
Figura 12: Parâmetros tromboelastométricos em pacientes COVID-19 e controles normais .....	85
Figura 13: Parâmetros tromboelastométricos em pacientes COVID-19 de acordo com a gravidade da doença.....	90
Figura 14: Proposta de Árvores de Decisão com parâmetros tromboelastométricos para diferenciar pacientes COVID-19 de acordo com a gravidade da doença.....	101
Figura 15: Curvas ROC e TG-ROC utilizadas para a construção das Árvores de Decisão.....	102
Figura 16: Curvas ROC e TG-ROC utilizadas para a construção das Árvores de Decisão.....	103
Figura 17: Análise passo-a-passo com parâmetros tromboelastométricos para classificar pacientes COVID-19 de acordo com a gravidade da doença.....	106

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Valores de referência da tromboelastometria rotacional.....	62
Tabela 2: Características basais dos participantes do estudo.....	82
Tabela 3: Parâmetros tromboelastométricos em pacientes COVID-19 e indivíduos normais....	87
Tabela 4: Parâmetros tromboelastométricos em indivíduos normais e pacientes não-graves e graves .....	92
Tabela 5: Performance dos parâmetros tromboelastométricos como biomarcadores para classificar pacientes COVID-19.....	95
Tabela 6: Performance dos parâmetros tromboelastométricos como biomarcadores para avaliar a evolução de pacientes COVID-19 .....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A5: Amplitude do coágulo em 5 minutos na tromboelastometria
- A10: Amplitude do coágulo em 10 minutos na tromboelastometria
- ACE2: Enzima Conversora da Angiotensina-2 (do inglês *Angiotensin Converting Enzyme-2*)
- ADAM-17: Desintegrina A e Metaloproteinase 17 (do inglês *A Disintegrin and Metalloproteinase 17*)
- ADAMTS13: Enzima metabolizadora do Fator de von Willebrand (do inglês *A Disintegrin and Metalloprotease with eight Thrombospondin-1-like, member 13*)
- AINE: Anti-Inflamatório Não Esteroidal
- ALT: Alanina aminotransferase
- Ang 1-7: Angiotensina 1-7
- Ang 1-9: Angiotensina 1-9
- Ang II: Angiotensina II
- Anti-β2GPI: Anti-beta 2 Glicoproteína I
- APTEM: Teste confirmatório contendo antifibrinolítico que confirma a presença de fibrinólise
- ARDS: Síndrome Respiratória Aguda (do inglês *Acute Respiratory Distress Syndrome*)
- AST: Aspartato aminotransferase
- AT1R: Receptor tipo 1 da Angiotensina II (do inglês *Angiotensin II type 1 receptor*)
- AT2R: Receptor tipo 2 da Angiotensina II (do inglês *Angiotensin II type 2 receptor*)
- ATP: Adenosinatrifosfato (do inglês *Adenosine TriPhosphate*)
- AVC: Acidente vascular cerebral
- AUC: Área sob a Curva (do inglês *Area Under the Curve*)
- BatCoV RaTG13: Coronavírus de morcego (do inglês *Bat Coronavirus*)
- BATF: Gene transcricional (do inglês *Basic leucine zipper Transcription Factor*)
- BNP: Peptídeo Natriurético Cerebral (do inglês *Brain Natriuretic Peptide*)
- BCoV: Coronavírus Bovino (do inglês *Bovine CoronaVirus*)
- C3: Componente 3 do Complemento (do inglês *Complement Component 3*)
- CAHA: Anormalidades Hemostáticas Associadas à COVID-19 (do inglês *COVID-19 Associated Hemostatic Abnormalities*)
- CART Cell therapy: Terapia com Células T com Receptores de Antígeno Quimérico (do inglês *Chimeric antigen receptor T cell therapy*)

CCL2: Ligante 2 de Quimiocina (do inglês *Chemokine ligand 2* ou *Monocyte chemotactic protein 1*)

CCL7: Ligante 7 de Quimiocina (do inglês *Chemokine ligand 7* ou *Monocyte chemotactic protein 3*)

CCL12: Ligante 12 de Quimiocina (do inglês *Chemokine ligand 12* ou *Monocyte chemotactic protein 5*)

CD4<sup>+</sup>: Grupamento de Diferenciação (do inglês *Cluster Differentiation 4*)

CD61<sup>+</sup>: Grupamento de Diferenciação (do inglês *Cluster Differentiation 61*)

CD62L: Molécula de Adesão de Leucócitos (também conhecida como L-Selectina)

CD8<sup>+</sup>: Grupamento de Diferenciação (do inglês *Cluster Differentiation 8*)

CEACAM1: Molécula de Adesão Celular Relacionada ao Antígeno Carcinoembriogênico (do inglês *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*)

Células Treg: Células T reguladoras (do inglês *T regulatory Cells*)

CFT: Tempo de Formação do Coágulo; tempo para a amplitude evoluir de 2 mm até 20 mm na tromboelastometria (do inglês *Clot Formation Time*)

CIVD: Coagulação Intravascular Disseminada

CK: Creatina kinase

COVID-19: Doença do Coronavírus de 2019 (do inglês *Corona Virus Disease 2019*)

CT: Tempo de Coagulação; tempo desde o início da formação do coágulo até amplitude de 2mm na tromboelastometria (do inglês *Clotting Time*)

CXCR3: Receptor de Quimiocina (do inglês *Chemokine Receptor*)

DAMPs: Padrões Moleculares Associados a Danos (do inglês *Damage-Associated Molecular Patterns*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (do inglês *DeoxyriboNucleic Acid*)

DPP4: Dipeptidil peptidase-4 (do inglês *DiPeptidil-Peptidase 4*)

EXTEM: Teste que avalia a via EXtrínseca da coagulação e fibrinólise na tromboelastometria

FC: Fator da Coagulação

Fc: Fragmento Cristalizável (do inglês *Fragment crystalline*)

FiO<sub>2</sub>: Fração Inspirada de Oxigênio

FIPV: Vírus da Peritonite Infeciosa de Felinos (do inglês *Feline Infectious Peritonitis Virus*)

FP: Peptídeo de Fusão (do inglês *Fusion Peptide*)

GCSF: Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos (do inglês *Granulocyte colony-stimulating factor*)

GM-CSF: Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (do inglês *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

HCoV-229E: Coronavírus Humano 229E (do inglês *Human Coronavirus 229E*)

HCoV-HKU1: Coronavírus Humano HKU1 (do inglês *Human Coronavirus HKU1*)

HCoV-NL63: Coronavírus Humano NL63 (do inglês *Human Coronavirus NL63*)

HCoV-OC43: Coronavírus Humano OC43 (do inglês *Human Coronavirus OC43*)

HEPTEM: Teste confirmatório contendo HEParinase que avalia a presença de heparina na amostra sanguínea na tromboelastometria

HR: Regiões de repetições do Heptal (do inglês *Heptad Repeat Region*)

HUB: Hospital Universitário de Brasília

IAM: Infarto Agudo do Miocárdio

IBV: Vírus da Bronquite Infecciosa (do inglês *Infectious Bronchitis Virus*)

INF  $\alpha/\beta$ : Interferon  $\alpha$  e/ou  $\beta$  (Interferon tipo I)

INF- $\gamma$ : Interferon -  $\gamma$  (Interferon tipo II)

INF- $\lambda$ : Interferon  $\lambda$  (Interferon tipo III)

IFITM1: Proteína Transmembrana 1 Induzida por Interferon (do inglês *InterFeron Induced TransMembrane protein 1*)

IFIT2: Proteína Induzida por Interferon com Repetições de Tetratricopeptídeos (do inglês *InterFeron-Induced protein with Tetratricopeptide repeats 2*)

IgA, IgG, IgM: Imunoglobulina A, G ou M (do inglês *Immunoglobulin A, G or M*)

IL-8: Interleucina-8 (do inglês *Interleukin-8*)

ILC: Células Linfoides Inatas (do inglês *Innate Lymphoid Cells*)

INTEM: Teste que avalia a via INtrínseca e presença de heparina não-fracionada na tromboelastometria

IP-10: Proteína 10 Induzida por Interferon (do inglês *Interferon induced Protein 10*)

IRF4: Fator Regulador do Interferon 4 (do inglês *Interferon Regulatory Factor 4*)

ISG: Gene Estimulado por Interferon (do inglês *Interferon Stimulated Gene*)

ISTH: Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (do inglês *International Society of Thrombosis and Haemostasis*)

JAK-STAT: Transdutor de Sinal Janus Quinase e Ativador da Transcrição (do inglês *Janus Kinases Signal Transducer and Activator of Transcription proteins*)

LDH: Lactato desidrogenase

- LFA-1: Antígeno 1 Associado à Função Linfocitária (do inglês *Leukocyte Function-associated Antigen 1*)
- LMWH: Heparina de Baixo Peso Molecular (do inglês *Low Molecular Weight Heparin*)
- MasR: Receptor da Angiotensina 1-7 (do inglês *Mas Receptor*)
- MCF: Amplitude máxima do coágulo na tromboelastometria (do inglês *Maximum Clot Firmness*)
- MCP-1: Proteína 1 Quimioatraente de Monócitos (do inglês *Monocyte Chemoattractant Protein-1*)
- MERS-CoV: Síndrome Respiratória do Oriente Médio por Coronavírus (do inglês *Middle Eastern Respiratory Syndrome – Coronavirus*)
- MHV: Virus da Hepatite Murina (do inglês *Murine Hepatitis Virus*)
- MIP: Proteína Inflamatória de Macrófagos (do inglês *Macrophage Inflammatory Protein*)
- ML: Lise máxima; percentual de queda na amplitude do coágulo ao final de 60 minutos na tromboelastometria (do inglês *Maximum Lysis*)
- MPO: Mieloperoxidase (do inglês *Myeloperoxidase*)
- MX1: Proteína de Ligação ao GTP induzida por Interferon (do inglês *Interferon-induced GTP-binding protein*)
- NAAT: Teste de Amplificação de Ácidos Nucleicos (do inglês *Nucleic Acid Amplification Test*)
- NATEM: Teste sem ativadores da coagulação
- NET: Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*)
- NF- $\kappa$ B: Fator Nuclear  $\kappa$ B (do inglês *Nuclear Factor kappa B*)
- NLR: Família de Genes NLR (do inglês *NB-LRR - Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat proteins - related gene family*)
- NK: Células Matadoras Naturais (do inglês *Natural Killer*)
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- OPAS: Organização Panamericana de Saúde
- ORF8: Proteína não estrutural codificada pelo RNA do Coronavírus
- ORF3a: Proteína não estrutural codificada pelo RNA do Coronavírus
- OxPLs: Fosfolípidos Oxidados (do inglês *Oxidized PhosphoLipids*)
- PAD-4: Enzima Peptidil Arginina Deaminase 4 (do inglês *Peptidil Arginine Deiminase 4*)
- PAI-1: Inibidor do Ativador do Plasminogênio (do inglês *Plasminogen Activator Inhibitor 1*)
- PAMP: Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*)
- PaO<sub>2</sub>: Pressão Parcial de Oxigênio Arterial

PAP: Plasmina-AntiPlasmina

PAR: Receptores Ativados por Protease (do inglês *Protease Activated Receptors*)

PCR: Proteína C Reativa

PDGF: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (do inglês *Platelet Derived Growth Factor*)

POC: Exames realizados no local de cuidado ao paciente (do inglês *Point of care*)

PRR: Receptores de Reconhecimento de Padrões (do inglês *Pattern-Recognition Receptors*)

R0: Número básico de reprodução (do inglês *Basic reproduction number*)

RAS: Sistema Renina-Angiotensina (do inglês *Renin-Angiotensin System*)

RBD: Domínio de Ligação do Receptor (do inglês *Receptor Binding Domain*)

RdRp: Polimerase de RNA dependente de RNA (do inglês *RNA-dependent RNA polymerase*)

RLR: Receptores do tipo RIG (do inglês *RIG - Retinoic acid-Inducible Gene I - Like Receptors*)

ROTEM®: Tromboelastometria; marca registrada

RT-PCR: Reação em Cadeia de Polimerase – Transcriptase Reversa (do inglês *Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*)

SAPS II: Escore Simplificado de Fisiologia Aguda (do inglês *Simplified Acute Physiology Score II*)

SARS: Síndrome Respiratória Aguda Grave (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*)

SARS-CoV: Síndrome Respiratória Aguda Grave por Coronavírus (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome – Coronavirus*)

SARS-CoV-2: Síndrome Respiratória Aguda Grave por Coronavírus 2 (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome - Coronavirus-2*)

SOCS2: Supressor de Sinalização de Citocina 2 (do inglês *Supressor Of Cytokine Signaling 2*)

SOFA: Avaliação Sequencial da Falência Orgânica (do inglês *Sequential Organ Failure Assessment*)

SpO<sub>2</sub>: Saturação periférica de oxigênio

TACE: Enzima de Clivagem do TNF- $\alpha$  (do inglês *TNF- $\alpha$  cleavage enzyme*)

TAFI: Inibidor da Fibrinólise Ativável por Trombina (do inglês *Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor*)

TAP: Tempo de Atividade da Protrombina

TAT: Complexo Trombina-AntiTrombina

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TEG®: Tromboelastografia; marca registrada

TEP: Tromboembolismo pulmonar

TF: Fator Tecidual (do inglês *Tissue Factor*)

TFPI: Inibidor da Via do Fator Tecidual (do inglês *Tissue Factor Pathway Inhibitor*)

Th1: Linfócito T auxiliar do tipo 1 (do inglês *T-helper type-1*)

TLR: Receptores tipo Toll (do inglês *Toll-Like Receptor*)

TMPRSS2: Serino protease Transmembrana do tipo 2 (do inglês *TransMembrane serine protease 2*)

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (do inglês *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* )

t-PA: Ativador do Plasminogênio Tecidual (do inglês *Tissue Plasminogen Activator*)

TPI: Índice do Potencial Trombodinâmico (do inglês *Thrombodynamic Potential Index*)

TRAF6: Fator 6 Associado ao Receptor de TNF (do inglês *TNF Receptor Associated Factor 6*)

TRIF: Interferon  $\beta$  indutor do Adaptador do Domínio TIR (do inglês *TIR domain containing adapter inducing interferon- $\beta$* )

TSR: Terapia de Substituição Renal

TTPA: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

u-PA: Ativador do Plasminogênio tipo Urokinase (do inglês *Urokinase-like Plasminogen Activator*)

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

VLA-4: Antígeno 4 de Ativação Muito Tardia (do inglês *Very Late Activation antigen 4*)

vWF: Fator de von Willebrand (do inglês *von Willebrand Factor*)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>23</b>
<b>1.1 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>23</b>
1.1.1 COVID-19	23
1.1.1.1 Os Coronavírus	24
1.1.1.2 O SARS-CoV-2	25
1.1.1.3 Invasão celular	27
1.1.1.4 Destruição celular	30
1.1.1.5 Fisiopatologia	30
1.1.1.5.1 <i>Realce Dependente de Anticorpos</i>	31
1.1.1.5.2 Tempestade de citocinas	31
1.1.1.5.3 Resposta imunológica inata	32
1.1.1.5.4 Resposta imunológica adaptativa: linhagem mieloide	33
1.1.1.5.5 Resposta imunológica inata: linhagem linfoide	34
1.1.1.5.6 Resposta de células T	34
1.1.1.5.7 Resposta de células B	35
1.1.1.6 Quadro clínico	36
1.1.1.7 Diagnóstico	40
1.1.1.8 Tratamento	43
1.1.1.8.1 Suporte respiratório	43
1.1.1.8.2 Tratamento específico ou contra a resposta do hospedeiro	43
1.1.1.8.3 Tromboprofilaxia	44
1.1.2 Alterações hemostáticas relacionadas à COVID-19	45
1.1.2.1 Definição	45
1.1.2.2 Fisiopatologia	45
1.1.2.2.1 O papel da disfunção endotelial	49
1.1.2.2.2 Participação das plaquetas	50
1.1.2.2.3 Ação dos neutrófilos	51
1.1.2.2.4 O papel da ativação por material genético	51
1.1.2.2.5 Participação dos pulmões nas alterações da hemostasia	51
1.1.2.3 Perfil laboratorial das alterações hemostáticas relacionadas ao SARS-CoV-2	52
1.1.3 Tromboelastometria	53
1.1.3.1 Avaliação da via extrínseca	57
1.1.3.2 Avaliação da via intrínseca	58
1.1.3.3 Avaliação funcional do fibrinogênio	59
1.1.3.4 Avaliação de ativação endógena da coagulação	60
1.1.3.5 Confirmação da presença de heparina não-fracionada	61
1.1.3.6 Confirmação da ocorrência de fibrinólise	63
1.1.3.7 Interpretação	64
1.1.3.8 Limitações	65
1.1.4 Tromboelastometria e a trombose	66
1.1.4.1 Diagnóstico de coagulopatia na sepse e relação com exames padrão	67
1.1.4.2 Alterações na tromboelastometria com valor prognóstico no paciente grave	68
1.1.4.3 Tromboelastometria para prever benefício da anticoagulação	68
1.1.5 Tromboelastometria e COVID-19	69
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>71</b>
<b>3 OBJETIVO</b>	<b>72</b>
<b>3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO</b>	<b>72</b>

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	72
<b>4 PACIENTES E MÉTODOS</b>	<b>73</b>
4.1 Tipo de estudo	73
4.2 O Protocolo TARGET	73
4.3 Duração do estudo	74
4.4 População estudada	74
4.5 Critérios de inclusão	74
4.6 Classificação quanto à gravidade da doença	74
4.7 Critérios de exclusão	75
4.8 Instrumento de coleta de dados	75
4.9 Coleta de amostra sanguínea	76
4.10 Tromboelastometria <sup>66, 68</sup>	76
4.10.1 Avaliação da via extrínseca da coagulação (EXTEM)	77
4.10.2 Teste da via intrínseca da coagulação (INTEM)	77
4.10.3 Teste da ativação endógena da hemostasia (NATEM)	77
4.10.4 Avaliação funcional do fibrinogênio (FIBTEM)	78
4.11 Tamanho da amostra	78
4.12 Análise estatística	79
4.13 Tratamento dos dados tromboelastométricos obtidos	79
4.13.1 Determinação de pontos de corte	79
4.13.2 Criação de Árvores de Decisão para uso clínico	80
4.13.3 Representação dos algoritmos na forma de gráficos de dispersão	81
4.13.4 Representação das curvas ROC e TG-ROC utilizadas nos algoritmos	81
4.14 Ética em pesquisa	81
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>83</b>
5.1 PERFIL DA AMOSTRA ESTUDADA	83
5.2 DADOS TROMBOELASTOMÉTRICOS	87
5.2.1 Parâmetros tromboelastométricos em pacientes COVID-19 e controles normais (HC)	87
5.2.2 Parâmetros tromboelastométricos em pacientes COVID-19 de acordo com a gravidade da doença	91
5.2.3 Performance dos parâmetros tromboelastométricos como possíveis biomarcadores para classificar pacientes COVID-19	96
5.2.4 Árvores de Decisão propostas para classificar pacientes COVID-19 de acordo com a gravidade da doença	102
5.2.5 Análise passo-a-passo para classificar pacientes COVID-19 de acordo com a gravidade da doença	107
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>110</b>
6.1 POPULAÇÃO AVALIADA	110
6.1.1 Tamanho da amostra	110
6.1.2 Momento da coleta	110
6.1.3 Descrição da amostra	111
6.2 PARÂMETROS TROMBOELASTOMÉTRICOS	112
6.3 LIMITAÇÕES	116

<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>117</b>
<b>8 PERSPECTIVAS</b>	<b>118</b>
<b>9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA (ARTIGOS PUBLICADOS)</b>	<b>119</b>
<b>10 BIBLIOGRAFIA</b>	<b>120</b>
<b>APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL COM DADOS DE TROMBOELASTOMETRIA Qualis Capes A2 – FI 3,24</b>	<b>131</b>
<b>APÊNDICE B – ARTIGO DE REVISÃO - Qualis Capes A2 – FI 2,727</b>	<b>151</b>
<b>APÊNDICE C – RELATO DE CASO - Qualis Capes B1 – FI 1,498</b>	<b>170</b>
<b>APÊNDICE D – PROTOCOLO TARGET - Qualis Capes B2 – FI 1,25</b>	<b>174</b>
<b>ANEXO A – Parecer da CONEP</b>	<b>188</b>
<b>ANEXO B – Ficha Clínica</b>	<b>196</b>
<b>ANEXO C - TCLE</b>	<b>200</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 REVISÃO DA LITERATURA

#### 1.1.1 COVID-19

O primeiro caso reconhecido como infecção por um vírus até então não identificado, foi de um homem de 41 anos, admitido em um hospital da cidade chinesa de Wuhan, província de Hubei, no dia 26 de dezembro de 2019. Já no dia 31 de dezembro, a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi informada da ocorrência de casos de pneumonia viral de origem desconhecida. Dia 07 de janeiro de 2020, um novo tipo de coronavírus foi identificado e isolado pelos chineses e, no dia 12 de janeiro, a sequência genética foi publicamente divulgada.<sup>1,2</sup> Em menos de 3 meses, em 11 de março de 2020, a OMS declarou estado de pandemia.<sup>2,3</sup>

Filogeneticamente, o previamente denominado 2019-nCoV é muito semelhante (96,2% dos nucleotídeos) a um vírus que provoca Síndrome Aguda Respiratória Grave (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome-like*) em morcegos, o que possibilitou deduzir que o vírus se originou nesses animais.<sup>2,4</sup> Foi detectada pequena diferença em componentes estruturais (na proteína S e do nucleocapsídeo), permitindo especular que o vírus tivesse sofrido alguma mutação, passando a infectar humanos.<sup>2</sup>

Posteriormente, o vírus foi renomeado para SARS-CoV2 pelo *International Committee for Taxonomy of Viruses* e a doença passou a ser chamada pela OMS, em 11 de fevereiro de 2020, de COVID-19 (*Coronavirus Disease-19*).<sup>1-3, 5</sup> Apesar de menos diversificado do que outros vírus como o da influenza, já foram identificadas duas cepas: tipo L (70%) e tipo S (30%). Aparentemente, o tipo L é uma evolução do tipo S, sendo mais agressivo e contagioso.<sup>2, 5</sup>

Como todos os *Betacoronavirus*, o SARS-CoV-2 é um vírus esférico, medindo cerca de 60-140nm. Pode ser inativado por radiação ultravioleta, calor e, quimicamente, por éter, etanol, ácido peroxiacético e clorofórmio.<sup>1,5</sup> Tem viabilidade relativamente longa, sendo de cerca de 3 horas em aerossol, 4 horas sobre superfícies de cobre, até 24 horas em papelão e de 2 a 3 dias em aço inoxidável.<sup>1,4,5</sup> Apesar da persistência em superfícies inanimadas reforçar o potencial de transmissão via fômites, o principal meio de infecção permanece sendo via gotículas em suspensão no ar, transmitidas via contato interpessoal.<sup>6</sup> O Número básico de reprodução (do inglês *Basic reproduction number – R0*) é de 2,2 (95% CI, 1,4-3,9).<sup>5</sup>

### 1.1.1.1 Os Coronavírus

*Coronaviridae* é uma família viral já conhecida dos seres humanos pois, até 2019, outras quatro cepas eram responsáveis por quadros infecciosos de vias aéreas superiores em populações vulneráveis de crianças e idosos.<sup>1,6</sup> São elas: Coronavírus Humano 229E (do inglês *Human Coronavirus 229E – HCoV-229E*), Coronavírus Humano OC43 (do inglês *Human Coronavirus OC43 – HCoV-OC43*), Coronavírus Humano NL63 (do inglês *Human Coronavirus NL63 – HCoV-NL63*) e Coronavírus Humano HKU1 (do inglês *Human Coronavirus HKU1 – HCoV-HKU1*). Estima-se que esses vírus, endêmicos, sejam responsáveis por cerca de 1/3 de todos os casos de resfriados comuns.<sup>2, 7</sup> Já outras duas, Síndrome Respiratória Aguda Grave por Coronavírus (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome – Coronavirus - SARS-CoV*) e Síndrome Respiratória do Oriente Médio por Coronavírus (do inglês *Middle Eastern Respiratory Syndrome – Coronavirus - MERS-CoV*), são responsáveis por quadros respiratórios de vias aéreas inferiores mais graves.<sup>1, 7</sup> Análise filogenética do genoma viral mostrou que SARS-CoV-2 compartilha 79,5% de sua identidade genética com o SARS-CoV e somente 50% com o MERS-CoV. Mas, se considerados domínios conservados de replicases como o ORF1ab (*Open Reading Frame replicase*), a semelhança é de 94,6%, tornando o SARS-CoV-2 um *Betacoronavirus* da linhagem B (*Sarbecovirus*).<sup>5,8</sup>

Os Coronavírus humanos foram descritos em 1965, por Tyrrel & Binoe que cultivaram partículas virais obtidas de um aluno com gripe, tendo sido chamado de B814. Antes disso, porém, em 1937 já havia sido identificado o primeiro Coronavírus em galinhas, o vírus da Bronquite Infecciosa (do inglês *Infectious Bronchitis Virus – IBV*).<sup>2</sup>

Após essa descrição, observaram-se que diversos vírus animais eram relacionados, sendo descrito então o gênero *Coronavirus*, que engloba diversos causadores de doenças animais como o Vírus da Hepatite Murina (do inglês *Murine Hepatitis Virus - MHV*), o já citado IBV de aves, o Vírus da Peritonite Infecciosa de Felinos (do inglês *Feline Infectious Peritonitis Virus – FIPV*), o Vírus da Gastroenterite Transmissível de suínos (do inglês *Transmissible GastroEnteritis Virus*) e o Coronavírus Bovino (do inglês *Bovine CoronaVirus - BCoV*).<sup>1</sup>

Os surtos mais recentes de Coronavírus (Figura 1) provavelmente ocorreram quando houve passagem interespecie a partir de reservatórios animais. Em 2002, foi descrita a SARS, constituída por quadro clínico pneumônico grave, com mortalidade de 10,8%, com provável origem na província chinesa de Guangdong, e possível hospedeiro animal um tipo de gato.<sup>1, 2</sup>

Em 2005 e 2018, foram descritas duas epidemias causadas por HCoV-NL63 e HCoV-HKU1, vírus causadores de quadros mais leves em humanos.<sup>9</sup> Em 2012, a chamada MERS-CoV teve o primeiro caso diagnosticado na Arábia Saudita, com mortalidade muito elevada de 34,4% e com provável origem em dromedários.<sup>1, 2, 4</sup> Em ambos os casos, é possível que o hospedeiro original tenha sido um morcego, que transmitiu para esses animais citados e daí para o ser humano.<sup>2-4</sup> O Coronavírus de morcego (do inglês *Bat Coronavirus* - BatCoV RaTG13) possui 96% de identidade com o SARS-CoV-2, sendo, então, a possível origem do vírus humano um morcego do gênero *Rhinolophusaffinis*, encontrado na província de Yunnan.<sup>5, 10</sup> Da mesma forma que o SARS-CoV e MERS-CoV, o vírus do morcego não é capaz de infectar humanos, a menos que sofra alguma mutação, em geral, passando por outro hospedeiro animal. No caso do SARS-CoV-2, o pangolim tem sido apontado como esse hospedeiro intermediário, já que um CoV desse animal possui 99% de semelhança com o vírus humano.<sup>5, 10</sup>

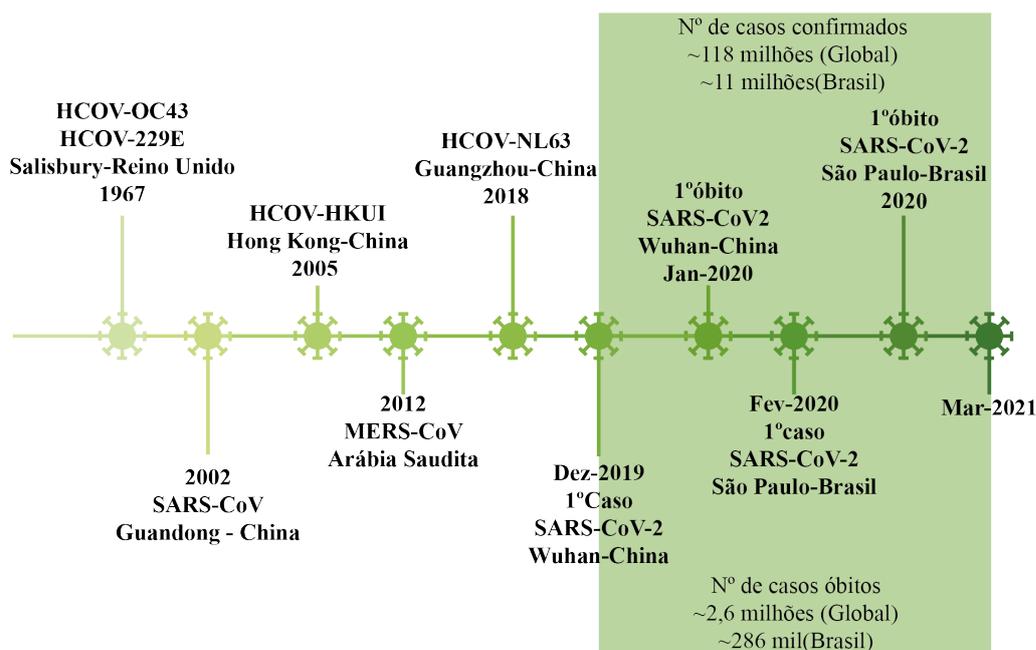


Figura 1: Epidemias de Coronavírus ao longo do tempo. Fonte: autoral, adaptado de Cruz et al<sup>9</sup>. 1967: primeiro caso descrito no Reino Unido; 2005 e 2018: vírus causadores de quadros leves; 2002: epidemia por SARS-CoV; 2012: epidemia por MERS-CoV; 2019: primeiro caso de SARS-CoV-2 na China; 2020: primeira descrição de caso no Brasil

#### 1.1.1.2 O SARS-CoV-2

Membro da ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae*, que possui 04 gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e

*Deltacoronavirus*.<sup>1,2</sup> SARS-CoV e SARS-CoV-2 pertencem ao gênero *Betacoronavirus*. Alfa e Beta infectam mamíferos, enquanto Gamma e Delta infectam primariamente aves.<sup>2, 11</sup>

Os Coronavírus são vírus de RNA que possuem uma fita simples (cerca de 30 kilobases, codificando 9860 aminoácidos), com polaridade positiva (orientação da sequência de bases no sentido 5'-3') e que codifica basicamente quatro estruturas proteicas: a proteína transmembrana, o envelope proteico (proteína E), o nucleocapsídeo (proteína N) e a proteína da espícula (proteína S).<sup>1, 11</sup> Entre os vírus de RNA, o genoma dos Coronavírus está entre os maiores.<sup>2, 5</sup> Externamente, são vírus envelopados por um fragmento de membrana derivada da célula hospedeira (Figura 2).<sup>2</sup>

Além das proteínas estruturais, codificam também proteínas ditas não-estruturais como a Polimerase de RNA dependente de RNA (do inglês *RNA-dependent RNA polymerase – RdRp*).<sup>2</sup> Por sinal, essa proteína, por ser muito suscetível a mutações e erros durante a duplicação, faz com os Coronavírus apresentem muitas diversificações, permitindo que infectem inúmeras espécies animais.<sup>2</sup>

As proteínas S, ORF8 e ORF3a apresentam diferenças importantes em relação às mesmas proteínas do SARS-CoV, o que pode explicar os distintos perfis de transmissibilidade e patogenicidade.<sup>12</sup>

A proteína do nucleocapsídeo (N), liga-se ao material genético viral e se relaciona a processos necessários à replicação viral, participando da montagem e brotamento dos vírus completos.<sup>1,2</sup>

A proteína da espícula, ou Spike (S), como tradicionalmente ficou conhecida, é uma glicoproteína de membrana do tipo 1 com alguns domínios funcionais próximos aos terminais S1 (aminoterminal) e S2 (carboxiterminal).<sup>1</sup> É a responsável pela aparência em coroa vista ao microscópio eletrônico e de onde deriva o nome Corona.<sup>2, 10</sup> A porção S2 tem configuração transmembrana e se relaciona com a fusão da partícula viral às células hospedeiras. Já a porção S1, é mais periférica e tem função de ligação com outros receptores.<sup>10</sup>

Quanto à imunogenicidade, a terminação S1 tende a ser mais antigênica, por induzir à formação de anticorpos neutralizantes em elevados níveis.<sup>1, 11</sup> A proteína S no SARS-CoV-2 é mais estável que no SARS-CoV, podendo explicar a maior infectividade do primeiro.<sup>8</sup>

A proteína transmembrana (M) está diretamente relacionada com a montagem de novas partículas virais. Interage com ribonucleoproteínas do vírus e induz a montagem de envelopes a partir da membrana das células hospedeiras, após excluir proteínas próprias da célula infectada.<sup>1</sup>

Finalmente, a menor proteína é a do envelope (E). Tem suas funções ainda mal conhecidas, pois apenas pequena porção é incorporada ao envelope viral propriamente dito. Evidências sugerem que ela deve participar da montagem viral, podendo ser essencial à liberação das partículas já montadas e, talvez esteja relacionada com a patogênese do SARS-CoV-2.<sup>1</sup>

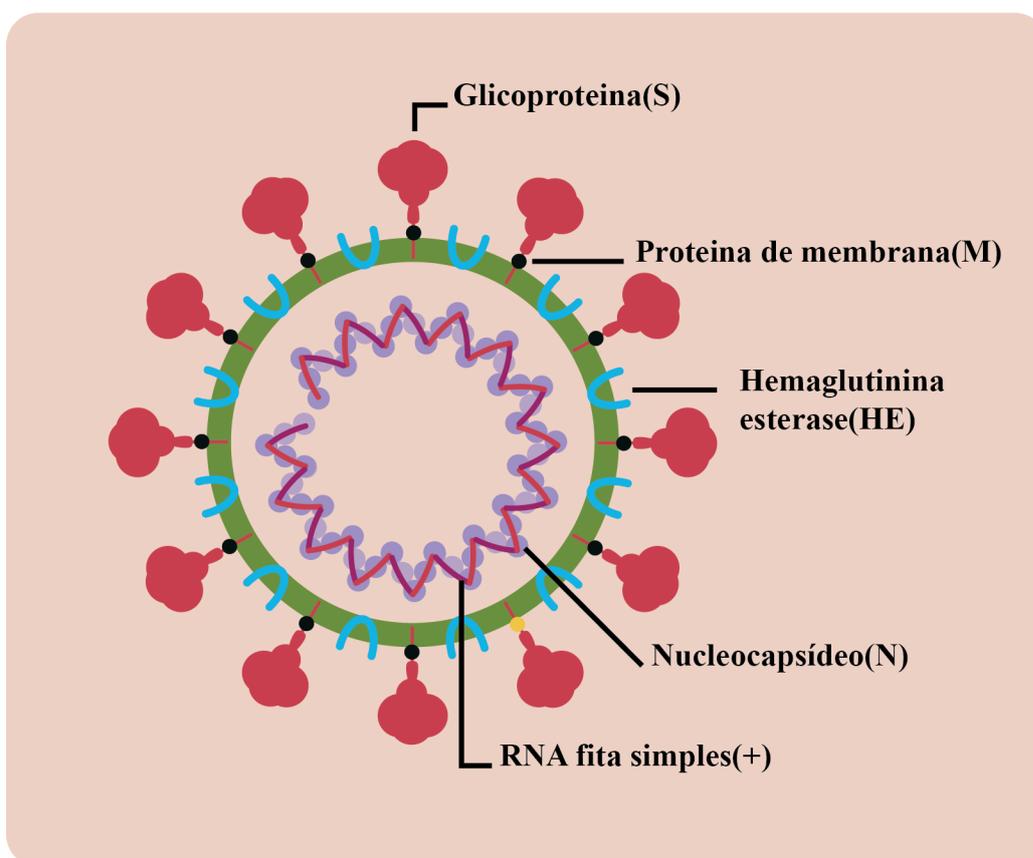


Figura 2: Estrutura do SARS-CoV-2. Fonte: autoral, adaptado de Cruz *et al*<sup>9</sup>

### 1.1.1.3 Invasão celular

O ciclo viral é caracterizado por 05 fases: acoplamento à célula hospedeira, penetração, biossíntese, maturação e liberação de partículas virais (Figura 3).<sup>11</sup>

A ligação do vírus às células hospedeira se dá através do contato da proteína S com o receptor na membrana celular.<sup>2</sup> O SARS-CoV e SARS-CoV-2, além do HCoV-NL63, utilizam a enzima conversora de Angiotensina 2 (do inglês *Angiotensin Converting Enzyme-2 – ACE2*) como seu receptor. HCoV-229E usa a aminopeptidase N, enquanto MERS-CoV se liga à dipeptidil-peptidase 4.<sup>1</sup>

A invasão das células hospedeiras ocorre através da proteína S, composta por duas subunidades, S1 e S2. A subunidade S2 é o cerne da proteína, possui porção transmembrana e participa da fusão à célula hospedeira. Já a subunidade S1 tem como função a ligação a um receptor na célula atacada, notadamente os receptores ACE2 através de um domínio específico, conhecido como Domínio de Ligação do Receptor (do inglês *Receptor Binding Domain - RBD*).<sup>11</sup> S1 possui um domínio N-terminal (NTD) e três domínios C-terminal (CTD1, CTD2 e CTD3). O RBD está localizado no domínio CTD1.<sup>8</sup> Após a ligação à célula hospedeira, ocorre clivagem entre S1 e S2, permitindo que a porção S2 seja ativada e haja fusão com a membrana celular. S2 é formada por duas porções, o Peptídeo de Fusão (do inglês *Fusion Peptide - FP*) e Regiões de repetições do Heptal (do inglês *Heptad Repeat Region - HR*). Ao se aderir à membrana celular, a proteína S2 se dobra, unindo as regiões HR1 e HR2, fazendo com que a membrana viral se funda à membrana celular e libere o material genético no citoplasma hospedeiro.<sup>10</sup>

A afinidade do SARS-CoV-2 pela ACE2 é de 20-30 vezes maior que a do SARS-CoV.<sup>5</sup>  
<sup>8</sup> A ACE2 tem função catalítica, funcionando como grande reguladora do Sistema Renina-Angiotensina (do inglês *Renin-Angiotensin System - RAS*), através da conversão da Angiotensina I em Angiotensina 1-9 e da Angiotensina II em Angiotensina 1-7.<sup>13</sup> Receptores ACE2 estão presentes em diversos tecidos corporais, notadamente pneumócitos 1 e 2, enterócitos, borda em escova de artérias proximais renais, veias e células musculares lisas arteriais. Dito isso, explica-se o tropismo por pulmões, intestino delgado e rins.<sup>1, 13, 14</sup>

O SARS-CoV-2 apresenta modificações de aminoácidos na sua proteína S que aumentaram sua afinidade pela ACE2. Após ligação ao RBD, ocorre um *down-regulation* de ACE2 celular e o vírus se utiliza de diversas proteases do hospedeiro para conseguir penetrar na célula alvo, incluindo a catepsina L, catepsina B, tripsina, elastase, fator X e Serino protease Transmembrana do tipo 2 (do inglês *TransMembrane serine protease 2 - TMPRSS2*)<sup>6</sup>. A redução da expressão celular de ACE2 leva a acúmulo de Angiotensina II, o que pode explicar o dano a múltiplos órgãos e sistemas.<sup>13</sup>

Após entrada na célula hospedeira, ocorre ativação da Desintegrina A e Metaloproteinase 17 (do inglês *A Disintegrin and Metalloproteinase 17 - ADAM17*), também conhecida como Enzima de Clivagem do TNF- $\alpha$  (do inglês *TNF- $\alpha$  cleavage enzyme - TACE*), uma metaloproteinase zinco-dependente que tem como substrato diversas citocinas e receptores com o TNF- $\alpha$  e a ACE2. O aumento de ação da ADAM-17 provoca maior quebra da ACE2 e acúmulo de Angiotensina II. Essa, por sua vez, ativa Receptores tipo 1 da Angiotensina II (do inglês *Angiotensin II type 2 receptor - AT2R*), que mais uma vez, aumentam a atividade da



#### 1.1.1.4 Destruição celular

Após a invasão celular, uma série de eventos em cascata pode resultar na morte celular programada, apoptose celular, ou uma forma altamente inflamatória, a piroptose.<sup>16</sup>

A proteína E viral é capaz de alterar o equilíbrio intracelular de íons, provocando efluxo de cálcio do complexo de Golgi para o espaço intracelular e efluxo celular de potássio para o espaço extracelular. Esse desbalanço inicia um processo inflamatório intracelular pela ativação de inflamossomos, um complexo de proteínas inflamatórias, notadamente da Família de Genes NLR (do inglês *Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat proteins - related gene family - NB-LRR*) ativadora do domínio de pirina. Esse processo termina com formação de poros de gasdermina-D, secreção de Interleucina 1b (IL-1b) e Interleucina 18 (IL-18) e, finalmente, edema celular e ruptura da membrana.<sup>16</sup>

#### 1.1.1.5 Fisiopatologia

Após contaminação por via respiratória, o vírus invade células epiteliais primariamente das vias respiratórias superiores, seguido por vias inferiores e mucosa gastrointestinal. Provavelmente, todas as células que expressam ACE2 em sua superfície são possíveis alvos do vírus, logo, brônquios, pulmões, coração, esôfago, rins, estômago, bexiga, íleo e testículos podem ser invadidos pelo SARS-CoV-2, gerando sintomas específicos em cada órgão acometido.<sup>5</sup>

Com cerca de 5-6 dias, ocorre o pico da viremia por SARS-CoV-2, tempo bem menor que os 10 dias do SARS-CoV.<sup>10</sup>

O pulmão acometido evidencia grande infiltrado inflamatório intersticial mononuclear, predominantemente de linfócitos, que se agregam ao longo de pequenos vasos sanguíneos, estes repletos de plaquetas e trombos. Os espaços alveolares estão preenchidos por membrana hialina, pneumócitos tipo 2 descamados e grande quantidade de muco.<sup>5, 17</sup> Megacariócitos CD61<sup>+</sup> intravasculares também são encontrados, juntamente com neutrófilos presos nos trombos.<sup>14, 18</sup> Edema endotelial e trombos de fibrina são igualmente vistos difusamente nas áreas lesadas, concordantes com as lesões em vidro fosco.<sup>19, 20</sup>

Do ponto de vista vascular, as alterações patológicas compreendem macrotromboses constituídas de eritrócitos, leucócitos, plaquetas e fibrina, e microtromboses, formadas por fibrina e plaquetas. O acometimento alcança vênulas, arteríolas e capilares de todos os órgãos.<sup>14,</sup>

#### 1.1.1.5.1 Realce Dependente de Anticorpos

Fenômeno virológico bem descrito em diversos vírus (dengue, flavivírus e influenza etc.), pode ser a causa de piora da infecção por SARS-CoV-2 em alguns indivíduos.<sup>5</sup>

Estudos em animais com SARS-CoV mostram que o início da síntese e secreção de anticorpos neutralizantes anti-S se relaciona com piora do quadro pulmonar.<sup>5</sup>

Foi proposto que os anticorpos Anti-S-IgG induzem uma polarização de macrófagos alveolares em direção ao polo inflamatório, com produção de Proteína 1 Quimioatraente de Monócitos (do inglês *Monocyte Chemoattractant Protein-1 – MCP-1*) e Interleucina-8 (do inglês *Interleukin -8 - IL-8*). Essa reação ocorreria pela ligação do complexo vírus-anti-S-IgG com receptores de Fragmento Cristalizável (do inglês *Fragment crystalline – Fc*) de macrófagos e monócitos.<sup>5, 17</sup>

#### 1.1.1.5.2 Tempestade de citocinas

O termo tempestade de citocinas foi cunhado em 1993 para descrever um quadro patológico ocorrido na situação de reação enxerto versus hospedeiro.<sup>17</sup> Desde então, passou a ser utilizada para caracterizar o excesso de produção de citocinas levando a dano tissular no indivíduo acometido.<sup>22</sup> Este fenômeno ocorre, por exemplo, em doenças autoimunes, linfocitose hemofagocítica, Terapia com Células T com Receptores de Antígeno Quimérico (do inglês *Chimeric antigen receptor T cell therapy – CART Cell Therapy*), sepse e doenças infecciosas. Nessa situação, um sistema imune superativado secreta grande quantidade de citocinas levando a dano tissular colateral.<sup>17, 23</sup>

Não está claro em que momento da reação do organismo ao estímulo desencadeante ocorre essa desregulação nem o porquê de alguns indivíduos a desenvolverem e outros não.<sup>17, 23</sup>

Padrões Moleculares Associados a Danos (do inglês *Damage-Associated Molecular Patterns*) e Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) podem ser causas de aumento da secreção de citocinas inflamatórias. Células do sistema imune ativadas dessa forma podem induzir anomalmente vias do Fator Nuclear  $\kappa$ B (do inglês *Nuclear Factor kappa B*), que estão particularmente ativas nos pacientes graves e críticos.<sup>24</sup>

### 1.1.1.5.3 Resposta imunológica inata

A primeira linha de defesa antiviral ainda não está totalmente esclarecida, e muito tem sido definido por aproximação com dados já conhecidos de outros Coronavírus.<sup>3</sup> Primariamente, a resposta será desencadeada por células dendríticas, macrófagos e células epiteliais.<sup>11</sup>

Nesse caso, ocorre acoplamento entre Receptores de Reconhecimento de Padrões (do inglês *Pattern-Recognition Receptors – PRR*) com RNA viral utilizando-se de Receptores do tipo RIG (do inglês *RIG - Retinoic acid-Inducible Gene I - Like Receptors*) citosólicos capazes de detectar intermediários dsRNA oriundos da replicação viral intracelular.<sup>3, 25</sup> Mais ainda, receptores Toll-like 7 (TLR7) em células dendríticas e TLR3 e TLR8 (em outros tipos celulares) são capazes de reconhecer fragmentos endocitados de RNA viral.<sup>25</sup> Essa ligação induzirá ativação em cascata de uma resposta pró-inflamatória composta principalmente por Interferon I/III (INF), Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (do inglês *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ), Proteína Inflamatória de Macrófagos (do inglês *Macrophage Inflammatory Protein – MIP1 $\alpha$* ), IL-1, IL-6 e IL-8.<sup>3, 11</sup> O efeito dessa liberação de substâncias será a indução de programação antiviral nas células alvo e a potencialização da resposta imune adaptativa que ocorrerá em seguida.<sup>3, 17</sup> Entre os mecanismos propostos para essa ação antiviral está a inibição da entrada do vírus na célula hospedeira, atuando sobre a proteína S do envelope viral.<sup>3</sup> No entanto, foi descrito que na infecção por SARS-CoV-2 existe um retardo na liberação inicial de INF-I, o que faz com que haja uma quimiotaxia importante de macrófagos e monócitos e ativação de moléculas quimiotáticas para mais células inflamatórias através do Ligante 7 ou 12 de Quimiocina (do inglês *Chemokine ligand 7 or 12 ou Monocyte chemotactic protein 1 – CCL 7 and CCL12*).<sup>7, 23</sup>

Sabe-se que o INF faz parte essencial da resposta inicial à infecção viral, havendo basicamente três tipos: tipo I (INF  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\omega$ ), tipo II (INF- $\gamma$ ) e tipo III (INF- $\lambda$ ). Ao haver contato com partículas virais, ocorre ativação do INF do tipo I, que irá desencadear uma resposta antiviral segundo a via Transdutora de Sinal Janus Quinase e Ativador da Transcrição (do inglês *Janus Kinases Signal Transducer and Activator of Transcription proteins – JAK-STAT*), induzindo a expressão de Genes Estimulados por Interferon (do inglês *Interferon Stimulated Gene - ISG*) como Proteína de Ligação ao GTP induzida por Interferon (do inglês *Interferon-induced GTP-binding protein – MX1*), Proteína Transmembrana 1 Induzida por Interferon (do inglês *InterFeron Induced TransMembrane protein 1 – IFITM1*) e Proteína Induzida por Interferon com Repetições de Tetratricopeptídeos (do inglês *InterFeron-Induced protein with Tetratricopeptide repeats 2 – IFIT2*).<sup>23, 24</sup>

Estudos moleculares mostram que indivíduos que evoluem mal com COVID-19 apresentam resposta elevada mas pouco duradoura de INF- $\alpha$ , enquanto aqueles que evoluem bem apresentam uma resposta intensa e mantida.<sup>24</sup> Mais especificamente, os pacientes com pior evolução apresentam elevada produção de INF- $\lambda$ 2 e tipo I, mas sem expressão de ISGs.<sup>25</sup>

#### 1.1.1.5.4 Resposta imunológica adaptativa: linhagem mieloide

Estudos têm demonstrado que existe um perfil inflamatório composto pelo aumento da expressão de monócitos inflamatórios. Nos pulmões, o aumento dessas células associadas a macrófagos derivados de monócitos suplanta a presença de macrófagos reparadores alveolares, sendo uma das causas da redução da patência alveolar.<sup>3, 23</sup>

Macrófagos juntamente com células epiteliais pulmonares detectam, através de PRR, produtos de destruição viral (RNA viral), os chamados PAMPs e DAMPs como: Adenosinatrifosfato (do inglês *Adenosine TriPhosphate - ATP*), ácido desoxirribonucleico (do inglês *DeoxyriboNucleic Acid - DNA*) e outros produtos celulares. Tal reconhecimento ativará resposta inflamatória com liberação de citocinas típicas de resposta de Linfócitos T auxiliares do tipo 1 (do inglês *T-helper type-1*).<sup>10, 26</sup>

A presença abundante de macrófagos e monócitos pulmonares e uma resposta atrasada de IFN se relacionam com elevada liberação de citocinas, aumento da permeabilidade vascular e maior dificuldade para indução de respostas das células T.<sup>3, 23</sup> A possível infecção dessas células pelo SARS-CoV-2 pode causar piroptose de macrófagos e linfócitos o que poderia explicar uma grande liberação de citocinas dessas células.<sup>5</sup>

Neutrófilos também têm participação importante na resposta imune desregulada na COVID-19. À medida que a infecção progride, o número de neutrófilos circulantes aumenta. Em resposta à infecção, são capazes de lançar as Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (do inglês *Neutrophil Extracellular Traps - NETs*) que nada mais são do que redes extracelulares de fibras contendo DNA histona e enzimas como a Mieloperoxidase (do inglês *Myeloperoxidase - MPO*) e elastase.<sup>14, 20</sup>

A capacidade de formar NETs, definida como NETose, inicia-se pela ativação e mobilização de neutrófilos por PRR com posterior mobilização de cálcio e produção de radicais livres de oxigênio, os quais por sua vez, levam à ativação da enzima intracelular Enzima Peptidil Arginina Deiminase 4 (do inglês *Peptidil Arginine Deiminase 4 - PAD4*) que, então,

induzirá a produção das NETs (citrulinização de resíduos de arginina em histonas promovendo descondensação da cromatina e extração das NETs).<sup>20</sup>

#### 1.1.1.5.5 Resposta imunológica inata: linhagem linfoide

Células linfoides inatas (do inglês *Innate Lymphoid Cells - ILC*) têm participação importante na resposta antiviral. Divididas em dois grupos: Células Helper não citotóxicas (ILC1, ILC2 e ILC3) e as Células Matadoras Naturais (do inglês *Natural Killer - NK*) que podem ter atividade predominante citotóxica (CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) ou produtora de citocinas (CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>).<sup>3</sup>

Células NK são, na grande maioria, externas aos pulmões, sendo recrutadas em caso de necessidade pela participação das moléculas Receptoras de Quimiocina (do inglês *Chemokine Receptor - CXCR3*). Em pacientes COVID-19, notou-se que os níveis sanguíneos de células NK estão reduzidos, o que se correlaciona com a gravidade da doença.<sup>3, 17, 24, 27</sup>

Após ativadas, células NK podem induzir a lise das células infectadas ou ativar produção de mais citocinas, sendo um provável participante da tempestade de citocinas observada na SARS.<sup>3, 17</sup>

Quanto às Células Helper (ILC), ainda não há estudos que demonstrem alterações em seu funcionamento em pacientes infectados por SARS-CoV-2.<sup>3</sup>

#### 1.1.1.5.6 Resposta de células T

Divididas em dois tipos: Grupamento de Diferenciação 4 (do inglês *Cluster Differentiation 4 - CD4<sup>+</sup>*) e Grupamento de Diferenciação 8 (do inglês *Cluster Differentiation 8 - CD8<sup>+</sup>*), provavelmente desempenhando importante função no controle da infecção viral, assim como em outros vírus como o Vírus Sincicial Respiratório e o Vírus Influenza A.<sup>27</sup> Mas assim como em outros vírus, a contagem total dessas células também está reduzida na infecção por SARS-CoV-2, notadamente da população CD8<sup>+</sup>.<sup>3, 5, 17, 24</sup> Possíveis causas seriam o próprio excesso de citocinas inflamatórias como a IL-6 (induzindo apoptose).<sup>17</sup> Outra possibilidade seria o recrutamento dessas células para os sítios de infecção, como os pulmões.<sup>3, 17</sup> A queda nos níveis dessas células se relaciona com a gravidade da doença e com o perfil de liberação de citocinas<sup>23, 27</sup>; assim, 1-2 dias antes da redução, observa-se aumento dos níveis de IL-6, enquanto os níveis mais baixos de CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ocorrem com 4-6 dias de doença, momento em que níveis máximos de IL-10, IL-12 e TNF foram detectados.<sup>17</sup>

Além disso, observou-se redução importante de Células T reguladoras (do inglês *T regulatory Cells - Treg*) em COVID-19, o que pode ser um dos fatores relacionados com a imunopatologia pulmonar,<sup>3,5</sup> na medida em que esse tipo celular seria responsável por manter um equilíbrio entre a resposta antiviral e o excesso de citocinas, deletérias ao organismo.<sup>17</sup> De maneira geral, células CD8<sup>+</sup> estão mais ativadas que CD4<sup>+</sup> em pacientes COVID-19<sup>3,24</sup> com tendência a exibir exaustão funcional e com menor citotoxicidade.<sup>3,10</sup>

#### 1.1.1.5.7 Resposta de células B

Como acontece com outros vírus, a participação de células B é essencial para o controle da doença e para o desenvolvimento de uma resposta rápida em caso de reinfeção. Pacientes infectados por SARS-CoV-2 exibem importante produção de imunoglobulinas classes IgM e IgG.<sup>3,17,27</sup>

Anticorpos são produzidos contra diversas proteínas virais, notadamente as proteínas N e S; nessa última, o domínio RBD é altamente imunogênico (especificamente os sítios 1a e 1b), sendo, potencialmente, um anticorpo que impede a entrada do vírus na célula hospedeira.<sup>10,25</sup> Anticorpos neutralizantes são os últimos a serem produzidos, principalmente contra a proteína S.<sup>10</sup>

Após convalescença, plasmócitos permanecem produzindo anticorpos, que junto com células B de memória, permitirão que haja imunidade duradoura. Estudos em outros Coronavírus mostraram que em MERS, detectaram-se anticorpos até 3 anos após a infecção, enquanto em SARS-CoV, por 2-3 anos.<sup>3,10</sup>

#### 1.1.1.5.8 Suscetibilidade a quadros graves

Muitos estudos têm sido produzidos para se tentar melhor entender o porquê de alguns indivíduos evoluírem mal após infecção pelo SARS-CoV-2. A explicação tende a ser multifatorial, envolvendo inicialmente uma incapacidade de alguns desses pacientes de desenvolverem uma adequada resposta por INF tipo I.<sup>25</sup>

Além disso, também foi identificada a presença de autoanticorpos contra INF- $\alpha$ , INF- $\omega$ , fosfolipídeos, antígenos de células T e B e citocinas naqueles casos com pior evolução.<sup>25</sup> Os níveis de anticorpos contra INF- $\alpha$  e INF- $\omega$  aumentam com a idade do indivíduo, podendo ajudar a explicar o fato de piores evoluções em pacientes mais idosos.<sup>25</sup>

Outra situação que pode favorecer quadros clínicos piores é uma resposta inflamatória descontrolada, que foi descrita na chamada mielopoiese emergencial na qual grande quantidade de células imaturas como monócitos, neutrófilos e progenitores mieloides são liberados na circulação. Tais células, por sua vez, são capazes de liberar quantidades abundantes de citocinas inflamatórias, resultando em dano tecidual e alteração da permeabilidade vascular. Possivelmente ocorra nas situações em que a eliminação viral é mais demorada.<sup>25</sup>

Especificamente, algumas condições clínicas têm mostrado risco mais alto de desenvolvimento de quadro graves. Entre elas, a idade acima de 65 anos tem sido caracterizada como a mais importante, talvez devido ao aumento progressivo dos anticorpos anti-*INF*. Outro fator detectado é o sexo masculino, possivelmente devido a uma resposta imunológica inata aumentada, uma menor capacidade de ativação de uma resposta de células T e produção de autoanticorpos afucosilados contra SARS-CoV-2, em comparação com as mulheres.<sup>25</sup>

#### *1.1.1.6 Quadro clínico*

A partir de fevereiro de 2021, havia duas principais linhagens do vírus em circulação em território brasileiro, especificamente, a B.1.1.33 (29,9%) e a B.1.1.28 (28,9%).<sup>28</sup> O quadro clínico referido abaixo, refere-se à apresentação mais comum nesse período.

São considerados cinco possíveis evoluções após infecção por SARS-CoV-2: assintomáticos (1,2%), oligossintomáticos (80,9%), graves (13,8%), críticos (4,7%) e óbito (2,3%). Em crianças abaixo dos 10 anos, a incidência de assintomáticos pode chegar a 15,8%.<sup>5</sup> Quanto à mortalidade, variou a depender da presença de fatores de risco como doença cardiovascular (10,5%), diabetes (7,3%), doença respiratória crônica (6,3%), hipertensão (6%) e câncer (5,6%); enquanto para pacientes sem fatores de risco associado, ela foi tão baixa quanto 0,9%.<sup>5</sup> Assume-se que, de maneira geral, a mortalidade se situe ao redor de 2,6%.<sup>16</sup> Fumo, obesidade, D-dímeros acima de 1mcg/ml e doença arterial coronariana também têm sido considerados fatores de risco.<sup>5,11,29</sup>

Após um período de incubação de até 14 dias (maioria entre 3 e 7 dias, com média de 5,2 dias e com 97,5% em 11,5 dias), tem início o quadro clínico respiratório, leve na maior parte das vezes, mas com potencial de se tornar grave, principalmente em indivíduos portadores de fatores de risco.<sup>2, 5, 10</sup> Enquanto cerca de 25% de todos os infectados têm fatores de risco, entre os hospitalizados esse índice chega a 60-90%.<sup>6</sup>

Até 20% dos casos podem evoluir para gravidade, representada por falência respiratória aguda (26,2%), choque séptico (20,6%), lesões miocárdicas (11,2%) e renais agudas (13,1%)<sup>30</sup>.

As manifestações clínicas mais comuns são febre (97,2%), tosse (62,2%), fadiga (64,5%), secreção respiratória (33,4%), dispneia (32,7%), anorexia (30,8%), mialgia (30,8%), odinofagia (13,9%) e cefaleia (13,6%).<sup>2, 6, 30</sup> Disfunção do olfato e do paladar podem ser encontradas em 64-80% (mais frequentemente disgeusia e parosmia) dos pacientes, enquanto ageusia e anosmia podem ocorrer como única queixa em até 3% dos indivíduos.<sup>6</sup>

Durante a admissão, a gravidade do quadro clínico pode ser determinada pela ocorrência das seguintes condições: Saturação Periférica de Oxigênio (SpO<sub>2</sub>) < 93% em ar ambiente, frequência respiratória maior do que 30 incursões respiratórias por minuto e relação entre Pressão Parcial Arterial de Oxigênio e Fração Inspirada de Oxigênio (PaO<sub>2</sub> / FiO<sub>2</sub>) < 300mmHg.<sup>27</sup>

Estudo prospectivo nos EUA revelou que a mortalidade intra-hospitalar pode ser da ordem de 39%, com tempo de ventilação mecânica de 18 dias (9-28) para os que sobreviveram e de 10 dias para os que faleceram.<sup>31</sup>

As causas de mortes por COVID-19 incluem falência respiratória (78,9%), choque séptico (5,3%), morte súbita (5,3%), infarto agudo do miocárdio (5,3%) e choque hemorrágico (5,3%).<sup>30</sup>

Clinicamente, divide-se a evolução da doença em três fases (Figura 4):

- **Fase 01:** a primeira semana é caracterizada por elevada replicação viral, febre, tosse, dispneia e outros sintomas sistêmicos. Do ponto de vista laboratorial, linfopenia, Testes de Amplificação de Ácidos Nucleicos (do inglês *Nucleic Acid Amplification Test - NAAT*) positivos e tempo de protrombina alargado;<sup>30</sup>
- **Fase 02:** melhora progressiva dos sintomas sistêmicos como tosse, febre e dispneia. NAAT negativa até o 13º dia. Linfopenia persiste mesmo após a resolução dos sintomas. Nos pacientes que evoluem mal, a disfunção de órgãos e sistemas se desenvolve na 2ª semana.<sup>30</sup> Síndrome Respiratória Aguda (do inglês *Acute Respiratory Distress Syndrome*) ocorre por volta de 8-9 dias do início dos sintomas;<sup>10</sup>

- **Fase 03:** naqueles com pior evolução, a disfunção de órgãos progride, a linfopenia piora, com associação de plaquetopenia. Piora das funções pulmonar e renal, evoluindo para ARDS e terapia de substituição renal (TSR).<sup>30</sup>

Pacientes graves apresentam quadro sistêmico e laboratorial semelhante a um grupo de doenças chamado de síndromes hiperferritinêmicas, composto por síndrome da ativação macrofágica, Doença de Still de início no adulto, síndrome anti-fosfolípideo catastrófica e choque séptico.<sup>32</sup> Ferritina, além de ser um depósito de ferro intracelular, possui ação imunomodulatória. Formada por duas subunidades, H e L, que variam a depender do tecido, a subunidade H possui função tanto imunomodulatória quanto pró-inflamatória, sendo capaz de induzir a liberação de IL-1 $\beta$ .<sup>32</sup> Elevação da Ferritina ocorre com maior intensidade em casos graves de infecções virais do que em quadros bacterianos.<sup>33</sup> A presença elevada no sangue dessa proteína pode se dar por secreção a partir de hepatócitos e possivelmente via macrófagos ativado<sup>32</sup>, além da liberação após morte celular.

Parte do ferro ligado à Ferritina permanece livre no sangue, dando início à produção de radicais hidroxila. Estes, ao alterarem a morfologia das hemácias e, juntamente com fibrina, podem levar à formação de coágulos anômalos<sup>32</sup>, podendo ser uma das explicações do aumento de eventos tromboembólicos nesses pacientes.

Enterócitos do intestino delgado expressam grande quantidade de ACE2 o que torna essas células particularmente importantes como alvo do SARS-CoV-2. O desbalanço no RAS com acúmulo de Angiotensina II e aumento da ativação de AT1R leva à quebra da barreira hemato-intestinal com maior risco de absorção de bactérias, endotoxinas e metabólitos.<sup>13</sup> De maneira geral, a ação do SARS-CoV-2 sobre a parede intestinal pode levar a disbiose intestinal, disfunção da parede e perda da integridade da mesma.<sup>13</sup> O acometimento intestinal se expressa por dor abdominal, diarreia, vômitos e náuseas que podem estar presentes desde o início e ser acompanhado pela detecção de RNA viral nas fezes, sugerindo uma possível rota de transmissão oro-fecal.<sup>30</sup>

Os pulmões são sede de grande expressão de ACE2, estando a sua diminuição relacionada a pior prognóstico em casos de ARDS de diversas etiologias.<sup>13</sup> O fato de que indivíduos idosos tem redução progressiva de ACE2 ajuda a explicar os piores prognósticos nessa faixa etária quando infectados por SARS-CoV-2.<sup>13</sup> Do ponto de vista pulmonar, a lesão é caracterizada por acometimento bilateral.<sup>30</sup> A evolução para ARDS parece depender tanto de

predisposição genética quando da resposta inflamatória do hospedeiro à infecção viral. Estudos têm mostrado que quanto maiores os níveis de IL-6 e IL-8, pior a evolução do quadro pulmonar.<sup>5, 6</sup> Indivíduos com quadros graves e internados em UTI apresentam níveis mais elevados de IL-2, IL-7, IL-10, Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos (do inglês *Granulocyte colony-stimulating factor - GCSF*), IP-10, MCP-1, MIP-1A e TNF- $\alpha$ , o que sugere a ocorrência do que ficou conhecido como tempestade de citocinas.<sup>5</sup> Moléculas inflamatórias como o INF- $\alpha/\beta$  e o INF- $\gamma$  induzem tanto o acúmulo de células inflamatórias nos pulmões quanto a apoptose de células epiteliais e endoteliais, com consequente aumento da permeabilidade capilar e edema alveolar.<sup>6, 7</sup>

Ilhotas pancreáticas também podem ser acometidas pelo SARS-CoV-2 por expressarem ACE2.

Os rins podem ser atingidos durante o quadro de COVID-19, em qualquer fase da evolução da doença, inclusive com necessidade de TSR, o que piora ainda mais o prognóstico em casos graves.<sup>34</sup> Estatísticas apontam que 31% dos pacientes COVID-19 em ventilação mecânica e 4% daqueles em ventilação espontânea precisarão de TSR.<sup>31, 34</sup> O acometimento renal pode ser de várias origens: processos trombóticos intra-renais, lesão tubular provocada pelo próprio vírus e glomerulonefrite, além de causas extra renais como depleção de volume circulante, rabdomiólise e falência de múltiplos órgãos.<sup>34</sup>

Cérebro pode ter complicações da infecção por SARS-CoV-2 com doença aguda cerebrovascular e encefalite acontecendo em até 8% dos pacientes graves.<sup>6</sup>

Coração também pode se sede de complicações como miocardite, cardiomiopatia, arritmias ventriculares e instabilidade hemodinâmica em 7-17%.<sup>6</sup>

Em crianças, menores de 01 ano foram os que apresentaram formas graves em maior frequência.<sup>11</sup> Cerca de 2-5% dos diagnósticos de COVID-19 foram abaixo dos 18 anos, com média de 11 anos. Na maioria da população pediátrica, os sintomas são restritos às vias aéreas superiores e com menor intensidade. No entanto, até 7% das internadas por COVID-19 precisarão de ventilação mecânica.<sup>6</sup> Além disso, uma síndrome inflamatória sistêmica semelhante à síndrome de Kawasaki foi descrita nessa população.<sup>6</sup>

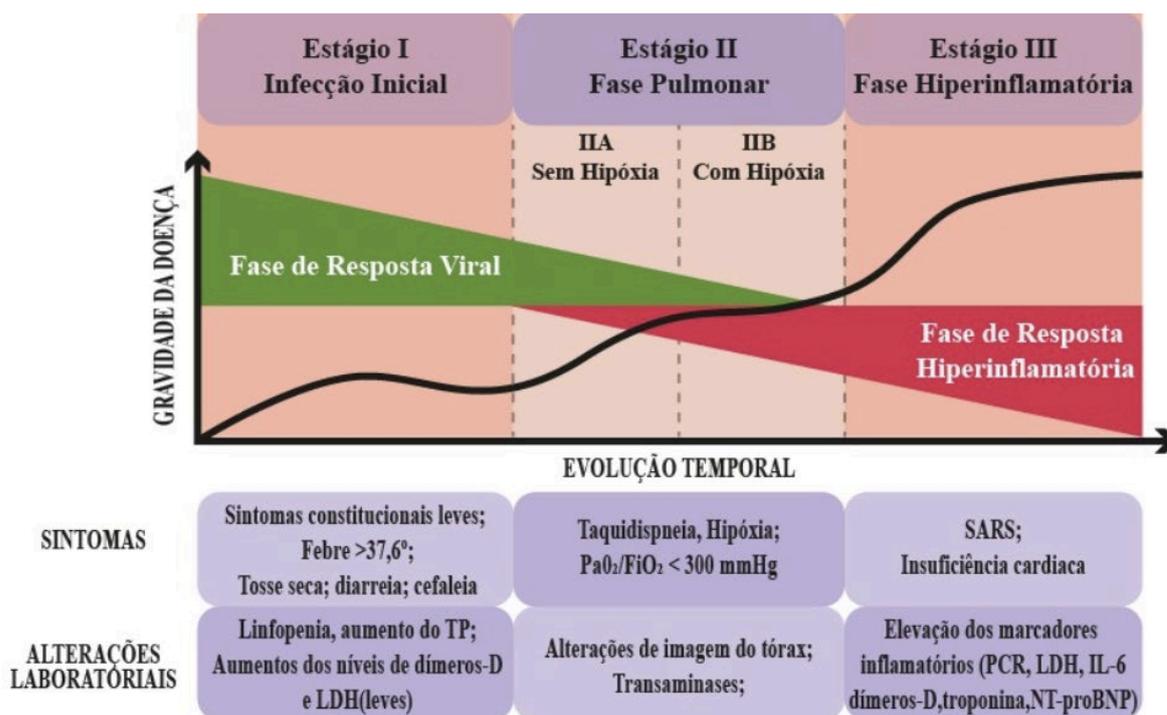


Figura 4: Fases de evolução da COVID-19 e potenciais terapias. Fonte: autoral, adaptado de Cruz *et al*<sup>9</sup>

#### 1.1.1.7 Diagnóstico

A detecção da infecção viral pode ser realizada especificamente por métodos que verifiquem a existência de material genético circulante ou que avaliem a resposta imunológica do hospedeiro após a infecção.

- Detecção de ácidos nucleicos
  - Logo após o início da pandemia, métodos de detecção de RNA viral foram desenvolvidos utilizando-se da técnica RT-PCR;<sup>5</sup>
  - A média de duração do isolamento viral por essa técnica varia em torno de 12 dias (1-24 dias)<sup>29</sup>, mas podendo ser detectadas em *Swab* de orofaringe por até 6 semanas;<sup>6</sup>
  - A capacidade de detecção depende do momento da coleta, sendo a sensibilidade de 33% aos 4 dias após a exposição, 62% no dia de início dos sintomas e até 80% com 03 dias após início dos sintomas;<sup>6</sup>
  - Em fluido bronco-alveolar, a sensibilidade pode chegar a 93% e 72% no escarro;<sup>6</sup>

- Detecção nas fezes pode ocorrer em até 50% dos casos, no sangue em 8% e ausência de detecção viral na urina.<sup>6, 29</sup> Pode persistir por até 22 dias nas fezes, 28 dias no escarro e saliva e 16 dias no soro, tempo que é variável, dependendo da severidade da infecção.<sup>14</sup>
- Sorologia
  - A resposta do hospedeiro ao vírus é caracterizada pela produção de anticorpos das classes IgM e IgG que podem ser detectados no soro dos pacientes;<sup>5</sup>
  - A detecção de IgM pode ser realizada 5 dias após a infecção, com os níveis mais elevados em 2-3 semanas. Já para IgG, a detecção começa a ocorrer aos 14 dias de início dos sintomas;<sup>6</sup>
  - Permanece por ser definido se a produção de anticorpos é duradoura, se protege de novos contatos com o vírus e até se existe imunidade, já que nem todos os anticorpos produzidos são neutralizantes.<sup>6</sup>

Além de métodos específicos, outras metodologias inespecíficas auxiliam o médico na confirmação diagnóstica. São métodos mais acessíveis, mas que não têm achados patognomônicos, sendo, portanto, necessária suspeição clínica associada ao seu uso.

- Imagenologia
  - Tomografia computadorizada de tórax tem sido utilizada com sucesso com elevado grau de suspeição diagnóstica, dadas as imagens características de infiltrados bilaterais, multilobulares com padrão em vidro fosco;<sup>5, 6</sup>
  - O infiltrado é difuso, apresenta broncogramas aéreos, espessamentos ou irregularidades septais e espessamento da pleura adjacente;<sup>6</sup>
  - No início da doença, até 15% das tomografias de tórax e 40% das radiografias de tórax podem ser normais. Além do mais, as alterações são inespecíficas, e podem ser devidas a outras infecções pulmonares.<sup>6</sup>
- Exames laboratoriais: diversos exames laboratoriais podem ser realizados como forma de evidenciar o estado inflamatório desencadeado pela infecção viral, além de

identificar e monitorar a extensão e intensidade do acometimento dos diversos órgãos e sistemas. Logo, são solicitados de acordo com a necessidade e avaliação clínica individualizada.<sup>6, 35, 36</sup>

- Hemograma completo com diferenciais: identificação de linfopenia (em até 83% dos casos), neutrofilia e plaquetopenia (em cerca de 30% dos casos)<sup>37</sup>;
- TAP (tempo de protrombina) e TTPA (Tempo de tromboplastina parcial ativada): identificação de coagulopatia em curso (em cerca de 5% dos casos)<sup>37</sup>;
- Fibrinogênio: identificação de consumo de fatores da coagulação<sup>35</sup>;
- D-dímero: identificação de ativação da hemostasia e risco de eventos tromboembólicos (em cerca de 43% a 60% dos casos)<sup>37</sup>;
- Proteína C Reativa (PCR): monitorar status inflamatório (acima de 60% dos casos)<sup>37</sup>;
- Lactato Desidrogenase (LDH): acompanhar lesão tecidual (50-60% dos casos)<sup>37</sup>;
- Aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e bilirrubinas: identificar acometimento hepático (em cerca de 33% e 25% dos casos)<sup>37</sup>;
- Albumina: identificar acometimento hepático (albumina pode estar reduzida em até 75% dos casos)<sup>38</sup>; em pacientes hospitalizados, até 19% podem evoluir com disfunção hepática<sup>37</sup>
- Creatina kinase (CK): identificar lesão muscular<sup>35</sup>;
- Lipase: identificar lesão pancreática<sup>35</sup>;
- Creatinina e Ureia: identificar e acompanhar lesão renal; pode estar presente em até 9% dos indivíduos internados<sup>37</sup>
- Troponina T: identificar lesão miocárdica, que pode estar presente em até 7-17% dos pacientes internados<sup>37</sup>
- Peptídeo Natriurético Cerebral (do inglês *Brain Natriuretic Peptide* - BNP): identificar falência cardíaca<sup>35</sup>;
- Ferritina: identificar e monitorar resposta inflamatória sistêmica<sup>35</sup>;
- Pró-calcitonina: identificar coinfeções bacterianas.<sup>35</sup>

### 1.1.1.8 Tratamento

O tratamento da COVID-19 tem sido baseado basicamente em dois pilares distintos: suporte respiratório e tratamento específico ou contra a resposta do organismo hospedeiro.

#### 1.1.1.8.1 Suporte respiratório

Inicialmente, deve-se almejar o melhor tratamento possível para a hipoxemia e SARS. Estimativas têm apontado que mais de 75% dos pacientes hospitalizados necessitarão de suplementação de oxigênio, desde aquele oferecido por cânula nasal até ventilação não invasiva ou ventilação mecânica.<sup>37</sup> Caso haja necessidade de intubação, técnicas de ventilação protetiva têm se mostrado benéficas, com baixos volumes correntes, baixas pressões de platô, pressões positivas no final da expiração mais altas e, por vezes, ventilação em posição prona.<sup>37</sup>

#### 1.1.1.8.2 Tratamento específico ou contra a resposta do hospedeiro

Inúmeros medicamentos foram e continuam sendo testados na tentativa de reduzir ou impedir a replicação viral e assim, diminuir os efeitos desencadeados pela infecção pelo SARS-CoV-2. Até o momento, têm sido utilizados medicamentos antivirais adaptados de outros vírus, não havendo, ainda, formulação criada especificamente para o tratamento da COVID-19. Entre esses, os inibidores da polimerase de RNA dependente de RNA, como a Ribavirina, o Favipiravir e o Remdesivir são os mais promissores.<sup>37, 39</sup>

Após a fase inicial, quando atuar sobre a replicação viral seria mais efetivo, tem-se tentado também impedir ou reduzir a resposta inflamatória do hospedeiro, com a intenção de inibir a ação de inúmeras citocinas liberadas. Nessa classe de tratamento, os inibidores da IL-6 como o Tocilizumabe e o Sarilumabe, além dos inibidores da tirosina-kinase como o Imatinib têm sido amplamente estudados.<sup>40, 41</sup>

Resumidamente, as melhores recomendações no momento da confecção desse documento foram compiladas por *Agarwal et al*<sup>42</sup>:

- Para pacientes com doença leve, mas apresentando elevado risco de internação hospitalar, deveriam receber a combinação dos antivirais inibidores de protease, nirmatrelvir e ritonavir. Indivíduos com baixo risco de internação, não deveriam receber a combinação de fármacos;<sup>42</sup>

- Indivíduos com doença não-grave, mas com os mais altos riscos de internação hospitalar deveriam receber remdesivir, um análogo nucleosídeo que interage com a polimerase viral. Nessa mesma condição clínica, uma alternativa seria o molnupiravir;
- Inibidores da Janus Kinase:<sup>42</sup>
  - Baricitinibe: para pacientes com COVID-19 grave
  - Ruxolitinibe ou tofacitinibe: não deveriam ser utilizados em pacientes com quadros graves de COVID-19
- Plasma de convalescentes: não deveria ser utilizado nem em quadros leves nem graves de COVID-19;<sup>42</sup>
- Casirivimabe-imdevimabe: deveria ser utilizado em casos não-graves de infecção pelo SARS-CoV-2 com elevado risco de hospitalização ou naqueles que desenvolveram quadros clínicos graves, desde que a genotipagem demonstre que a cepa em questão não é a Omicron BA1;<sup>42</sup>
- Bloqueadores de receptores de IL-6: Tocilizumabe e Sarilumabe são anticorpos monoclonais que se ligam a receptores de IL-6, solúveis ou ligados a membranas. Deveriam ser utilizados em casos graves ou críticos de COVID-19. Não deveriam ser utilizados em associação aos inibidores da Janus Kinase;<sup>42</sup>
- Ivermectina, cloroquina (ou hidroxicloroquina) e Lopinavir-Ritonavir não deveriam ser utilizados em pacientes COVID-19, independentemente da gravidade do caso;<sup>42</sup>
- Corticosteroides: deveriam ser utilizados em todos os quadros graves ou críticos da infecção, sendo evitados nos quadros leves.<sup>42</sup>

Após o estudo RECOVERY, o uso de corticosteroides, na forma de dexametasona, passou a ser amplamente utilizado com redução da mortalidade em 28 dias, notadamente nos casos com mais de 7 dias de sintomas.<sup>37, 43</sup>

#### 1.1.1.8.3 Tromboprofilaxia

Dadas as elevadas taxas (de até 35-45%) de ocorrência de fenômenos tromboembólicos, principalmente nos pacientes mais graves, tem sido recomendada a quimioprofilaxia com Heparina de Baixo Peso Molecular (do inglês *Low Molecular Weight Heparin - LMWH*) para todos os pacientes hospitalizados por COVID-19.<sup>37, 44</sup>

Além do efeito profilático sobre a ocorrência de trombose, é sabido que a LMWH possui propriedades anti-inflamatórias, podendo ter, assim, ação benéfica em um quadro clínico caracterizado por intensa resposta inflamatória.<sup>45</sup>

Desde o início da pandemia, a melhor estratégia de anticoagulação tem sido amplamente debatida e a questão ainda permanece em aberto. Na última revisão utilizada nesse trabalho, *Moore et al*,<sup>46</sup> trazem resultado de consenso após revisão da literatura. De maneira geral, tem ficado mais claro que indivíduos gravemente doentes deveriam receber doses profiláticas padrão seja de LMWH ou de heparina não-fracionada. Os autores especulam que possivelmente tais indivíduos já teriam alcançado um ponto de não retorno e, desse modo, doses mais elevadas passariam a ser deletérias.<sup>47</sup>

Já pacientes moderadamente doentes, deveriam receber doses terapêuticas daquelas medicações sob a justificativa de que ainda seria possível reverter o quadro de lesão endotelial e disfunção orgânica sistêmica.<sup>47</sup>

Não existe ainda consenso de como triar pacientes que possam evoluir pior e que deveriam, portanto, receber anticoagulação plena mais precocemente.

## 1.1.2 Alterações hemostáticas relacionadas à COVID-19

### 1.1.2.1 Definição

Conjunto de alterações do sistema de hemostasia resultantes da interação entre a ação do vírus SARS-CoV-2 e a resposta imunológica do hospedeiro, do inglês *COVID-19 Associated Hemostatic Abnormalities (CAHA)*.<sup>14</sup>

### 1.1.2.2 Fisiopatologia

Fenômenos tromboembólicos tem sido descritos em diversas partes do mundo, sendo uma característica fisiopatológica importante na infecção pelo SARS-CoV-2, responsáveis por elevada morbimortalidade.<sup>19, 33, 48</sup> O estado de coagulopatia sistêmica e trombofilia adquirida acomete todos os territórios vasculares: arteriais, venosos e microvasculares.<sup>14, 49</sup>

Em pacientes hospitalizados por COVID-9, a ocorrência desses eventos pode chegar a 10-25%. Já nos pacientes graves, em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), essa incidência pode alcançar 31-59%<sup>6</sup>, com grande incidência de tromboembolismo pulmonar (TEP), chegando a representar 81% dos eventos.<sup>14, 18, 50</sup> Para comparação, pacientes de UTI não-COVID-19

apresentam taxa de tromboembolismo da ordem de 5-15%.<sup>44</sup> Mesmo pacientes COVID-19 não internados em UTI, mas admitidos em hospitais, apresentam taxas mais elevadas de fenômenos embólicos, da ordem de 11,5%.<sup>16</sup>

Pacientes sem outros fatores de risco para trombose passam a apresentar episódios como perda de cateteres vasculares e coagulação de circuitos de hemodiálise, muitas vezes com difícil controle, mesmo com anticoagulação em doses habituais.<sup>18</sup>

Estudos em autópsias têm mostrado eventos tromboembólicos difusos, macro e microvasculares, inclusive com comprometimento fetal, com oligoâmnio e atraso do crescimento intrauterino devido à disfunção na circulação placentária pela deposição de fibrina subcoriônica e intervilosa.<sup>26</sup>

A elevada ocorrência de fenômeno tromboembólicos deixa clara a ocorrência de desregulação do sistema de hemostasia. Apesar de ainda não totalmente elucidada, a coagulopatia relacionada à COVID-19 parece envolver ativação exagerada do processo de coagulação.<sup>33, 51</sup>

Autores como *Blasi et al*<sup>52</sup> demonstraram que indivíduos infectados mostram níveis elevados de indicadores da ativação da coagulação, representados pelo complexo Trombina-Anti-trombina (TAT) e Plasmina-anti-plasmina (PAP), apesar da utilização de heparina de baixo peso molecular.

Pacientes que faleceram tiveram níveis mais elevados de D-dímeros e valores mais alargados de TAP e TTPA.<sup>14, 53</sup> No entanto, existem dúvidas quanto ao real valor de D-dímero como valor prognóstico de ocorrência de tromboembolismo.<sup>33</sup> Existem evidências de que a alteração da permeabilidade capilar pode permitir que ocorra formação de coágulos extravasculares e, assim, a detecção de D-dímeros elevados não necessariamente se corresponderia com trombos intravasculares.<sup>54</sup>

Foram fatores de risco preditivos de fenômenos tromboembólicos a idade elevada, TAP > 3s e TTPA > 5s dos valores superiores e D-dímeros acima de 6 vezes os limites superiores da normalidade.<sup>14, 53</sup>

Em estágios avançados da infecção, os pacientes podem exibir quadros clínicos com critérios para Coagulação Intravascular Disseminada pela Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (do inglês *International Society of Thrombosis and Haemostasis - ISTH*) com mais de 05 pontos na escala. Alguns relatos mostram que até 71,4% dos pacientes graves conseguem essa pontuação.<sup>55</sup> Apesar dessa característica, de maneira geral, o que ocorre não é um quadro de coagulopatia consumptiva, mas uma maior tendência à hipercoagulabilidade.<sup>56</sup>

Apesar de não estar totalmente esclarecida, a inter-relação com o processo inflamatório sistêmico deve exercer papel fundamental no desenvolvimento da disfunção hemostática.<sup>19</sup> Sabe-se que a IL-6 atuando sobre monócitos circulantes pode induzi-los a produzir e expressar Fator Tecidual (do inglês *Tissue Factor* – *TF* - fator III da coagulação ou CD142).<sup>44, 55</sup> Esse fator é o principal desencadeador da formação de trombos de fibrina e, normalmente, só seria apresentado em casos de lesão do endotélio vascular.<sup>23</sup> Outros possíveis ativadores de monócitos circulantes são os Fosfolipídeos Oxidados (do inglês *Oxidized Phospholipids* - *OxPLs*), produzidos em resposta ao estresse oxidativo e que podem atuar via *Receptores tipo Toll 4* (do inglês *Toll Like Receptor 4* – *TLR4*), Interferon  $\beta$  Indutor do Adaptador do Domínio TIR (do inglês *TIR domain containing adapter inducing interferon- $\beta$*  - *TRIF*), Fator 6 Associado ao Receptor de TNF (do inglês *TNF Receptor Associated Factor 6* – *TRAF6*) e NF- $\kappa$ B ativando e recrutando monócitos, além de induzir células endoteliais para ativação e ligação àqueles monócitos.<sup>23</sup> Já o TNF- $\alpha$  e a IL-1 são as principais citocinas envolvidas com a inibição das vias endógenas anticoagulantes.<sup>44</sup>

A ação viral sobre as células endoteliais provoca dano às mesmas, levando à expressão do TF produzido por essas células<sup>19</sup>, além de induzir à liberação de Fator de von Willebrand (do inglês *von Willebrand Factor* - *vWF*) e microvesículas.<sup>55, 57</sup>

Neutrófilos circulantes são atraídos para os locais de lesão e podem atuar liberando NETs. Essas podem, por sua vez, ativar o sistema de coagulação através da via de contato e provocando ativação e quimiotaxia de plaquetas.<sup>23, 57</sup>

Além disso, descreveu-se a redução de fatores protetores, como os anticoagulantes naturais anti-trombina e Inibidor da Via do Fator Tecidual (do inglês *Tissue Factor Pathway Inhibitor* - *TFPI*).<sup>23, 26</sup>

Finalmente, do ponto de vista do sistema de fibrinólise, também se observam diversas alterações como a diminuição de proteases como o Ativador do Plasminogênio Tecidual (do inglês *Tissue Plasminogen Activator* - *tPA*) e o Ativador do Plasminogênio tipo Urokinase (do inglês *Urokinase-like Plasminogen Activator* - *uPA*).<sup>14, 49, 58</sup> Em princípio, a lesão endotelial difusa pode levar à secreção elevada de tPA que pode estar até 6x mais elevado em pacientes com SARS por COVID-19 do que em pacientes não infectados.<sup>44</sup> No entanto, níveis de Inibidor da Fibrinólise Ativado por Fibrina (do inglês *Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor* - *TAFI*) e inibidor da proteína C têm se mostrado aumentados<sup>59</sup> no lavado bronco alveolar de pacientes com doença pulmonar intersticial e a  $\alpha$ -2-macroglobulina (inibidor da plasmina) também está elevada na ARDS.<sup>59</sup> Mais ainda, o principal inibidor da fibrinólise, o Inibidor do Ativador do

Plasminogênio 1 (do inglês *Plasminogen Activator Inhibitor 1 – PAI-1*) está aumentado em pacientes SARS-CoV, o que se sobrepõe à ação dos sistemas uPA e tPA, podendo explicar o reduzido *turnover* de fibrina nos espaços alveolares.<sup>26, 59</sup> Diversos estudos têm mostrado um aumento da presença de PAI-1 no espaço alveolar, não somente pela secreção celular endotelial (induzida pela Proteína C reativa), mas também vindo através das plaquetas (maior pool de PAI-1), que por estarem acumuladas nos alvéolos, aumentam muito a presença desse inibidor da fibrinólise nos pulmões.<sup>26, 49, 59</sup>

Resumindo, uma hipofunção do sistema fibrinolítico no espaço alveolar e intravascular<sup>59</sup>, ativação inflamatória do sistema de coagulação com expressão de fator tecidual, dano endotelial induzido pela ação viral e ativação plaquetária com ligação ao endotélio lesado<sup>49</sup>, atuam em conjunto, tornando o indivíduo suscetível à ocorrência de fenômenos tromboembólicos difusos.

Existem propostas para classificar as alterações hemostáticas (CAHA) em 03 etapas:<sup>16,</sup>

50

- **Etapa 1:**
  - Indivíduos oligo ou assintomáticos;
  - Quando internam, esses pacientes apresentam fibrinogênio, plaquetas normais, TAP e TTPA normais;
  - D-dímeros podem estar aumentados de 2-3 vezes os limites superiores da normalidade;
  - Microtrombos não são detectados por TC de tórax ou USG periférica;
  
- **Etapa 2:**
  - Paciente apresenta sintomas mais importantes, podendo necessitar de terapia intensiva;
  - Plaquetopenia entre  $100-150 \times 10^9/L$ ;
  - TAP levemente alargado;
  - D-dímeros elevados de 3-6 vezes os limites superiores da normalidade;
  - TC de tórax e USG evidenciando trombos assintomáticos;

- USG-doppler em grandes vasos pode demonstrar padrão de fluxo lento, que pode se associar a uma taxa aumentada de Trombose Venosa Profunda (TVP).<sup>18</sup>
  
- **Etapa 3:**
  - Quadro clinicamente muito grave;
  - D-dímeros muito elevados: > de 6 vezes os limites superiores;
  - Trombocitopenia < 100 x 10<sup>9</sup>/L;
  - TAP e TTAP prolongados;
  - Fibrinogênio decrescente;

#### 1.1.2.2.1 O papel da disfunção endotelial

O endotélio tem inúmeras funções, sendo especialmente atuante nos processos de vasodilatação, fibrinólise e antiagregação plaquetária.<sup>11, 18</sup>

Células endoteliais expressam ACE2 e serão infectadas pelo SARS-CoV-2. Correspondem a cerca de um terço das células pulmonares e, sendo assim, terão participação importante no quadro patológico que se instala com a invasão viral.<sup>11, 50</sup>

Além das próprias células endoteliais, existe expressão de ACE2 em células subendoteliais e pericitos dos pulmões, rins e coração.<sup>16</sup> Pericitos têm função essencial na manutenção da homeostase das células endoteliais e podem, portanto, ter participação na disfunção orgânica pela lesão viral.<sup>16</sup>

Invasão e subsequente lesão de células endoteliais em processos de apoptose ou piroptose levam à exposição de material subendotelial, de elevado potencial trombogênico e posteriormente, agregação plaquetária. Em pequenos capilares, onde o fluxo sanguíneo já é mais lento, o edema e os microtrombos plaquetários já podem obstruir o fluxo sanguíneo, explicando a ocorrência difusa de trombose vascular.<sup>60</sup>

Ao mesmo tempo em que tem potencial pró-trombótico, as próprias células endoteliais saudáveis atuam com intuito de limitar a ocorrência de trombos, produzindo óxido nítrico, liberando adenosina ou ativando a via anticoagulante da proteína C. No entanto, como a lesão endotelial tende a ser difusa, cada vez menos tecido saudável estará disponível para contrabalançar os efeitos pró-coagulantes induzidos inicialmente.<sup>60</sup>

Como a lesão endotelial provavelmente se relaciona com a gravidade da doença, é possível que indivíduos mais graves tenham mais lesão endotelial e, por conseguinte, redução dos níveis de moléculas anticoagulantes como a trombosmodulina e outros heparinoides endógenos.<sup>52</sup>

#### 1.1.2.2.2 Participação das plaquetas

As plaquetas, além das funções tipicamente envolvidas com hemostasia, participam ativamente de respostas imunomediadas contra infecções virais e bacterianas. Seja por ligação direta, através de proteínas plasmáticas ou através de receptores Fc de imunoglobulinas, as plaquetas atuam liberando grânulos com participação na quimiotaxia de células inflamatórias.<sup>14, 26, 60</sup>

Por serem abundantes na circulação, é possível que a ação plaquetária seja importante primeira linha de defesa contra patógenos. Em pacientes com influenza, vírus de RNA simples, como o SARS-CoV-2, partículas virais são internalizadas por plaquetas e as ativam, via receptores TLR7.<sup>60</sup> Essa via leva à liberação de  $\alpha$ -grânulos e à interação das plaquetas com neutrófilos circulantes, além da liberação de C3, o qual induzirá o processo de NETose mediada por complemento.<sup>60</sup> Ao mesmo tempo, plaquetas ativadas são capazes de secretar *GM-CSF* que, por sua vez, modula o processo de liberação de DNA pelos neutrófilos. Apesar de plausível, esse mecanismo de ação protagonista de plaquetas dependeria da capacidade de internalizar partículas virais. RNA de ACE2 ainda não foi demonstrado em plaquetas, então, outros mecanismos precisariam ocorrer, como a micropinocitose.<sup>60</sup>

Plaquetas também tem ação passiva, ao serem ativadas pelo aumento de citocinas circulantes. Sabe-se que IL-6 e IL-1b são capazes de aumentar a agregação plaquetária induzida por agonistas. Outra citocina elevada, o TNF- $\alpha$  pode induzir hiperatividade plaquetária, com possível exaustão no decorrer da doença.<sup>60</sup>

Em COVID-19, uma característica marcante é a presença de megacariócitos circulantes e plaquetopenia, proporcional à gravidade da doença.<sup>14, 16</sup> Megacariócitos originados na medula óssea permanecem no interior dos pulmões, em microvasos. Tanto mais megacariócitos são encontrados, quanto mais intensa for a infecção. Tendo capacidade quimiotática, pode ser um dos mecanismos essenciais à geração de um ambiente propício à ativação do sistema de coagulação e consequente formação de trombos.<sup>14, 26</sup>

Os trombócitos possuem em seu citosol RNA que pode ser transferido para células nucleares com as quais estejam aderidas através de um processo de transferência horizontal. Da

mesma forma, os chamados microgrânulos plaquetários são outra fonte de RNA para células inflamatórias como linfócitos T, macrófagos, células musculares lisas e neutrófilos. Esse RNA transferido pode induzir migração de células inflamatórias, alteração da expressão gênica e modulação do funcionamento das células endoteliais.<sup>14</sup>

#### 1.1.2.2.3 Ação dos neutrófilos

NETs têm elevada capacidade pró-trombótica, na medida em que podem induzir ativação plaquetária através de TLRs e liberação de grânulos plaquetários com Fator V/Va levando à geração de trombina.<sup>14, 16, 59</sup> Mais ainda, podem funcionar como base para agregação de outros elementos figurados do sangue, como plaquetas, hemácias e leucócitos<sup>16</sup> e formação de trombos.

Autores como *Nicolai et al*<sup>61</sup> encontraram trombos repletos de NETs em diversos órgãos. Estudos tem demonstrado que NETs solúveis estão aumentadas em indivíduos com quadros graves de COVID-19 (níveis 10 vezes maiores nos pulmões do que no sangue), tendo potencial altamente citotóxico para células epiteliais pulmonares (induzindo apoptose e fibrose).<sup>20</sup> Os neutrófilos desses indivíduos têm maior capacidade de produção de NETs e quando formadas, essas redes são de maior tamanho do que em outros contextos.<sup>20</sup>

#### 1.1.2.2.4 O papel da ativação por material genético

O processo de combate à infecção gera quantidades variáveis de material genético livre, tanto homólogo quanto do vírus. Alguns autores tem evidenciado que RNA livre é capaz de ativar o ativador do Fator VII da coagulação.<sup>14</sup> Além disso, o RNA extracelular pode ser capaz de ativar proteases da via intrínseca da coagulação, pela via de contato, incluindo os fatores XI e XII.<sup>14</sup>

#### 1.1.2.2.5 Participação dos pulmões nas alterações da hemostasia

Os pulmões têm se mostrado o foco inicial do processo de trombofilia adquirida. A ativação da resposta imunoinflamatória pela ação viral nos pulmões induziria todo o processo de imotrombose, inicialmente na microvasculatura pulmonar<sup>33</sup>, mas, com o avanço da doença, acometeria também maiores vasos, tanto pulmonares quanto do resto do corpo.<sup>50, 59</sup>

A exsudação de plasma, fibrinogênio, fatores de coagulação e células imunológicas leva a um processo inflamatório intenso, tanto alveolar quanto perialveolar, com formação de depósitos de fibrina que posteriormente poderão evoluir para um processo fibrótico pulmonar.<sup>59, 62</sup>

A passagem de fatores da coagulação para os espaços alveolares também tem participação sobre o processo inflamatório, pois são capazes de ativar Receptores Ativados por Protease (do inglês *Protease Activated Receptors - PAR*) não só no epitélio alveolar, mas também sobre células inflamatórias e fibroblastos. Essas vias PAR podem ser ativadas por fator tecidual, fator Xa da coagulação, Fator VIIa e trombina, e o resultado será fibrose e geração de mais trombina. A ativação de receptores PAR leva à expressão aumentada de IL-6, IL-8, Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (do inglês *Platelet Derived Growth Factor - PDGF*) e indução da proliferação de fibroblastos.<sup>26, 59</sup>

#### 1.1.2.3 Perfil laboratorial das alterações hemostáticas relacionadas ao SARS-CoV-2

Pacientes com COVID-19 que evoluíram com trombofilia adquirida apresentaram perfil laboratorial pró-coagulante, podendo ser citados<sup>14, 50</sup>:

- D-dímeros elevados. Estudos chineses têm mostrado que 46% dos pacientes apresentam valores acima dos limites superiores. Níveis acima de 1000ng/ml se correlacionaram com risco de óbito 18x maior quando comparados com níveis abaixo de 500ng/ml.<sup>18, 44</sup> Também houve correlação com tromboembolismo venoso, com sensibilidade de 70%, especificidade de 96,7% e valor preditivo positivo de 87,5% para valores acima de 3000ng/ml;<sup>18, 63</sup>
- Fator de von Willebrand: altos níveis do antígeno de vWF, elevada atividade do vWF e altos níveis do Fator VIII;<sup>51</sup>
- Anticoagulante lúpico: detectável na forma da anticardiolipina e anti $\beta$ 2Glicoproteína I (anti $\beta$ 2GPI). Estudo francês evidenciou elevado percentual de positividade, da ordem de 87,7% em pacientes internados em UTI;<sup>18</sup>
- Plaquetas: normais até estágios avançados da doença, atingindo níveis em torno de 50.000. Cinco por cento podem apresentar plaquetas abaixo de 50.000, enquanto valores abaixo de 150.000 podem ser vistos em 70-95% dos casos. Trombocitopenia não se provou ser um fator preditivo de maior gravidade da doença<sup>44</sup>, mas níveis mais baixos podem se correlacionar com doenças mais graves em até 5 vezes.<sup>26</sup> O nadir de plaquetas

tende a acontecer em cerca de 7 dias, havendo uma trombocitose reativa cujo pico ocorrerá em torno da terceira semana de doença;<sup>26</sup>

- Fibrinogênio: elevado até estágios avançados. Trabalhos da China mostraram queda súbita para menos de 100mg/dl antes do óbito em uma proporção dos pacientes.<sup>44</sup> Como proteína de fase aguda, a produção hepática pode aumentar de 2 a 10 vezes durante processos infecciosos, inclusive com produção local pelo epitélio pulmonar;<sup>33, 59</sup>
- TAP: alargado; > 3s nos casos graves. Pode se correlacionar com pior prognóstico. Como a alteração não é intensa, a apresentação do dado na forma do INR pode encobrir a diferença.<sup>44</sup> Pode se prolongar por até 2 semanas.<sup>26</sup> Estudo de Klok<sup>64</sup> relacionou idade e ocorrência de coagulopatia (TAP > 3s ou TTPA >5s) com maior incidência de complicações trombóticas;
- TTPA: alargado; >5s nos casos graves;
- Anti-trombina: reduzida mais intensamente nos que não sobreviveram do que nos sobreviventes. Mas, raramente abaixo de 80% do normal.<sup>44</sup>

### 1.1.3 Tromboelastometria

Em casos de sangramento por coagulopatia clinicamente importante, o médico que assiste o doente precisa saber a etiologia mais provável do fenômeno para que o tratamento correto possa ser aplicado. É importante saber qual hemocomponente ou hemoderivado deve ser administrado, em qual momento, em qual quantidade e com que frequência, para que os melhores resultados sejam obtidos.<sup>65</sup>

Com vistas a obter tais informações, seria necessário um exame que fornecesse uma avaliação dinâmica do coágulo, que evidenciasse desde a ativação, polimerização de fibrina, estabilização do coágulo e, finalmente, a dissolução através da fibrinólise endógena. Além disso, seria necessário que essa mesma avaliação pudesse demonstrar separadamente a ação dos elementos participantes de todo o processo de formação do coágulo, notadamente, fatores de coagulação, plaquetas, fibrinogênio e plasminogênio/plasmina. Todas essas informações puderam ser obtidas após a descrição da tromboelastometria.<sup>65</sup>

Inicialmente chamada de tromboelastografia (TEG) pelo professor alemão Hellmut Hartert, em 1948, em Heidelberg<sup>66, 67</sup>, teve utilização nas décadas de 50 e 60, mas caiu no esquecimento até a década de 80 do século passado. A partir de então, dois novos modelos de equipamentos passaram a estudar dinamicamente a coagulação, o TEG® (Tromboelastograma,

Haemonetics, Braintree, MA, EUA) e o ROTEM® (Tromboelastometria, Tem Innovations GmbH, Munique, Alemanha).<sup>65</sup>

Basicamente, no ROTEM®, uma cubeta contendo sangue total entra em contato com um pino, com cerca de 1mm de espaço entre o mesmo e as paredes da cubeta. Sangue total (300µl) é pipetado e acrescentado à cubeta, sendo sucedido pelos ativadores específicos de cada teste (veja os exames específicos a partir de 1.1.3.1 Avaliação da via extrínseca).<sup>68</sup> O pino gira, alternadamente, 4,75° para cada lado. À medida que o coágulo se forma, o movimento do pino vai ficando restrito e essa redução de movimento é opticamente detectada e transformada em um gráfico com os respectivos valores de cada parâmetro analisado.<sup>65</sup> Um valor de 0mm significa que o pino gira livremente, enquanto uma amplitude de 100mm teoricamente corresponderia à imobilidade total do pino.<sup>69</sup> Após processamento eletrônico, tais alterações são transformadas em um gráfico, comumente chamado de Temograma<sup>69</sup>, exemplificado na Figura 5. São disponíveis 04 canais de avaliação simultânea.

Já no TEG®, o princípio é muito semelhante, mas nesse, o pino é fixo e o que gira é a cubeta. Essa metodologia é semelhante à desenvolvida por Hartert e, segundo o mesmo, tornava o dispositivo mais sensível a oscilações.<sup>65</sup> Um mililitro de sangue total é previamente misturado em um frasco contendo caulim. Após homogeneização, 300µl da mistura são transferidas para a cubeta de teste.<sup>68</sup> São disponíveis 02 canais de avaliação simultânea.

O sangue utilizado na tromboelastometria é o sangue total citratado (entre 3,2 e 3,8%) o que permite maior tempo até a avaliação (idealmente 2 horas, mas possível em até 4 horas)<sup>69</sup> e maior uniformidade do exame.<sup>65, 69, 70</sup> Outros fatores pré-analíticos são importantes, assim como nos testes padrão da coagulação, destacando-se a coleta com o mínimo de hemólise (evitando-se agulhas muito finas e pressão excessiva à aspiração do sangue, assim como não utilizar o vácuo do tubo de coleta), ressuspender qualquer sedimento antes da pipetagem (5 inversões do tubo) e manter o tubo de coleta em temperatura ambiente.<sup>69</sup>

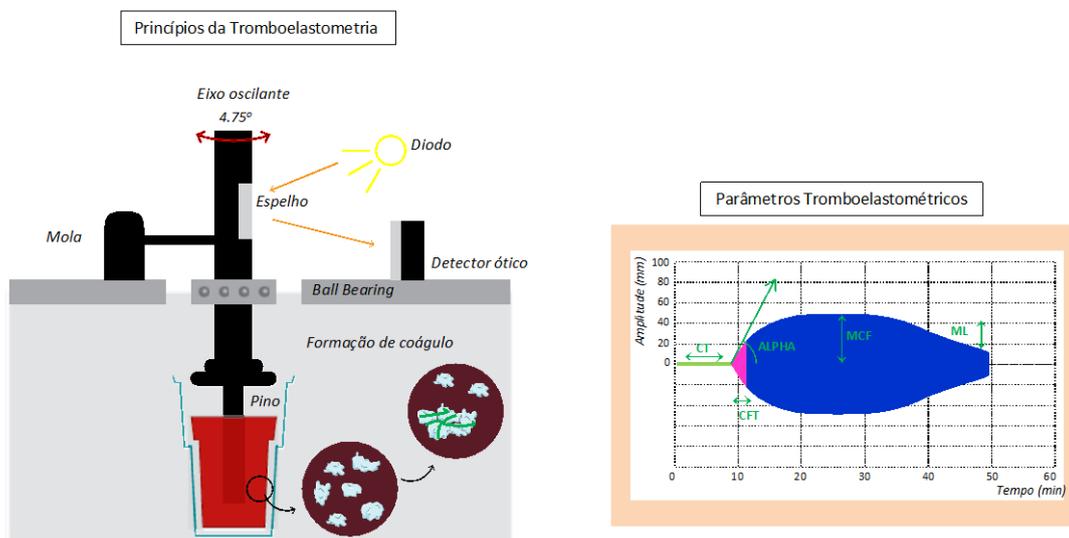


Figura 5. Método tromboelastométrico para avaliação do coágulo. Sangue citratado é colocado em uma cubeta e em contato com um pino metálico que gira em torno de seu próprio eixo. Após recalcificação do sangue e acréscimo de um ativador (dependendo do teste), o coágulo começa a se formar e, à medida que fica mais firme, a capacidade de giro do pino vai progressivamente sendo reduzida. Tal redução é opticamente detectada e, após processamento, transforma-se em um gráfico, apresentado na tela do aparelho com amplitude crescente. Quando o processo de fibrinólise começa, o coágulo torna-se mais frouxo e, assim, o pino readquire sua capacidade de giro, o que será transformado pelo sistema em uma redução na amplitude do coágulo. **CT**, Tempo de Coagulação, é o tempo desde o início da ativação até uma amplitude de 2mm e representa o início da ativação da trombina. O **CFT**, Tempo de Formação do Coágulo, representa a dinâmica de formação do coágulo e corresponde ao tempo desde 2mm até 20mm de amplitude. **MCF**, Firmeza Máxima do Coágulo, é a amplitude máxima que o coágulo alcança e informa sobre os principais componentes, plaquetas e fibrinogênio. **ML**, Lise Máxima do coágulo, percentual de queda da amplitude após o MCF e representa o quanto do coágulo sofreu fibrinólise. Dessa forma, ao final de 60 minutos, a tromboelastometria apresenta informações sobre todas as fases de formação e quebra do coágulo

O equipamento tem tutorial na própria tela, que orienta a ordem de utilização de cada insumo e o momento de troca das ponteiros para pipetagem eletrônica. São utilizados 300 $\mu$ l de sangue total para cada teste.<sup>69</sup>

Os parâmetros analisados no ROTEM® são os seguintes:<sup>65, 69, 70</sup>

- **CT (*Clotting Time*) Tempo de Coagulação**
  - Tempo desde o início da análise até detecção de formação de coágulo em uma amplitude de 2mm;
  - Formação inicial de trombina;
  - Mostra o quão rápido se dá o início da formação de trombina;
  - CT reduzido representaria uma ativação mais rápida da coagulação.
  
- **CFT (*Clot Formation Time*) Tempo de Formação do Coágulo**
  - Tempo entre amplitude de 2mm até amplitude de 20mm;
  - Representa a dinâmica de formação do coágulo;
  - Polimerização da fibrina e estabilização do coágulo com plaquetas e fator da coagulação XIII ;
  - Influenciado pelos níveis de fibrinogênio e plaquetas;
  - CFT abaixo do valor de referência indica um estado de hipercoagulação.
  
- **Ângulo  $\alpha$  (ALPHA)**
  - Ângulo formado entre o eixo médio do gráfico e a tangente da curva do coágulo na amplitude de 2mm;
  - Descreve a cinética do coágulo, muito semelhante às informações obtidas com o CFT;
  - Valores angulares aumentados representam tendência aumentada para formação de coágulos.
  
- **MCF (*Maximum Clot Firmness*) Firmeza Máxima do Coágulo**
  - Evidencia a qualidade do coágulo formado;
  - Ação do fibrinogênio, plaquetas e FC XIII estabilizando o coágulo;
  - MCF acima do valor de referência indica um estado de hipercoagulação.

- **ML (*Maximum Lysis*) Lise Máxima**

- Redução da firmeza do coágulo após o MCF em relação ao MCF;
- A ML evidencia o quanto de coágulo foi perdido;
- Até 15%, reflete estabilidade do coágulo;
- Fibrinólise: ML > 15% em 1 hora;

Os parâmetros acima mencionados são os tradicionais, já utilizados clinicamente. No entanto, diversos outros parâmetros foram descritos e podem ser utilizados em pesquisa clínica para melhor caracterização de determinado passo do processo de formação e lise do coágulo.<sup>70</sup> Um parâmetro potencialmente útil, que serve como um resumo de todo o processo de coagulação é o TPI. O *Thrombodynamic Potential Index* descreve globalmente o processo de coagulação, pois utiliza em seu cálculo tanto medida da cinética da coagulação (CFT) como mensuração da participação de plaquetas e fibrinogênio (MCF).<sup>70, 71</sup>

$$\text{TPI} = [(100 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF})] / \text{CFT}$$

Para que as informações de interesse sejam obtidas, o sangue total citratado deve ser submetido à ativação na presença de ativadores diversos, segundo o exame desejado. Dessa forma, surgiram as seis curvas disponíveis na tromboelastometria, sendo 04 curvas diagnósticas e 02 confirmatórias:<sup>65, 72</sup>

### 1.1.3.1 Avaliação da via extrínseca

Esse teste avalia os fatores da coagulação da via extrínseca (fatores I, II, V, VII e X), além de plaquetas e fibrinólise. O ativador é uma tromboplastina, em geral cérebro de coelho. Insensível à ação da heparina pela presença de um antagonista, o polibreno. Exame conhecido como EXTEM (Figura 6).

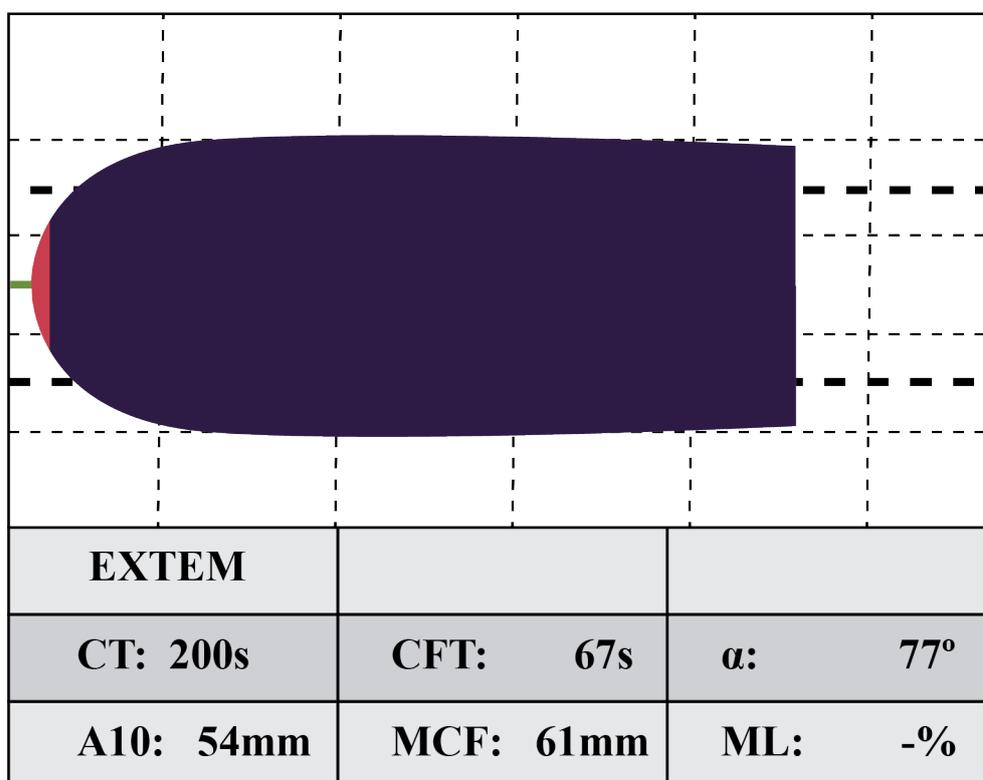


Figura 6: Exemplo de resultado do teste EXTEM. Fonte: autoral, adaptado de Calatzis *et al*<sup>72</sup>. CT (expresso em segundos) = Tempo de Coagulação: se refere à formação de trombina, tempo desde a ativação até uma amplitude de 2mm;  $\alpha$  (expresso em  $^{\circ}$ ) = definido como ângulo entre a linha de base e a tangente da curva de coagulação na amplitude de 2mm; CFT (expresso em segundos) = Tempo de Formação do Coágulo: refere-se à dinâmica da formação de fibrina, intervalo entre a amplitude de 2mm e a de 20mm; A10 = amplitude do gráfico aos 10 minutos; MCF (expressa em mm) = Firmeza Máxima do Coágulo: refere-se à máxima amplitude do gráfico, proporcional à quantidade de fibrinogênio e plaquetas; ML (expressa em %) = Lise Máxima: representa o percentual de redução da amplitude do coágulo após a iniciação da fibrinólise.

### 1.1.3.2 Avaliação da via intrínseca

Esse teste permite avaliar a via de contato, também chamada de via intrínseca da coagulação. Recebe como ativador o ácido elágico. Permite estudar os fatores da coagulação I, II, V, IX, X, XI e XII, além de plaquetas e fibrinólise. Muito sensível à ação da heparina não-fractionada. Teste conhecido como INTEM (Figura 7).

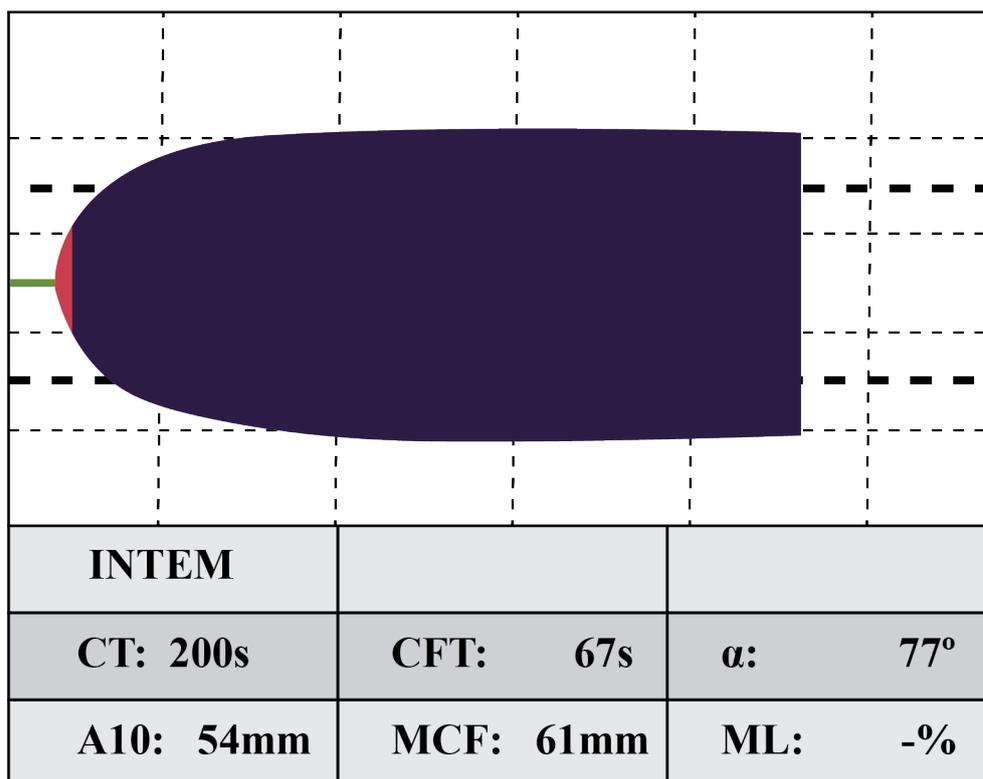


Figura 7: Exemplo de resultado do teste INTEM. Fonte: autoral, adaptado de Calatzis et al<sup>72</sup>. CT (expresso em segundos) = Tempo de Coagulação: se refere à formação de trombina, tempo desde a ativação até uma amplitude de 2mm;  $\alpha$  (expresso em °) = definido como ângulo entre a linha de base e a tangente da curva de coagulação na amplitude de 2mm; CFT (expresso em segundos) = Tempo de Formação do Coágulo: refere-se à dinâmica da formação de fibrina, intervalo entre a amplitude de 2mm e a de 20mm; A10 = amplitude do gráfico aos 10 minutos; MCF (expressa em mm) = Firmeza Máxima do Coágulo: refere-se à máxima amplitude do gráfico, proporcional à quantidade de fibrinogênio e plaquetas; ML (expressa em %) = Lise Máxima: representa o percentual de redução da amplitude do coágulo após a iniciação da fibrinólise.

### 1.1.3.3 Avaliação funcional do fibrinogênio

Nesse estudo, a coagulação é ativada da mesma forma que no EXTEM, mas com a adição de citocalasina D, um antiagregante plaquetário. Dessa forma, o coágulo resultante depende somente da formação e da polimerização da fibrina. Avaliação conhecida como FIBTEM (Figura 8).

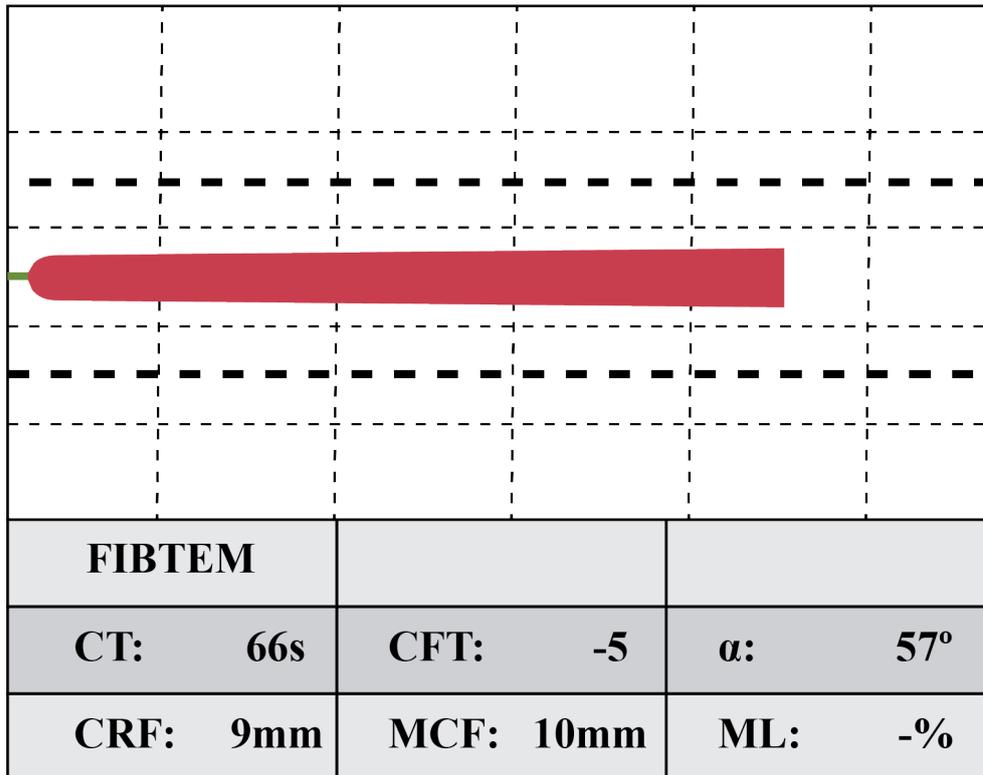


Figura 8: Exemplo de resultado do teste FIBTEM. Fonte: autoral, adaptado de Calatzis *et al*<sup>72</sup>. CT (expresso em segundos) = Tempo de Coagulação: se refere à formação de trombina, tempo desde a ativação até uma amplitude de 2mm;  $\alpha$  (expresso em °) = definido como ângulo entre a linha de base e a tangente da curva de coagulação na amplitude de 2mm; CFT (expresso em segundos) = Tempo de Formação do Coágulo: refere-se à dinâmica da formação de fibrina, intervalo entre a amplitude de 2mm e a de 20mm; A10 = amplitude do gráfico aos 10 minutos; MCF (expressa em mm) = Firmeza Máxima do Coágulo: refere-se à máxima amplitude do gráfico, proporcional à quantidade de fibrinogênio e plaquetas; ML (expressa em %) = Lise Máxima: representa o percentual de redução da amplitude do coágulo após a iniciação da fibrinólise.

#### 1.1.3.4 Avaliação de ativação endógena da coagulação

Estudo realizado sem a adição de ativadores da coagulação, havendo somente a recalcificação da amostra. Visa evidenciar a existência de ativadores endógenos da coagulação como o fator tecidual. Teste conhecido como NATEM (Figura 9). Como depende da existência de ativadores endógenos, o CT costuma ser bem mais prolongado que o CT do EXTEM, por exemplo.

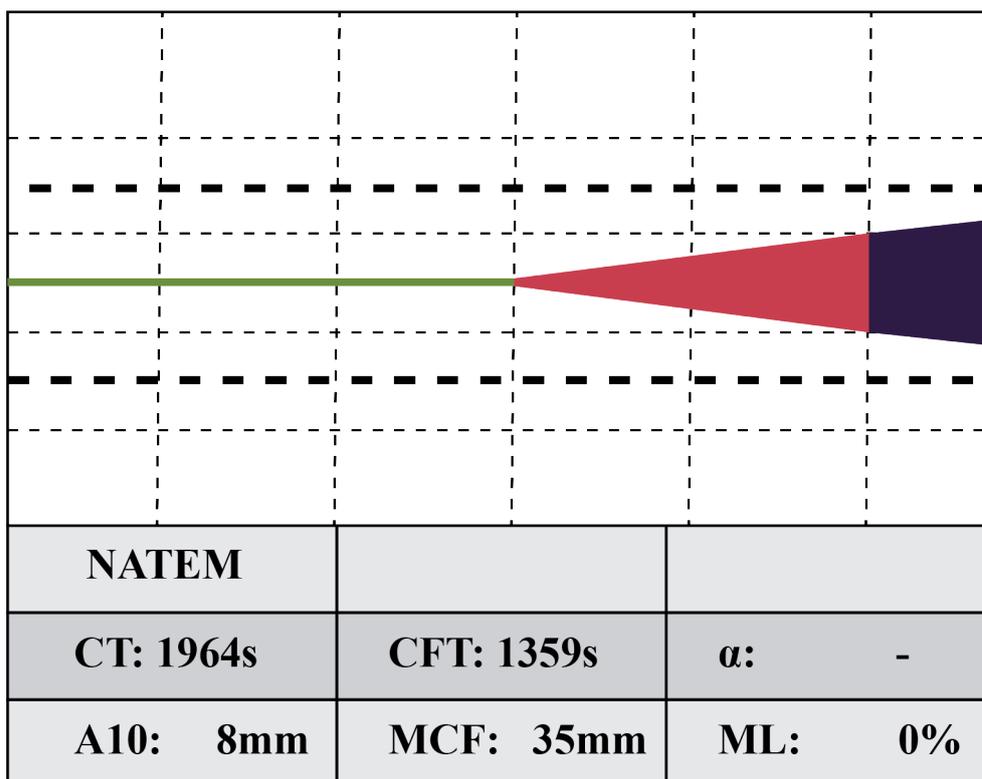


Figura 9: Exemplo de resultado do teste NATEM. Fonte: autoral, adaptado de *Calatzis et al*<sup>72</sup>. CT (expresso em segundos) = Tempo de Coagulação: se refere à formação de trombina, tempo desde a ativação até uma amplitude de 2mm;  $\alpha$  (expresso em  $^{\circ}$ ) = definido como ângulo entre a linha de base e a tangente da curva de coagulação na amplitude de 2mm; CFT (expresso em segundos) = Tempo de Formação do Coágulo: refere-se à dinâmica da formação de fibrina, intervalo entre a amplitude de 2mm e a de 20mm; A10 = amplitude do gráfico aos 10 minutos; MCF (expressa em mm) = Firmeza Máxima do Coágulo: refere-se à máxima amplitude do gráfico, proporcional à quantidade de fibrinogênio e plaquetas; ML (expressa em %) = Lise Máxima: representa o percentual de redução da amplitude do coágulo após a iniciação da fibrinólise.

#### 1.1.3.5 Confirmação da presença de heparina não-fracionada

Primeira das curvas confirmatórias. Esse teste é realizado em conjunto com o INTEM, exame muito sensível à heparina não-fracionada, como mencionado acima. Caso o parâmetro Tempo de Coagulação (CT) se normalize na presença da heparinase, conclui-se que o alargamento do CT no teste INTEM era devido à presença daquele fármaco anticoagulante. Estudo conhecido como HEPTEM (Figura 10).

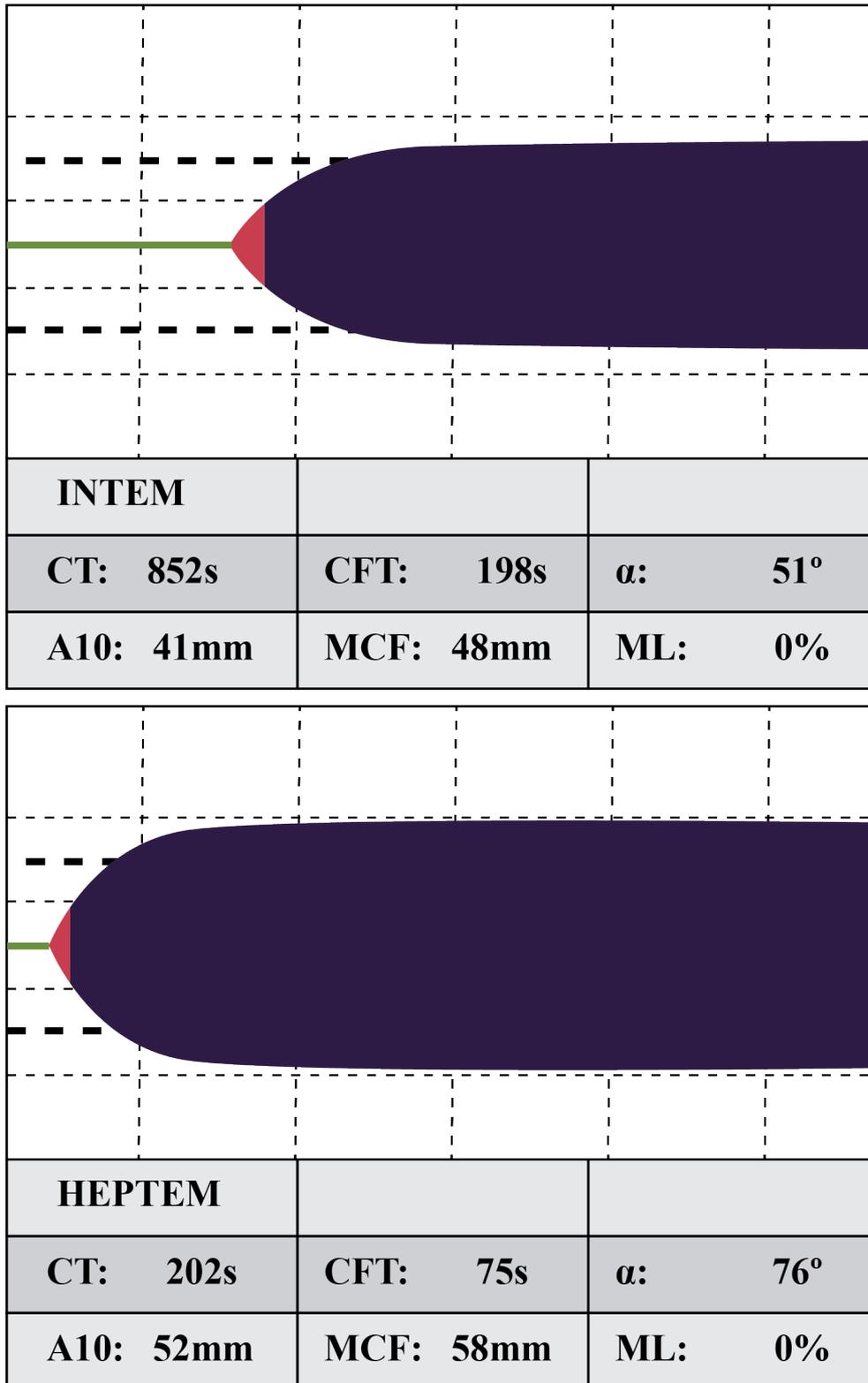


Figura 10: Exemplo de resultado do teste HEPTM. Fonte: autoral, adaptado de *Calatzis et al*<sup>72</sup>. CT (expresso em segundos) = Tempo de Coagulação: se refere à formação de trombina, tempo desde a ativação até uma amplitude de 2mm;  $\alpha$  (expresso em °) = definido como ângulo entre a linha de base e a tangente da curva de coagulação na amplitude de 2mm; CFT (expresso em segundos) = Tempo de Formação do Coágulo: refere-se à

dinâmica da formação de fibrina, intervalo entre a amplitude de 2mm e a de 20mm; A10 = amplitude do gráfico aos 10 minutos; MCF (expressa em mm) = Firmeza Máxima do Coágulo: refere-se à máxima amplitude do gráfico, proporcional à quantidade de fibrinogênio e plaquetas; ML (expressa em %) = Lise Máxima: representa o percentual de redução da amplitude do coágulo após a iniciação da fibrinólise.

#### 1.1.3.6 Confirmação da ocorrência de fibrinólise

Estudo confirmatório solicitado quando existe suspeita de fibrinólise. Nessa avaliação, adiciona-se um antifibrinolítico, a aprotinina ou o ácido tranexâmico. Caso ocorra normalização da curva em relação à curva EXTEM, confirma-se a ocorrência de processo fibrinolítico na amostra (Figura 11).

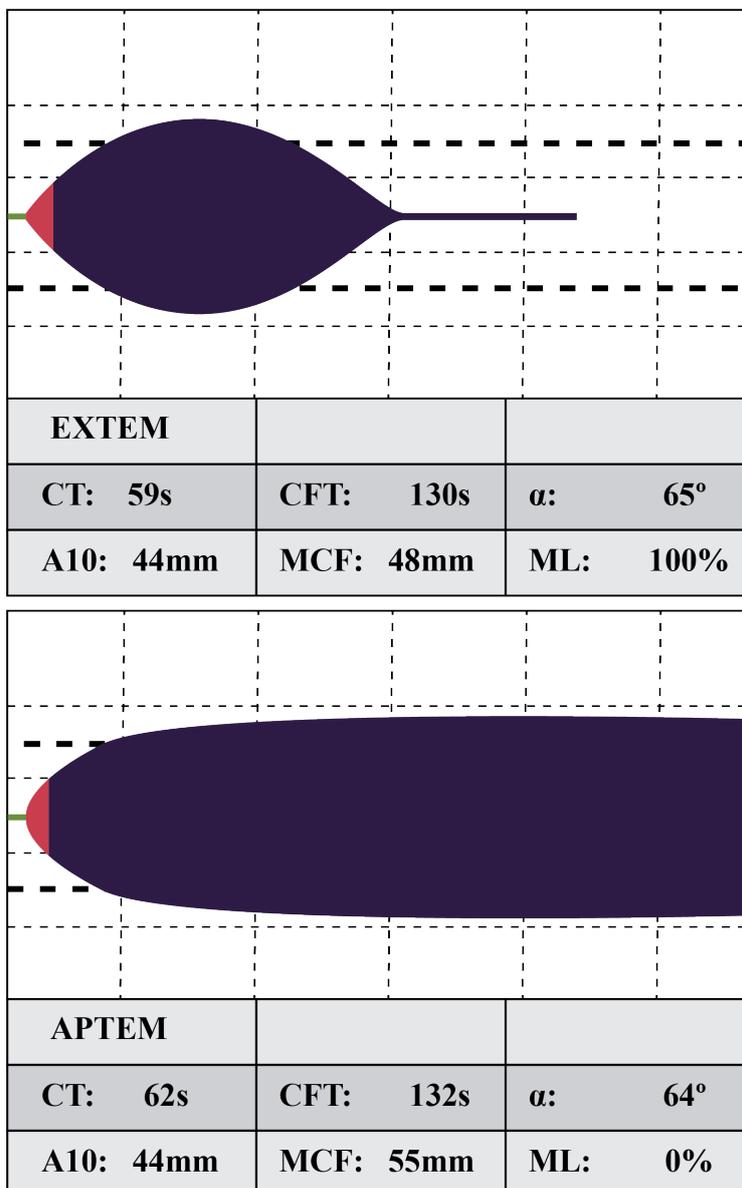


Figura 11: Exemplo de resultado do teste APTEM. Fonte: autoral, adaptado de *Calatzis et al*<sup>72</sup>. CT (expresso em segundos) = Tempo de Coagulação: se refere à formação de trombina, tempo desde a ativação até uma amplitude de 2mm; ALFA (expresso em °) = definido como ângulo entre a linha de base e a tangente da curva de coagulação na amplitude de 2mm; CFT (expresso em segundos) = Tempo de Formação do Coágulo: refere-se à dinâmica da formação de fibrina, intervalo entre a amplitude de 2mm e a de 20mm; A10 = amplitude do gráfico aos 10 minutos; MCF (expressa em mm) = Firmeza Máxima do Coágulo: refere-se à máxima amplitude do gráfico, proporcional à quantidade de fibrinogênio e plaquetas; ML (expressa em %) = Lise Máxima: representa o percentual de redução da amplitude do coágulo após a iniciação da fibrinólise.

### 1.1.3.7 Interpretação

A conclusão sobre qual distúrbio hemorrágico está presente ocorre através do estudo dos valores de referência em relação aos obtidos. Importante lembrar que os valores de referência (conforme podem ser vistos na Tabela 1)<sup>65</sup> foram determinados para indivíduos jovens normais, ou seja, em populações especiais como gestantes e recém-nascidos, os valores podem ser ligeiramente distintos.

Tabela 1. Valores de referência da tromboelastometria.

Parâmetro	CT (s)	ALPHA (°)	CFT (s)	MCF (mm)	ML (%)
EXTEM	38-79	63-81	34-159	50-72	>85%
INTEM	100-240	71-83	30-110	50-71	>85%
FIBTEM	n.d.	n.d.	n.d.	9-25	n.d.
NATEM	300-1000	30-70	150-700	40-65	<15

Valores de referência normal fornecidos pelo fabricante. EXTEM: análise da via extrínseca da coagulação; INTEM: análise da via intrínseca; FIBTEM: avaliação funcional do fibrinogênio; NATEM: avaliação de ativação endógena da coagulação; CT: Tempo de Coagulação; ALPHA: ângulo Alfa; CFT: Tempo de Formação do Coágulo; MCF: Firmeza Máxima do Coágulo e ML: Lise Máxima do coágulo.

A avaliação da ativação do coágulo pode ser feita pela análise do CT do EXTEM e INTEM. CT alargado mostra ativação prolongada da hemostasia, provavelmente por deficiência de fatores da coagulação. CT encurtado evidencia aceleração da ativação.

Já a formação do coágulo pode ser avaliada pela análise do ALPHA, CFT e MCF tanto do EXTEM quanto do INTEM. O CFT evidencia o quão rápido a fibrina está sendo formada, enquanto o MCF depende mais dos substratos fibrinogênio e plaquetas. O ALPHA se relaciona

com o CFT e caracteriza a cinética da formação de fibrina; quanto maior o valor angular, tanto maior a velocidade de formação de fibrina.<sup>65</sup>

Sendo assim, se o MCF estiver reduzido, um dos dois substratos deve estar diminuído (fibrinogênio ou plaquetas); para que se saiba qual, deve-se analisar o MCF do FIBTEM. Caso esteja normal, os causadores do MCF EXTEM ou INTEM reduzido serão as plaquetas. Caso o MCF do FIBTEM esteja reduzido, conclui-se que o nível baixo de fibrinogênio está dificultando a adequada formação do coágulo.

E, finalmente, a lise do coágulo pela ação da plasmina/plasminogênio poderá ser verificada pela redução da amplitude do coágulo após atingido o MCF.<sup>65</sup> Lise do coágulo de até 15% em 1 hora é considerado fisiológico, ao passo que valores mais altos demonstram a ocorrência de hiperfibrinólise e ausência de fibrinólise demonstra a ocorrência do fenômeno do *shutdown* fibrinolítico, em que a falta de fibrinólise fisiológica pode ser responsável pela ocorrência de trombose disseminada como em certa parcela de indivíduos politraumatizados.<sup>72</sup>

#### 1.1.3.8 Limitações

Apesar de fornecer ampla variedade de informações, as limitações do método precisam ser sempre levadas em consideração quando se analisam os resultados.

A tromboelastometria da forma como foi apresentada, não é sensível ou apresenta sensibilidade variável a:<sup>72, 73</sup>

- Antiagregantes plaquetários como Aspirina: não detecta;
- Antiagregantes plaquetários como Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor, Ticlopidina: não detecta;
- Deficiência de fator de von Willebrand: não detecta;
- Heparina fracionada (baixo peso molecular): baixa sensibilidade;
- Inibidores da trombina: Dabigatrana: baixa sensibilidade;
- Inibidores do fator X da coagulação: Rivaroxaban, Edoxaban e Apixaban: baixa sensibilidade;
- Inibidores dos fatores vitamina K dependentes: Varfarina sódica e Femprocumona: baixa sensibilidade.

#### 1.1.4 Tromboelastometria e a trombose

Inicialmente criada com o intuito de avaliar a deficiência de participantes do processo de coagulação, percebeu-se que a tromboelastometria poderia evidenciar indivíduos com resultados elevados, acima dos valores de referência.<sup>74-76</sup>

Com o interesse aumentando, estudos começaram a descrever um risco mais elevado de desenvolvimento de fenômenos tromboembólicos como IAM, trombose venosa profunda, tromboembolismo pulmonar, AVC, insuficiência renal etc. em indivíduos nessa faixa de resultados da tromboelastometria.<sup>76</sup>

Mais ainda, começou-se a especular que, talvez, esses valores aumentados poderiam funcionar como elementos preditores de pior evolução em diversos cenários clínicos como na sepse bacteriana, no trauma, na obstetrícia, na cirurgia ortopédica e em uma ampla gama de condições patológicas.<sup>75</sup>

Apesar de potencialmente relevante, o estudo do polo oposto ao hemorrágico ainda vem ganhando espaço na literatura e a tromboelastometria ainda não é ferramenta universal de avaliação.<sup>75</sup>

As dificuldades se iniciam pela própria definição do que corresponderia a hipercoagulabilidade.<sup>77</sup> Apesar de não ser incomum numericamente (até mais de 600.000 eventos de trombose venosa profunda anualmente, só nos EUA), não é percentualmente frequente. Por isso, a utilização de parâmetros específicos como preditores da ocorrência de fenômenos tromboembólicos necessitaria de grandes amostras, que nunca são encontradas nos estudos.<sup>75</sup> Além do mais, o momento de avaliação pode influenciar: estudos longitudinais já evidenciaram que em pacientes submetidos a cirurgias ortopédicas pode haver sinais de hipercoagulabilidade desde algumas horas após o trauma até casos com início de alterações sugestivas somente com um ou dois dias de pós-operatório.<sup>75</sup>

Diversos autores têm avaliado a aplicabilidade do uso da tromboelastometria durante o tratamento de indivíduos graves em Unidades de Terapia Intensiva (UTI).<sup>76</sup> Sabidamente, tais indivíduos desenvolvem alterações importantes da coagulação em um amplo espectro variando da hipocoagulabilidade à hipercoagulabilidade, expressando-se como sangramento ativo até Coagulação Intravascular Disseminada (CIVD) evoluindo com falência múltiplas de órgãos.<sup>62,</sup>

78

Por ser justamente uma síndrome com infinitos agentes etiológicos possíveis, gravidades variadas e terapias distintas, os estudos têm tido dificuldade em padronizar

desfechos, momentos de coleta da tromboelastometria, valores de referência<sup>69,77</sup> e testes padrão comparativos.<sup>78</sup>

*Dimitrova et al*, avaliando pacientes consecutivos admitidos com fenômenos tromboembólicos, encontrou que o TPI > 3,5 do EXTEM foi capaz de diferenciar os grupos (com e sem trombose) com sensibilidade de 100% e especificidade de 93%.<sup>71</sup>

De qualquer forma, tem ficado cada vez mais evidente que a tromboelastometria é técnica promissora como método que permite evidenciar alterações do sistema de hemostasia de maneira mais completa que os testes padrão da coagulação em uso atualmente. Notadamente, permite estudar na prática clínica processos que basicamente só são avaliados em ambiente de pesquisa, como a fibrinólise (mal avaliada pelos níveis de D-dímeros).<sup>76,78</sup>

Algumas situações práticas que demandam investigação e que potencialmente podem se beneficiar da tromboelastometria seriam:

#### *1.1.4.1 Diagnóstico de coagulopatia na sepse e relação com exames padrão*

Diversos estudos têm avaliado a capacidade da tromboelastometria em diagnosticar a coagulopatia induzida pela sepse.<sup>76,79</sup>

Alterações da coagulação na sepse são muito variadas, já que pacientes podem apresentar hipercoagulabilidade inicialmente, evoluindo para quadros normais ou até de hipocoagulabilidade, havendo necessidade de se determinar qual seria o momento ideal de avaliação.<sup>58,78</sup> Adicionalmente, tem-se observado que alterações da hemostasia terciária (fibrinólise) também se desenvolvem durante a sepse, variando desde hiperfibrinólise até ausência completa de dissolução do coágulo, conhecida como *shutdown* fibrinolítico.<sup>58,76</sup> Estudo de *Durila et al*<sup>80</sup> mostrou que redução da atividade fibrinolítica (representada pelos índices de lise - ML) foram mais sensíveis e específicos (84% e 94%) que a pró-calcitonina e proteína C reativa (PCR) para diferenciar sepse de SIRS.<sup>81</sup>

Nesse tocante, em conjunto, a evidência sugere que a tromboelastometria é capaz de evidenciar alterações do sistema de hemostasia entre 43 e 100% dos pacientes. No entanto, as modificações têm se mostrado heterogêneas e variáveis ao longo do tempo.<sup>62,78</sup>

#### 1.1.4.2 Alterações na tromboelastometria com valor prognóstico no paciente grave

Esse tópico também oferece grande possibilidade de impacto em condutas clínicas pois seria possível determinar em certo momento, qual paciente teria uma pior evolução clínica baseada em algum parâmetro da tromboelastometria.<sup>77, 78</sup>

*Adamzik et al*<sup>81</sup> mostraram que o perfil tromboelastométrico que mais se correlacionou com piores prognósticos em sepse foi a hipocoagulabilidade na admissão, que se revelou como fator de risco independente para mortalidade em 30 dias, melhor que os conhecidos Avaliação Sequencial da Falência Orgânica (do inglês *Sequential Organ Failure Assessment - SOFA*) e Escore Simplificado de Fisiologia Aguda (do inglês *Simplified Acute Physiology Score II – SAPS II*).

Fisiopatologicamente, pode se desenvolver um quadro de hipofibrinólise em pacientes com ARDS, o que justificaria a deposição de fibrina vista em amostras pulmonares.<sup>62</sup> A tromboelastometria pode ajudar a evidenciar tais pacientes, que possivelmente terão uma pior evolução clínica como *Wright et al*<sup>82</sup> descreveu. Em seu estudo, os pacientes com *shutdown* fibrinolítico detectado por tromboelastografia tiveram uma taxa de TVP de 40%, contra 5% no grupo que não apresentou o mesmo fenômeno.

#### 1.1.4.3 Tromboelastometria para prever benefício da anticoagulação

A utilização de trombopprofilaxia farmacológica é conduta frequente e essencial em indivíduos internados em UTI. Em algumas situações o clínico tem dificuldade em decidir se um indivíduo em particular irá se beneficiar de terapia. Distinguir quais indivíduos se beneficiarão ainda não pode ser conseguido nem pelos testes padrão da coagulação nem pela tromboelastometria.<sup>78, 83</sup>

O que existem são poucos trabalhos mostrando que a sepse altera os parâmetros de coagulação, com tendência pró-coagulante. No entanto, mesmo com profilaxia farmacológica alguns desses índices não são normalizados.<sup>78</sup>

A tromboelastometria poderia servir para monitorar e adequar a dose dos medicamentos anticoagulantes.

### 1.1.5 Tromboelastometria e COVID-19

A frequente ocorrência de fenômenos tromboembólicos em pacientes portadores de COVID-19<sup>83, 84</sup> e a baixa capacidade dos testes padrão da coagulação em esclarecer as alterações do sistema de hemostasia<sup>76, 84</sup> levaram à natural utilização da tromboelastometria, método mais completo e rápido para avaliação de eventuais alterações nas diversas fases de formação e dissolução do coágulo.<sup>33, 84</sup>

*Panigada et al*<sup>85</sup> foram uns dos primeiros autores a evidenciar que a tromboelastometria seria capaz de mostrar as consequências da ação viral e resposta do hospedeiro sobre o sistema de hemostasia. Avaliando pacientes críticos internados em UTI, observaram perfil francamente pró-trombótico composto por encurtamento dos tempos de iniciação da coagulação (CT), aumento da polimerização de fibrina (encurtamento do CFT), aumento da força e estabilidade finais do coágulo (aumento da amplitude do MCF) e redução da velocidade de lise do mesmo (reduzidos valores de ML).<sup>33, 62, 76, 85, 86</sup>

Ainda avaliando pacientes críticos, em UTI, *Mortus et al*<sup>57</sup> encontraram resultados semelhantes. Esses pesquisadores dividiram os pacientes em relação à ocorrência de fenômenos tromboembólicos em baixa e levada ocorrência. Naquele grupo com elevada incidência, a existência de valores alterados na tromboelastografia (equivalente ao MCF na tromboelastometria) mostrou sensibilidade de 100% e um valor preditivo negativo de 100%.

Além da avaliação da formação do coágulo, a quebra do mesmo, ou seja, a fibrinólise, também pode ser avaliada pela tromboelastometria.<sup>33</sup> Aqui, a hipótese seria que os elevados níveis de D-dímeros observados<sup>76, 85, 86</sup> fossem secundários à elevada ativação de enzimas fibrinolíticas. No entanto, a real situação sugere apontar para o fato de que a fibrinólise não estaria aumentada<sup>62</sup>, demonstrado pelo aumento importante de inibidores da fibrinólise como o PAI-1 (até 4 vezes mais que em indivíduos normais) e à curta meia-vida de 3 minutos do ativador do Plasminogênio tecidual (tPA).<sup>52, 87</sup> Dessa forma, a elevação dos D-dímeros seria somente a expressão de elevada formação de coágulos, mas sem aumentado expressivo no processo de quebra dos mesmos, já que somente cerca de 0,02% da massa de fibrinogênio é quebrada em D-dímeros.<sup>62, 87, 88</sup> Outros autores especulam que a lesão endotelial pulmonar levaria à liberação de uPA, com lise dos coágulos localmente, mas não sistemicamente, explicando a aparente discrepância entre a fibrinólise detectada pela tromboelastometria e os níveis de D-dímeros.<sup>48</sup> Dessa forma, e baseando-se em testes mais complexos como o Tempo de Lise do Coágulo, admite-se que haja mais uma hipofibrinólise do que realmente um *shutdown* fibrinolítico.<sup>52</sup>

Na mesma linha, *Creel-Bulos et al*<sup>56</sup> relatam a ocorrência de *shutdown* fibrinolítico em 44% dos pacientes em sua amostra de indivíduos internados em UTI com ARDS por COVID-19. Nesse caso, 73% desses pacientes apresentaram fenômenos tromboembólicos, o que deixa transparecer que não somente a ativação e formação do coágulo são importantes, mas que, provavelmente a não quebra do coágulo formado também tenha participação essencial na ocorrência clínica aumentada de coagulação disfuncional.<sup>56</sup>

Também *Heinz et al*<sup>89</sup> trazem evidências de que o sistema de fibrinólise está hipofuncionante, através de dados de tromboelastometria modificada com tPA, revelando resistência à ação do ativador do plasminogênio, possivelmente pelo excesso de inibidores circulantes.

Em indivíduos com sepse de origem bacteriana, *Levi et al*<sup>90</sup> demonstraram a ocorrência de níveis aumentados de ativadores endógenos da coagulação, especificamente o Fator Tecidual. Nesses indivíduos, o teste NATEM, em que não se acrescenta ativadores, permite detectar se o indivíduo analisado possui fatores circulantes dando início à coagulação de maneira anômala. Em COVID-19, essas alterações ainda não haviam sido descritas, mas poderiam mostrar o quão precoce as alterações induzidas pelo vírus acarretam disfunção da coagulação. E evidenciando também que não somente os indivíduos graves as apresentam, mas que uma enorme quantidade de indivíduos classificados com quadros ditos leves também expressa fatores indutores de coagulação anômala, talvez expondo esses pacientes a um risco aumentado de fenômenos tromboembólicos.

Portanto, ainda faltam estudos com maiores amostras mostrando a capacidade dos métodos viscoelásticos de prever complicações tromboembólicas e o resultado de tromboprolaxia farmacológica.<sup>76, 86</sup> No entanto, a tromboelastometria desponta como único método atual capaz de avaliar as diversas fases do processo de hemostasia, sendo, portanto, possível, que mais estudos permitam a indicação mais robusta da técnica na avaliação e tratamento de pacientes com COVID-19.<sup>33, 84</sup>

## 2 JUSTIFICATIVA

Pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 têm apresentado frequência aumentada de fenômenos tromboembólicos. Apesar disso, ainda não estão disponíveis meios laboratoriais que permitam identificar a extensão das alterações na hemostasia.

Assim, o estudo de métodos viscoelásticos, que analisam toda a cinética de formação e dissolução do coágulo, pode auxiliar a elucidar a complexa fisiopatologia desencadeada pela ação viral.

E, potencialmente, parâmetros tromboelastométricos poderiam ser utilizados como biomarcadores para detectar quais indivíduos teriam pior evolução e servir como método de escolha e acompanhamento da terapia anticoagulante eventualmente instituída.

Estudar a tromboelastometria nas doenças hipercoagulantes ajudará a aumentar a quantidade de informação disponível com o intuito de reduzir a ocorrência de quadros clínicos de alta letalidade, como os fenômenos trombóticos.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

- Descrever o perfil tromboelastométrico de pacientes com diagnóstico de COVID-19, incluindo formas graves e não-graves da doença e comparar esses perfis com os de indivíduos não doentes.

#### 3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Verificar ocorrência de ativação intrínseca da coagulação em indivíduos graves e não-graves SARS-CoV-2 positivos e comparar com os indivíduos voluntários.
- Caracterizar a ocorrência de *shutdown* fibrinolítico em indivíduos graves e não-graves confirmados como COVID-19, comparando com o grupo de voluntários não doentes.
- Avaliar a performance dos parâmetros tromboelastométricos como possíveis biomarcadores para classificar pacientes COVID-19 quanto à gravidade da doença.

## 4 PACIENTES E MÉTODOS

### 4.1 Tipo de estudo

Os dados obtidos da avaliação do sistema de hemostasia foram coletados uma única vez, tratando-se, pois, de um estudo observacional transversal.

### 4.2 O Protocolo TARGET

Com a caracterização da pandemia pelo SARS-CoV-2, iniciou-se um amplo estudo colaborativo multi-institucional (Universidade de Brasília, Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares, Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade Federal de Uberlândia e Secretaria de Saúde do Distrito Federal), com o objetivo de se avaliarem diversos aspectos da resposta biológica à infecção pelo Coronavírus, chamado Projeto TARGET.<sup>91</sup>

Nesse estudo, realizou-se o acompanhamento longitudinal de pacientes sucessivos admitidos com COVID-19 em um dos hospitais de referência no Distrito Federal, com a coleta de amostras sanguíneas em 04 momentos:

- à admissão;
- com 3 dias;
- entre 7 e 10 dias e
- entre 15-20 dias após a confirmação diagnóstica.

Em cada coleta foram feitas as seguintes análises:

- Admissão: biomarcadores imunológicos, fenotipagem de leucócitos, dosagens de cortisol e prolactina e análise metabolômica;
- Com 3 dias: biomarcadores imunológicos, fenotipagem de leucócitos, níveis de cortisol e prolactina, expressão gênica e análise metabolômica;
- Entre 7-10 dias: tromboelastometria rotacional, biomarcadores imunológicos, fenotipagem de leucócitos, perfil de imunoglobulinas, expressão gênica, dosagens de

cortisol e prolactina, análise de neutrófilos e metabólica;

- Entre 15-20 dias: anticorpos neutralizantes, perfil de imunoglobulinas, níveis de cortisol e prolactina e análise metabólica.

#### 4.3 Duração do estudo

Para a avaliação da tromboelastometria, foram incluídos pacientes entre os dias 1º de agosto e 30 de setembro de 2020.

#### 4.4 População estudada

Foram incluídos no estudo, pacientes atendidos no Hospital Regional da Asa Norte (HRAN) ou Hospital Universitário de Brasília (HUB), centros de referência para tratamento de pacientes com COVID-19 no Distrito Federal.

#### 4.5 Critérios de inclusão

- Pacientes acima de 18 anos;
- Capacidade de compreensão e preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
- Pacientes com confirmação diagnóstica de COVID-19 por Reação em Cadeia de Polimerase – Transcriptase Reversa (do inglês *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*).

#### 4.6 Classificação quanto à gravidade da doença

Para alocação em um dos grupos, graves ou não-graves, foram utilizados critérios publicados pela OMS<sup>92</sup> de modo a padronizar a seleção dos indivíduos.

Dessa forma, foram considerados pacientes graves aqueles que apresentaram à admissão:

- Dispneia (frequência respiratória maior que 30 incursões respiratórias por minuto);
- SpO2 menor que 93% em ar ambiente;

- Relação  $PaO_2/FiO_2$  menor que 300mmHg;
- Admissão em unidade de terapia intensiva ou;
- Necessidade de ventilação mecânica.

#### 4.7 Critérios de exclusão

- Pacientes gestantes;
- Doença mental orgânica, funcional ou oligofrenia, que comprometesse a qualidade da informação fornecida pelo paciente;
- Indivíduos abaixo de 18 anos de idade;
- Pacientes portadores de distúrbios da coagulação no polo trombótico (trombofilias);
- Portadores de distúrbios da coagulação no polo hemorrágico (hemofilias ou outros distúrbios hereditários);
- Pacientes que tivessem recebido plasma de convalescentes;
- Pacientes que tivessem recebido hemocomponentes ou hemoderivados nos últimos 30 dias;
- Pacientes que estivessem em uso de anticoagulantes inibidores da trombina (Dabigatrana);
- Pacientes que estivessem em uso de anticoagulantes inibidores do fator X da coagulação (Rivaroxaban, Edoxaban e Apixaban);
- Pacientes que estivessem em uso de anticoagulantes inibidores dos fatores da coagulação dependentes da vitamina K (Varfarina sódica ou Femprocumona);
- Pacientes que estivessem em uso de antiagregantes plaquetários.

Pacientes que estavam recebendo quimioprofilaxia para eventos tromboembólicos com heparina de baixo peso molecular não foram excluídos pois o uso desse tipo de medicação fazia parte do tratamento institucional das formas graves.

#### 4.8 Instrumento de coleta de dados

Todo paciente incluído no estudo foi submetido a entrevista (quando factível), com um membro da equipe, de forma a obter variáveis demográficas gerais como sexo, idade e registros

clínicos como comorbidades associadas, medicações em uso, tempo de início dos sintomas até buscar auxílio médico, sintomas iniciais e presença de sinais de gravidade (dispneia, taquipneia, hipoxemia). Pacientes que já se encontravam em estado grave, tiveram as informações coletadas a partir do prontuário da instituição.

Todas as informações foram coletadas em instrumento especificamente criado para a pesquisa (Ficha Clínica, Anexo B).

#### 4.9 Coleta de amostra sanguínea

No momento em que se considera ser o pico da viremia e da resposta inflamatória sistêmica, entre 7-10 dias de sintomas<sup>10</sup>, foi realizada coleta de amostra de 3,8ml de sangue citratado. Como naquele momento não se dispunha de dados sorológicos que pudessem caracterizar a resposta do hospedeiro, padronizou-se a coleta da amostra entre 7 e 10 dias após a confirmação diagnóstica pelo PCR.

Já os indivíduos saudáveis, tiveram os mesmos 3,8ml de sangue citratado coletados no máximo 03 dias após exame de PCR negativo para SARS-CoV-2.

#### 4.10 Tromboelastometria<sup>70, 72</sup>

Para realização dos exames, optou-se por um aparelho fixo, modelo ROTEM® Delta, em um laboratório fora dos hospitais de coleta (Laboratório DASA).

O sangue coletado era imediatamente transferido para o local de teste, realizado sempre no mesmo aparelho, com os mesmos analistas de laboratório.

Todos os insumos utilizados, incluindo: ponteira da pipeta eletrônica, cubetas e todos os reagentes foram fornecidos diretamente pela Werfen do Brasil, empresa de origem espanhola e detentora dos direitos de comercialização do ROTEM® e dos insumos.

Os controles de qualidade foram realizados semanalmente, segundo a indicação do fabricante, com os reagentes ROTROL N e ROTROL P, igualmente fornecidos pela Werfen do Brasil.

A calibração do equipamento seguiu a rotina determinada pelo fabricante de modo a garantir a reprodutibilidade dos exames.

Ao chegarem ao laboratório, todas as amostradas foram submetidas a pré-aquecimento na área de trabalho por 5-10 minutos, já que as mesmas não foram avaliadas imediatamente após a coleta, mas sempre respeitando a indicação de no máximo 04 horas após a venóclise.<sup>72</sup>

#### 4.10.1 Avaliação da via extrínseca da coagulação (EXTEM)

- Inserção do pino e da cubeta no primeiro canal de teste;
- Seleção do teste;
- Pipetagem de 300µl de sangue citratado;
- Pipetagem dos ativadores r ex-tem® e ex-tem® L e do recalcificante star-tem®;
- Colocação do suporte da cubeta na posição de medida;
- Execução do exame;
- Descarte dos materiais.

#### 4.10.2 Teste da via intrínseca da coagulação (INTEM)

- Inserção do pino e da cubeta no segundo canal de teste;
- Seleção do teste;
- Pipetagem de 300µl de sangue citratado;
- Pipetagem do ativador in-tem® e do recalcificante star-tem®;
- Colocação do suporte da cubeta na posição de medida;
- Execução do exame;
- Descarte dos materiais.

#### 4.10.3 Teste da ativação endógena da hemostasia (NATEM)

- Inserção do pino e da cubeta no terceiro canal de teste;
- Seleção do teste;
- Pipetagem de 300µl de sangue citratado;

- Pipetagem do recalificante star-tem®;
- Colocação do suporte da cubeta na posição de medida;
- Execução do exame;
- Descarte dos materiais.

#### 4.10.4 Avaliação funcional do fibrinogênio (FIBTEM)

- Inserção do pino e da cubeta no quarto canal de teste;
- Seleção do teste;
- Pipetagem de 300µl de sangue citratado;
- Pipetagem dos ativadores r ex-tem® e ex-tem® L e do recalificante e inibidor plaquetário fib-tem®;
- Colocação do suporte da cubeta na posição de medida;
- Execução do exame;
- Descarte dos materiais.

#### 4.11 Tamanho da amostra

Para determinação do tamanho da amostra foi utilizado o software G\*Power (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) adotando-se erro alfa de 5% e erro beta de 20% para Poder de 95% e Size Effect de 1,66, tendo como base teste t com variáveis independentes.<sup>93</sup>

Até o momento de início desse estudo, não havia descrição publicada do perfil tromboelastométrico do teste NATEM em pacientes com COVID-19. Para efeito de cálculo amostral, utilizamos como base estudos prévios realizados por outros autores que avaliaram a ativação endógena da coagulação (teste NATEM) em indivíduos com sepse bacteriana.<sup>81</sup>

Para avaliar a cinética da formação do trombo, optou-se por escolher o CFT para o cálculo amostral. Dessa forma, utilizaram-se os valores das médias  $\pm$  DP desse parâmetro: 229 $\pm$ 19 segundos em indivíduos sépticos *versus* 259 $\pm$ 17 segundos em indivíduos normais. Dessa forma, obteve-se uma amostra de 11 pacientes em cada grupo (não-grave e grave).

#### 4.12 Análise estatística

O software GraphPad Prism versão 8.0.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) foi usado para a análise estatística descritiva.

Uma distribuição normal foi testada com o teste de Shapiro-Wilk, já que todos os grupos foram constituídos por menos de 30 indivíduos.

As variáveis categóricas foram descritas como frequências absolutas e relativas e analisadas com o teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

As variáveis contínuas foram descritas como a média  $\pm$  DP. As comparações múltiplas entre os grupos foram realizadas usando *one way* ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparações de pares. O teste t de Student bicaudal foi usado para comparações entre pacientes não-graves e graves. Em todos os casos, valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística.

#### 4.13 Tratamento dos dados tromboelastométricos obtidos

##### 4.13.1 Determinação de pontos de corte

Ainda não existe definição universalmente aceita de quais deveriam ser os valores de referência tromboelastométricos para se considerar hipercoagulabilidade. Alguns autores utilizam aumento do MCF<sup>75, 94, 95</sup>, enquanto outros utilizam reduções do CT<sup>94</sup>, denotando aumento da cinética de formação do coágulo, enquanto alguns, ainda, preferem utilizar a redução da fibrinólise (ML).<sup>96</sup> Para não serem adotados valores arbitrários de pontos de corte, construíram-se as Receiver Operating Characteristics Curves (ROC) para cada um dos parâmetros tromboelastométricos analisados. As Curvas ROC são ferramentas de análise estatística comumente utilizadas para estudos da acurácia de métodos diagnósticos, com sua principal medida de comparação, a Área sob a Curva (do inglês *Area Under the Curve*) e parâmetros descritores característicos, a Sensibilidade (Se), Especificidade (Sp) e as Razões de Verossimilhança tanto positiva (LR +), quanto negativa (LR -).<sup>97-99</sup>

As curvas ROC foram construídas usando o software MedCalc, versão 7.3.0.0 (Ostend, Bélgica, URL <https://www.medcalc.org/>), para definir os valores de corte e estimar a precisão global com base na área sob a curva ROC (AUC).

Como as curvas ROC não permitem a avaliação simultânea do ponto de corte escolhido e suas respectivas sensibilidade e especificidade, construíram-se as curvas Two-Graph Receiver Operating Characteristics (TG-ROC). Essa construção permitiu confirmar o valor do ponto de

corte quanto aos melhores índices de desempenho.<sup>100, 101</sup> Também foi utilizado o software MedCalc, versão 7.3.0.0 (Ostend, Bélgica, URL <https://www.medcalc.org/> nessa fase das análises.

#### 4.13.2 Criação de Árvores de Decisão para uso clínico

Para que os dados obtidos da tromboelastometria pudessem ser utilizados na prática clínica, optou-se por construir algoritmos na forma de Árvores de Decisão. A partir dos índices de desempenho obtidos das curvas ROC, foram escolhidos aqueles parâmetros que tivessem mostrado Acurácia Global (AUC) moderada/elevada, correspondendo a valores maiores ou iguais a 0,7. Essa seleção de parâmetros foi realizada em quatro situações possíveis:

- (A) comparando controles normais com COVID-19;
- (B) controles normais e pacientes não-graves;
- (C) controles normais e pacientes graves;
- (D) pacientes não-graves e graves.

Esses parâmetros selecionados foram utilizados, posteriormente, para alimentar o software WEKA (Waikato Environment for Knowledge Analysis, versão 3.6.11, University of Waikato, Nova Zelândia, URL <https://www.cs.waikato.ac.nz/ml/weka/>) o qual permitiu classificar os pacientes COVID-19 e controles saudáveis com base nos parâmetros tromboelastométricos selecionados.<sup>102</sup>

Para avaliar se as Árvores de Decisão poderiam ser generalizáveis, os dados foram posteriormente analisados por técnicas de *machine learning*, do tipo Validação Cruzada (do inglês *Cross Validation*). Especificamente, foi utilizada a técnica *Leave-One-Out Cross Validation* (LOOCV), que permite testar o quão preciso foi o modelo desenvolvido. Rapidamente, nessa técnica, a amostra é dividida em  $n$  subgrupos, sendo  $n$  o número de indivíduos na amostra. A seguir, o sistema retira o valor de um componente da amostra e aplica o modelo. Isso é feito sucessivamente  $n$  vezes até que todos os dados tenham sido testados.<sup>103</sup>

Os gráficos (diagramas de barras, gráficos de dispersão e Árvores de Decisão) foram gerados usando o Microsoft Office Package versão 2012 e o software GraphPad Prism, versão 8.0.

#### 4.13.3 Representação dos algoritmos na forma de gráficos de dispersão

Além da representação das propostas de algoritmos na forma de Árvores de Decisão, também foram construídos gráficos de dispersão com os parâmetros tromboelastométricos já selecionados. Em cada gráfico, foram representados o número de indivíduos corretamente classificados, os pontos de corte utilizados e eventuais falhas de classificação.

#### 4.13.4 Representação das curvas ROC e TG-ROC utilizadas nos algoritmos

Finalmente, os parâmetros utilizados para construção das Árvores de Decisão foram apresentados com suas respectivas curvas ROC e TG-ROC, explicitando em cada uma, os parâmetros descritores Sensibilidade (Se), Especificidade (Sp), Razões de Verossimilhança positiva (LR+) e negativa (LR-) e pontos de corte considerados.

#### 4.14 Ética em pesquisa

O Protocolo TARGET<sup>91</sup> foi aprovado pelo Comitê de Ética da FM-UnB (Anexo A - número de homologação CAAE: 30846920.7.0000.0008 e número de parecer 4.077.252), de acordo com a declaração de Helsinque e sua atualização de 2013. Todos os pacientes foram incluídos após a assinatura do TCLE (Anexo C), seja assinado pelo próprio indivíduo, quanto por familiares responsáveis em caso de impossibilidade.

A coleta da assinatura no TCLE foi realizada por via eletrônica (versão digital do TCLE enviado via WhatasApp em um Formulário GoogleForms) tanto para os pacientes e voluntários normais quanto para eventuais familiares que fossem assinar por pacientes incapacitados para fazê-lo.

#### 4.15 Financiamento do estudo

O custo envolvido com a execução do trabalho constou de insumos para os testes tromboelastométricos, materiais de proteção individual e para coleta sanguínea e execução dos testes em equipamento apropriado.

Os insumos foram adquiridos pelo grupo de estudo com recursos próprios.

O laboratório DASA forneceu a execução de todos os exames sem ônus.

#### 4.17 Conflito de interesse

O autor, assim como orientadores declaram não haver qualquer conflito de interesses para a realização do presente estudo.

## 5 RESULTADOS

Foram incluídos 20 pacientes com formas leves de COVID-19 que estavam em isolamento domiciliar e 21 com formas graves, internados nos hospitais participantes do estudo, além de 09 indivíduos controles normais, voluntários.

Os pacientes com formas graves da doença foram captados no Hospital Regional da Asa Norte ou Hospital Universitário de Brasília, por membros integrantes do grupo de estudo, que realizavam a triagem e inclusão do voluntário. O preenchimento da Ficha Clínica para as etapas seguintes foi realizado pelo pesquisador principal.

Pacientes classificados como leves foram abordados pela mesma equipe de triagem nos hospitais participantes e o preenchimento da Ficha Clínica realizada pelo pesquisador principal.

Indivíduos saudáveis voluntários foram incluídos entre funcionários dos hospitais participantes ou da população geral.

Os TCLE foram todos aplicados pelo pesquisador principal.

### 5.1 PERFIL DA AMOSTRA ESTUDADA

As características da população estudada estão demonstradas na Tabela 2. Não houve diferença quanto à idade dos grupos, que mostrou mediana de 40 anos (23 a 51) nos controles normais, 39 anos (19-70) no grupo de pacientes não-graves e 50 anos (26-76) no grupo dos graves.

Quanto à distribuição por sexo, também não houve diferença estatística, com predominância absoluta de mulheres nos controles normais (100%), 40% nos não-graves e 57% nos graves.

Já o peso, mostrou diferença estatisticamente significativa entre controles normais ( $74\pm 8\text{kg}$ ) e pacientes graves ( $90\pm 16\text{kg}$ ), com  $p=0,04$ .

Quando se classificou os indivíduos quanto ao Índice de Massa Corporal (IMC), houve evidente maior proporção de indivíduos obesos ( $\text{IMC} \geq 30$ ) no grupo de paciente graves, com 62% do total, contra 15% de obesos no grupo de não-graves. Essa diferença se mostrou estatisticamente significativa com  $p=0,01$ .

Da mesma forma, o percentual de indivíduos hipertensos foi significativamente maior no grupo dos graves (48%) em relação aos não-graves (0), com  $p=0,0005$ . No entanto, a diferença não manteve significância quando se avaliou o percentual de utilização de

medicamentos bloqueadores dos receptores de angiotensina com 43% dos graves versus 20% dos não-graves.

Quanto aos sintomas apresentados pelos pacientes, foram citados na Tabela 2, aqueles mencionados por mais de 50% dos indivíduos. No grupo de não-graves as queixas mais usuais foram anosmia, ageusia, astenia e cefaleia, citados por 63%. Enquanto nos graves, foram mais citados a dispneia (81%), tosse (67%) e astenia (57%).

Ao se avaliar o grau de comprometimento pulmonar à Tomografia Computadorizada de Tórax, observou-se que os indivíduos com quadros clínicos graves apresentaram acometimento pulmonar maior, com 38% desses apresentando de 25-50% de acometimento ante 0% nos não-graves com  $p=0,04$ . Da mesma forma, o acometimento maior do que 50% dos pulmões foi muito mais frequente (33%) nos graves do que nos não-graves (0%) com  $p=0,009$ .

Inicialmente, a intenção era coletar informações de exames laboratoriais de todos os indivíduos avaliados (conforme Ficha Clínica – ANEXO B). No entanto, não foi possível realizar qualquer análise pois os voluntários sadios e aqueles com quadros leves, em geral, não foram submetidos a exames laboratoriais. Mesmo no grupo de indivíduos com formas graves, a disponibilidade de exames foi errática e incompleta. Dessa forma, optamos por não considerar exames laboratoriais de nossa amostra para análise estatística.

Quanto à necessidade de internação em UTI, observou-se que 24% dos graves necessitaram desse suporte, enquanto nenhum dos pacientes não-graves o fez, com  $p=0,05$ . Finalmente, no tocante ao tratamento clínico instituído, os não-graves receberam predominantemente Azitromicina (70%), alguma formulação de corticosteroide (60%) e 20% receberam trombotprofilaxia com Enoxaparina. Enquanto nos graves, além da Azitromicina (95%) e algum corticoide (100%), a trombotprofilaxia foi observada em 90% dos casos.

Tabela 2. Características basais dos participantes do estudo §

Parâmetro	Controles normais (HC, n=09)	Não-graves (NS, n=20)	Graves (S, n=21)	p
Idade (Mediana, Min-Max)	40, 23-51	39, 19-70	50, 26-76	NS
Sexo, F/M (% de F)	9/0 (100)	8/12 (40)	12/9 (57)	NS
Peso (kg, médias±DP)	74±8 *	78±19	90±16 *	0,04
IMC (% do total) ‡				
≤24,9	3 (33)	6 (30)	2 (9)	NS
25-29,9	3 (33)	10 (55)	6 (29)	NS
≥30	3 (33)	3 (15) *	13 (62) *	0,01
Hipertensão (%)	0 (0)	0 (0) *	10 (48) *	0,0005
Obesidade (%)	3 (33)	3 (15) *	13 (62) *	0,004
Uso de BRA (%)	0 (0)	4 (20)	9 (43)	NS
Sintomas (%) ‡	---	Anosmia 12 (63) Ageusia 12 (63) Astenia 12 (63) Cefaleia 12 (63) Tosse 11 (58)	Dispneia 17 (81) Tosse 14 (67) Astenia 12 (57) Febre 11 (52)	
TC de Tórax #				
<25%	0 (0)	3 (15)	6 (29)	NS
25-50%	0 (0)	0 (0) *	8 (38) *	0,004
>50%	0 (0)	0 (0) *	7 (33) *	0,009
Admissão em UTI	0 (0)	0 (0)	5 (24)	0,05
Tratamento	---	Azitromicina 14 (70) Corticoide 12 (60) Enoxaparina 4 (20)	Corticoide 21 (100) Azitromicina 20 (95) Enoxaparina 19 (90)	

Dados estão representados como número de indivíduos (%), exceto para idade (anos, mediana – mínimo-máximo), sexo (F/M, % de F) e peso (kg, médias±DP). BRA = bloqueadores dos receptores de angiotensina. ‡ Somente sintomas presentes em mais de 50% dos indivíduos foram listados. ¶ Somente os tratamentos mais frequentes foram listados. ¥ IMC: Índice de Massa Corporal: calculado pela divisão do peso em quilogramas pelo quadrado da altura em metros. Resultado adimensional: abaixo de 24,9 peso saudável; de 25 a 29,9 sobrepeso e acima de 30, obesidade. # Tomografia computadorizada de Tórax (TC de tórax): avaliação subjetiva por radiologista quanto ao grau de comprometimento do parênquima pulmonar (opacidade em vidro fosco). <25%: menos do que 25% de acometimento; 25-50%: entre 25 e 50% de acometimento; >50%: mais de 50% de acometimento pulmonar. UTI: Unidade de Terapia Intensiva. \* Pares de dados que mostraram diferença estatisticamente significante com seu respectivo valor de p. HC = controles normais; NS = pacientes não-graves com COVID-19; S = pacientes graves com COVID-19.

## 5.2 DADOS TROMBOELASTOMÉTRICOS

### 5.2.1 Parâmetros tromboelastométricos em pacientes COVID-19 e controles normais (HC)

Os parâmetros tromboelastométricos obtidos de pacientes com COVID-19, independentemente da gravidade, e controles normais, foram ilustrados na Figura 12. A Tabela 3 mostra, detalhadamente, os valores das médias e DP de cada parâmetro analisado e os valores de  $p$  em caso de significância estatística.

Na avaliação da via extrínseca da coagulação, no teste EXTEM, detectou-se alargamento significativo do CT em pacientes COVID-19 em relação aos normais ( $56\pm 7s$  versus  $65\pm 10s$ , com  $p=0,02$ ). Demais parâmetros do EXTEM (ALPHA, CFT, MCF, ML e TPI) não se mostraram diferentes.

Já na análise da via intrínseca, no teste INTEM, não se mostrou qualquer diferença na comparação entre esses dois grupos.

Quando se avaliou a ocorrência de ativação endógena na hemostasia, através do teste NATEM, observou-se encurtamento do CT ( $471\pm 211s$  versus  $283\pm 108s$ , com  $p=0,008$ ), alargamento do ângulo Alfa ( $66\pm 8^\circ$  versus  $72\pm 8^\circ$ , com  $p=0,01$ ), aumento do MCF ( $61\pm 6mm$  versus  $67\pm 6mm$ , com  $p=0,008$ ) e do TPI ( $2\pm 1$  versus  $3\pm 2$ , com  $p=0,01$ ) em relação aos controles normais. Os parâmetros CFT e ML apresentaram resultados semelhantes entre os grupos.

Na avaliação funcional do fibrinogênio, pelo teste FIBTEM, observou-se aumento significativo do MCF ( $19\pm 4mm$  versus  $27\pm 9mm$ , com  $p=0,01$ ) ao se comparar com os indivíduos voluntários sem COVID-19.

Parâmetros tromboelastométricos em pacientes COVID-19 e Controles Normais

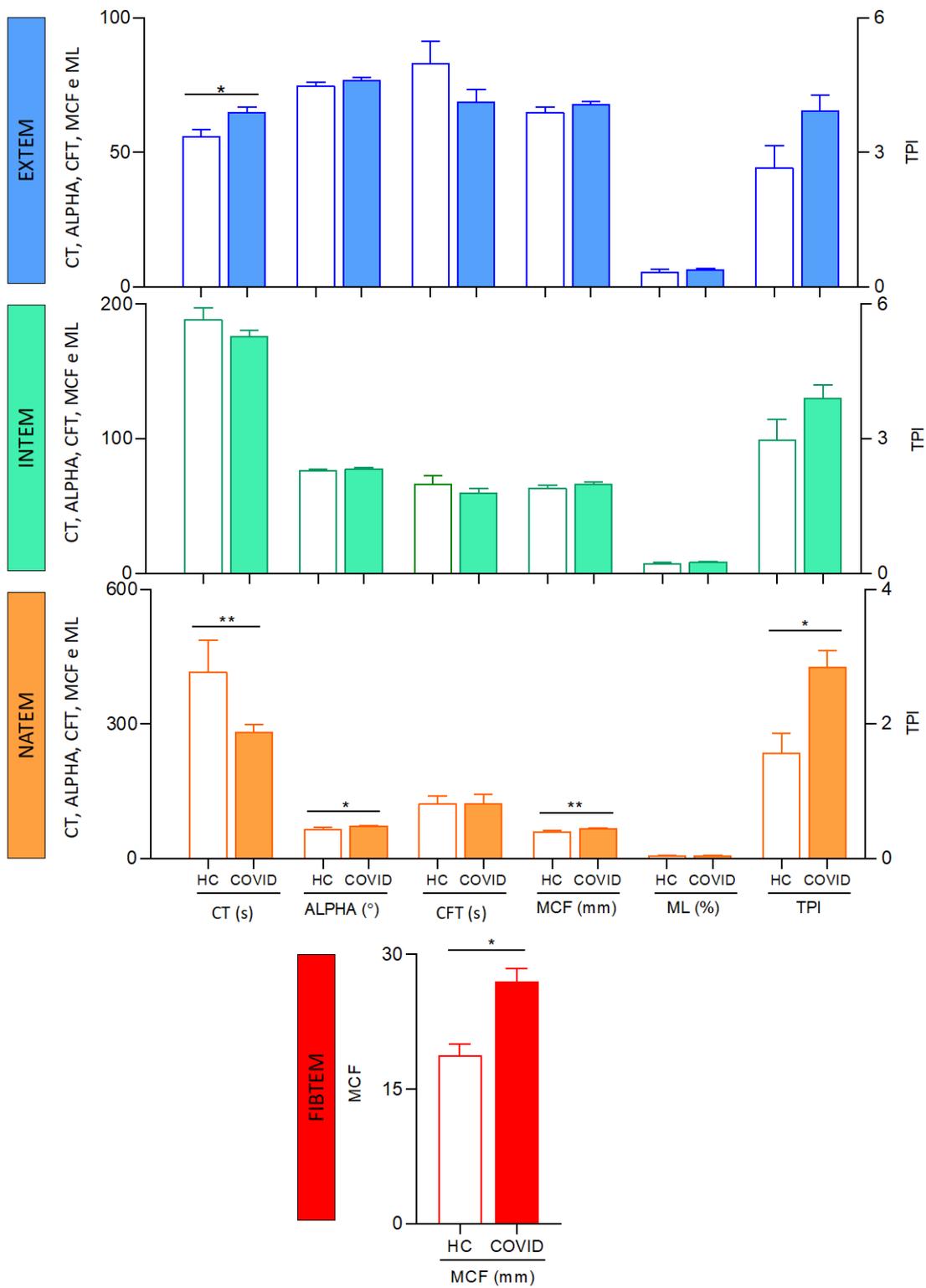


Figura 12: Parâmetros tromboelastométricos em pacientes COVID-19 e controles normais. Avaliação das vias extrínseca (EXTEM) e intrínseca (INTEM), avaliação funcional do fibrinogênio (FIBTEM) e teste não ativado da coagulação (NATEM) foram realizados de acordo com o descrito na sessão 4.10 Tromboelastometria. Os resultados para pacientes COVID-19 (COVID, n=41, barras coloridas) e controles normais (HC, n=9, barras brancas) foram representados pela média  $\pm$  desvio padrão. CT (expresso em segundos) = Tempo de Coagulação: se refere à formação de trombina, tempo desde a ativação até uma amplitude de 2mm; ALPHA (expresso em  $^{\circ}$ ) = definido como ângulo entre a linha de base e a tangente da curva de coagulação na amplitude de 2mm; CFT (expresso em segundos) = Tempo de Formação do Coágulo: refere-se à dinâmica da formação de fibrina, intervalo entre a amplitude de 2mm e a de 20mm; MCF (expressa em mm) = Firmeza Máxima do Coágulo: refere-se à máxima amplitude do gráfico, proporcional à quantidade de fibrinogênio e plaquetas; ML (expressa em %) = Lise Máxima: representa o percentual de redução da amplitude do coágulo após a iniciação da fibrinólise. TPI = Índice do Potencial Trombodinâmico, calculado como  $[(100 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF})] / \text{CFT}$ . Diferenças estatisticamente significantes foram identificadas por uma linha horizontal conectando os respectivos pares e por \* ou \*\* para valores de  $p \leq 0,05$  e  $\leq 0,01$ , respectivamente. HC = controles normais; NS = pacientes não-graves com COVID-19; S = pacientes graves com COVID-19.

Tabela 3. Parâmetros tromboelastométricos em pacientes COVID-19 e indivíduos normais

Parâmetros	Controles normais (HC, n=09)	Pacientes (COVID, n=41)	Valor de p †
<b>EXTEM</b>			
CT	56±7	65±10	0,02
ALPHA	75±4	77±5	NSS
CFT	83±24	69±28	NSS
MCF	65±5	68±6	NSS
ML	6±3	6±3	NSS
TPI	3±2	4±2	NSS
<b>INTEM</b>			
CT	189±25	176±30	NSS
ALPHA	77±3	78±3	NSS
CFT	67±17	60±17	NSS
MCF	63±6	67±6	NSS
ML	7±3	9±4	NSS
TPI	3±1	4±2	NSS
<b>NATEM</b>			
CT	417±211	283±108	0,008
ALPHA	66±8	72±8	0,01
CFT	124±50	123±95	NSS
MCF	61±6	67±6	0,008
ML	6±4	7±4	NSS
TPI	2±1	3±2	0,01
<b>FIBTEM</b>			
MCF	19±4	27±9	0,01

HC = controles normais; COVID = grupo de pacientes independentemente da gravidade; NSS = não estatisticamente significante; EXTEM = avaliação da fase extrínseca; INTEM = avaliação da fase intrínseca; NATEM = teste não ativado da coagulação e FIBTEM = avaliação funcional do fibrinogênio. CT (expresso em segundos) = Tempo de Coagulação: se refere à formação de trombina, tempo desde a ativação até uma amplitude de 2mm; ALPHA (expresso em °) = definido como ângulo entre a linha de base e a tangente da curva de coagulação na amplitude de 2mm; CFT (expresso em segundos) = Tempo de Formação do Coágulo: refere-se à dinâmica da formação de fibrina, intervalo entre a amplitude de 2mm e a de 20mm; MCF (expressa em mm) = Firmeza Máxima do Coágulo: refere-se à amplitude máxima do gráfico, proporcional à quantidade de fibrinogênio e plaquetas; ML (expressa em %) = Lise Máxima: representa o percentual de redução da amplitude do coágulo após a iniciação da fibrinólise. TPI = Índice do Potencial Trombodinâmico, calculado como  $[(100 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF})] / \text{CFT}$ . § Dados expressos como Média ± DP. † Valores de p foram calculados com o teste t de Student para amostras independentes para variáveis contínuas.

### 5.2.2 Parâmetros tromboelastométricos em pacientes COVID-19 de acordo com a gravidade da doença

Os parâmetros tromboelastométricos obtidos de pacientes com COVID-19, classificados de acordo com a gravidade do quadro clínico em graves e não graves, e de controles normais, foram ilustrados na Figura 13. A Tabela 4 mostra, detalhadamente, os valores das médias e DP de cada parâmetro analisado e os valores de p em caso de significância estatística.

Na avaliação da via extrínseca da coagulação, no teste EXTEM, detectou-se alargamento significativo do CT em pacientes graves ( $68 \pm 9s$ ) em relação aos normais ( $56 \pm 7s$ ), com  $p=0,002$  e em relação aos não-graves ( $61 \pm 9s$ ), com  $p=0,02$ . O ALPHA mostrou aumento nos graves ( $79 \pm 2^\circ$ ) em relação aos normais ( $75 \pm 4^\circ$ ), com  $p=0,0006$  e em relação aos não-graves ( $74 \pm 5^\circ$ ), com  $p=0,0007$ . O CFT mostrou diminuição nos graves ( $57 \pm 14s$ ) em relação aos normais ( $83 \pm 24s$ ), com  $p=0,0009$  e comparando-se aos não-graves ( $81 \pm 33s$ ), com  $p=0,004$ . A amplitude máxima do coágulo (MCF) também mostrou alargamento nos casos graves ( $70 \pm 5mm$ ) comparando-se com os controles ( $65 \pm 5mm$ ), com  $p=0,007$  e em relação aos não-graves ( $65 \pm 5mm$ ), com  $p=0,001$ . O TPI se apresentou significativamente elevado nos graves ( $4,8 \pm 2$ ) comparando-se aos normais ( $3 \pm 2$ ), com  $p=0,009$  e em relação aos não-graves ( $3 \pm 2$ ), com  $p=0,003$ . A análise da lise, pelo ML, não se mostrou distinta entre os grupos.

Já na análise da via intrínseca, no teste INTEM, observou-se ampliação do ALPHA nos graves ( $79 \pm 2^\circ$ ) em relação aos normais ( $77 \pm 3^\circ$ ), com  $p=0,009$  e comparando-se com os não-graves ( $76 \pm 3^\circ$ ), com  $p=0,003$ . O CFT encontrava-se reduzido nos graves ( $52 \pm 10s$ ) ao se comparar com os saudáveis ( $67 \pm 17s$ ), com  $p=0,009$  e em relação aos não-graves ( $68 \pm 19s$ ), com  $p=0,003$ . O MCF também mostrou elevação nos graves ( $69 \pm 5mm$ ) ao se comparar com os normais ( $63 \pm 6mm$ ), com  $p=0,006$  e em relação aos não-graves ( $63 \pm 5mm$ ), com  $p=0,0007$ . Da mesma forma, o TPI se apresentou aumentado nos graves ( $5 \pm 2$ ) em relação aos indivíduos saudáveis ( $3 \pm 1$ ) e  $p=0,01$  e ao se comparar com os não-graves ( $3 \pm 1$ ), com  $p=0,001$ . Já os parâmetros CT e ML não se mostraram distintos entre os grupos analisados.

Quando se avaliou a ocorrência de ativação endógena da hemostasia, através do teste NATEM, observou-se encurtamento do CT dos graves ( $284 \pm 120s$ ) em relação aos normais ( $417 \pm 211s$ ), com  $p=0,03$  e dos não-graves ( $269 \pm 115s$ ) comparando-se aos normais ( $417 \pm 211s$ ),

com  $p=0,02$ . Avaliando-se o ALPHA, encontrou-se aumento da angulação nos casos graves ( $75\pm 5^\circ$ ) ao se comparar com os normais ( $66\pm 8^\circ$ ) e  $p=0,0009$  e em relação aos não-graves ( $69\pm 9^\circ$ ), com  $p=0,007$ . Para o CFT, os dados evidenciaram redução desse parâmetro nos indivíduos graves ( $73\pm 31s$ ) em relação aos normais ( $124\pm 50s$ ), com  $p=0,002$  e em relação aos não-graves ( $122\pm 94s$ ), com  $p=0,03$ . O MCF também se mostrou ampliado nos pacientes graves ( $69\pm 4mm$ ) em relação aos normais ( $61\pm 6mm$ ) e  $p=0,0002$  e ao se comparar com os não-graves ( $63\pm 5mm$ ), com  $p=0,0005$ . Quanto ao TPI, também se observou elevação nos casos graves ( $4\pm 2$ ) em relação aos normais ( $2\pm 1$ ) e  $p=0,0005$  e comparando-se com os não-graves ( $2\pm 1$ ), com  $p=0,0003$ . O parâmetro ML não apresentou diferença nas comparações realizadas.

Na avaliação funcional do fibrinogênio, pelo teste FIBTEM, observou-se aumento significativo do MCF ( $33\pm 7mm$ ) ao se comparar com os saudáveis ( $19\pm 4mm$ ) e  $p=0,0001$  e em relação aos indivíduos não-graves ( $20\pm 6mm$ ), com  $p=0,0001$ .

Parâmetros tromboelastométricos em pacientes COVID-19 de acordo com a gravidade da doença

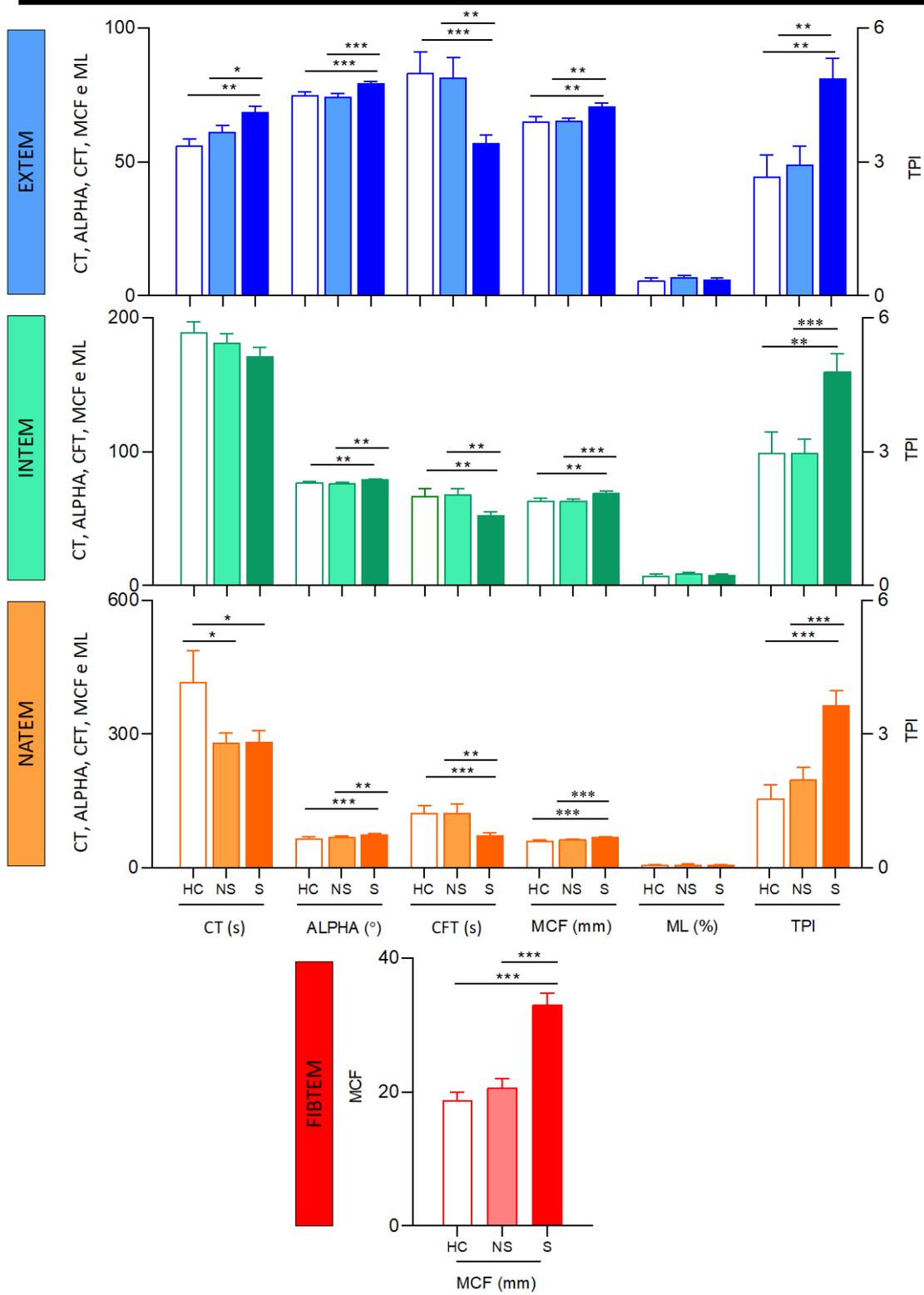


Figura 13: Parâmetros tromboelastométricos em pacientes COVID-19 de acordo com a gravidade da doença. Estudo das vias extrínseca (EXTEM) e intrínseca (INTEM) da coagulação, avaliação funcional do fibrinogênio (FIBTEM) e teste não ativado da coagulação (NATEM) foram realizados de acordo com o descrito na sessão 4.10 Tromboelastometria. Os resultados para pacientes COVID-19 não-graves (NS, n=20, barras de cores claras), graves (S, n=21, barras de cores escuras) e controles normais (HC, n=9, barras brancas) estão representados como médias  $\pm$  desvio padrão. CT (expresso em segundos) = Tempo de Coagulação: se refere à formação de trombina, tempo desde a ativação até uma amplitude de 2mm; ALPHA (expresso em  $^{\circ}$ ) = definido como ângulo entre a linha de base e a tangente da curva de coagulação na amplitude de 2mm; CFT (expresso em segundos) = Tempo de Formação do Coágulo: refere-se à dinâmica da formação de fibrina, intervalo entre a amplitude de 2mm e a de 20mm; MCF (expressa em mm) = Firmeza Máxima do Coágulo: refere-se à máxima amplitude do gráfico, proporcional à quantidade de fibrinogênio e plaquetas; ML (expressa em %) = Lise Máxima: representa o percentual de redução da amplitude do coágulo após a iniciação da fibrinólise. TPI = Índice do Potencial Trombodinâmico, calculado como  $[(100 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF})] / \text{CFT}$ . Diferenças estatisticamente significantes estão identificadas por uma linha horizontal conectando os respectivos pares e por \*, \*\* ou \*\*\* para valores de  $p \leq 0,05$ ,  $\leq 0,01$  e  $\leq 0,001$ , respectivamente. HC = controles normais; NS = pacientes não-graves com COVID-19; S = pacientes graves com COVID-19.

Tabela 4. Parâmetros tromboelastométricos em indivíduos normais e pacientes não-graves e graves

Parâmetros	Controles normais (HC, n=09)	Não-graves (NS, n=20)	Graves (S, n=21)	Valor de p †
<b>EXTEM</b>				
CT	56±7	61±9	68±9 <sup>b,c</sup>	0,002 <sup>b</sup> /0,02 <sup>c</sup>
ALPHA	75±4	74±5	79±2 <sup>b,c</sup>	0,0006 <sup>b</sup> /0,0007 <sup>c</sup>
CFT	83±24	81±33	57±14 <sup>b,c</sup>	0,0009 <sup>b</sup> /0,004 <sup>c</sup>
MCF	65±5	65±5	70±5 <sup>b,c</sup>	0,007 <sup>b</sup> /0,001 <sup>c</sup>
ML	6±3	7±3	6±2	NSS
TPI	3±2	3±2	4,8±2 <sup>b,c</sup>	0,009 <sup>b</sup> /0,003 <sup>c</sup>
<b>INTEM</b>				
CT	189±25	181±30	171±29	NSS
ALPHA	77±3	76±3	79±2 <sup>b,c</sup>	0,009 <sup>b</sup> /0,003 <sup>c</sup>
CFT	67±17	68±19	52±10 <sup>b,c</sup>	0,009 <sup>b</sup> /0,003 <sup>c</sup>
MCF	63±6	63±5	69±5 <sup>b,c</sup>	0,006 <sup>b</sup> /0,0007 <sup>c</sup>
ML	7±3	9±3	8±3	NSS
TPI	3±1	3±1	5±2 <sup>b,c</sup>	0,01 <sup>b</sup> /0,001 <sup>c</sup>
<b>NATEM</b>				
CT	417±211	269±115 <sup>a</sup>	284±120 <sup>b</sup>	0,02 <sup>a</sup> /0,03 <sup>b</sup>
ALPHA	66±8	69±9	75±5 <sup>b,c</sup>	0,0009 <sup>b</sup> /0,007 <sup>c</sup>
CFT	124±50	122±94	73±31 <sup>b,c</sup>	0,002 <sup>b</sup> /0,03 <sup>c</sup>
MCF	61±6	63±5	69±4 <sup>b,c</sup>	0,0002 <sup>b</sup> /0,0005 <sup>c</sup>
ML	6±4	7±4	6±3	NSS
TPI	2±1	2±1	4±2 <sup>b,c</sup>	0,0005 <sup>b</sup> /0,0003 <sup>c</sup>
<b>FIBTEM</b>				
MCF	19±4	20±6	33±7 <sup>b,c</sup>	0,0001 <sup>b</sup> /0,0001 <sup>c</sup>

HC = controles normais; NS = pacientes não-graves; S = pacientes graves; NSS = não estatisticamente significante; EXTEM = avaliação da via extrínseca; INTEM = avaliação da via intrínseca; NATEM = teste não ativado da coagulação e FIBTEM = avaliação funcional do fibrinogênio. CT (expresso em segundos) = Tempo de Coagulação: se refere à formação de trombina, tempo desde a ativação até uma amplitude de 2mm; ALPHA (expresso em °) = definido como ângulo entre a linha de base e a tangente da curva de coagulação na amplitude de 2mm; CFT (expresso em segundos) = Tempo de Formação do Coágulo: refere-se à dinâmica da formação de fibrina, intervalo entre a amplitude de 2mm e a de 20mm; MCF (expressa em mm) = Firmeza Máxima do Coágulo: refere-se à máxima amplitude do coágulo, proporcional à quantidade de fibrinogênio e plaquetas; ML (expressa em %) = Lise Máxima: representa o percentual de redução da amplitude do coágulo após a iniciação da fibrinólise. TPI = Índice do Potencial Trombodinâmico, calculado como  $[(100 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF})] / \text{CFT}$ . § Dados expressos como Média ± DP. † Valores de p foram calculados com o teste t de Student para amostras independentes para variáveis contínuas. Diferenças significantes estão identificadas com letras “a”, “b” e “c” para comparações entre NS vs HC, S vs HC e S vs NS, respectivamente.

### 5.2.3 Performance dos parâmetros tromboelastométricos como possíveis biomarcadores para classificar pacientes COVID-19

Após a descrição do perfil tromboelastométrico da amostra, a próxima etapa envolveu avaliar a aplicabilidade de parâmetros tromboelastométricos obtidos dos testes EXTEM, INTEM, NATEM e FIBTEM com o intuito de classificar pacientes COVID-19 de acordo com a gravidade da doença e estes em relação a indivíduos normais.

Em uma primeira análise, foram selecionados parâmetros que tivessem apresentado Acurácia Global de moderada a alta, indicados por  $AUC > 0,7$ .

Com esse critério, treze parâmetros foram selecionados para análises subsequentes, primeiramente para classificar pacientes COVID-19 versus controles normais (HC):

- EXTEM: CT, ALPHA, CFT, MCF e TPI;
- INTEM: MCF e TPI;
- NATEM: CT, ALPHA, CFT, MCF e TPI;
- FIBTEM: MCF (Tabela 5 em negrito).

Para separar pacientes não-graves de graves, outros treze parâmetros apresentaram  $AUC > 0,7$ :

- EXTEM: ALPHA, CFT, MCF e TPI;
- INTEM: ALPHA, CFT, MCF e TPI;
- NATEM: ALPHA, CFT, MCF e TPI;
- FIBTEM: MCF (Tabela 5 em negrito).

Na comparação entre não-graves e controles normais, outros três parâmetros mostraram Acurácia Global de moderada a alta ( $AUC > 0,7$ ):

- EXTEM: CT;
- NATEM: CT e MCF (Tabela 6 em negrito).

Finalmente, dezesseis parâmetros mostraram Acurácia Global moderada a elevada ( $AUC > 0,7$ ) para distinguir pacientes graves de controles normais:

- EXTEM: CT, ALPHA, CFT, MCF e TPI;
- INTEM: CT, ALPHA, CFT, MCF e TPI;
- NATEM: CT, ALPHA, CFT, MCF e TPI;
- FIBTEM: MCF do FIBTEM (Tabela 6 em negrito).

Todos os parâmetros selecionados acima foram utilizados para novas análises e construção de um modelo de predição (4.13.2 Criação de Árvores de Decisão) para distinguir pacientes não-graves de graves e estes, dos controles normais.

Tabela 5. Performance dos parâmetros tromboelastométricos como biomarcadores para classificar pacientes COVID-19

PARÂMETROS*	DIAGNÓSTICO					PROGNÓSTICO				
	HC x COVID					COVID (NS x S)				
	AUC	Se (%)	Sp (%)	LR (-)	LR (+)	AUC	Se (%)	Sp (%)	LR (-)	LR (+)
EXTEM										
CT	<b>0,7 (0,6-0,9)</b>	<b>46 (31-63)</b>	<b>100 (66-100)</b>	<b>0,5</b>	<b>+∞</b>	0,6 (0,5-0,8)	86 (64-97)	40 (19-64)	0,4	1,4
ALPHA	<b>0,7 (0,5-0,8)</b>	<b>51 (35-67)</b>	<b>89 (52-98)</b>	<b>0,6</b>	<b>4,6</b>	<b>0,8 (0,7-0,9)</b>	<b>81 (58-94)</b>	<b>80 (56-94)</b>	<b>0,2</b>	<b>4,0</b>
CFT	<b>0,7 (0,6-0,8)</b>	<b>78 (49-80)</b>	<b>78 (40-97)</b>	<b>0,4</b>	<b>3,0</b>	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>62 (39-82)</b>	<b>90 (68-99)</b>	<b>0,4</b>	<b>6,2</b>
MCF	<b>0,7 (0,5-0,8)</b>	<b>44 (29-60)</b>	<b>89 (52-98)</b>	<b>0,6</b>	<b>4,0</b>	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>62 (39-82)</b>	<b>85 (62-97)</b>	<b>0,5</b>	<b>4,1</b>
ML	0,6 (0,4-0,7)	15 (6-29)	100 (66-100)	0,9	+∞	0,6 (0,4-0,8)	14 (3-36)	100 (83-100)	0,9	+∞
TPI	<b>0,7 (0,5-0,8)</b>	<b>61 (45-76)</b>	<b>78 (40-97)</b>	<b>0,5</b>	<b>2,7</b>	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>62 (39-82)</b>	<b>90 (68-99)</b>	<b>0,4</b>	<b>6,2</b>
INTEM										
CT	0,6 (0,5-0,8)	76 (60-88)	56 (21-86)	0,4	1,7	0,6 (0,4-0,8)	62 (39-82)	70 (46-88)	0,5	2,1
ALPHA	0,6 (0,5-0,8)	68 (52-82)	67 (30-92)	0,5	2,1	<b>0,7 (0,6-0,9)</b>	<b>91 (70-99)</b>	<b>55 (32-77)</b>	<b>0,2</b>	<b>2,0</b>
CFT	0,6 (0,5-0,8)	71 (55-84)	67 (30-92)	0,4	2,1	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>91 (70-99)</b>	<b>55 (32-77)</b>	<b>0,2</b>	<b>2,0</b>
MCF	<b>0,7 (0,5-0,8)</b>	<b>76 (60-88)</b>	<b>56 (21-86)</b>	<b>0,4</b>	<b>1,7</b>	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>67 (43-85)</b>	<b>80 (56-94)</b>	<b>0,4</b>	<b>3,3</b>
ML	0,6 (0,4-0,7)	22 (11-38)	100 (66-100)	0,8	+∞	0,5 (0,4-0,7)	95 (76-99)	25 (9-49)	0,2	1,3
TPI	<b>0,7 (0,5-0,8)</b>	<b>73 (57-86)</b>	<b>67 (30-92)</b>	<b>0,4</b>	<b>2,2</b>	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>71 (48-89)</b>	<b>70 (46-88)</b>	<b>0,4</b>	<b>2,4</b>
NATEM										
CT	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>56 (40-72)</b>	<b>89 (52-98)</b>	<b>0,5</b>	<b>5,1</b>	0,5 (0,4-0,7)	57 (34-78)	60 (36-81)	0,7	1,4
ALPHA	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>42 (26-58)</b>	<b>100 (66-100)</b>	<b>0,6</b>	<b>+∞</b>	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>81 (58-94)</b>	<b>70 (46-88)</b>	<b>0,3</b>	<b>2,7</b>
CFT	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>44 (29-60)</b>	<b>100 (66-100)</b>	<b>0,6</b>	<b>+∞</b>	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>91 (70-99)</b>	<b>60 (36-81)</b>	<b>0,2</b>	<b>2,3</b>
MCF	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>76 (60-88)</b>	<b>67 (30-92)</b>	<b>0,4</b>	<b>2,3</b>	<b>0,8 (0,7-0,9)</b>	<b>86 (64-97)</b>	<b>65 (41-85)</b>	<b>0,2</b>	<b>2,5</b>
ML	0,6 (0,4-0,7)	15 (6-29)	100 (66-100)	0,9	+∞	0,5 (0,3-0,7)	86 (64-97)	25 (9-49)	0,6	1,1
TPI	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>47 (31-63)</b>	<b>100 (66-100)</b>	<b>0,5</b>	<b>+∞</b>	<b>0,8 (0,7-0,9)</b>	<b>71 (48-89)</b>	<b>90 (68-99)</b>	<b>0,3</b>	<b>7,1</b>
FIBTEM										
MCF	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>68 (52-82)</b>	<b>89 (52-98)</b>	<b>0,4</b>	<b>6,2</b>	<b>0,9 (0,8-1,0)</b>	<b>76 (53-92)</b>	<b>90 (68-99)</b>	<b>0,3</b>	<b>7,6</b>

HC = Controles Normais (n=09); COVID = Pacientes com infecção pelo SARS-Cov-2 (n=41); NS = Pacientes não-graves com COVID-19 (n=20); S = Pacientes graves com COVID-19 (n=21); AUC = Área sob a Curva ROC; Se = Sensibilidade; Sp = Especificidade; LR = Razão de Verossimilhança positiva e negativa. Análise das vias Extrínseca (EXTEM) e Intrínseca (INTEM) da coagulação, Teste não-ativado (NATEM) e avaliação funcional do fibrinogênio (FIBTEM). CT = Tempo de Coagulação, expresso em segundos; ALPHA = ângulo Alfa, expresso em °; CFT = Tempo de Formação do Coágulo, expresso em segundos; MCF = Firmeza Máxima do Coágulo, expressa em mm; ML = Lise Máxima, expressa em % e TPI = Índice do Potencial Trombodinâmico, calculado como:  $[(100 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF})] / \text{CFT}$ . \*Pontos de corte: HC\_x COVID: EXTEM = CT  $\geq$  66; ALPHA  $\geq$  78; CFT  $\leq$  70; MCF  $\geq$  69; ML  $\geq$  9; TPI  $\geq$  2,9; INTEM = CT  $\leq$  196; ALPHA  $\geq$  77; CFT  $\leq$  63; MCF  $\geq$  63; ML  $\geq$  11; TPI  $\geq$  2,8; NATEM = CT  $\leq$  255; ALPHA  $\geq$  75; CFT  $\leq$  72; MCF  $\geq$  63; ML  $\geq$  11; TPI  $\geq$  2,9 e FIBTEM = MCF  $\geq$  22. \*Pontos de corte: NS x S: EXTEM = CT  $\geq$  57; ALPHA  $\geq$  78; CFT  $\leq$  56; MCF  $\geq$  70; ML  $\leq$  2; TPI  $\geq$  4; INTEM = CT  $\leq$  175; ALPHA  $\geq$  77; CFT  $\leq$  62; MCF  $\geq$  67; ML  $\leq$  12; TPI  $\geq$  3,4; NATEM = CT  $\leq$  252; ALPHA  $\geq$  74; CFT  $\leq$  90; MCF  $\geq$  64; ML  $\geq$  4; TPI  $\geq$  3,1 e FIBTEM = MCF  $\geq$  27. Parâmetros com AUC > 0,7 foram sublinhados e negritos para análises subsequentes.

Tabela 6. Performance dos parâmetros tromboelastométricos como biomarcadores para avaliar a evolução de pacientes COVID-19

PARÂMETROS*	PROGNÓSTICO					PROGNÓSTICO				
	HC x NS					HC x S				
	AUC	Se (%)	Sp (%)	LR (-)	LR (+)	AUC	Se (%)	Sp (%)	LR (-)	LR (+)
<b>EXTEM</b>										
CT	<b>0,7 (0,5-0,8)</b>	<b>40 (19-64)</b>	<b>100 (66-100)</b>	<b>0,2</b>	<b>+∞</b>	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>52 (30-74)</b>	<b>100 (66-100)</b>	<b>0,5</b>	<b>+∞</b>
ALPHA	0,5 (0,3-0,7)	10 (2 – 32)	100 (66-100)	0,9	+∞	<b>0,9 (0,7-1,0)</b>	<b>81 (58-94)</b>	<b>89 (52-98)</b>	<b>0,2</b>	<b>7,3</b>
CFT	0,6 (0,4-0,8)	55 (33-77)	78 (40-97)	0,6	2,5	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>90 (70-99)</b>	<b>67 (30-92)</b>	<b>0,1</b>	<b>2,7</b>
MCF	0,5 (0,3-0,7)	10 (2-32)	100 (66-100)	0,9	+∞	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>67 (43-85)</b>	<b>89 (52-98)</b>	<b>0,4</b>	<b>6</b>
ML	0,6 (0,4-0,8)	20 (6-44)	100 (66-100)	0,8	+∞	0,5 (0,3-0,7)	57 (34-78)	56 (21-86)	0,8	1,3
TPI	0,6 (0,4-0,7)	50 (27-73)	78 (40-97)	0,6	2,3	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>67 (43-85)</b>	<b>89 (52-98)</b>	<b>0,4</b>	<b>6</b>
<b>INTEM</b>										
CT	0,6 (0,4-0,8)	70 (46-88)	56 (21-86)	0,2	+∞	<b>0,7 (0,5-0,8)</b>	<b>81 (58-94)</b>	<b>56 (21-86)</b>	<b>0,3</b>	<b>1,8</b>
ALPHA	0,5 (0,3-0,7)	85 (62-97)	33 (8-70)	0,5	1,3	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>90 (70-99)</b>	<b>67 (30-92)</b>	<b>0,1</b>	<b>2,7</b>
CFT	0,5 (0,3-0,7)	85 (62-97)	33 (8-70)	0,5	1,3	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>90 (70-99)</b>	<b>67 (30-92)</b>	<b>0,1</b>	<b>2,7</b>
MCF	0,5 (0,3-0,7)	45 (23-68)	67 (30-92)	0,8	1,4	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>95 (76-99)</b>	<b>56 (21-86)</b>	<b>0,1</b>	<b>2,1</b>
ML	0,6 (0,4-0,8)	25 (9- 49)	100 (66-100)	0,8	+∞	0,5 (0,4-0,7)	19 (6-42)	100 (66-100)	0,8	+∞
TPI	0,5 (0,3-0,7)	55 (32-77)	67 (30-92)	0,7	1,7	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>90 (70-99)</b>	<b>67 (30-92)</b>	<b>0,1</b>	<b>2,7</b>
<b>NATEM</b>										
CT	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>40 (19-64)</b>	<b>100 (66-100)</b>	<b>0,6</b>	<b>+∞</b>	<b>0,8 (0,6-0,9)</b>	<b>48 (26-70)</b>	<b>100 (66-100)</b>	<b>0,5</b>	<b>+∞</b>
ALPHA	0,6 (0,4-0,8)	95 (75-99)	33 (8-70)	0,2	1,4	<b>0,9 (0,7-1,0)</b>	<b>81 (58-94)</b>	<b>78 (40-97)</b>	<b>0,2</b>	<b>3,6</b>
CFT	0,6 (0,4-0,8)	85 (62-97)	44 (14-79)	0,3	1,5	<b>0,9 (0,7-1,0)</b>	<b>62 (39-82)</b>	<b>100 (66-100)</b>	<b>0,4</b>	<b>+∞</b>
MCF	<b>0,7 (0,5-0,8)</b>	<b>85 (62-97)</b>	<b>44 (14-79)</b>	<b>0,3</b>	<b>1,5</b>	<b>0,9 (0,7-1,0)</b>	<b>86 (64-97)</b>	<b>78 (40-97)</b>	<b>0,2</b>	<b>3,9</b>
ML	0,6 (0,4-0,8)	20 (6-44)	100 (66-100)	0,2	+∞	0,5 (0,4-0,7)	86 (64-97)	33 (8-70)	0,4	1,3
TPI	0,6 (0,5-0,8)	85 (62-97)	56 (21-86)	0,3	1,9	<b>0,9 (0,7-1,0)</b>	<b>71 (48-89)</b>	<b>100 (66-100)</b>	<b>0,3</b>	<b>+∞</b>
<b>FIBTEM</b>										
MCF	0,6 (0,4-0,8)	40 (19-64)	89 (52-98)	0,7	3,6	<b>1,0 (0,8-1,0)</b>	<b>95 (76-99)</b>	<b>89 (52-98)</b>	<b>0,1</b>	<b>8,6</b>

HC = controles normais (n=09); COVID = Pacientes com infecção por SARS-Cov-2 (n=41); NS = Pacientes não-graves com COVID-19 (n=20); S = Pacientes graves com COVID-19 (n=21); AUC = Área sob a Curva ROC; Se = Sensibilidade; Sp = Especificidade; LR = Razão de Verossimilhança positiva e negativa. Análise das vias Extrínseca (EXTEM) e Intrínseca (INTEM) da coagulação, teste não-ativado (NATEM) e avaliação funcional do fibrinogênio (FIBTEM). CT = Tempo de Coagulação, expresso em segundos; ALPHA = ângulo Alfa, expresso em °; CFT = Tempo de Formação do Coágulo, expresso em segundos; MCF = Firmeza Máxima do Coágulo, expressa em mm; ML = Lise Máxima, expressa em % e TPI = Índice do Potencial Trombodinâmico, calculado como:  $[(100 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF})] / \text{CFT}$ . \*Pontos de corte: HC x NS: EXTEM = CT  $\geq$  66; ALPHA  $\leq$  65; CFT  $\leq$  70; MCF  $\leq$  53; ML  $\geq$  9; TPI  $\geq$  2,9; INTEM = CT  $\leq$  191; ALPHA  $\leq$  79; CFT  $\geq$  49; MCF  $\leq$  61; ML  $\geq$  11; TPI  $\geq$  2,8; NATEM = CT  $\leq$  223; ALPHA  $\geq$  61; CFT  $\leq$  130; MCF  $\geq$  59; ML  $\geq$  11; TPI  $\geq$  1,1 e FIBTEM = MCF  $\geq$  22. \*Pontos de corte: HC x S: EXTEM = CT  $\geq$  66; ALPHA  $\geq$  78; CFT  $\leq$  72; MCF  $\geq$  69; ML  $\leq$  6; TPI  $\geq$  3,7; INTEM = CT  $\leq$  196; ALPHA  $\geq$  77; CFT  $\leq$  62; MCF  $\geq$  63; ML  $\geq$  11; TPI  $\geq$  2,8; NATEM = CT  $\leq$  240; ALPHA  $\geq$  74; CFT  $<$  72; MCF  $\geq$  64; ML  $\geq$  4; TPI  $\geq$  2,9 e FIBTEM = MCF  $\geq$  22. Parâmetros com AUC  $>$  0,7 foram sublinhados e negritados para análises subsequentes.

#### 5.2.4 Árvores de Decisão propostas para classificar pacientes COVID-19 de acordo com a gravidade da doença

Os parâmetros que mostraram  $AUC > 0,7$  foram utilizados para construção de uma proposta de algoritmos que pudessem separar os grupos de indivíduos analisados (Figura 14). Essas Árvores de Decisão foram restritas a um atributo raiz e no máximo um atributo ramo, com o intuito de manter a simplicidade e facilidade de uso prático, mas mantendo a capacidade de separar os indivíduos com a maior acurácia possível. Foram realizadas 04 grupos de comparações:

- HC *versus* COVID-19 (Figura 14A);
- HC *versus* NS (Figura 14B);
- HC *versus* S (Figura 14C);
- NS *versus* S (Figura 14D).

As curvas ROC e TG-ROC utilizadas em cada raiz ou atributo ramo, nas comparações realizadas, foram apresentadas nas Figuras 15 e 16 com os respectivos descritores Sensibilidade, Especificidade, AUC, Razões de Verossimilhança positiva e negativa e pontos de corte utilizados.

O algoritmo para separar pacientes COVID de controles normais propôs o uso do MCF do FIBTEM (com ponto de corte de 22mm) e o CT do EXTEM (ponto de corte de 66s) como atributos raiz e do primeiro ramo, respectivamente, com elevada acurácia final (80%, LOOCV 80%) (Figura 14A). No atributo raiz,  $FIBTEM-MCF > 22m$ , foi possível identificar corretamente 68% dos pacientes COVID (28 de 41 pacientes). Aqueles com  $FIBTEM-MCF \leq 22mm$  passaram pelo segundo atributo, EXTEM-CT, que foi capaz de separar 89% (08 de 09 indivíduos) dos controles normais com valores menores ou iguais a 66s.

Para distinguir os não-graves de controles normais (NS *vs* HC) os parâmetros selecionados foram CT do EXTEM (ponto de corte de 66s) e CT do NATEM (ponto de corte de 223s) como atributos raiz e primeiro ramo, respectivamente, com alta acurácia final (83%,

LOOCV=83%) (Figura 14B). 40% dos indivíduos não-graves (08 de 20 pacientes) foram identificados com EXTEM-CT maior que 66s. Passando para o segundo atributo, NATEM-CT, 100% dos controles normais (09 de 09 voluntários) foram corretamente identificados com valores > 223s, enquanto outros 35% dos não-graves (07 de 20 pacientes) foram separados com valores < 223s.

A diferenciação de pacientes graves e controles normais (S vs HC) foi obtida com elevada acurácia (93%, LOOCV 93%) utilizando-se o MCF do FIBTEM (ponto de corte de 22mm) como atributo raiz único (Figura 14C). Nessa avaliação, 95% dos pacientes graves (20 de 21 pacientes) foram corretamente identificados com valores > 22mm enquanto 89% dos controles normais (08 de 09 indivíduos) mostraram valores menores ou iguais a 22mm.

Adicionalmente, a diferenciação entre não-graves e graves (NS vs S) foi possível utilizando-se também um único atributo raiz, no caso o MCF do FIBTEM com ponto de corte de 27mm, com elevada acurácia (83%, LOOCV 83%) (Figura 14D). Nesse caso, 76% dos casos graves (16 de 21 pacientes) foram corretamente identificados com valores maiores que 27mm, enquanto 90% dos casos não-graves (18 de 20 pacientes) puderam ser identificados com valores menores ou iguais ao ponto de corte.

Proposta de Árvore de Decisão com Parâmetros Tromboelastométricos para Diferenciar Pacientes COVID-19 de Acordo com a Gravidade da Doença

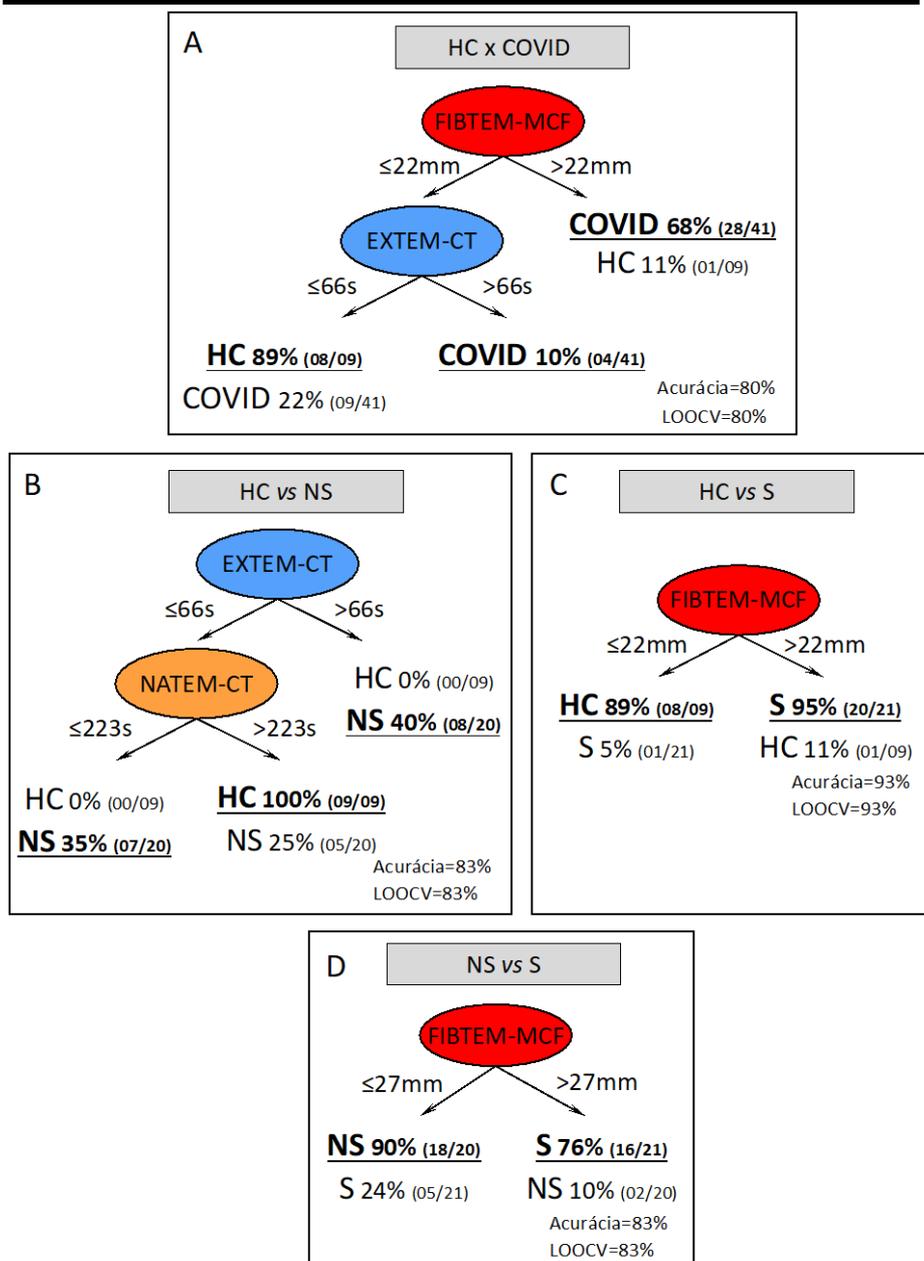


Figura 14: Proposta de Árvore Decisão com parâmetros tromboelastométricos para diferenciar pacientes COVID-19 de acordo com a gravidade da doença. Árvores de Decisão foram construídas com parâmetros tromboelastométricos para diferenciar (A) controles normais de pacientes COVID-19 (HC x COVID); (B) controles normais de pacientes não-graves (HC x NS); (C) controles normais de pacientes graves (HC x S); e (D) pacientes não-graves de graves (NS x S). Os números nos ramos indicam os pontos de corte utilizados para classificar cada grupo. A acurácia global e valores de *Leave-One-Out-Cross-Validation* (LOOCV) estão ilustrados na figura. FIBTEM-MCF = Firmeza Máxima do Coágulo na avaliação funcional do fibrinogênio; EXTEM-CT = Tempo de Coagulação na avaliação da via extrínseca; NATEM-CT = Tempo de Coagulação na avaliação de ativação endógena da hemostasia. HC = controles normais; NS = pacientes não-graves com COVID-19; S = pacientes graves com COVID-19.

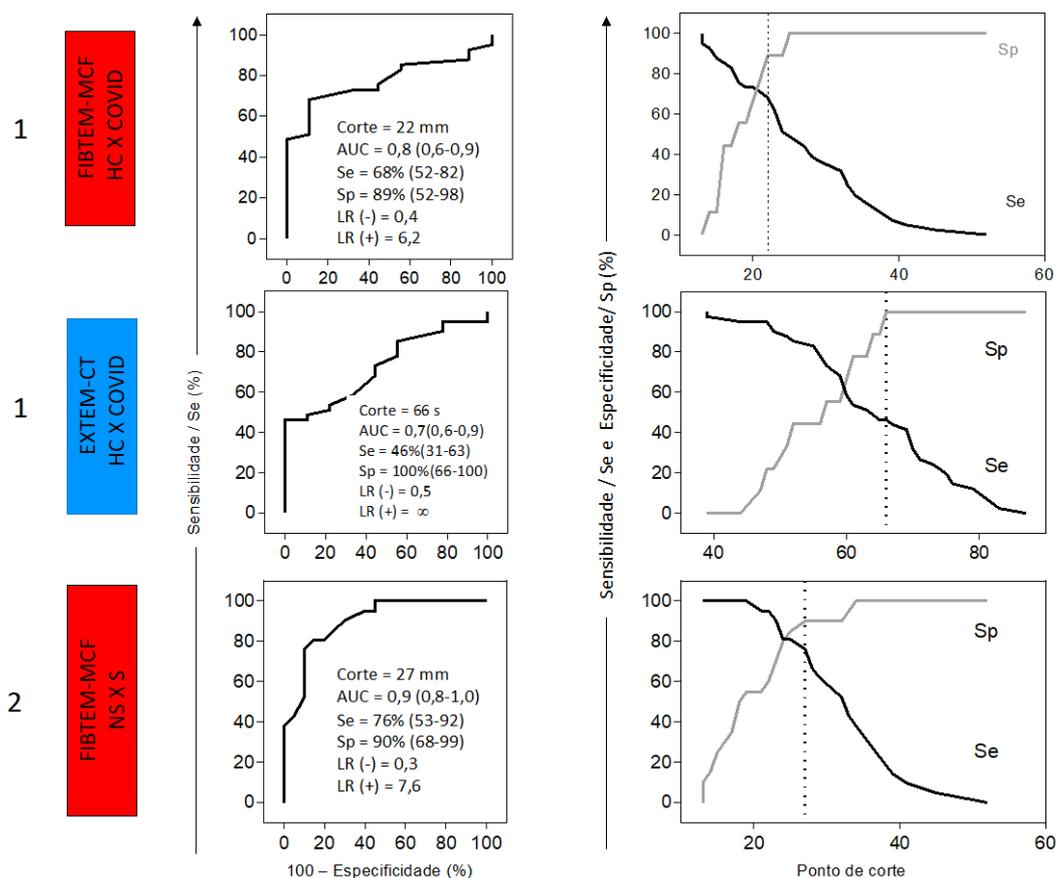


Figura 15: Curvas ROC e TG-ROC utilizadas para construção das Árvores de Decisão. Curvas ROC foram construídas para determinação dos valores de pontos de corte para cada parâmetro tromboelastométrico, assim como para a determinação de índices de desempenho: Acurácia Global (AUC), Sensibilidade (Se), Especificidade (Sp), Razões de Verossimilhança positiva (LR+) e negativa (LR-). A seguir, curvas TG-ROC foram elaboradas para melhor visualização dos pontos de corte escolhidos. (1) controles normais x COVID-19 (HC x COVID) e (2) pacientes não-graves x graves (NS x S). FIBTEM-MCF = Firmeza Máxima do Coágulo na avaliação funcional do fibrinogênio; EXTEM-CT = Tempo de Coagulação na avaliação da via extrínseca; NATEM-CT = Tempo de Coagulação na avaliação de ativação endógena da hemostasia. HC = controles normais; NS = pacientes não-graves com COVID-19; S = pacientes graves com COVID-19; COVID = grupo de todos os pacientes com COVID-19, graves e não-graves.

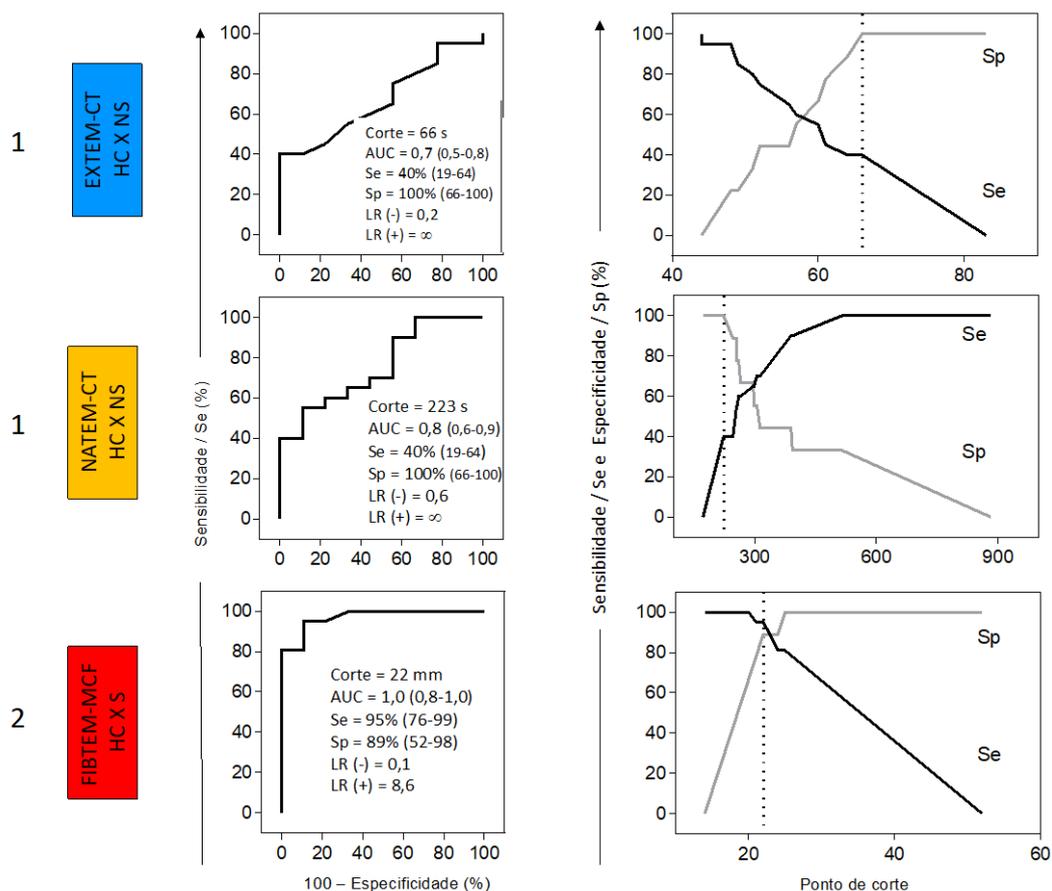


Figura 16: Curvas ROC e TG-ROC utilizadas para construção das Árvores de Decisão. Curvas ROC foram construídas para determinação dos valores de pontos de corte para cada parâmetro tromboelastométrico, assim como para a determinação de índices de desempenho: Acurácia Global (AUC), Sensibilidade (Se), Especificidade (Sp), Razões de Verossimilhança positiva (LR+) e negativa (LR-). A seguir, curvas TG-ROC foram elaboradas para melhor visualização dos pontos de corte escolhidos. (1) controles normais x COVID-19 não-graves (HC x NS) e (2) controles normais x COVID-19 graves (HC x S). FIBTEM-MCF = Firmeza Máxima do Coágulo na avaliação funcional do fibrinogênio; EXTEM-CT = Tempo de Coagulação na avaliação da via extrínseca; NATEM-CT = Tempo de Coagulação na avaliação de ativação endógena da hemostasia. HC = controles normais; NS = pacientes não-graves com COVID-19; S = pacientes graves com COVID-19.

### 5.2.5 Análise passo-a-passo para classificar pacientes COVID-19 de acordo com a gravidade da doença

Os algoritmos propostos para a classificação dos pacientes COVID-19 em subgrupos foram também representados como uma análise passo-a-passo em um gráfico de dispersão (Figura 17).

A análise passo-a-passo para classificar indivíduos entre normais e COVID-19 compreendeu duas etapas sucessivas, incluindo MCF do FIBTEM seguido pelo CT do EXTEM. Na primeira análise, foi possível classificar com precisão 28 dos 41 pacientes, com uma classificação errada de um controle normal, utilizando-se como ponto de corte valores maiores do que 22mm para os pacientes. Amostras com MCF do FIBTEM abaixo de 22mm foram novamente analisadas, agora pelo perfil do CT do EXTEM. Os resultados desse parâmetro quando menores ou iguais a 66 segundos, classificaram 08/08 como controles normais com falha na classificação de 09/13 pacientes COVID (Figura 17A). De maneira geral, a análise passo-a-passo classificou corretamente 40 dos 50 indivíduos.

Para separar pacientes não-graves de controles normais (NS vs HC), foram utilizadas também duas etapas: primeiramente CT do EXTEM, seguido pelo CT do NATEM. No primeiro passo, o modelo matemático separou com acurácia 08 de 20 pacientes não-graves, sem qualquer falha de classificação, adotando-se como ponto de corte valores maiores do que 66s como sendo pacientes. Amostras com CT do EXTEM menores ou iguais a 66 segundos foram novamente avaliadas, agora pelo CT do NATEM. Nesse parâmetro, valores menores ou iguais a 223 segundos foram utilizados para classificar 07/12 como não-graves, sem nenhum erro de classificação. Amostras com CT do NATEM maiores que 223 segundos foram categorizadas como controles normais (HC), com 5 falhas de classificação (Figura 17B). No geral, a análise separou corretamente 24 de 29 indivíduos.

O algoritmo para distinguir pacientes graves de controles normais (S vs HC), se valeu de somente um parâmetro, o MCF do FIBTEM. O modelo matemático classificou, com acurácia, amostras com valores maiores do que 22mm como pacientes graves, com 20 acertos

de 21 casos possíveis e uma falha de classificação de um controle normal como paciente grave (Figura 17C).

Igualmente, para separar pacientes não-graves de graves, o algoritmo sugeriu um único parâmetro, o MCF do FIBTEM, com ponto de corte de 27mm. Com valores maiores, 16 de 21 pacientes foram corretamente classificados como graves, com somente 2 falhas de separação de não-graves como graves (Figura 17D).

Análise Progressiva com Parâmetros Tromboelastométricos para Classificar Pacientes COVID-19 de acordo com a Gravidade da Doença

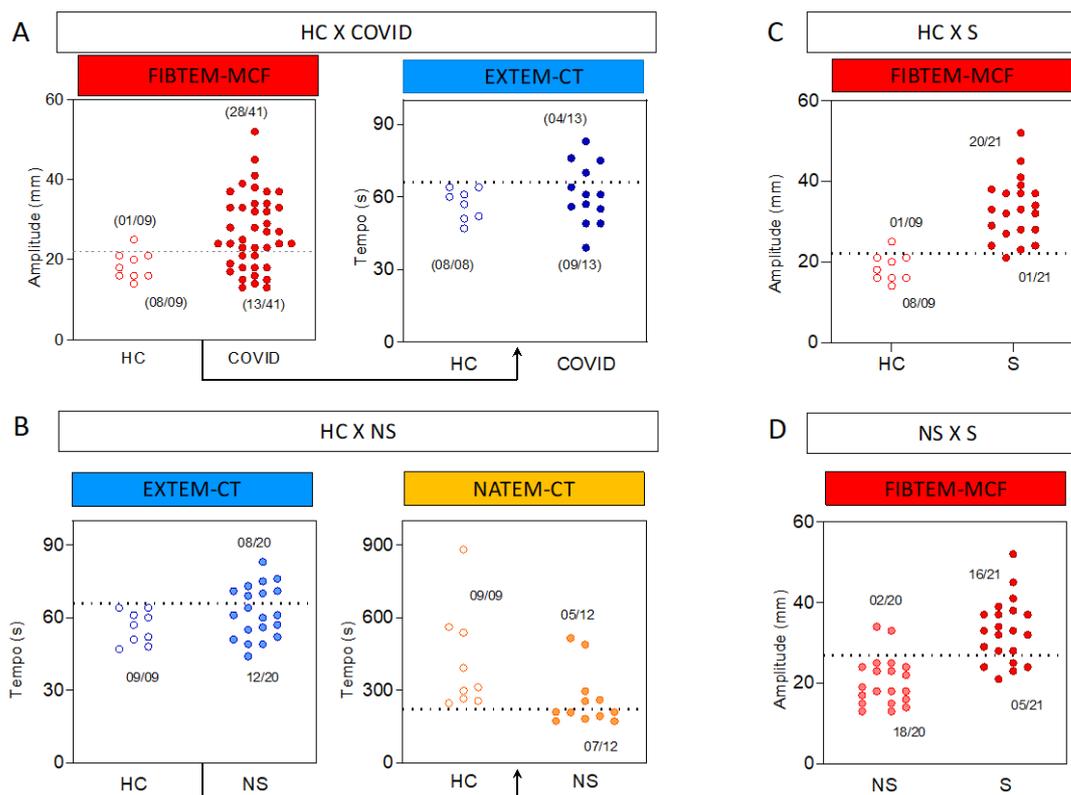


Figura 17. Análise passo-a-passo com parâmetros tromboelastométricos para classificar pacientes COVID-19 de acordo com a gravidade da doença. Gráficos de dispersão ilustrando análises em dois passos ou em um único passo das propostas para diferenciar (A) controles normais de pacientes COVID-19 (HC x COVID); (B) controles normais de pacientes não-graves (HC x NS); (C) controles normais de pacientes graves (HC x S); e (D) pacientes não-graves de graves (NS x S). As linhas pontilhadas representam os pontos de corte selecionados da análise de curvas ROC com a máxima acurácia global (AUC). Na análise passo-a-passo, a região com fundo cinza evidencia as amostras usadas no segundo passo. As proporções de classificações corretas estão representadas nas figuras. FIBTEM-MCF = Firmeza Máxima do Coágulo na avaliação funcional do fibrinogênio; EXTEM-CT = Tempo de Coagulação na avaliação da via extrínseca; NATEM-CT = Tempo de Coagulação na avaliação de ativação endógena da hemostasia. HC = controles normais; NS = pacientes não-graves com COVID-19; S = pacientes graves com COVID-19; COVID = grupo de todos os pacientes com COVID-19, graves e não-graves.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 POPULAÇÃO AVALIADA

#### 6.1.1 Tamanho da amostra

Ao se iniciar esse estudo, o principal objetivo era descrever o perfil tromboelastométrico de pacientes com formas leves pois em pacientes graves, já haviam sido descritas alterações nesse exame.<sup>57, 85</sup> A hipótese era de que uma doença com características de elevada ativação inflamatória, possivelmente deveria levar a alterações na hemostasia, mesmo em indivíduos oligossintomáticos devido à intensa inter-relação entre sistemas imunológico / inflamatório e sistema de coagulação.

E para acrescentar mais dados à informação existente, optou-se por adicionar a avaliação não ativada do ROTEM®, o NATEM, partindo-se da teoria de que quadros infecciosos com elevada produção de citocinas poderiam induzir a expressão anômala de Fator Tecidual e, assim, ativar a coagulação na ausência de ativadores exógenos.

Decidindo-se o que avaliar, abordou-se o problema de haver poucos estudos com avaliação do NATEM (por ser um teste não realizado de rotina) e, quando existentes, em pacientes portadores de sepse bacteriana. Não havendo outra possibilidade, escolhemos trabalho de *Adamzik et al*<sup>81</sup> como base de valores de parâmetros do NATEM para calcular o tamanho de nossa amostra.

Dessa forma, obtivemos cálculo de 11 pacientes em cada grupo de indivíduos doentes. Para efeito de comparação, resolveu-se testar uma amostra mínima de voluntários normais na população brasileira.

#### 6.1.2 Momento da coleta

Nossa amostra foi caracterizada como de conveniência pois foi composta com os indivíduos que aceitavam participar do estudo após procurarem atendimento em um dos hospitais públicos de referência para COVID-19 no Distrito Federal, durante o período que ficou conhecido como “Primeira Onda da COVID-19”, entre agosto e setembro de 2020.

O momento de coleta da amostra também gerou discussão pois os Protocolos da época recomendavam a coleta do PCR entre 3-5 dias de início dos sintomas. Na prática, observamos que muitas vezes os pacientes não sabiam referir quando os sintomas haviam se iniciado, gerando incerteza na estruturação do estudo. A opção para padronização foi realizar o teste ROTEM® entre 7-10 do resultado positivo no PCR. Dessa forma, todos os indivíduos incluídos teriam um marco objetivo de inclusão no estudo.

### 6.1.3 Descrição da amostra

Não observamos diferença na apresentação por sexo entre nossos grupos de pacientes, apesar de estudos populacionais mostrarem certa preferência quanto ao sexo masculino com 60% dos casos.<sup>4</sup> Uma possível explicação para essa ocorrência foi que se percebeu uma maior vontade em participar do estudo entre os pacientes do sexo feminino. A maioria das negativas foram recebidas de homens.

Também não observamos diferenças entre as idades medianas de nossos pacientes. Descrições epidemiológicas citam idade média em torno dos 50 anos,<sup>104</sup> compatível com a idade de nossa amostra.

Entre os fatores de risco classicamente considerados para COVID-19 mais grave, encontram-se a hipertensão, diabetes mellitus, doenças respiratórias e cardiovasculares. Nossa amostra de pacientes graves era composta por 48% de hipertensos, em conformidade com médias descritas, entre 22 e 55% de incidência nos casos graves da doença.<sup>104</sup>

Quanto ao peso corporal, diversos trabalhos têm relacionado aumento do peso ou IMC com maior incidência de complicações da COVID-19 como internação em UTI e intubação orotraqueal.<sup>105</sup> Em trabalho recente de *Lighter et al*<sup>106</sup>, em população americana, os autores descreveram cerca de 37% de sua amostra com IMC > 30. Esse dado ganha especial importância, quando se percebe que a prevalência de obesidade na população americana é da ordem de 40%. Nossa amostra mostrou 62% dos pacientes graves nessa faixa de IMC e 15% dos não graves. Como a população brasileira tem apresentado prevalências crescentes de obesidade (cerca de 20,8% atualmente)<sup>107</sup>, nossos dados estão em linha com o apresentado por outros autores, corroborando a obesidade como fator de risco para a doença.

Curiosamente, em nossa amostra não se encontrou pacientes com diabetes mellitus, também um conhecido fator de risco para casos mais graves de COVID-19, sendo citado por estar presente em cerca de 7-10% dos pacientes infectados em amostras populacionais.<sup>108</sup>

A distribuição dos sintomas entre os grupos de pacientes graves e não-graves está em consonância com o descrito em diversos trabalhos epidemiológicos.<sup>108-110</sup>

## 6.2 PARÂMETROS TROMBOELASTOMÉTRICOS

A avaliação dos distúrbios da coagulação não é uma tarefa fácil, principalmente no polo pró-trombótico, dada a escassez de informações obtidas com os testes padrão da coagulação (TAP, TTPA). Nesse sentido, os testes viscoelásticos surgem como uma técnica promissora para permitir a análise detalhada de todos os estágios da coagulação, incluindo iniciação (CT), polimerização de fibrina (ALPHA e CFT), contribuições de fibrinogênio e plaquetas (MCF) e fibrinólise (ML).<sup>57, 71, 95, 111</sup>

Poucos estudos caracterizaram o processo coagulopático em pacientes com COVID-19 e, desses, a maioria foi realizada em pacientes críticos. Nesses indivíduos, parâmetros tromboelastométricos podem vir a ser úteis como biomarcadores para indicar e acompanhar a melhor terapia anticoagulante possível, evitando-se sobre dosagens naqueles com menor risco, ao mesmo tempo, adequando a dosagem para aqueles com maior risco de trombose.

Já para os pacientes não-graves, descrever o perfil tromboelastométrico pode ser utilizado para identificar indivíduos que, mesmo com quadro de sintomas leves, podem ter risco elevado de fenômenos tromboembólicos. Não existe ferramenta, atualmente, que permita essa conclusão. Na prática, qualquer indivíduo com quadro leve será tratado domiciliarmente.

No presente trabalho, caracterizamos o perfil tromboelastométrico das formas não graves e graves de COVID-19 em comparação com controles saudáveis. Nossos achados mostraram um claro perfil hipercoagulante<sup>57, 85</sup> nas formas graves de COVID-19 com base na avaliação dos parâmetros do EXTEM: aumento de ALPHA, MCF e TPI, além de redução do CFT. Dessa forma, observamos pacientes cuja hemostasia mostrou uma cinética de formação de fibrina aumentada, aumento de fibrinogênio e por conseguinte, gerando coágulos de maior amplitude, mais estruturados e estabilizados. Um único parâmetro (EXTEM-CT) não preencheu o diagnóstico de hipercoagulabilidade, mas com valores na faixa normal.<sup>112</sup>

Já no INTEM, esse padrão hipercoagulante<sup>113</sup> ficou demonstrado pelo aumento do ALPHA, MCF e TPI, além de redução do CFT, demonstrando, da mesma forma, aumento da cinética de formação do coágulo terminando com coágulos mais amplos e estáveis. Digno de nota, que o CT se manteve dentro dos valores da normalidade, apesar de ser um parâmetro com certa sensibilidade ao uso da heparina de baixo peso molecular. Seria de se esperar que observássemos CTs mais alargados, pelo menos em alguns pacientes, devido à ação do fármaco anticoagulante. Como a trombopprofilaxia foi administrada a 90% dos pacientes graves incluídos na presente investigação e eles ainda apresentavam um CT dentro dos valores normais, aventamos a hipótese de que a terapia com heparina não tenha sido suficiente para controlar a tendência trombótica nesses pacientes. Dessa forma, a análise do INTEM poderia representar um biomarcador relevante para prever e ajustar o manejo da trombopprofilaxia em pacientes com COVID-19, mesmo sabendo que o INTEM não é particularmente sensível à HBPM.<sup>113-115</sup> Estudos adicionais com um número maior de pacientes são necessários para confirmar a aplicabilidade do INTEM-CT como um biomarcador para terapia de anticoagulação insuficiente.

Avaliações anteriores dos parâmetros NATEM não foram realizadas em pacientes COVID-19, nem graves nem não-graves. Perfis alterados de NATEM foram bem descritos em pacientes com sepse bacteriana.<sup>44, 116, 117</sup> Nesses, a indução da expressão do fator tecidual (FT) em células mononucleares circulantes pode explicar a ocorrência de trombos disseminados e falência de múltiplos órgãos.<sup>44, 116, 117</sup> Como nenhum ativador específico é adicionado ao ensaio NATEM, a produção de trombina será desencadeada por FT circulante anormalmente gerado. Nossos resultados mostraram que os pacientes com COVID-19 grave e não-grave apresentavam perfis de NATEM alterados, caracterizados por encurtamento do CT, ou seja, com o processo de ativação da hemostasia mais acelerado do que se esperaria. Como os pacientes não-graves exibiram este parâmetro tromboelastométrico (NATEM-CT) sugestivo de hipercoagulabilidade, nossos resultados sugerem que mesmo pacientes não hospitalizados, com formas não-graves de COVID-19, podem apresentar risco de desenvolver eventos tromboembólicos, o que provavelmente se deve ao aumento dos níveis circulante de FT. Estudos adicionais em pacientes não-graves podem confirmar se o NATEM-CT alterado representaria um parâmetro tromboelastométrico útil como preditor de pior desfecho clínico,

permitindo uma intervenção mais precoce a fim de evitar a evolução para formas clínicas mais graves.

Além dessa possível função, é sabido que o NATEM é mais sensível à HBPM do que o INTEM, logo, seria possível postular que esse parâmetro poderia ser usado para gerenciar a dosagem da quimioprofilaxia.<sup>115</sup> Hipoteticamente, se o paciente ainda apresenta CT encurtado, poderíamos concluir que a dose de HBPM ainda não seria suficiente e deveria ser ajustada até que o CT passasse para os limites da normalidade. Outros estudos determinando a real sensibilidade entre NATEM e HBPM poderiam ser realizados e, a partir deles, determinar a aplicabilidade clínica do teste NATEM como parâmetro de gerenciamento de tromboprofilaxia.

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo na literatura a mostrar a ativação endógena da coagulação usando o teste NATEM em COVID-19 nas formas não-graves e graves e para descrever o distúrbio de coagulação de pacientes não-graves.

A análise dos resultados do FIBTEM reforça os achados de hipercoagulabilidade acima mencionados e observados em pacientes com COVID-19 grave. Além disso, o parâmetro FIBTEM-MCF foi capaz de diferenciar pacientes graves e não-graves entre si, através de técnicas de *machine learning*. Nossos dados corroboram relatórios anteriores em que resultados mais elevados de FIBTEM-MCF foram encontrados em pacientes com COVID-19 gravemente enfermos.<sup>112</sup> O fato de o fibrinogênio ser uma proteína de fase aguda, que progressivamente se eleva durante processos infecciosos e/ou inflamatórios<sup>118, 119</sup> confirma os achados refletidos pela tromboelastometria. Utilizando-se os processos de *machine learning* desse estudo, o FIBTEM-MCF foi o parâmetro tromboelastométrico que melhor se prestou a distinguir pacientes COVID-19 pela gravidade da doença, já em fases iniciais da doença, quando da realização dos testes desse estudo.

O TPI é calculado a partir dos parâmetros tromboelastométricos CFT e MCF e representa uma medida robusta do potencial trombogênico naquele momento.<sup>71</sup> Poderia funcionar como um parâmetro único, capaz de distinguir pacientes com baixo ou elevado risco de fenômenos tromboembólicos, como *Dimitrova et al*<sup>71</sup> fizeram em seu estudo, com o valor de TPI de 3,5 se relacionando positivamente com maior risco trombótico. Em nosso estudo, o TPI foi capaz de diferenciar pacientes graves de não-graves e de controles saudáveis nos ensaios EXTEM, INTEM e NATEM. Vários ensaios clínicos avaliaram biomarcadores tromboinflamatórios associados a mau prognóstico entre pacientes com COVID-19. Até onde

sabemos, trabalhos anteriores não avaliaram o parâmetro TPI em pacientes COVID-19. Nossos resultados mostrando um perfil hipercoagulável refletido pelo TPI representam novas possibilidades para a aplicação de biomarcadores na terapia antitrombótica personalizada para COVID-19.<sup>120</sup>

Existe a hipótese de que uma importante redução da fibrinólise ocorra durante a progressão de COVID-19,<sup>56, 82, 89</sup> e que, ao mesmo tempo, um processo de hiperfibrinólise pulmonar local também poderia acontecer.<sup>48</sup> Em geral, o potencial de fibrinólise foi associado aos níveis de D-dímeros. No entanto, os níveis aumentados desses produtos de degradação da fibrina observados em pacientes com COVID-19 não estão necessariamente associados a um perfil de fibrinólise mais elevado, pois apenas cerca de 0,02 a 0,2% da massa de fibrinogênio é clivada.<sup>112</sup> Seguindo-se esse raciocínio, a elevação dos níveis de D-dímeros seriam apenas marcadores de ativação aumentada da hemostasia. Nossos dados não demonstraram diferenças significativas na ML entre pacientes com COVID-19 grave e não-grave ou em relação aos controles saudáveis. A faixa de normalidade da fibrinólise é ampla (de até 15%) e, talvez, valores mais baixos, próximos ao zero, pudessem ser caracterizados como uma nova categoria de indivíduos, aqueles em que a fibrinólise é insuficiente.

Até o momento, os valores de corte da tromboelastometria para definir hipercoagulabilidade permanecem controversos. No presente estudo, apresentamos um algoritmo de Árvore de Decisão baseado em pontos de corte derivados de uma análise da curva ROC para classificar os pacientes com COVID-19 de acordo com o estado clínico. O algoritmo proposto usa uma abordagem passo a passo ou em uma única etapa e representa uma ferramenta objetiva para aplicação como um método laboratorial complementar para classificar pacientes com COVID-19 de acordo com a gravidade da doença. Método semelhante, poderia ser desenvolvido com parâmetros da tromboelastometria para ser usado no aprimoramento da profilaxia antitrombótica.

Caso se conseguisse relacionar algum parâmetro tromboelastométrico com a adequação de terapia trombotrófica, tal conduta poderia incorrer em ganhos para o indivíduo, que receberia a terapia apropriada, evitando-se o subtratamento, mas também reduzindo-se a possibilidade de eventos adversos relacionados com a terapia em excesso, como sangramentos e as consequências dos mesmos. A racionalização do tratamento com o uso da tromboelastometria, apesar de gerar custo extra, poderia, em tese, ser plenamente

contrabalançada pela redução de tais eventos adversos e pela possível diminuição do consumo de medicamentos trombotoprolifáticos pela individualização da posologia.

### 6.3 LIMITAÇÕES

Apesar de termos realizado uma avaliação prospectiva dos casos (pelo Protocolo TARGET), os pacientes seguiam a rotina própria de tratamento e avaliação disponíveis nos serviços hospitalares em que estavam sendo assistidos. Logo, não foi possível coletar dados clínicos mais apurados como escores de SOFA, escore de Berlin e parâmetros laboratoriais comumente estudados no campo das coagulopatias, como D-dímeros e outros mais complexos como níveis de anti-trombina, fator de von Willebrand, proteínas C e S.

Como a amostra foi calculada com vistas à determinação do aumento da cinética de formação do coágulo (CFT), o número de indivíduos avaliados é insuficiente para utilizarmos alguma variável do ROTEM® como preditor de prognóstico em indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2. Essa caracterização seria uma importante ferramenta, caso pudesse prever quais indivíduos evoluiriam pior, permitindo a adequação do tratamento.

Não foram coletados dados quanto à ocorrência de fenômenos tromboembólicos nessa população de pacientes.

O fato de percentual elevado de indivíduos graves estar em uso de heparina fracionada pode ter levado a alteração do exame, notadamente nos valores do CT do teste NATEM, o mais sensível a esse medicamento. Nessa situação, esperar-se-ia um alargamento desse parâmetro, induzido pelo fármaco. Em tese, como o CT ainda se encontrava encurtado, pôde-se deduzir que a quantidade de medicação administrada não foi suficiente para contrabalançar os efeitos da própria doença. Assim sendo, caso os pacientes estivessem sem a terapia, esperar-se-ia uma diferença ainda mais evidente em relação aos não-graves e sadios.

## 7 CONCLUSÃO

- Os pacientes com COVID-19 grave exibiram um perfil de tromboelastometria com disfunção da hemostasia, caracterizada por hipercoagulabilidade e que foi significativamente diferente dos perfis de pacientes com COVID-19 não-grave e controles saudáveis. Os resultados mostraram que a análise de dados TPI de EXTEM, INTEM e NATEM foram significativamente diferentes nas formas não-graves em comparação com as formas clínicas graves;
- Os dados do NATEM sugeriram que os pacientes com COVID-19 grave e não-grave apresentaram ativação endógena da coagulação (CT e CFT reduzidos), possivelmente pela indução da expressão de moléculas de Fator Tecidual;
- Os dados de nossa amostra não se mostraram diferentes entre os grupos graves e não-graves quanto à ocorrência de fibrinólise ou mesmo de *shutdown* fibrinolítico;
- O perfil FIBTEM-MCF foi selecionado como um biomarcador para diferenciar pacientes com COVID-19 grave de pacientes não-graves e controles saudáveis, e apresentou acurácia moderada / elevada. Foi possível a utilização de parâmetros tromboelastométricos para construção de Árvores de Decisão com aplicabilidade clínica.

## 8 PERSPECTIVAS

- Capacidade de lise do coágulo ainda constitui um campo pouco explorado nas coagulopatias pró-trombóticas. Estudos mais amplos poderiam tentar determinar qual o nível de fibrinólise ou de redução da fibrinólise se relaciona com ocorrência de fenômenos tromboembólicos;
- Relacionar algum parâmetro tromboelastométrico como preditor de fenômenos tromboembólicos;
- Avaliar CT do NATEM ou CT do INTEM como referências de tromboprofilaxia adequada.

## 9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA (ARTIGOS PUBLICADOS)

- Aires RB, Soares A, Gomides APM, Nicola AM, Teixeira-Carvalho A, da Silva DLM, et al. Thromboelastometry demonstrates endogenous coagulation activation in nonsevere and severe COVID-19 patients and has applicability as a decision algorithm for intervention. *PLoS One*. 2022;17(1): e0262600. (Apêndice A – Qualis Capes A2 – FI 3,24).
- Shu Kurizky P, Dos Santos Neto LL, Barbosa Aires R, Henrique da Mota LM, Martins Gomes C. Opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2020;101509. (Apêndice B – Qualis Capes A2 – FI 2,727);
- Kurizky PS, Cerqueira S, Cunha DV, Albuquerque CP, Aires RB, Mota L, et al. The challenge of concomitant infections in the coronavirus disease 2019 pandemic era: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection in a patient with chronic Chagas disease and dimorphic leprosy. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2020;53:e20200504. (Apêndice C – Qualis Capes B1 – FI 1,498);
- Kurizky P, Nobrega OT, Soares A, Aires RB, Albuquerque CP, Nicola AM, et al. Molecular and Cellular Biomarkers of COVID-19 Prognosis: Protocol for the Prospective Cohort TARGET Study. *JMIR Res Protoc*. 2021;10(3):e24211. (Apêndice D – Qualis Capes B2 – FI 1,25);

## 10 BIBLIOGRAFIA

1. Hasöksüz M, Kiliç S, Saraç F. Coronaviruses and SARS-COV-2. *Turk J Med Sci.* 2020;50(Si-1):549-56.
2. Ludwig S, Zarbock A. Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. *Anesth Analg.* 2020;131(1):93-6.
3. Vabret N, Britton GJ, Gruber C, Hegde S, Kim J, Kuksin M, et al. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity.* 2020.
4. Li LQ, Huang T, Wang YQ, Wang ZP, Liang Y, Huang TB, et al. COVID-19 patients' clinical characteristics, discharge rate, and fatality rate of meta-analysis. *J Med Virol.* 2020.
5. Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses.* 2020;12(4).
6. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA.* 2020.
7. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J Infect.* 2020;80(6):607-13.
8. He J, Tao H, Yan Y, Huang SY, Xiao Y. Molecular Mechanism of Evolution and Human Infection with SARS-CoV-2. *Viruses.* 2020;12(4).
9. Cruz KP, A; Lima, PS. MAIN ASPECTS OF THE NEW SARS-CoV-2 CORONAVIRUS: A WIDE REVIEW. *Arquivos do Mudi.* 2021;25(1):17.
10. Tay MZ, Poh CM, Renia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol.* 2020.
11. Yuki K, Fujiogi M, Koutsogiannaki S. COVID-19 pathophysiology: A review. *Clin Immunol.* 2020;215:108427.
12. liu w, Li h. COVID-19:Attacks the 1-Beta Chain of Hemoglobin and Captures the Porphyrin to Inhibit Human Heme Metabolism2020.
13. Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, Nguyen Q, Zhong JC, Turner AJ, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin

System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2. *Circ Res.* 2020;126(10):1456-74.

14. Becker RC. COVID-19 update: Covid-19-associated coagulopathy. *J Thromb Thrombolysis.* 2020;50(1):54-67.

15. Annweiler C, Cao Z, Wu Y, Faucon E, Mouhat S, Kovacic H, et al. Counter-regulatory 'Renin-Angiotensin' System-based Candidate Drugs to Treat COVID-19 Diseases in SARS-CoV-2-infected patients. *Infect Disord Drug Targets.* United Arab Emirates: Copyright© Bentham Science Publishers; For any queries, please email at [epub@benthamscience.net](mailto:epub@benthamscience.net); 2020.

16. Ortega-Paz L, Capodanno D, Montalescot G, Angiolillo DJ. Coronavirus Disease 2019-Associated Thrombosis and Coagulopathy: Review of the Pathophysiological Characteristics and Implications for Antithrombotic Management. *J Am Heart Assoc.* 2021;10(3):e019650.

17. Wang J, Jiang M, Chen X, Montaner LJ. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *J Leukoc Biol.* 2020.

18. Mucha SR, Dugar S, McCrae K, Joseph DE, Bartholomew J, Sacha G, et al. Coagulopathy in COVID-19. *Cleve Clin J Med.* 2020.

19. Li H, Liu L, Zhang D, Xu J, Dai H, Tang N, et al. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *Lancet.* 2020;395(10235):1517-20.

20. Veras FP, Pontelli M, Silva C, Toller-Kawahisa J, de Lima M, Nascimento D, et al. SARS-CoV-2 triggered neutrophil extracellular traps (NETs) mediate COVID-19 pathology. *medRxiv.* 2020:2020.06.08.20125823.

21. Hamilton KV, Hussey KK. Intra-arterial thrombosis associated with COVID-19. *J Vasc Surg.* 2020.

22. Conti CB, Henchi S, Coppeta GP, Testa S, Grassia R. Bleeding in COVID-19 severe pneumonia: The other side of abnormal coagulation pattern? *Eur J Intern Med.* 2020.

23. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nature Reviews Immunology.* 2020;20(6):355-62.

24. Hadjadj J, et al. Impaired type I Interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science.* 2020.

25. Merad M, Blish CA, Sallusto F, Iwasaki A. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science*. 2022;375(6585):1122-7.
26. Giannis D, Ziogas IA, Gianni P. Coagulation disorders in coronavirus infected patients: COVID-19, SARS-CoV-1, MERS-CoV and lessons from the past. *J Clin Virol*. 2020;127:104362.
27. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, et al. Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. *J Infect Dis*. 2020;221(11):1762-9.
28. Saúde MdS-SdVe. 52 Boletim Epidemiológico Especial - Doença pelo Coronavírus COVID-19 -. 2021 04/03/2021.
29. Young BE, Ong SWX, Kalimuddin S, Low JG, Tan SY, Loh J, et al. Epidemiologic Features and Clinical Course of Patients Infected With SARS-CoV-2 in Singapore. *JAMA*. 2020;323(15):1488-94.
30. Wang D, Yin Y, Hu C, Liu X, Zhang X, Zhou S, et al. Clinical course and outcome of 107 patients infected with the novel coronavirus, SARS-CoV-2, discharged from two hospitals in Wuhan, China. *Crit Care*. 2020;24(1):188.
31. Cummings MJ, Baldwin MR, Abrams D, Jacobson SD, Meyer BJ, Balough EM, et al. Epidemiology, clinical course, and outcomes of critically ill adults with COVID-19 in New York City: a prospective cohort study. *The Lancet*. 2020;395(10239):1763-70.
32. Colafrancesco S, Alessandri C, Conti F, Priori R. COVID-19 gone bad: A new character in the spectrum of the hyperferritinemic syndrome? *Autoimmun Rev*. 2020;19(7):102573.
33. Almskog L, Wikman A, Svensson J, Wanecek M, Bottai M, van der Linden J, et al. Rotational Thromboelastometry predicts care level in Covid-19. *medRxiv*; 2020.
34. Selby NM, Forni LG, Laing CM, Horne KL, Evans RD, Lucas BJ, et al. Covid-19 and acute kidney injury in hospital: summary of NICE guidelines. *Bmj*. 2020;369:m1963.
35. Favaloro EJ, Lippi G. Recommendations for Minimal Laboratory Testing Panels in Patients with COVID-19: Potential for Prognostic Monitoring. *Semin Thromb Hemost*. 2020;46(3):379-82.
36. Luo HC, You CY, Lu SW, Fu YQ. Characteristics of coagulation alteration in patients with COVID-19. *Ann Hematol*. 2021;100(1):45-52.

37. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *Jama*. 2020;324(8):782-93.
38. Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutiérrez-Ocampo E, Villamizar-Peña R, Holguin-Rivera Y, Escalera-Antezana JP, et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2020;34:101623.
39. Sanders JM, Monogue ML, Jodlowski TZ, Cutrell JB. Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *Jama*. 2020;323(18):1824-36.
40. Osuchowski MF, Winkler MS, Skirecki T, Cajander S, Shankar-Hari M, Lachmann G, et al. The COVID-19 puzzle: deciphering pathophysiology and phenotypes of a new disease entity. *Lancet Respir Med*. 2021;9(6):622-42.
41. Scavone C, Brusco S, Bertini M, Sportiello L, Rafaniello C, Zoccoli A, et al. Current pharmacological treatments for COVID-19: What's next? *Br J Pharmacol*. 2020;177(21):4813-24.
42. Agarwal A, Rochweg B, Lamontagne F, Siemieniuk RA, Agoritsas T, Askie L, et al. A living WHO guideline on drugs for covid-19. *Bmj*. 2020;370:m3379.
43. Horby P, Lim W, Group RC. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19 — Preliminary Report. *New England Journal of Medicine*. 2020.
44. Levi M, Thachil J, Iba T, Levy JH. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol*. 2020;7(6):e438-e40.
45. Thachil J, Tang N, Gando S, Falanga A, Cattaneo M, Levi M, et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*.n/a(n/a).
46. Moores LK, Tritschler T, Brosnahan S, Carrier M, Collen JF, Doerschug K, et al. Thromboprophylaxis in Patients With COVID-19: A Brief Update to the CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest*. 2022.
47. Alnima T, Mulder MMG, van Bussel BCT, ten Cate H. COVID-19 Coagulopathy: From Pathogenesis to Treatment. *Acta Haematologica*. 2022.
48. Ibañez C, Perdomo J, Calvo A, Ferrando C, Reverter JC, Tassies D, et al. High D dimers and low global fibrinolysis coexist in COVID19 patients: what is going on in there? *J Thromb Thrombolysis*. 2020:1-5.

49. Iba T, Levy JH, Levi M, Connors JM, Thachil J. Coagulopathy of Coronavirus Disease 2019. *Crit Care Med.* 2020.
50. Thachil J, Cushman M, Srivastava A. A proposal for staging COVID-19 coagulopathy. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis.* 2020;4(5):731-6.
51. Hoechter DJ, Becker-Pennrich A, Langrehr J, Bruegel M, Zwissler B, Schaefer S, et al. Higher procoagulatory potential but lower DIC score in COVID-19 ARDS patients compared to non-COVID-19 ARDS patients. *Thromb Res.* 2020;196:186-92.
52. Blasi A, von Meijenfeldt FA, Adelmeijer J, Calvo A, Ibañez C, Perdomo J, et al. In vitro hypercoagulability and ongoing in vivo activation of coagulation and fibrinolysis in COVID-19 patients on anticoagulation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2020.
53. Tang N, Bai H, Chen X, Gong J, Li D, Sun Z. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2020;18(5):1094-9.
54. Thachil J. All those D-dimers in COVID-19. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2020.
55. Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2020;18(4):844-7.
56. Creel-Bulos C, Auld SC, Caridi-Scheible M, Barker N, Friend S, Gaddh M, et al. Fibrinolysis Shutdown and Thrombosis in A COVID-19 ICU. *Shock.* 2020.
57. Mortus JR, Manek SE, Brubaker LS, Loor M, Cruz MA, Trautner BW, et al. Thromboelastographic Results and Hypercoagulability Syndrome in Patients With Coronavirus Disease 2019 Who Are Critically Ill. *JAMA Netw Open.* 2020;3(6):e2011192.
58. Tsantes AE, Tsantes AG, Kokoris SI, Bonovas S, Frantzeskaki F, Tsangaris I, et al. COVID-19 Infection-Related Coagulopathy and Viscoelastic Methods: A Paradigm for Their Clinical Utility in Critical Illness. *Diagnostics (Basel).* 2020;10(10).
59. Whyte CS, Morrow GB, Mitchell JL, Chowdary P, Mutch NJ. Fibrinolytic abnormalities in acute respiratory distress syndrome (ARDS) and versatility of thrombolytic drugs to treat COVID-19. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2020.
60. Koupenova M. Potential role of platelets in COVID-19: Implications for thrombosis. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis.* 2020;4(5):737-40.

61. Nicolai L, Leunig A, Brambs S, Kaiser R, Weinberger T, Weigand M, et al. Immunothrombotic Dysregulation in COVID-19 Pneumonia Is Associated With Respiratory Failure and Coagulopathy. *Circulation*. 2020;142(12):1176-89.
62. Collett LW, Gluck S, Strickland RM, Reddi BJ. Evaluation of coagulation status using viscoelastic testing in intensive care patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): An observational point prevalence cohort study. *Aust Crit Care*. 2020.
63. Thachil J, Tang N, Gando S, Falanga A, Levi M, Clark C, et al. Laboratory haemostasis monitoring in COVID-19. *Journal of thrombosis and haemostasis* : JTH2020.
64. Klok FA, Kruip M, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers D, Kant KM, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res*. 2020.
65. Calatzis A GK, Spannagl M, Vorweg M. ROTEM\_Analysis\_delta\_platelet\_EN\_2016-09-website.pdf. 2016.
66. Hartert H. Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klinische Wochenschrift*. 1948;26(37):577-83.
67. Obituary: Hellmut Hartert (1918–1993). *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 1994;14:3-5.
68. Chitlur M, Sorensen B, Rivard GE, Young G, Ingerslev J, Othman M, et al. Standardization of thromboelastography: a report from the TEG-ROTEM working group. *Haemophilia*. 2011;17(3):532-7.
69. Lang T, Bauters A, Braun SL, Potzsch B, von Pape KW, Kolde HJ, et al. Multi-centre investigation on reference ranges for ROTEM thromboelastometry. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2005;16(4):301-10.
70. ROTEMdelta2.8.0.01.EN\_.mail\_ [Internet]. 2016 [cited june of 2020]. Available from: [https://www.rotem.de/wp-content/uploads/2016/08/ROTEMdelta2.8.0.01.EN\\_.mail\\_.pdf](https://www.rotem.de/wp-content/uploads/2016/08/ROTEMdelta2.8.0.01.EN_.mail_.pdf).
71. Dimitrova-Karamfilova A, Patokova Y, Solarova T, Petrova IaN, G. Rotation thromboelastography for assessment of hypercoagulation and thrombosis in patients with cardiovascular diseases. *Life Sci*. 2012(6):8.
72. Calatzis A GK, Spannagl M, Vorweg M. <ROTEM\_Analysis\_delta\_platelet\_EN\_2016-09-website.pdf>. 2016.

73. Thomas W, Samama CM, Greinacher A, Hunt BJ. The utility of viscoelastic methods in the prevention and treatment of bleeding and hospital-associated venous thromboembolism in perioperative care: guidance from the SSC of the ISTH. *Journal of thrombosis and haemostasis* : JTH. 2018;16(11):2336-40.
74. Akay OM. The Double Hazard of Bleeding and Thrombosis in Hemostasis From a Clinical Point of View: A Global Assessment by Rotational Thromboelastometry (ROTEM). *Clin Appl Thromb Hemost*. 2018;24(6):850-8.
75. Brown W, Lunati M, Maceroli M, Ernst A, Staley C, Johnson R, et al. Ability of Thromboelastography to Detect Hypercoagulability: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Orthop Trauma*. 2020;34(6):278-86.
76. Pavoni V, Giancesello L, Pazzi M, Stera C, Meconi T, Frigieri FC. Evaluation of coagulation function by rotation thromboelastometry in critically ill patients with severe COVID-19 pneumonia. *J Thromb Thrombolysis*. 2020:1-6.
77. van Veenendaal N, Scheeren TWL, Meijer K, van der Voort PHJ. Rotational thromboelastometry to assess hypercoagulability in COVID-19 patients. *Thromb Res*. 2020;196:379-81.
78. Müller MC, Meijers JC, Vroom MB, Juffermans NP. Utility of thromboelastography and/or thromboelastometry in adults with sepsis: a systematic review. *Crit Care*. 2014;18(1):R30.
79. Brenner T, Schmidt K, Delang M, Mehrabi A, Bruckner T, Lichtenstern C, et al. Viscoelastic and aggregometric point-of-care testing in patients with septic shock - cross-links between inflammation and haemostasis. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2012;56(10):1277-90.
80. Durila M, Bronsky J, Harustiak T, Pazdro A, Pechova M, Cvachovec K. Early diagnostic markers of sepsis after oesophagectomy (including thromboelastography). *BMC Anesthesiol*. 2012;12:12.
81. Adamzik M, Eggmann M, Frey UH, Gorlinger K, Brocker-Preuss M, Marggraf G, et al. Comparison of thromboelastometry with procalcitonin, interleukin 6, and C-reactive protein as diagnostic tests for severe sepsis in critically ill adults. *Crit Care*. 2010;14(5):R178.
82. Wright FL, Vogler TO, Moore EE, Moore HB, Wohlauer MV, Urban S, et al. Fibrinolysis Shutdown Correlation with Thromboembolic Events in Severe COVID-19 Infection. *J Am Coll Surg*. 2020.

83. Raval JS, Burnett AE, Rollins-Raval MA, Griggs JR, Rosenbaum L, Nielsen ND, et al. Viscoelastic testing in COVID-19: a possible screening tool for severe disease? *Transfusion*. 2020;60(6):1131-2.
84. Iwasaki Y, Shiga T, Konno D, Saito K, Aoyagi T, Oshima K, et al. Screening of COVID-19-associated hypercoagulopathy using rotational thromboelastometry. *J Clin Anesth*. 2020;67:109976.
85. Panigada M, Bottino N, Tagliabue P, Grasselli G, Novembrino C, Chantarangkul V, et al. Hypercoagulability of COVID-19 patients in Intensive Care Unit. A Report of Thromboelastography Findings and other Parameters of Hemostasis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2020.
86. Spiezia L, Boscolo A, Poletto F, Cerruti L, Tiberio I, Campello E, et al. COVID-19-Related Severe Hypercoagulability in Patients Admitted to Intensive Care Unit for Acute Respiratory Failure. *Thrombosis and haemostasis*. 2020;120(6):998-1000.
87. Madathil RJ, Tabatabai A, Rabin J, Menne AR, Henderson R, Mazzeffi M, et al. Thromboelastometry and D-Dimer Elevation in Coronavirus-2019. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2020.
88. Gorlinger K, Levy JH. COVID-19-associated Coagulopathy. *Anesthesiology*. 2021;134(3):366-9.
89. Heinz C, Miesbach W, Herrmann E, Sonntagbauer M, Raimann FJ, Zacharowski K, et al. Greater Fibrinolysis Resistance but No Greater Platelet Aggregation in Critically Ill COVID-19 Patients. *Anesthesiology*. 2021;134(3):457-67.
90. Levi M, van der Poll T. Coagulation and sepsis. *Thromb Res*. 2017;149:38-44.
91. Kurizky P, Nobrega OT, Soares A, Aires RB, Albuquerque CP, Nicola AM, et al. Molecular and Cellular Biomarkers of COVID-19 Prognosis: Protocol for the Prospective Cohort TARGET Study. *JMIR Res Protoc*. 2021;10(3):e24211.
92. Organization WH. Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected: interim guidance, 13 March 2020. 2020.
93. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang A-G. Statistical power analyses using G\*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behavior Research Methods*. 2009;41(4):1149-60.

94. Davies NA, Harrison NK, Sabra A, Lawrence MJ, Noble S, Davidson SJ, et al. Application of ROTEM to assess hypercoagulability in patients with lung cancer. *Thromb Res.* 2015;135(6):1075-80.
95. Hincker A, Feit J, Sladen RN, Wagener G. Rotational thromboelastometry predicts thromboembolic complications after major non-cardiac surgery. *Crit Care.* 2014;18(5):549.
96. Prakash S, Verghese S, Roxby D, Dixon D, Bihari S, Bersten A. Changes in fibrinolysis and severity of organ failure in sepsis: a prospective observational study using point-of-care test--ROTEM. *J Crit Care.* 2015;30(2):264-70.
97. Obuchowski NA, Bullen JA. Receiver operating characteristic (ROC) curves: review of methods with applications in diagnostic medicine. *Phys Med Biol.* 2018;63(7):07tr1.
98. Subtil F, Rabilloud M. An enhancement of ROC curves made them clinically relevant for diagnostic-test comparison and optimal-threshold determination. *J Clin Epidemiol.* 2015;68(7):752-9.
99. Ferreira JeP, CM. Entendendo os testes diagnósticos. *J Bras Pneumol.* 2018;44(1):4.
100. Greiner M, Sohr D, Göbel P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J Immunol Methods.* 1995;185(1):123-32.
101. Greiner M. Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): a Microsoft-EXCEL template for the selection of cut-off values in diagnostic tests. *J Immunol Methods.* 1995;185(1):145-6.
102. Che D, Liu Q, Rasheed K, Tao X. Decision tree and ensemble learning algorithms with their applications in bioinformatics. *Adv Exp Med Biol.* 2011;696:191-9.
103. Shao Z, Er MJ, Wang N. An Efficient Leave-One-Out Cross-Validation-Based Extreme Learning Machine (ELOO-ELM) With Minimal User Intervention. *IEEE Trans Cybern.* 2016;46(8):1939-51.
104. Yang J, Zheng Y, Gou X, Pu K, Chen Z, Guo Q, et al. Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2020;94:91-5.
105. Zhou Y, Chi J, Lv W, Wang Y. Obesity and diabetes as high-risk factors for severe coronavirus disease 2019 (Covid-19). *Diabetes Metab Res Rev.* 2021;37(2):e3377.

106. Lighter J, Phillips M, Hochman S, Sterling S, Johnson D, Francois F, et al. Obesity in Patients Younger Than 60 Years Is a Risk Factor for COVID-19 Hospital Admission. *Clin Infect Dis*. 2020;71(15):896-7.
107. Passos CMD, Maia EG, Levy RB, Martins APB, Claro RM. Association between the price of ultra-processed foods and obesity in Brazil. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2020;30(4):589-98.
108. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *Jama*. 2020;323(13):1239-42.
109. Liu K, Fang YY, Deng Y, Liu W, Wang MF, Ma JP, et al. Clinical characteristics of novel coronavirus cases in tertiary hospitals in Hubei Province. *Chin Med J (Engl)*. 2020;133(9):1025-31.
110. Khan M, Khan H, Khan S, Nawaz M. Epidemiological and clinical characteristics of coronavirus disease (COVID-19) cases at a screening clinic during the early outbreak period: a single-centre study. *J Med Microbiol*. 2020;69(8):1114-23.
111. McCrath DJ, Cerboni E, Frumento RJ, Hirsh AL, Bennett-Guerrero E. Thromboelastography maximum amplitude predicts postoperative thrombotic complications including myocardial infarction. *Anesth Analg*. 2005;100(6):1576-83.
112. Almskog LM, Wikman A, Svensson J, Wanecek M, Bottai M, van der Linden J, et al. Rotational thromboelastometry results are associated with care level in COVID-19. *J Thromb Thrombolysis*. 2021;51(2):437-45.
113. Oswald E, Velik-Salchner C, Innerhofer P, Tauber H, Auckenthaler T, Ulmer H, et al. Results of rotational thromboelastometry, coagulation activation markers and thrombin generation assays in orthopedic patients during thromboprophylaxis with rivaroxaban and enoxaparin: a prospective cohort study. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2015;26(2):136-44.
114. Thomas O, Larsson A, Tynngård N, Schött U. Thromboelastometry versus free-oscillation rheometry and enoxaparin versus tinzaparin: an in-vitro study comparing two viscoelastic haemostatic tests' dose-responses to two low molecular weight heparins at the time of withdrawing epidural catheters from ten patients after major surgery. *BMC Anesthesiol*. 2015;15:170.
115. Görlinger K, Almutawah H, Almutawaa F, Alwabari M, Alsultan Z, Almajed J, et al. The role of rotational thromboelastometry during the COVID-19 pandemic: a narrative review. *Korean J Anesthesiol*. 2021;74(2):91-102.

116. Preston RJS, O'Sullivan JM, O'Donnell JS. Advances in understanding the molecular mechanisms of venous thrombosis. *Br J Haematol.* 2019;186(1):13-23.
117. Görlinger K, Dirkmann D, Gandhi A, Simioni P. COVID-19 associated coagulopathy and inflammatory response: what do we know already and what are the knowledge gaps? *Anesth Analg.* 2020.
118. Iba T, Levy JH, Levi M, Connors JM, Thachil J. Coagulopathy of Coronavirus Disease 2019. *Crit Care Med.* 2020;48(9):1358-64.
119. Fei Y, Tang N, Liu H, Cao W. Coagulation dysfunction: A hallmark in COVID-19. *Arch Pathol Lab Med.* 2020.
120. Chaudhary R, Kreutz RP, Bliden KP, Tantry US, Gurbel PA. Personalizing Antithrombotic Therapy in COVID-19: Role of Thromboelastography and Thromboelastometry. *Thrombosis and haemostasis.* 2020;120(11):1594-6.

APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL COM DADOS DE TROMBOELASTOMETRIA  
Qualis Capes A2 – FI 3,24

## RESEARCH ARTICLE

# Thromboelastometry demonstrates endogenous coagulation activation in nonsevere and severe COVID-19 patients and has applicability as a decision algorithm for intervention

Rodrigo B. Aires<sup>1,2</sup>\*, Alexandre A. de S. M. Soares<sup>1</sup>, Ana Paula M. Gomides<sup>3</sup>, André M. Nicola<sup>1</sup>, Andréa Teixeira-Carvalho<sup>4</sup>, Dayde Lane M. da Silva<sup>5</sup>, Eliana T. de Góis<sup>1,6</sup>, Flávia D. Xavier<sup>1</sup>, Francielle P. Martins<sup>1,7</sup>, Gabriela P. J. Santos<sup>1,8</sup>, Heidi Luise Schulte<sup>1</sup>, Isabelle S. Luz<sup>9</sup>, Laila S. Espindola<sup>1,10</sup>, Laurence R. do Amaral<sup>11</sup>, Liza F. Felicori<sup>12</sup>, Luciana A. Naves<sup>1,13</sup>, Máira R. M. de Carvalho<sup>1,14</sup>, Matheus de S. Gomes<sup>11</sup>, Otávio T. Nóbrega<sup>1</sup>, Patrícia Albuquerque<sup>15</sup>, Wagner Fontes<sup>9</sup>, Ciro M. Gomes<sup>1,16</sup>, Patricia S. Kurizky<sup>1,16</sup>\*, Cleandro P. Albuquerque<sup>1,17</sup>, Olindo A. Martins-Filho<sup>4</sup>‡, Licia Maria H. da Mota<sup>1,17</sup>‡



**1** Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil, **2** Serviço de Anestesiologia, Hospital Santa Lúcia Sul, Brasília, Distrito Federal, Brazil, **3** Faculdade de Ciências da Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil, **4** Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **5** Departamento de Farmácia, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil, **6** Unidade de Clínica Médica, Hospital Regional do Gama (HRG), Brasília, Distrito Federal, Brazil, **7** Núcleo de Gestão Interna de Leitos, Hospital Regional da Asa Norte (HRAN), Brasília, Distrito Federal, Brazil, **8** Unidade de Medicina Interna, Hospital Regional de Taguatinga, Brasília, Distrito Federal, Brazil, **9** Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil, **10** Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil, **11** Laboratório de Bioinformática e Análises Moleculares, Rede Multidisciplinar de Pesquisa, Ciência e Tecnologia (RMPCT), Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, Minas Gerais, Brazil, **12** Laboratório de Biologia Sintética e Biomiméticos, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **13** Serviço de Endocrinologia, Hospital Universitário de Brasília, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil, **14** Unidade de Medicina Interna, Hospital Regional da Asa Norte (HRAN), Brasília, Distrito Federal, Brazil, **15** Faculdade UnB Ceilândia, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil, **16** Serviço de Dermatologia, Hospital Universitário de Brasília, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil, **17** Serviço de Reumatologia, Hospital Universitário de Brasília, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, Distrito Federal, Brazil

\* These authors contributed equally to this work.

‡ OAMF and LMHM also contributed equally to this work.

\* airesrod@gmail.com (RBA); patyshu79@gmail.com (PSK)

## Abstract

In patients with severe forms of COVID-19, thromboelastometry has been reported to display a hypercoagulant pattern. However, an algorithm to differentiate severe COVID-19 patients from nonsevere patients and healthy controls based on thromboelastometry parameters has not been developed. Forty-one patients over 18 years of age with positive qRT-PCR for SARS-CoV-2 were classified according to the severity of the disease: nonsevere (NS, n = 20) or severe (S, n = 21). A healthy control (HC, n = 9) group was also

, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

**Funding:** The authors are grateful for the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). LFF thank the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), under process no. 88887.506611/2020-00 and 88887.504420/2020-00 and Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), under process no. REDE-00140-16. LSE thank the ArboControl Brazil Project funded by the Ministry of Health, under process no. TED 74/2016 & TED 42/2017 for financial support. LAN, MSG, OTN, WF and OAMF thank CNPq for the PQ fellowship program. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

examined. Blood samples from all participants were tested by extrinsic (EXTEM), intrinsic (INTEM), non-activated (NATEM) and functional assessment of fibrinogen (FIBTEM) assays of thromboelastometry. The thrombodynamic potential index (TPI) was also calculated. Severe COVID-19 patients exhibited a thromboelastometry profile with clear hypercoagulability, which was significantly different from the NS and HC groups. Nonsevere COVID-19 cases showed a trend to thrombotic pole. The NATEM test suggested that non-severe and severe COVID-19 patients presented endogenous coagulation activation (reduced clotting time and clot formation time). TPI data were significantly different between the NS and S groups. The maximum clot firmness profile obtained by FIBTEM showed moderate/elevated accuracy to differentiate severe patients from NS and HC. A decision tree algorithm based on the FIBTEM-MCF profile was proposed to differentiate S from HC and NS. Thromboelastometric parameters are a useful tool to differentiate the coagulation profile of nonsevere and severe COVID-19 patients for therapeutic intervention purposes.

## Introduction

Patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) have shown an increased frequency of thromboembolic phenomena since the beginning of the pandemic, which represents a high morbidity-mortality burden [1–3]. The pathophysiology of these findings is not fully established, although information available to date shows that the changes in the hemostasis system seem to be triggered by the high production of proinflammatory cytokines [1–5]. The massive production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , among others, leads to a parallel increase in fibrinolysis inhibitors, such as plasminogen activator inhibitor (PAI-1) and thrombin activated fibrinolysis inhibitor (TAFI), increased expression of tissue factor by circulating mononuclear cells and release of neutrophil extracellular traps (NETs) [1, 4–6].

The standard tests for the evaluation of coagulopathies are activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time and activity (PTA), d-dimer and platelet count [4, 7]. However, these methods present several limitations because they only cover the initial phase of coagulation and do not evaluate the different components involved in the dynamics of clot formation. In this sense, viscoelastic methods traditionally used to monitor hemorrhagic disturbances have emerged as a possible tool for assessing the hemostasis profile in the thrombotic pole of blood coagulation disorders [8, 9]. Indeed, reduced clotting time (CT) and increased maximum clot firmness (MCF) have been used to characterize hypercoagulability conditions [10–12]. In this scenario, the thrombodynamic potential index (TPI) [10] constitutes an alternative parameter for monitoring the risk of thromboembolic events by representing the global coagulation process [8, 9, 13].

Few thromboelastometry studies have evaluated the coagulopathic process in COVID-19, with most being performed in critically ill patients, where a prothrombotic profile is characterized by reduced CT and CFT along with increased MCF of functional fibrinogen (FIBTEM), extrinsic (EXTEM) and intrinsic (INTEM) assays [14–16]. To date, whether nonsevere patients also develop coagulation derangements, that could increase their risk of thrombotic complications, remains undetermined. Even in severe patients, the effects of pathophysiologic alterations on the initial stages of hemostasis have not been determined. In this regard, the use of nonactivated temogram (NATEM) could be used as a complementary method to evaluate

the participation of circulating tissue factor, which has been observed in patients with bacterial sepsis [17–20].

Thromboelastometry could be a useful tool for better assessing the coagulation profile of nonsevere and severe patients, which would help clinicians choose the most appropriate thromboprophylaxis intervention. The aim of this study was to characterize the coagulation process in nonsevere and severe forms of COVID-19 compared to that of healthy controls.

Our study was able to demonstrate that even nonsevere patients already show coagulation derangements.

## Patients and methods

### Experimental design

The present study is part of a major investigation protocol named the TARGET project (<http://dx.doi.org/10.2196/24211>): a longitudinal observational study carried out at tertiary hospitals responsible for the care of COVID-19 patients during the pandemic in midwestern Brazil (Hospital Regional da Asa Norte and Hospital Universitário de Brasília, Brasília, DF, Brazil) [21]. This study was registered on the Brazilian Registry of Clinical Trials Platform (ReBEC, RBR-62zdkk) and approved by the National Commission for Ethics in Research in Brazil (CONEP, CAAE 30846920.7.0000.0008). STROBE recommendations for observational studies were followed.

In order to avoid unnecessary manipulation of objects between healthy and sick individuals in a pandemic situation, all study participants signed an electronic informed consent, which was approved by our institutional review board.

### Study population

Forty-one patients over 18 years of age with positive qRT-PCR for SARS-CoV-2 were recruited and classified into two groups according to the severity of the disease. The nonsevere (NS,  $n = 20$ ) group included patients with no need for hospitalization, and the severe (S,  $n = 21$ ) group included patients with a need for hospital care due to [22]:

1. dyspnea (respiratory rate  $>30$  respiratory incursions per minute), S
2. SpO<sub>2</sub>  $<93\%$  in room air,
3. PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>  $<300$  mmHg,
4. admission to the intensive care unit (ICU) or
5. need for mechanical ventilation.

Nine healthy controls (HCs,  $n = 9$ ) with SARS-CoV-2-negative qRT-PCR from 5 to 7 days before blood collection were enrolled to establish local thromboelastometric reference values for ROTEM. The demographic parameters (age and sex) as well as the clinical records (weight, body mass index, comorbidities, use of angiotensin receptor blockers, symptoms, chest CT, ICU admission and treatments prescribed) are detailed in Table 1.

Peripheral venous blood (4 mL) was collected from each participant in vacuum tubes, with 3.8% citrate used as an anticoagulant. Blood sampling of COVID-19 patients was carried out from 7 to 10 days after the diagnostic confirmation of the disease. The hemostasis assessment included only thromboelastometric tests in a single evaluation. All tests were performed within 4 hours after blood sampling.

Table 1. Baseline characteristics of the study participants.

Parameter*	Healthy Control	Non-Severe	Severe
	HC, n = 09	NS, n = 20	S, n = 21
Age, Median, Min-Max	40, 23–51	39, 19–70	50, 26–76
Gender, F/M (%)	9/0 (100)	8/12 (40)	12/9 (57)
Weight, kg, mean±SD	74±8	78±19	90±16
BMI †			
≤24.9	3 (33)	6 (30)	2 (9)
25–29.9	3 (33)	11 (55)	6 (29)
≥30	3 (33)	3 (15)	13 (62)
Hypertension	0 (0)	0 (0)	10 (48)
Obesity	3 (33)	3 (15)	13 (62)
Use of ARB	0 (0)	4 (20)	9 (43)
Symptoms (%) ‡	—	Anosmia 12 (63)	
		Ageusia 12 (63)	Dyspnoea 17 (81)
		Asthenia 12 (63)	Cough 14 (67)
		Headache 12 (63)	Asthenia 12 (57)
		Cough 11 (58)	Fever 11 (52)
Chest CT (%) §			
<25%	0 (0)	3 (15)	6 (29)
25–50%	0 (0)	0 (0)	8 (38)
>50%	0 (0)	0 (0)	7 (33)
ICU admission (%)	0 (0)	0 (0)	5 (24)
Treatment (%)	—	Azythromycin 14 (70)	Corticoid 21 (100)
		Corticoid 12 (60)	Azithromycin 20 (95)
		Enoxaparin 4 (20)	Enoxaparin 19 (90)

\* Data are reported as number of subjects (%), except for age (median–Min-Max), sex (F/M, %) and weight (kg, mean±SD)

† BMI, Body Mass Index, calculated as the ration between weight in kilograms by the square of the height in meters, considering ≤24.9 as healthy weight, 25–29.9 as overweight and ≥30 as obese. ARB, Angiotensin Receptor Blockers.

‡ Only symptoms that were present in more than 50% of the subjects were listed. Only the most frequent treatments offered to the subjects were listed.

§ Chest CT = Computed Tomography, considering the radiologist subjective evaluation of pulmonary parenchyma compromise (ground glass opacity), categorized as: 25%, 25–50% and >50%. ICU, Intensive Care Unit.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262600.t001>

### Inclusion criteria

COVID-19 patients treated during the pandemic in midwestern Brazil (Hospital Regional da Asa Norte and Hospital Universitário de Brasília, Brasília, DF, Brazil (between August 1<sup>st</sup> and September 30<sup>th</sup>, 2020) were included. Confirmatory diagnosis was based on positive SARS-CoV-2 infection results in oropharyngeal swabs by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).

### Exclusion criteria

The exclusion criteria were as follows:

1. under 18 years old.
2. pregnancy.
3. thrombophilia or previous thromboembolic events.
4. previous use of anticoagulants.

5. previous use of antiplatelet drugs
6. surgical procedures in the last 4 weeks.
7. hereditary coagulopathies and
8. psychiatric diseases that impaired the understanding of the informed consent form.

### Thromboelastometry

Briefly, the ROTEM® Delta device (Werfen, Barcelona, Spain) was used to perform the thromboelastometric analysis following the manufacturer's instructions (**protocol available:** [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bwvbp2n](https://doi.org/10.17504/protocols.io.bwvbp2n)).

All tests were performed by the same experienced laboratory technician at the DASA clinical laboratory, Brasília, Brazil. The EXTEM, INTEM and NATEM outputs were analyzed to yield the following parameters:

1. CT = clotting time, expressed in seconds.
2. ALPHA = alpha angle, expressed in °;
3. CFT = clot formation time, expressed in seconds.
4. MCF = maximum clot firmness, expressed in mm; and
5. ML = maximum lysis, expressed in %.
6. The thrombodynamic potential index (TPI) was calculated as  $[(100 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF})] / \text{CFT}$  [10]. In the FIBTEM assay, only MCF was considered, provided that the main function of this test is to analyze the participation of fibrinogen in clot firmness. An illustrative overview of the thromboelastometry principles and parameters measured in the temograms is displayed in Fig 1.

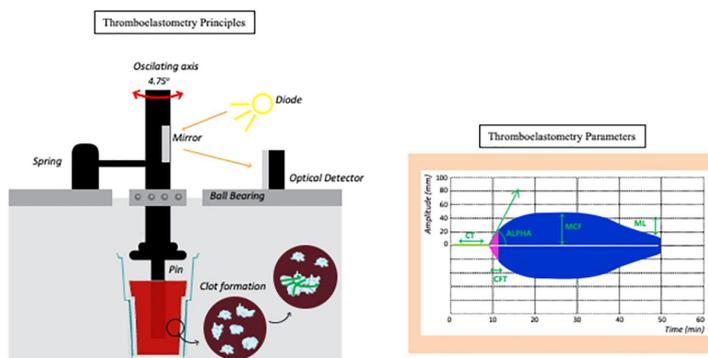
### Statistical analysis

The sample size calculation was carried out based on a previous study of NATEM curves in septic patients and healthy controls [23]. The G\*Power software version 3.1.9.6 was used and, considering a power of 95%, effect size  $d = 1.664$  and a maximum type I error of 5%, yielded a minimal sample of 11 patients in each group [24]. No data was excluded.

GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows software (GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) was used for the descriptive statistical analysis. A Normal distribution was tested with the Shapiro-Wilk test. Categorical variables were described as absolute and relative frequencies and analyzed with the Chi-square or Fisher exact test. Continuous variables were described as the mean  $\pm$  SD. Multiple comparisons among groups were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's test for pairwise comparisons. Two-tailed Student's *t* test was used for comparisons between nonsevere and severe patients. In all cases, *p* values  $< 0.05$  indicated statistical significance.

ROC curves were constructed using MedCalc software, Version 7.3.0.0 (Ostend, Belgium, URL <https://www.medcalc.org/>), to define the cutoff values and estimate the global accuracy based on the area under the ROC curve (AUC). Performance indices expressed as percentages (sensitivity and specificity) were obtained for each thromboelastometric parameter in all ROTEM tests. TG-ROC curves were assembled to confirm the selected cutoffs.

Decision trees were built using WEKA software (Waikato Environment for Knowledge Analysis, version 3.6.11, University of Waikato, New Zealand, URL <https://www.cs.waikato.ac.nz/>).



**Fig 1. Thromboelastometry method for clot evaluation.** A pin that spins around its own axis is put in contact with a citrated blood sample inside a cuvette. After recalcification and addition of a specific activator (depending upon the test), the clotting starts, and as it becomes firmer, the spinning capacity of the axis is reduced, which is transformed by the system in a graphic representation of the clot, with increasing amplitude. As fibrinolysis starts, the clot becomes less firm, which is represented as a decreasing amplitude on the monitor. EXTEM: thromboplastin is the activator, and it evaluates the extrinsic activation of coagulation; INTEM: elagic acid is the activator, and it evaluates the intrinsic activation of coagulation; FIBTEM: thromboplastin and cytochalasin D (which inhibits platelet activity) are added, and it only depicts the participation of fibrinogen in the clot; and NATEM: recalcified blood with no activator, it performs a nonactivated evaluation of coagulation. Circulating tissue factors, such as those expressed on monocytes in inflammatory states, will start the coagulation process. CT represents the clotting time (expressed in seconds), which is the timeframe from activation until an amplitude of 2 mm, and indicates thrombin formation; ALPHA (expressed in °) is defined as the angle between the middle axis and the tangent to the clotting curve through the 2 mm amplitude point and represents the dynamic polymerization of fibrin; CFT represents clot formation time (expressed in seconds) and indicates the dynamic polymerization of fibrin, and it is the timeframe between 2 mm and 20 mm of clot amplitude; MCF represents maximum clot firmness (expressed in mm), and it indicates the maximum amplitude of the clot and represents its main constituents, namely, fibrinogen and platelets; ML represents maximum lysis (expressed in %), and it indicates the percentage of clot reduction after initiation of fibrinolysis. Therefore, thromboelastometry analyzed 60 minutes after initiation depicts important information about every phase of the coagulation process.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262600.g001>

ac.nz/ml/weka/) to classify COVID patients and healthy controls based on selected thromboelastometric parameters. Leave-one-out cross-validation (LOOCV) was applied to estimate the classification accuracy and test the generalizability of the model.

The graphics (bar diagrams, scatter charts and decision trees) were generated using Microsoft Office Package version 2012 and GraphPad Prism software, Version 8.0.

## Results

### Population characteristics

Age and sex distributions were similar between the nonsevere and severe groups ( $p = 0.1683$  and  $p = 0.354$ , respectively). Severe patients showed significantly higher weight (21% higher) than HCs. For  $BMI \geq 30$ , the severe forms differed from the nonsevere forms (62% vs 15%). The percentage of hypertensive patients was higher in the severe than the nonsevere patients (48% vs 0%). Dyspnea, cough, and asthenia were the most frequent symptoms in severe patients, while anosmia, ageusia and asthenia were more frequent symptoms in nonsevere patients (Table 1).

### Thromboelastometry parameters in COVID-19 patients and healthy controls

A comparison of the thromboelastometric profiles of COVID-19 patients (NS+S) and healthy controls (HC) is shown in Fig 2. The data analysis demonstrated a significant increase in CT

values from the EXTEM temogram of COVID-19 patients compared to HCs. Moreover, COVID-19 patients exhibited significantly shorter CT values and higher ALPHA angle, MCF and TPI results from the NATEM test in comparison with healthy controls. Higher MCF values from FIBTEM were also reported for COVID-19 patients compared with HCs. Regardless of the thromboelastometric assay, differences were not observed for CFT or ML. Moreover, the INTEM parameters did not differ between the COVID-19 patients and HCs (Fig 2). A detailed description of the viscoelastic tests is provided in S1 Table.

### Thromboelastometry parameters in COVID-19 patients according to the disease severity

A comparative analysis of the temograms from COVID-19 patients with nonsevere or severe forms of the disease is presented in Fig 3. The data analysis demonstrated that patients with severe disease exhibited EXTEM results characterized by increased CT, ALPHA angle and MCF values and reduced CFT values compared to nonsevere patients and healthy controls. Notably, higher TPI values from EXTEM were observed in severe patients. No difference in the ML parameter was observed among the NS, S and HC patients (Fig 3).

An analysis of the INTEM thermogram in patients with severe disease, indicated a hypercoagulability profile with an increased ALPHA angle and MCF along with reduced CFT but unaltered CT and ML compared to the nonsevere patients and healthy controls. The TPI values from the INTEM assay were also increased in the S patients compared to the NS and HC patients (Fig 3).

Data from the NATEM thromboelastogram showed that regardless of disease severity, CT was significantly lower in COVID-19 patients than in HCs. However, the CFT value was lower in the S patients than the NS and HC patients. The ALPHA angle and MCF values were higher in the S group than in the NS and HC groups. In the NATEM test, the TPI values were higher in the S group than in the NS and HC groups (Fig 3).

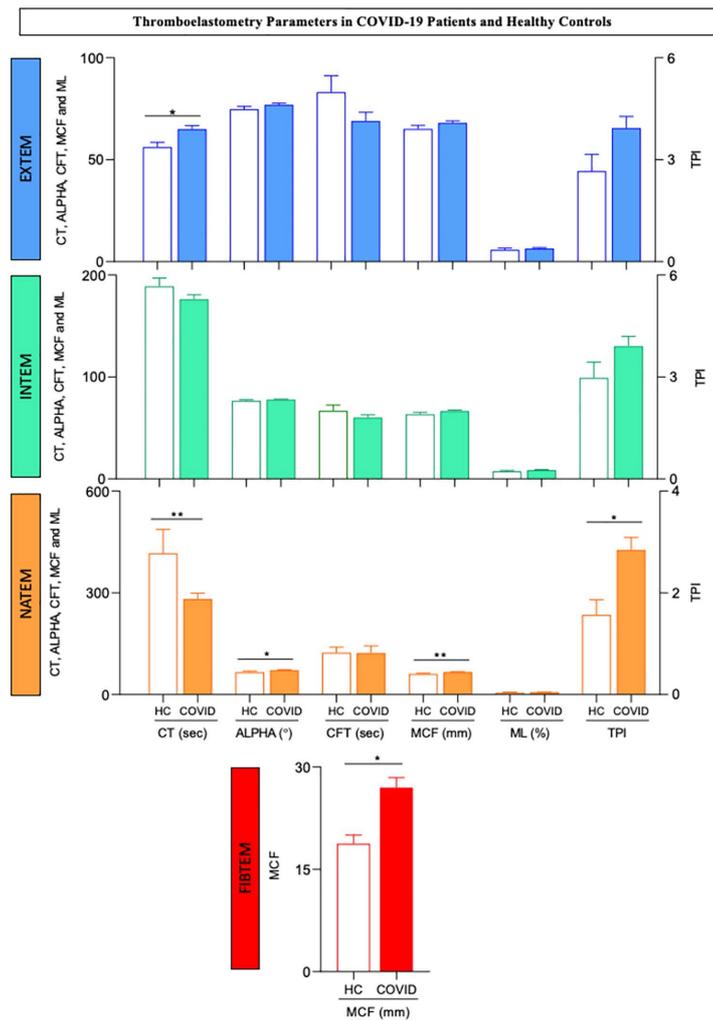
The FIBTEM test showed a clear elevation of MCF values in severe patients relative to the NS and HC groups (Fig 3).

### Performance of thromboelastometry parameters as complementary biomarkers to classify COVID-19 patients

To further explore the applicability of thromboelastometry parameters from EXTEM, INTEM, NATEM and FIBTEM to cluster COVID-19 patients from healthy controls as well as subgroups of COVID-19 patients according to disease severity, the global accuracy (AUC) of each parameter was evaluated along with other performance indices (sensitivity, specificity, negative and positive likelihood ratios) obtained from the ROC curve attributes. The results are presented in Tables 2 and 3.

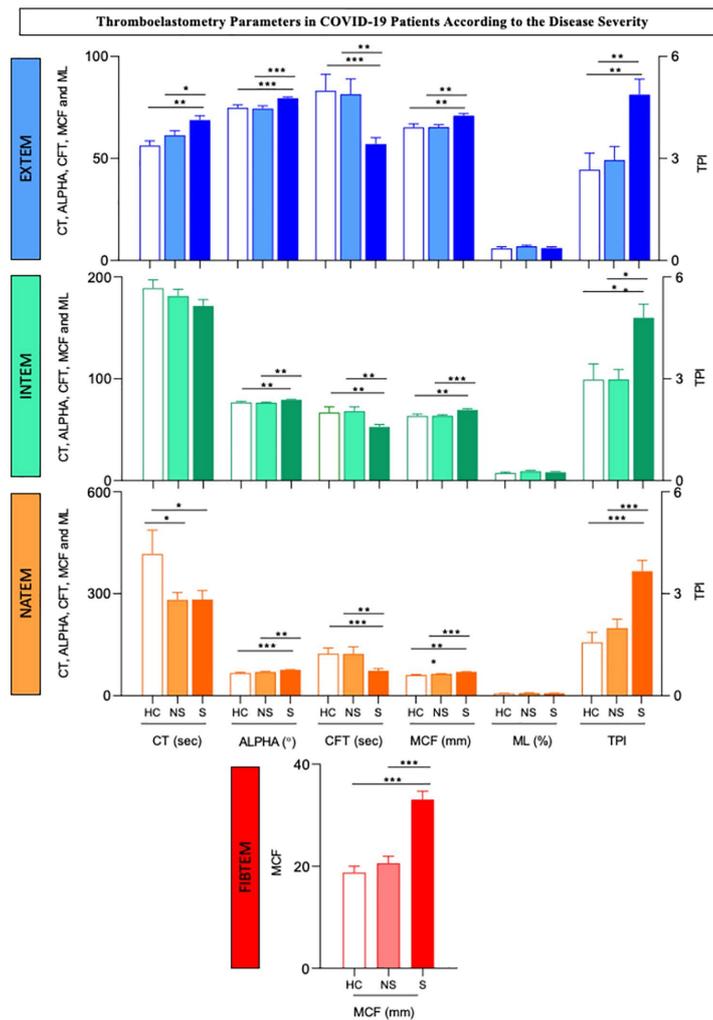
A panoramic overview analysis was carried out based on AUC values higher than 0.7 as an indicator of moderate or elevated global accuracy. Based on these criteria, thirteen parameters were preselected for further analysis to classify COVID-19 vs HC: CT, ALPHA angle, CFT, MCF and TPI from EXTEM; MCF and TPI from INTEM; CT, ALPHA angle, CFT, MCF and TPI from NATEM and MCF from FIBTEM (Table 2). Additionally, thirteen attributes were used to cluster NS from S with moderate or elevated global accuracy (AUC>0.7): including ALPHA angle, CFT, MCF and TPI from EXTEM; ALPHA angle, CFT, MCF and TPI from INTEM; ALPHA angle, CFT, MCF and TPI from NATEM and MCF from FIBTEM (Table 2).

Further comparisons between the HC and NS patients indicated that three parameters exhibited moderate or elevated global accuracy (AUC>0.7): CT from EXTEM and CT and MCF from NATEM (Table 3). Additionally, sixteen parameters showed the ability to cluster



**Fig 2. Thromboelastometry parameters in COVID-19 patients and healthy controls.** Extrinsic (EXTEM) and intrinsic (INTEM) coagulation activity assays, nonactivated coagulation assays (NATEM) and functional assessments of fibrinogen assays (FIBTEM) were carried out as described in the Materials and Methods. The results for COVID-19 patients (COVID,  $n = 41$ , color bars) and healthy controls (HC,  $n = 9$ , white bars) are presented as the mean values  $\pm$  standard error. CT = clotting time, expressed in seconds; ALPHA = alpha angle, expressed in  $^{\circ}$ ; CFT = clot formation time, expressed in seconds; MCF = maximum clot firmness, expressed in mm; ML = maximum lysis, expressed in % and TPI = thrombodynamic potential index, calculated as  $[(100 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF})] / \text{CFT}$ . Significant differences are highlighted by connecting lines and \* or \*\* for  $p$  values  $\leq 0.05$  and  $\leq 0.01$ , respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262600.g002>



**Fig 3. Thromboelastometry parameters in COVID-19 patients according to disease severity.** Extrinsic (EXTEM) and intrinsic (INTEM) coagulation activity assays, nonactivated coagulation assays (NATEM) and functional assessments of fibrinogen assays (FIBTEM) were carried out as described in the Patients and Methods. The results for nonsevere (NS, n = 20, light color bars) and severe (S, n = 21, dark color bars) COVID-19 patients and healthy controls (n = 9, white bars) are presented as the mean values  $\pm$  standard error. CT = clotting time, expressed in seconds; ALPHA = alpha angle, expressed in  $^{\circ}$ ; CFT = clot formation time, expressed in seconds; MCF = maximum clot firmness, expressed in mm; ML = maximum lysis, expressed in % and TPI = thrombodynamic potential index, calculated as  $[(100 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF})] / \text{CFT}$ . Significant differences are highlighted by connecting lines and \*, \*\*, or \*\*\* for p values  $\leq 0.05$ ,  $\leq 0.01$  and  $\leq 0.001$ , respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262600.g003>

Table 2. Performance of thromboelastometry parameters as complementary biomarkers to segregate COVID-19 patients.

PARAMETERS	DIAGNOSIS					PROGNOSIS				
	HC x COVID					COVID (NS x S)				
	AUC	Se (%)	Sp (%)	LR(-)	LR(+)	AUC	Se (%)	Sp (%)	LR(-)	LR(+)
EXTEM										
CT	<u>0.7 (0.6–0.9)</u>	<u>46 (31–63)</u>	<u>100 (66–100)</u>	<u>0.5</u>	<u>+∞</u>	0.6 (0.5–0.8)	86 (64–97)	40 (19–64)	0.4	1.4
ALPHA	<u>0.7 (0.5–0.8)</u>	<u>51 (35–67)</u>	<u>89 (52–98)</u>	<u>0.6</u>	<u>4.6</u>	<u>0.8 (0.7–0.9)</u>	<u>81 (58–94)</u>	<u>80 (56–94)</u>	<u>0.2</u>	<u>4.0</u>
CFT	<u>0.7 (0.5–0.8)</u>	<u>78 (49–80)</u>	<u>78 (40–97)</u>	<u>0.4</u>	<u>3.0</u>	<u>0.8 (0.6–0.9)</u>	<u>62 (39–82)</u>	<u>90 (68–99)</u>	<u>0.4</u>	<u>6.2</u>
MCF	<u>0.7 (0.5–0.8)</u>	<u>44 (29–60)</u>	<u>89 (52–98)</u>	<u>0.6</u>	<u>4.0</u>	<u>0.8 (0.6–0.9)</u>	<u>62 (39–82)</u>	<u>85 (62–97)</u>	<u>0.5</u>	<u>4.1</u>
ML	0.6 (0.4–0.7)	15 (6–29)	100 (66–100)	0.9	+∞	0.6 (0.4–0.8)	14 (3–36)	100 (83–100)	0.9	+∞
TPI	<u>0.7 (0.5–0.8)</u>	<u>61 (45–76)</u>	<u>78 (40–97)</u>	<u>0.5</u>	<u>2.7</u>	<u>0.8 (0.6–0.9)</u>	<u>62 (39–82)</u>	<u>90 (68–99)</u>	<u>0.4</u>	<u>6.2</u>
INTEM										
CT	0.6 (0.5–0.8)	76 (60–88)	56 (21–86)	0.4	1.7	0.6 (0.4–0.8)	62 (39–82)	70 (46–88)	0.5	2.1
ALPHA	0.6 (0.5–0.8)	68 (52–82)	67 (30–92)	0.5	2.1	<u>0.7 (0.6–0.9)</u>	<u>91 (70–99)</u>	<u>55 (32–77)</u>	<u>0.2</u>	<u>2.0</u>
CFT	0.6 (0.5–0.8)	71 (55–84)	67 (30–92)	0.4	2.1	<u>0.8 (0.6–0.9)</u>	<u>91 (70–99)</u>	<u>55 (32–77)</u>	<u>0.2</u>	<u>2.0</u>
MCF	<u>0.7 (0.5–0.8)</u>	<u>76 (60–88)</u>	<u>56 (21–86)</u>	<u>0.4</u>	<u>1.7</u>	<u>0.8 (0.6–0.9)</u>	<u>67 (43–85)</u>	<u>80 (56–94)</u>	<u>0.4</u>	<u>3.3</u>
ML	0.6 (0.4–0.7)	22 (11–38)	100 (66–100)	0.8	+∞	0.5 (0.4–0.7)	95 (76–99)	25 (9–49)	0.2	1.3
TPI	<u>0.7 (0.5–0.8)</u>	<u>73 (57–86)</u>	<u>67 (30–92)</u>	<u>0.4</u>	<u>2.2</u>	<u>0.8 (0.6–0.9)</u>	<u>71 (48–89)</u>	<u>70 (46–88)</u>	<u>0.4</u>	<u>2.4</u>
NATEM										
CT	<u>0.8 (0.6–0.9)</u>	<u>56 (40–72)</u>	<u>89 (52–98)</u>	<u>0.5</u>	<u>5.1</u>	0.5 (0.4–0.7)	57 (34–78)	60 (36–81)	0.7	1.4
AA	<u>0.8 (0.6–0.9)</u>	<u>42 (26–58)</u>	<u>100 (66–100)</u>	<u>0.6</u>	<u>+∞</u>	<u>0.8 (0.6–0.9)</u>	<u>81 (58–94)</u>	<u>70 (46–88)</u>	<u>0.3</u>	<u>2.7</u>
CFT	<u>0.8 (0.6–0.9)</u>	<u>44 (29–60)</u>	<u>100 (66–100)</u>	<u>0.6</u>	<u>+∞</u>	<u>0.8 (0.6–0.9)</u>	<u>91 (70–99)</u>	<u>60 (36–81)</u>	<u>0.2</u>	<u>2.3</u>
MCF	<u>0.8 (0.6–0.9)</u>	<u>76 (60–88)</u>	<u>67 (30–92)</u>	<u>0.4</u>	<u>2.3</u>	<u>0.8 (0.7–0.9)</u>	<u>86 (64–97)</u>	<u>65 (41–85)</u>	<u>0.2</u>	<u>2.5</u>
ML	0.6 (0.4–0.7)	15 (6–29)	100 (66–100)	0.9	+∞	0.5 (0.3–0.7)	86 (64–97)	25 (9–49)	0.6	1.1
TPI	<u>0.8 (0.6–0.9)</u>	<u>47 (31–63)</u>	<u>100 (66–100)</u>	<u>0.5</u>	<u>+∞</u>	<u>0.8 (0.7–0.9)</u>	<u>71 (48–89)</u>	<u>90 (68–99)</u>	<u>0.3</u>	<u>7.1</u>
FIBTEM										
MCF	<u>0.8 (0.6–0.9)</u>	<u>68 (52–82)</u>	<u>89 (52–98)</u>	<u>0.4</u>	<u>6.2</u>	<u>0.9 (0.8–1.0)</u>	<u>76 (53–92)</u>	<u>90 (68–99)</u>	<u>0.3</u>	<u>7.6</u>

HC = Healthy controls (n = 09); COVID = Patients with SARS-Cov-2 infection (n = 41); NS = Non-Severe COVID patients (n = 20); S = Severe COVID patients (n = 21); AUC = Area under the ROC curve; Se = Sensitivity; Sp = Specificity. Extrinsic (EXTEM) and Intrinsic (INTEM) coagulation activity assay, Non-Activated coagulation assay (NATEM) and functional assessment of Fibrinogen assay (FIBTEM). CT = clotting time, expressed in seconds; ALPHA = alpha angle, expressed in °; CFT = clot formation time, expressed in seconds; MCF = maximum clot firmness, expressed in mm; ML = maximum lysis, expressed in % and TPI = thrombolytic potential index, calculated as:  $[(100 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF})] / \text{CFT}$ . \*Cut-offs HC x COVID: EXTEM = CT ≥ 66; ALPHA ≥ 78; CFT ≤ 70; MCF ≥ 69; ML ≥ 9; TPI ≥ 2.9; INTEM = CT ≤ 196; ALPHA ≥ 77; CFT ≤ 63; MCF ≥ 63; ML ≥ 11; TPI ≥ 2.8; NATEM = CT ≤ 255; ALPHA ≥ 75; CFT ≤ 72; MCF ≥ 63; ML ≥ 11; TPI ≥ 2.9 and FIBTEM = MCF ≥ 22. \*Cut-offs NS x S: EXTEM = CT ≥ 57; ALPHA ≥ 78; CFT ≤ 56; MCF ≥ 70; ML ≤ 2; TPI ≥ 4; INTEM = CT ≤ 175; ALPHA ≥ 77; CFT ≤ 62; MCF ≥ 67; ML ≤ 12; TPI ≥ 3.4; NATEM = CT ≤ 252; ALPHA ≥ 74; CFT ≤ 90; MCF ≥ 64; ML ≥ 4; TPI ≥ 3.1 and FIBTEM = MCF ≥ 27. Attributes with AUC > 0.7 were highlighted by bold underline format and pre-selected for further analysis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262600.t002>

severe patients from HC with moderate/elevated global accuracy (AUC > 0.7): CT, ALPHA angle, CFT, MCF and TPI from EXTEM; CT, ALPHA angle, CFT, MCF and TPI from INTEM; CT, ALPHA angle, CFT, MCF and TPI from NATEM and MCF from FIBTEM (Table 3). The preselected parameters underscored in Tables 2 and 3 were considered for further analysis.

### Decision tree algorithm proposed to classify COVID-19 patients according to disease severity

Considering the preselected thromboelastometry attributes with moderate/elevated global accuracy, decision tree algorithms were constructed to classify COVID-19 patients, and the

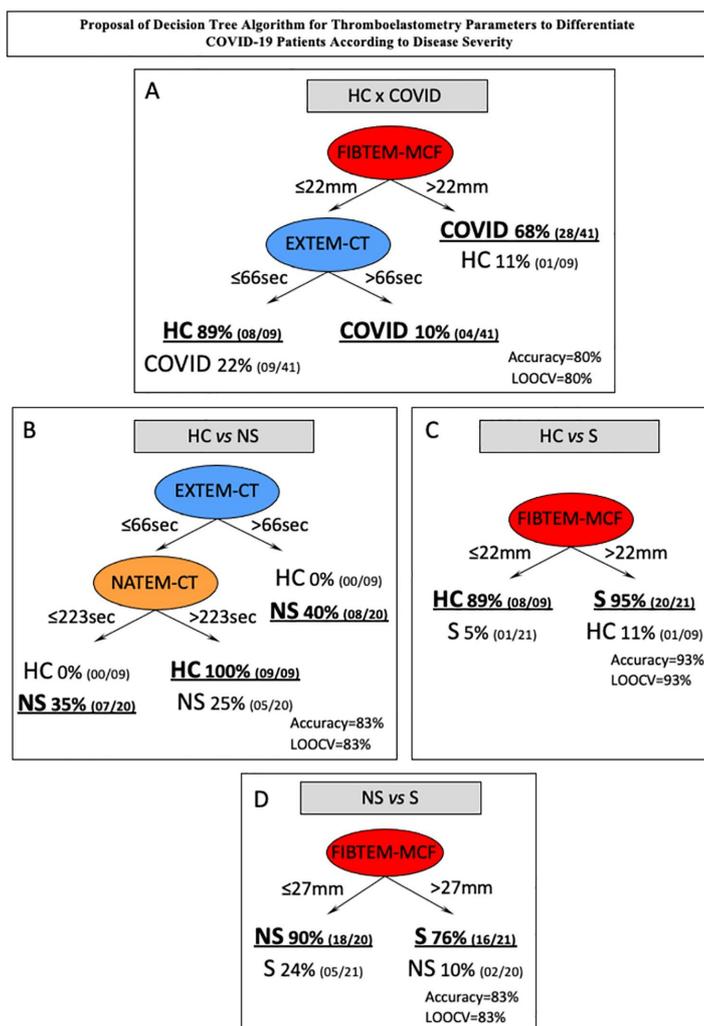
**Table 3. Performance of thromboelastometry parameters as complementary biomarkers to prognosis of SARS-Cov2 infection according to disease severity.**

PARAMETERS*	PROGNOSIS					PROGNOSIS				
	HC x NS					HC x S				
	AUC	Se (%)	Sp (%)	LR(-)	LR(+)	AUC	Se (%)	Sp (%)	LR(-)	LR(+)
EXTEM										
CT	<b>0.7 (0.5–0.8)</b>	<b>40 (19–64)</b>	<b>100 (66–100)</b>	<b>0.2</b>	$+\infty$	<b>0.8 (0.6–0.9)</b>	52 (30–74)	<b>100 (66–100)</b>	<b>0.5</b>	$+\infty$
ALPHA	0.5 (0.3–0.7)	10 (2–32)	100 (66–100)	0.9	$+\infty$	<b>0.9 (0.7–1.0)</b>	<b>81 (58–94)</b>	<b>89 (52–98)</b>	<b>0.2</b>	<b>7.3</b>
CFT	0.6 (0.4–0.8)	55 (33–77)	78 (40–97)	0.6	2.5	<b>0.8 (0.6–0.9)</b>	<b>90 (70–99)</b>	<b>67 (30–92)</b>	<b>0.1</b>	<b>2.7</b>
MCF	0.5 (0.3–0.7)	10 (2–32)	100 (66–100)	0.9	$+\infty$	<b>0.8 (0.6–0.9)</b>	<b>67 (43–85)</b>	<b>89 (52–98)</b>	<b>0.4</b>	<b>6</b>
ML	0.6 (0.4–0.8)	20 (6–44)	100 (66–100)	0.8	$+\infty$	0.5 (0.3–0.7)	57 (34–78)	56 (21–86)	0.8	1.3
TPI	0.6 (0.4–0.7)	50 (27–73)	78 (40–97)	0.6	2.3	<b>0.8 (0.6–0.9)</b>	<b>67 (43–85)</b>	<b>89 (52–98)</b>	<b>0.4</b>	<b>6</b>
INTEM										
CT	0.6 (0.4–0.8)	70 (46–88)	56 (21–86)	0.2	$+\infty$	<b>0.7 (0.5–0.8)</b>	<b>81 (58–94)</b>	<b>56 (21–86)</b>	<b>0.3</b>	<b>1.8</b>
ALPHA	0.5 (0.3–0.7)	85 (62–97)	33 (8–70)	0.5	1.3	<b>0.8 (0.6–0.9)</b>	<b>90 (70–99)</b>	<b>67 (30–92)</b>	<b>0.1</b>	<b>2.7</b>
CFT	0.5 (0.3–0.7)	85 (62–97)	33 (8–70)	0.5	1.3	<b>0.8 (0.6–0.9)</b>	<b>90 (70–99)</b>	<b>67 (30–92)</b>	<b>0.1</b>	<b>2.7</b>
MCF	0.5 (0.3–0.7)	45 (23–68)	67 (30–92)	0.8	1.4	<b>0.8 (0.6–0.9)</b>	<b>95 (76–99)</b>	<b>56 (21–86)</b>	<b>0.1</b>	<b>2.1</b>
ML	0.6 (0.4–0.8)	25 (9–49)	100 (66–100)	0.8	$+\infty$	0.5 (0.4–0.7)	19 (6–42)	100 (66–100)	0.8	$+\infty$
TPI	0.5 (0.3–0.7)	55 (32–77)	67 (30–92)	0.7	1.7	<b>0.8 (0.6–0.9)</b>	<b>90 (70–99)</b>	<b>67 (30–92)</b>	<b>0.1</b>	<b>2.7</b>
NATEM										
CT	<b>0.8 (0.6–0.9)</b>	<b>40 (19–64)</b>	<b>100 (66–100)</b>	<b>0.6</b>	$+\infty$	<b>0.8 (0.6–0.9)</b>	<b>48 (26–70)</b>	<b>100 (66–100)</b>	<b>0.5</b>	$+\infty$
ALPHA	0.6 (0.4–0.8)	95 (75–99)	33 (8–70)	0.2	1.4	<b>0.9 (0.7–1.0)</b>	<b>81 (58–94)</b>	<b>78 (40–97)</b>	<b>0.2</b>	<b>3.6</b>
CFT	0.6 (0.4–0.8)	85 (62–97)	44 (14–79)	0.3	1.5	<b>0.9 (0.7–1.0)</b>	<b>62 (39–82)</b>	<b>100 (66–100)</b>	<b>0.4</b>	$+\infty$
MCF	<b>0.7 (0.5–0.8)</b>	<b>85 (62–97)</b>	<b>44 (14–79)</b>	<b>0.3</b>	<b>1.5</b>	<b>0.9 (0.7–1.0)</b>	<b>86 (64–97)</b>	<b>78 (40–97)</b>	<b>0.2</b>	<b>3.9</b>
ML	0.6 (0.4–0.8)	20 (6–44)	100 (66–100)	0.2	$+\infty$	0.5 (0.4–0.7)	86 (64–97)	33 (8–70)	0.4	1.3
TPI	0.6 (0.5–0.8)	85 (62–97)	56 (21–86)	0.3	1.9	<b>0.9 (0.7–1.0)</b>	<b>71 (48–89)</b>	<b>100 (66–100)</b>	<b>0.3</b>	$+\infty$
FIBTEM										
MCF	0.6 (0.4–0.8)	40 (19–64)	89 (52–98)	0.7	3.6	<b>1.0 (0.8–1.0)</b>	<b>95 (76–99)</b>	<b>89 (52–98)</b>	<b>0.1</b>	<b>8.6</b>

HC = Healthy controls (n = 09); COVID = Patients with SARS-Cov-2 infection (n = 41); NS = Non-Severe COVID patients (n = 20); S = Severe COVID patients (n = 21); AUC = Area under the ROC curve; Se = Sensitivity; Sp = Specificity. Extrinsic (EXTEM) and Intrinsic (INTEM) coagulation activity assay, Non-Activated coagulation assay (NATEM) and functional assessment of Fibrinogen assay (FIBTEM). CT = clotting time, expressed in seconds; ALPHA = alpha angle, expressed in  $^{\circ}$ ; CFT = clot formation time, expressed in seconds; MCF = maximum clot firmness, expressed in mm; ML = maximum lysis, expressed in % and TPI = thrombodynamic potential index, calculated as:  $[(100 \times \text{MCF}) / (100 - \text{MCF})] / \text{CFT}$ . \*Cut-offs HC x NS: EXTEM =  $\text{CT} \geq 66$ ; ALPHA  $\leq 65$ ; CFT  $\leq 70$ ; MCF  $\leq 53$ ; ML  $\geq 9$ ; TPI  $\geq 2.9$ ; INTEM =  $\text{CT} \leq 191$ ; ALPHA  $\leq 79$ ; CFT  $\geq 49$ ; MCF  $\leq 61$ ; ML  $\geq 11$ ; TPI  $\geq 2.8$ ; NATEM =  $\text{CT} \leq 223$ ; ALPHA  $\geq 61$ ; CFT  $\leq 130$ ; MCF  $\geq 59$ ; ML  $\geq 11$ ; TPI  $\geq 1.1$  and FIBTEM =  $\text{MCF} \geq 22$ . \*Cut-offs HC x S: EXTEM =  $\text{CT} \geq 66$ ; ALPHA  $\geq 78$ ; CFT  $\leq 72$ ; MCF  $\geq 69$ ; ML  $\leq 6$ ; TPI  $\geq 3.7$ ; INTEM =  $\text{CT} \leq 196$ ; ALPHA  $\geq 77$ ; CFT  $\leq 62$ ; MCF  $\geq 63$ ; ML  $\geq 11$ ; TPI  $\geq 2.8$ ; NATEM =  $\text{CT} \leq 240$ ; ALPHA  $\geq 74$ ; CFT  $< 72$ ; MCF  $\geq 64$ ; ML  $\geq 4$ ; TPI  $\geq 2.9$  and FIBTEM =  $\text{MCF} \geq 22$ . Attributes with AUC  $> 0.7$  were highlighted by bold underline format and pre-selected for further analyses.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262600.t003>

data are presented in Fig 4. A data analysis was carried out to identify root and branch attributes to classify patients with higher accuracy as follows: HC vs COVID-19 (Fig 4A), HC vs NS (Fig 4B), HC vs S (Fig 4C) and NS vs S (Fig 4D). The decision trees were constructed using the cutoff values defined by the ROC curve analysis (Tables 2 and 3). The decision tree algorithm for HC vs COVID classification proposed the use of FIBTEM-MCF (22 mm) and EXTEM-CT (66 seconds) as the root and first branch attributes, respectively, to yield elevated accuracy (80%, LOOCV = 80%) (Fig 4A). Classification of HC vs NS with elevated accuracy (83%, LOOCV = 83%) was obtained by using EXTEM-CT (66 seconds) and NATEM-CT (223 seconds) as the root and first branch attributes, respectively (Fig 4B). Differentiation of S from HC was achieved with high accuracy (93%, LOOCV = 93%) using FIBTEM-MCF (22 mm) as a single root attribute (Fig 4C). Additionally, differentiation between NS and S COVID-19



**Fig 4. Proposed decision tree algorithm for thromboelastometry parameters to differentiate COVID-19 patients according to disease severity.** Decision tree algorithm using thromboelastometric parameters was generated to classify: (A) COVID-19 patients from healthy controls (HC x COVID); (B) nonsevere patients from healthy controls (HC x NS); (C) severe patients from healthy controls (HC x S); and (D) severe patients from nonsevere COVID-19 patients (NS x S). The numbers at branches indicate the cutoff values used to classify each group. The global accuracy and leave-one-out-cross-validation (LOOCV) scores are provided in the figure.

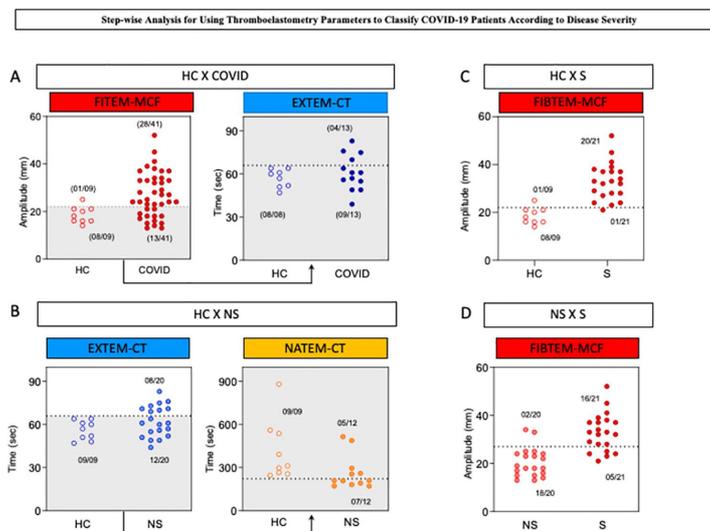
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262600.g004>

patients was possible by applying a simple algorithm based on the use of FIBTEM-MCF (27 mm) with elevated accuracy (83%, LOOCV = 83%) (Fig 4D).

### Stepwise and one-step analysis to classify COVID-19 patients

The proposed decision tree algorithms for classifying subgroups of COVID-19 patients and healthy controls were further presented as stepwise and one-step scatter plot analyses, as shown in Fig 5. The stepwise analysis to classify HC vs COVID-19 comprises two consecutive analyses, including FIBTEM-MCF followed by EXTEM-CT. In the first round of analysis, it was possible to precisely classify 28 out of 41 COVID-19 patients with one misclassification of HC as COVID-19. Samples with FIBTEM-MCF below or equal to 22 mm were further analyzed for the EXTEM-CT profile. The results of EXTEM-CT below or equal to 66 seconds classified 08/08 as HC and misclassified 09/13 COVID patients (Fig 5A). Overall, the stepwise analysis correctly classified 40 out of 50 subjects.

The stepwise algorithm for classifying HC vs NS consists of EXTEM-CT followed by NATEM-CT. In the first step, the decision tree accurately classified 08 out of 20 nonsevere COVID-19 patients with no misclassification. Samples with EXTEM-CT below or equal to 66 seconds were moved forward to the NATEM-CT analysis. NATEM-CT results below or equal to 223 seconds were used to classify 07/12 as NS, with no misclassification. Samples with NATEM-CT higher than 223 seconds were categorized as HC, with 5 misclassifications (Fig 5B). The final analysis correctly classified 24 out of 29 subjects.



**Fig 5. Stepwise analysis for using thromboelastometry parameters to classify COVID-19 patients according to disease severity.** Scatter plot distributions illustrate the stepwise and one-step analysis proposed to classify: (A) COVID-19 patients from healthy controls (HC x COVID); (B) nonsevere patients from healthy controls (HC x NS); (C) severe patients from healthy controls (HC x S); and (D) severe patients from nonsevere COVID-19 patients (NS x S). The dotted lines represent the cutoff values selected by ROC curve analysis with the highest global accuracy (AUC). In the stepwise analysis, the gray background underscored the samples used in the second round of analysis. The proportions of accurate classifications and T are provided in the figure.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262600.g005>

The algorithm proposed to classify HC vs S based on the single use of FIBTEM-MCF. The classification tree accurately classified samples with FIBTEM-MCF higher than 22 mm as severe COVID-19 patients, with 20 out of 21 hits and one misclassification of HC as severe COVID-19 (Fig 5C).

A one-step analysis was also proposed to differentiate S from NS COVID patients using FIBTEM-MCF as a single parameter. The algorithm precisely classified 16 out of 21 severe COVID-19 patients with FIBTEM-MCF higher than 27 mm, with only two misclassifications of NS as severe COVID-19 (Fig 5D).

## Discussion

The assessment of coagulation derangement is not an easy task, especially in the prothrombotic pole. In this regard, viscoelastic tests have emerged as a promising technique to enable the detailed analysis of all coagulation stages, including initiation (CT), fibrin polymerization (ALPHA and CFT), fibrinogen and platelet contributions (MCF) and fibrinolysis (ML) [7, 8, 11, 12]. Few studies have characterized the coagulopathic process in COVID-19 patients, and of these studies, most are performed in critically ill patients. Knowledge of the specific alterations of thromboelastometric parameters in nonsevere and severe COVID-19 patients may allow for the future characterization of biomarkers useful for thromboprophylaxis or decision making in patients with low-risk of thromboembolic events.

In the present work, we characterized the thromboelastometric profile of nonsevere and severe forms of COVID-19 compared to healthy controls. Our findings showed a clear hypercoagulant profile in severe forms of COVID-19 based on the evaluation of EXTEM parameters, as previously described [7, 16]. A single parameter (EXTEM-CT) did not fulfill the hypercoagulability diagnosis, with values in the normal range [14]. However, all INTEM parameters, even CT, which is known to be more heparin-sensitive, support a clear hypercoagulant pattern in severe COVID-19 [26]. Since heparin thromboprophylaxis was administered to 90% of severe patients included in the present investigation and they still presented a clear INTEM hypercoagulability profile, we hypothesize that heparin therapy in usual doses may not have been sufficient to control the thrombotic tendency in severe COVID-19 patients and that INTEM analysis may represent a relevant biomarker to predict and adjust thromboprophylaxis management in COVID-19 patients, even knowing that INTEM is not highly sensitive to LMWH [25–27]. Further studies with a larger number of patients are necessary to confirm the applicability of INTEM-CT as a biomarker for insufficient anticoagulation therapy.

Previous evaluations of NATEM parameters have not been performed in COVID-19 patients. Altered NATEM profiles have been well described in patients with bacterial sepsis [17–19]. In septic patients, the induction of tissue factor (TF) expression in circulating mononuclear cells may explain the occurrence of disseminated thrombi and multiple organ failure [17–19]. As no specific activator is added in the NATEM assay, the production of thrombin will be triggered by pre-existing circulating TF. Our results showed that both severe and nonsevere COVID-19 patients presented altered NATEM profiles, which were characterized by shortening of CT. As the nonsevere patients exhibited this thromboelastometric parameter (NATEM-CT) suggestive of incipient hypercoagulopathy, our results suggested that even patients not hospitalized with nonsevere forms of COVID-19 may present a risk of developing thromboembolic events, which is probably due to increased levels of circulating TF expression. Additional studies of nonsevere patients may confirm whether altered NATEM-CT would represent a thromboelastometric parameter useful as a predictor of worse clinical evolution, thereby allowing for earlier intervention to avoid evolution to more severe clinical forms.

Moreover, as NATEM is more sensitive to LMWH than INTEM, it is possible to postulate that this parameter could be used to manage anticoagulation dosing [27]. To the best of our knowledge, this is the first study in the literature to show endogenous coagulation activation using the NATEM test in COVID-19 nonsevere and severe forms and to describe the coagulation derangement of nonsevere patients.

The analysis of the FIBTEM results reinforces the abovementioned hypercoagulant findings observed for severe COVID-19 patients. Moreover, the FIBTEM-MCF parameter was able to differentiate nonsevere and severe patients. Our data corroborate previous reports in which higher FIBTEM-MCF results were found for severely ill COVID-19 patients than healthy controls and patients in regular wards [14]. As fibrinogen is an acute phase protein that is progressively elevated, this finding is further supported by previous data that severe patients exhibited higher fibrinogen levels than nonsevere patients [4, 28].

The TPI is calculated from the CFT and MCF thromboelastometric parameters and represents a robust measure of thrombogenic potential [8, 10]. In our study, TPI was able to differentiate severe from nonsevere patients and healthy controls in the EXTEM, INTEM and NATEM assays. Multiple clinical trials have evaluated thromboinflammatory biomarkers associated with poor prognosis among COVID-19 patients. To our knowledge, previous reports have not evaluated the TPI parameter in COVID-19 patients. Our findings of a hypercoagulable profile measured by TPI represent novel insights for the application of biomarkers in personalized antithrombotic therapy for COVID-19 [29].

Fibrinolysis shutdown has been hypothesized to occur during COVID-19 progression [30–32], and a local pulmonary hyperfibrinolysis process may also occur in COVID-19 patients [33]. In general, fibrinolysis potential has been associated with D-dimer levels. However, the increased D-dimer levels observed in COVID-19 patients are not necessarily associated with a higher fibrinolysis profile, as only about 0.02 to 0.2% of the fibrinogen mass is cleaved [14]. Our data did not demonstrate any significant differences in ML between severe and nonsevere COVID-19 patients or relative to the healthy controls.

To date, thromboelastometry cutoff values for defining hypercoagulability remain controversial. In the present study, we presented a decision tree algorithm based on cutoff values derived from a ROC curve analysis to classify COVID-19 patients according to clinical status. The proposed algorithm uses a stepwise or single-step approach and represents an objective tool for application as a complementary laboratory method to classify COVID-19 patients according to disease severity. Additionally, the same principles of the decision tree could be used to help attending physicians identify patients requiring further enhancement of antithrombotic prophylaxis.

As per current critical care guidelines, most of our patients were receiving some form of heparin during blood collection. Thus, some of our results could have been influenced by its anticoagulant properties, nevertheless thromboelastometric tests are less affected than other conventional coagulation tests. In addition, our reduced sample size prevents us from assessing coagulability differences in the broad spectrum of COVID-19 severity. Further studies are necessary to get into detail of the specific coagulability status presented by severe patients with different levels of organ dysfunctions.

Altogether, our findings demonstrate that patients with severe COVID-19 exhibited a thromboelastometry profile with clear hypercoagulability dysfunction, and it was significantly different from the profiles of nonsevere COVID-19 patients and healthy controls. Of note, the FIB-MCF profile was selected as a putative biomarker to differentiate patients with severe COVID-19 from nonsevere patients and healthy controls, and it presented moderate/elevated accuracy. The results showed that the TPI data analysis from EXTEM, INTEM and NATEM were significantly different in nonsevere forms compared to severe clinical forms.

Additionally, the NATEM data suggested that nonsevere and severe COVID-19 patients presented endogenous coagulation activation (reduced CT and CFT times).

## Conclusion

Our work demonstrated in our population, that thromboelastometry is useful to detect endogenous coagulation activation in both severe and nonsevere COVID-19 patients (reduced CT and CFT in NATEM). That TPI is enhanced in severe patients and that selected thromboelastometric parameters may be used to separate severe from nonsevere patients with moderate/high accuracy.

## Supporting information

**S1 Table. Detailed thromboelastometric results.** EXTEM = Extrinsic coagulation activity assay; INTEM = Intrinsic coagulation activity assay; NATEM = Non-Activated coagulation assay and FIBTEM = functional assessment of Fibrinogen assay. CT (expressed in seconds) = clotting time: refers to thrombin formation, timeframe from activation until an amplitude of 2mm; ALPHA (expressed in °) = defined as the angle between the middle axis and the tangent to the clotting curve through the 2mm amplitude point; CFT (expressed in seconds) = clot formation time: refers to the dynamic formation of fibrin, timeframe between 2 mm and 20 mm of clot amplitude; MCF (expressed in mm) = maximum clot firmness: refers to the maximum firmness of the clot, proportional to the amount of fibrinogen and platelets; ML (expressed in %) = maximum lysis: represents the percentage of clot reduction after initiation of fibrinolysis. § Data are expressed as Mean±SD. † P values were calculated with independent-samples Student's t-tests for continuous variables. Significant differences are underscored by letters "a", "b" and "c" for pairwise comparisons between NS vs HC, S vs HC and S vs NS, respectively. (DOCX)

## Acknowledgments

The study was supported by the Hospital Universitário de Brasília (HUB-EBSERH) from Universidade de Brasília (UnB) and Hospital Regional da Asa Norte (HRAN). The authors acknowledge the DASA Laboratory for performing the ROTEM analysis and Werfen Medical for supplying reagents for the ROTEM analysis. R.B.A. is enrolled in the Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da UnB.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Rodrigo B. Aires, Laurence R. do Amaral, Matheus de S. Gomes, Otávio T. Nóbrega, Ciro M. Gomes, Patricia S. Kurizky, Cleandro P. Albuquerque, Olindo A. Martins-Filho, Licia Maria H. da Mota.

**Data curation:** Rodrigo B. Aires, Heidi Luise Schulte, Patricia S. Kurizky, Olindo A. Martins-Filho.

**Formal analysis:** Rodrigo B. Aires, Alexandre A. de S. M. Soares, Ana Paula M. Gomides, André M. Nicola, Dayde Lane M. da Silva, Flávia D. Xavier, Isabelle S. Luz, Laila S. Espindola, Laurence R. do Amaral, Matheus de S. Gomes, Otávio T. Nóbrega, Wagner Fontes, Ciro M. Gomes, Patricia S. Kurizky, Cleandro P. Albuquerque, Olindo A. Martins-Filho, Licia Maria H. da Mota.

**Funding acquisition:** Laila S. Espindola, Olindo A. Martins-Filho.

**Investigation:** André M. Nicola, Dayde Lane M. da Silva, Francielle P. Martins, Gabriela P. J. Santos, Isabelle S. Luz, Liza F. Felicori, Luciana A. Naves, Máira R. M. de Carvalho, Ciro M. Gomes, Olindo A. Martins-Filho, Licia Maria H. da Mota.

**Methodology:** Rodrigo B. Aires, Andréa Teixeira-Carvalho, Flávia D. Xavier, Heidi Luise Schulte, Laurence R. do Amaral, Liza F. Felicori, Otávio T. Nóbrega, Patrícia Albuquerque, Wagner Fontes, Ciro M. Gomes, Patricia S. Kurizky, Cleandro P. Albuquerque, Olindo A. Martins-Filho, Licia Maria H. da Mota.

**Project administration:** Rodrigo B. Aires, Licia Maria H. da Mota.

**Resources:** Francielle P. Martins, Gabriela P. J. Santos, Laila S. Espindola, Luciana A. Naves, Máira R. M. de Carvalho, Ciro M. Gomes, Patricia S. Kurizky, Olindo A. Martins-Filho, Licia Maria H. da Mota.

**Software:** Laurence R. do Amaral, Matheus de S. Gomes, Cleandro P. Albuquerque, Olindo A. Martins-Filho.

**Supervision:** Patricia S. Kurizky, Olindo A. Martins-Filho, Licia Maria H. da Mota.

**Validation:** Patrícia Albuquerque, Patricia S. Kurizky, Cleandro P. Albuquerque, Olindo A. Martins-Filho, Licia Maria H. da Mota.

**Visualization:** Eliana T. de Gois, Heidi Luise Schulte, Patrícia Albuquerque, Wagner Fontes, Patricia S. Kurizky, Cleandro P. Albuquerque, Olindo A. Martins-Filho, Licia Maria H. da Mota.

**Writing – original draft:** Rodrigo B. Aires, Otávio T. Nóbrega, Ciro M. Gomes, Patricia S. Kurizky, Cleandro P. Albuquerque, Olindo A. Martins-Filho, Licia Maria H. da Mota.

**Writing – review & editing:** Rodrigo B. Aires, Alexandre A. de S. M. Soares, Ana Paula M. Gomides, André M. Nicola, Andréa Teixeira-Carvalho, Dayde Lane M. da Silva, Eliana T. de Gois, Flávia D. Xavier, Francielle P. Martins, Gabriela P. J. Santos, Heidi Luise Schulte, Isabelle S. Luz, Laila S. Espindola, Liza F. Felicori, Luciana A. Naves, Máira R. M. de Carvalho, Matheus de S. Gomes, Otávio T. Nóbrega, Patrícia Albuquerque, Wagner Fontes, Ciro M. Gomes, Patricia S. Kurizky, Cleandro P. Albuquerque, Olindo A. Martins-Filho, Licia Maria H. da Mota.

## References

1. Becker RC. COVID-19 update: Covid-19-associated coagulopathy. *J Thromb Thrombolysis*. 2020; 30(1):54–67. <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02134-3> PMID: 32415579
2. Cui S, Chen S, Li X, Liu S, Wang F. Prevalence of venous thromboembolism in patients with severe novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020; 18(6):1421–1424. <https://doi.org/10.1111/jth.14830> PMID: 32271988
3. Tal S, Spectre G, Kornowski R, Perl L. Venous Thromboembolism Complicated with COVID-19: What Do We Know So Far? *Acta Haematol*. 2020:1–8. <https://doi.org/10.1159/000508233> PMID: 32396903
4. Iba T, Levy JH, Levi M, Connors JM, Thachil J. Coagulopathy of Coronavirus Disease 2019. *Crit Care Med*. 2020; 48(9):1358–1364. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000004458> PMID: 32467443
5. Boccia M, Aronne L, Cella B, Mazzeo G, Ceparano M, D'Agnano V, et al. COVID-19 and coagulative axis: review of emerging aspects in a novel disease. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2020; 90(2):271–276. <https://doi.org/10.4081/monaldi.2020.1300> PMID: 32425013
6. Whyte CS, Morrow GB, Mitchell JL, Chowdhary P, Mutch NJ. Fibrinolytic abnormalities in acute respiratory distress syndrome (ARDS) and versatility of thrombolytic drugs to treat COVID-19. *J Thromb Haemost*. 2020; 18(7):1548–1555. <https://doi.org/10.1111/jth.14872> PMID: 32329246
7. Mortus JR, Manek SE, Brubaker LS, Loor M, Cruz MA, Trautner BW, et al. Thromboelastographic Results and Hypercoagulability Syndrome in Patients With Coronavirus Disease 2019 Who Are

- Critically Ill. *JAMA Netw Open*. 2020; 3(6):e2011192. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.11192> PMID: 32501489
8. Dimitrova-Karamfilova A, Patokova Y, Solarova T, Petrova IaN, G. Rotation thromboelastography for assessment of hypercoagulation and thrombosis in patients with cardiovascular diseases. *Life Sci*. 2012; 6(1):28–35. ISSN 1934-7405 (Online)
  9. Görlinger K, Dirkmann D, Hanke A. Rotational thromboelastometry (ROTEM). In: Gonzalez E, Moore HB and Moore EE, eds. *Trauma Induced Coagulopathy*. Switzerland: Springer International Publishing; 2016. pp 267–98. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-28308-1\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-28308-1_18)
  10. Calatzis A, Schramm W., Spannagl M. Management of Bleeding in Surgery and Intensive Care. In: Scharrer I, Schramm W, editors. *31st Hemophilia Symposium Hamburg*. Berlin: Springer; 2000. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-59383-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-59383-3_7). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-59383-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-59383-3_7)
  11. Hincker A, Feit J, Sladen RN, Wagener G. Rotational thromboelastometry predicts thromboembolic complications after major non-cardiac surgery. *Crit Care*. 2014; 18(5):549–556. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0549-2> PMID: 25292221
  12. McCrath DJ, Cerboni E, Frumento RJ, Hirsh AL, Bennett-Guerrero E. Thromboelastography maximum amplitude predicts postoperative thrombotic complications including myocardial infarction. *Anesth Analg*. 2005; 100(6):1576–83. <https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000155290.86795.12> PMID: 15920177
  13. Brown WMS, Lunati MMD, Maceroli MMD, et al. The ability of thromboelastography to detect hypercoagulability: a systematic review & meta-analysis. *J Orthop Trauma*. 2020; 34(6):278–286. <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000001714> PMID: 31815829
  14. Almskog L, Wikman A, Svensson J, Wanecek M, Bottai M, van der Linden J, et al. Rotational Thromboelastometry predicts care level in Covid-19. *J Thromb Thrombolysis*. 2021; 51:437–445. <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02312-3> PMID: 33068277
  15. Pavoni V, Giansello L, Pazzi M, Stera C, Meconi T, Frigieri FC. Evaluation of coagulation function by rotation thromboelastometry in critically ill patients with severe COVID-19 pneumonia. *J Thromb Thrombolysis*. 2020; 50:281–286. <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02130-7> PMID: 32394236
  16. Panigada M, Bottino N, Tagliabue P, Grasselli G, Novembrino C, Chantarangkul V, et al. Hypercoagulability of COVID-19 patients in Intensive Care Unit. A Report of Thromboelastography Findings and other Parameters of Hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2020; 18(7):1738–1742. <https://doi.org/10.1111/jth.14850> PMID: 32302438
  17. Preston RJS, O'Sullivan JM, O'Donnell JS. Advances in understanding the molecular mechanisms of venous thrombosis. *Br J Haematol*. 2019; 186(1):13–23. <https://doi.org/10.1111/bjh.15869> PMID: 30906986
  18. Levi M, Thachil J, Iba T, Levy JH. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol*. 2020; 7(6):e438–e440. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(20\)30145-9](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(20)30145-9) PMID: 32407672
  19. Görlinger K, Dirkmann D, Gandhi A, Simioni P. COVID-19 associated coagulopathy and inflammatory response: what do we know already and what are the knowledge gaps? *Anesth Analg*. 2020; 131(5):1324–1333. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000005147> PMID: 33079850
  20. Bautista-Vargas M, Bonilla-Abadía F, Cañas CA. Potential role for tissue factor in the pathogenesis of hypercoagulability associated with in COVID-19. *J Thromb Thrombolysis*. 2020; 50:479–483. <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02172-x> PMID: 32519164
  21. Kurizky P, Nobrega OT, Soares A, Aires RB, Albuquerque CP, Nicola AM, et al. Molecular and Cellular Biomarkers of COVID-19 Prognosis: Protocol for the Prospective Cohort TARGET Study. *JMIR Res Protoc*. 2021; 10(3):e24211. <https://doi.org/10.2196/24211> PMID: 33661132
  22. World Health O. Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected: interim guidance, 13 March 2020. Geneva: World Health Organization; 2020. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331446>.
  23. Adamzik M, Eggmann M, Frey UH, Görlinger K, Brocker-Preuss M, Marggraf G, et al. Comparison of thromboelastometry with procalcitonin, interleukin 6, and C-reactive protein as diagnostic tests for severe sepsis in critically ill adults. *Crit Care*. 2010; 14(5):R178. <https://doi.org/10.1186/cc9284> PMID: 20929576
  24. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang A-G. Statistical power analyses using G\*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behavior Research Methods*. 2009; 41(4):1149–60. <https://doi.org/10.3758/BRM.41.4.1149> PMID: 19897823
  25. Thomas O, Larsson A, Tynngård N, Schött U. Thromboelastometry versus free-oscillation rheometry and enoxaparin versus tinzaparin: an in-vitro study comparing two viscoelastic haemostatic tests' dose-responses to two low molecular weight heparins at the time of withdrawing epidural catheters from ten patients after major surgery. *BMC Anesthesiol*. 2015; 15:170. <https://doi.org/10.1186/s12871-015-0145-2> PMID: 26603039

26. Oswald E, Velik-Salchner C, Innerhofer P, Tauber H, Auckenthaler T, Ulmer H, et al. Results of rotational thromboelastometry, coagulation activation markers and thrombin generation assays in orthopedic patients during thromboprophylaxis with rivaroxaban and enoxaparin: a prospective cohort study. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2015; 26(2):136–44. <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000000203> PMID: 25396759
27. Görlinger K, Almutawah H, Almutawaa F, Alwabari M, Alsultan Z, Almajed J, et al. The role of rotational thromboelastometry during the COVID-19 pandemic: a narrative review. *Korean J Anesthesiol*. 2021; 74(2):91–102. <https://doi.org/10.4097/kja.21006> PMID: 33440114
28. Fei Y, Tang N, Liu H, Cao W. Coagulation dysfunction: A hallmark in COVID-19. *Arch Pathol Lab Med*. 2020; 144(10):1223–1229. <https://doi.org/10.5858/arpa.2020-0324-SA> PMID: 32551814
29. Chaudhary R, Kreutz RP, Bliden KP, Tantry US, Gurbel PA. Personalizing Antithrombotic Therapy in COVID-19: Role of Thromboelastography and Thromboelastometry. *Thromb Haemost*. 2020; 120(11):1594–1596. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1714217> PMID: 32679595
30. Wright FL, Vogler TO, Moore EE, Moore HB, Wohlauer MV, Urban S, et al. Fibrinolysis Shutdown Correlation with Thromboembolic Events in Severe COVID-19 Infection. *J Am Coll Surg*. 2020; 231(2):193–203. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2020.05.007> PMID: 32422349
31. Heinz C, Miesbach W, Herrmann E, Sonntagbauer M, Raimann FJ, Zacharowski K, et al. Greater Fibrinolysis Resistance but No Greater Platelet Aggregation in Critically Ill COVID-19 Patients. *Anesthesiol*. 2021; 134(3):457–67. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000003685> PMID: 33417674
32. Creel-Bulos C, Auld SC, Caridi-Scheible M, Barker NA, Friend S, Gaddh M, et al. Fibrinolysis Shutdown and Thrombosis in a COVID-19 ICU. *Shock*. 2021; 55(3):316–20. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001635> PMID: 32769822
33. Ibañez C, Perdomo J, Calvo A, Ferrando C, Reverter JC, Tassies D, et al. High D dimers and low global fibrinolysis coexist in COVID19 patients: what is going on in there? *J Thromb Thrombolysis*. 2020; 51:308–312. <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02226-0> PMID: 32671609

APÊNDICE B – ARTIGO DE REVISÃO - Qualis Capes A2 – FI 2,727

## Opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients

Patrícia Shu Kurizky<sup>a</sup>, Leopoldo Luiz dos Santos Neto<sup>b</sup>,  
Rodrigo Barbosa Aires<sup>b</sup>, Licia Maria Henrique da Mota<sup>a</sup>,  
Ciro Martins Gomes<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Hospital Universitário de Brasília, SGAN 605. Av. L2 Norte, CEP: 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, SGAN 605. Av. L2 Norte, CEP: 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, SGAN 605. Av. L2 Norte, CEP: 70910-900, Brasília, Distrito Federal, Brazil

### A B S T R A C T

#### Keywords:

Immunosuppression  
Rheumatology  
Tropical climate  
Infection control

Autoimmune and autoinflammatory diseases are associated with severe morbidity, and represent an impactful health and economic burden worldwide. The treatment of these diseases can include a course with detrimental side effects. Immunosuppression increases the risk of opportunistic infections, but in some cases, the abrupt discontinuation of these medications can result in immune reconstitution inflammatory syndrome. Special attention must be directed to endemic tropical infections, such as leishmaniasis, Chagas disease, malaria, arbovirosis, yellow fever, leprosy, paracoccidioidomycosis, disseminated strongyloidiasis, and ectoparasitosis. These endemic diseases of developing countries can be considered as possible emerging diseases in developed regions partially because of environmental factors and migration. In the present article, we aim to review the evidence-based aspects of the most important opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients. We also aim to review the important aspects of vaccination, chemical prophylaxis, and treatment for these infections in people with medication-induced immunosuppression.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [patyshu79@gmail.com](mailto:patyshu79@gmail.com) (P. Shu Kurizky), [leopoldoluiz99@gmail.com](mailto:leopoldoluiz99@gmail.com) (L.L. dos Santos Neto), [airesrod@icloud.com](mailto:airesrod@icloud.com) (R. Barbosa Aires), [liciamhota@gmail.com](mailto:liciamhota@gmail.com) (L.M. Henrique da Mota), [cirogomes@unb.br](mailto:cirogomes@unb.br) (C. Martins Gomes).

## Introduction

Autoimmune and autoinflammatory diseases are associated with severe morbidity and decreased quality of life. Over the last several decades, an increased prevalence of autoimmune-mediated diseases has been observed, which can be explained mostly by population aging [1]. Epidemiological data indicate that this increasing incidence is continuing, although new efforts for prevention and early treatment are being developed [1].

The chronic immune-mediated inflammatory disease (CIMID) concept describes a group of heterogeneous diseases that share common inflammatory pathways. The most frequent CIMIDs are rheumatoid arthritis (RA), ankylosing spondylitis (AS), psoriasis, psoriatic arthritis (PsA), multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus (SLE), and inflammatory bowel diseases. CIMIDs affect approximately 5–8% of the world population and are associated with a high risk of infection [2,3].

Some CIMIDs require strong immunosuppressive treatment [4]. The prescription of these medications, in addition to underlying disease-related immune changes, leads to an increased susceptibility to infections [5]. Usually, immunosuppression increases the general risk of opportunistic infections, but specific drugs can increase the risk of specific infections, depending on the drug mechanism of action. On the other hand, the abrupt discontinuation of these medications can result in immune reconstitution inflammatory syndrome [6].

Different treatment options for autoimmune diseases have been developed to increase their therapeutic effect and to reduce undesirable reactions. Corticosteroids are effective for the control of diseases that were once considered fatal. Methotrexate, cyclosporine, azathioprine, and cyclophosphamide, for example, also have wide and strong immunosuppressive effects. New immunobiological drugs are intended to act on very specific targets of the human immune response.

Disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) are important for the treatment of patients with CIMIDs. Given the lack of consensus regarding the definition of immunosuppression degrees among international experts, Brazilian medical societies involved in the treatment of patients with CIMIDs assembled to discuss and vote on a definition, aiming for standardization. The immunosuppression degree of patients with CIMIDs was categorized, and Table 1 summarizes the position of this consensus [7].

The popularization of immunobiologics implies that healthcare providers living in tropical countries will also experience more frequent contact with these medications. Additionally, migration and climate change are expected to change the epidemiological behaviors of infections [8]. We must also consider that infectious processes can be triggering factors of CIMIDs [9]. Viruses are the pathogens most commonly related to SLE. More specifically, *Leishmania* and *Mycobacterium leprae* infections can stimulate classical SLE and RA [9]. This delicate interaction makes safe immunosuppression a difficult task. Special attention must be directed to endemic tropical infections, such as leishmaniasis, Chagas

**Table 1**

The degree of immunosuppression conferred by drugs used to treat patients with chronic immune-mediated inflammatory diseases: Position of the Brazilian Societies of Rheumatology and Dermatology and Study Groups on Inflammatory Bowel Diseases.

Nonimmunosuppressed
Patients who are clinically stable under the following conditions: no drug treatment; using only sulfasalazine, hydroxychloroquine, mesalazine, or acitretin; or using topical, inhaled, peri- or intra-articular corticosteroids.
Low degree of immunosuppression
Patients using: Methotrexate at a dosage of $\leq 0.4$ mg/kg/week or $\leq 20$ mg/week; leflunomide at a dosage of $\leq 20$ mg/day; or corticosteroids at a dosage of $\leq 20$ mg/day (or 2 mg/kg/day for patients weighing $< 10$ kg) prednisone or equivalent.
High degree of immunosuppression
Patients using: Corticosteroids at a dosage of $\geq 20$ mg/day (or $> 2$ mg/kg/day for patients weighing $< 10$ kg) prednisone or equivalent for a period $\geq 14$ days; pulsed therapy with methylprednisolone; immunosuppressants, such as mycophenolate mofetil or sodic, cyclosporine, cyclophosphamide, tacrolimus, or azathioprine; JAK inhibitors, such as tofacitinib; bDMARDs

bDMARDs: biological disease-modifying antirheumatic drugs and JAK inhibitors: Janus kinase inhibitors.

Please cite this article as: Shu Kurizky P et al., Opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients, Best Practice & Research Clinical Rheumatology, <https://doi.org/10.1016/j.berh.2020.101509>

disease, malaria, arbovirosis, yellow fever, leprosy, paracoccidioidomycosis, disseminated strongyloidiasis, and ectoparasitosis. These diseases are endemic in countries where immunobiologics are now widely used.

We aim to review the evidence-based aspects of the most important opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients. We also aim to review the important aspects of vaccination, prophylaxis, and treatment for these infections in people with medication-induced immunosuppression.

#### Protozoan infections

##### Leishmaniasis

Leishmaniasis is considered a public health problem in 64 countries [10]. Approximately 1–1.5 million new cases of tegumentary leishmaniasis (TL) are reported every year [11], together with approximately 0.2–0.4 million annual cases of visceral leishmaniasis (VL) [12].

The disease is caused by several species of flagellated protozoa of the genus *Leishmania*, which are transmitted by insects of the genus *Lutzomyia* [13]. In highly endemic areas, more than 30% of the inhabitants may have asymptomatic infections [11]. Clinical manifestations of the disease depend on the geographical distribution, *Leishmania* species, and host immune response. According to the geographical distribution, leishmaniasis can be divided into Old World leishmaniasis and New World leishmaniasis. In both regions, VL is a severe disease that can be fatal.

In immunocompetent patients, TL usually presents as a single granulomatous ulcer called a localized cutaneous form. The mucous form can be the first presentation of TL or can also be a result of untreated cutaneous leishmaniasis. Mucous leishmaniasis can occur in the New World and in the Old World, but it is most frequent in South America, where *Leishmania (Viannia) braziliensis* is endemic. The diffuse form of TL also occurs most frequently in Latin America and is caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Diffuse leishmaniasis is an anergic form of TL that manifests with verrucous cutaneous and mucous membrane lesions [13].

*Leishmania infantum* is the causal agent of VL in the Old World and in the New World. Also known as *kala-azar*, the disease course involves malaise, fever, arthralgia, weight loss, hepatosplenomegaly, and anemia. A reticuloendothelial system invasion and diffuse bone marrow infestation can result in pancytopenia. Sepsis and coagulation problems can result in fatal outcomes. VL can be rarely complicated by secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis that can result in demonstrable hemophagocytosis [14].

Diagnosis is made by parasitological exams (culture or direct examination of bone marrow aspirates or lesion fragments), by molecular biology techniques, or by immunological techniques (serology and leishmanin skin testing) [13,15]. The treatment of leishmaniasis most commonly involves brief (<30 days) therapy with parenteral drugs, such as pentavalent antimonials or amphotericin B and pentamidine. Miltefosine is the only effective oral therapy for leishmaniasis. The most important form of disease prevention is the environmental control of vectors and of animal reservoirs, especially in periurban areas. To date, no effective vaccines or chemoprophylaxis strategies are available.

Most case reports that describe leishmaniasis in people with medication-induced immunosuppression describe clinical pictures similar to typical cases. An atypical presentation of the disease and difficult-to-treat forms have also been reported (Fig. 1), particularly in patients with a high degree of immunosuppression. The disease can begin with long periods of nonspecific symptoms, including fever and arthralgia. The clinical picture associated with pancytopenia can simulate SLE [16], and several unrecognized leishmaniasis patients have been exposed to iatrogenic immunosuppression [16].

Immunosuppression is a recognized factor that influences the onset and reactivation of the disease. Although human immunodeficiency virus (HIV) infection is the most studied condition, an increasing number of case reports have been published associating leishmaniasis with immunosuppressive drugs [12]. Infliximab and methotrexate have frequently been cited in reports that associated leishmaniasis with immunosuppressive treatments. Methotrexate, even at a dose of less than 20 mg/week (producing low degree of immunosuppression), decreases the cellular immune response and inhibits neutrophil chemotaxis and T lymphocyte proliferation [17]. Antitumor necrosis factor (TNF)-alpha (TNF- $\alpha$ ) therapy induces a high degree of immunosuppression and impairs macrophage activation and



**Fig. 1.** An atypical American tegumentary leishmaniasis lesion in a patient using etanercept and methotrexate for psoriatic arthritis. The patient achieved complete remission of psoriasis lesions, leaving hyperchromic macules. Leishmaniasis manifested as an infiltrated plaque with border ulceration.

granuloma formation. In a study conducted on mice infected with *Leishmania major*, the presence of *anti*-TNF- $\alpha$  antibodies was related to a significant decrease in the leishmanicidal action of macrophages [18].

Interestingly, the majority of cases related to leishmaniasis and immunosuppression have been found in European countries bordering the Mediterranean Sea, which is an endemic region for leishmaniasis. Although leishmaniasis in Europe accounts for no more than 2% of cases worldwide, autoimmune diseases are relatively more prevalent in developed countries than in developing countries, and immunosuppressors, especially modern immunobiologics, are expensive and consequently may not be widely available in developing countries.

Treatment with ustekinumab, a monoclonal antibody against IL-12/IL-23, generates a high degree of immunosuppression and is associated with an increased risk of leishmaniasis. Its association with leishmaniasis can be explained by studies that have shown that IL-12 is essential to *Leishmania* infection control by promoting the Th1 response [19]. The impact of immunosuppression on the natural progression of leishmaniasis is uncertain, but most reports show that the immunosuppression of any degree after leishmaniasis diagnosis was immediately discontinued. Reinstating immunosuppression after curing leishmaniasis does not seem to increase the risk of reactivation. There is no specific consensus regarding the management of leishmaniasis in immunosuppressed patients, although vector control is essential. The disease is not urbanized in most endemic regions [20].

#### Chagas disease

Twenty percent of Latin Americans (109 million individuals) are at risk of Chagas disease (or trypanosomiasis americana), and studies show that approximately 7.7 million to 16 million people have the disease [21,22]. Chagas disease is endemic from the southern USA to the northern parts of Argentina and Chile, but other nonendemic countries in Europe are reporting an increasing number of cases due to immigration [23,24].

The disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* [21,22]. Transmission occurs through triatomine vectors through oral, congenital, and transfusion/transplant-associated routes [24]. The clinical manifestations of Chagas disease are divided into two phases: the acute phase and the chronic phase. The acute phase is usually oligo- or asymptomatic, and symptoms include the inflammation of inoculation site (inoculation skin chancre or chagoma), inflammation of conjunctiva (the Romana sign), fever, lymphadenopathy, and hepatosplenomegaly [24]. After the acute phase, which usually resolves spontaneously, patients develop chronic Chagas disease characterized by positive *anti*-*T. cruzi* IgG. Most patients will develop the indeterminate form, which is characterized by no clinical manifestations. The remaining patients will develop clinical manifestations, including cardiac, digestive, or mixed forms [24].

Reactivation in indeterminate chronic Chagas disease can be symptomatic or asymptomatic and is defined by the presence of parasitemia. Parasitemia can be detected by direct parasitological exams or by molecular techniques [25], although a positive blood polymerase chain reaction (PCR) test is not

always representative of reactivation (indicating instead dead parasites or transitory parasitemia). In addition, in chronic disease, the appearance of malaise, fever, anorexia, panniculitis, myocarditis, meningitis, and encephalitis represent a more severe phase of reactivation [25].

In the acute phase, the diagnosis is made using direct parasitological methods and molecular techniques. Serology has limited utility during this phase of the disease. In the chronic form, the detection of IgG antibodies against *T. cruzi* can be considered the definition of a case [26]. In this phase, molecular detection techniques have low sensitivity [24,26]. Patients with acute, congenital, or reactivated disease as well as children with chronic disease, must be treated with antitrypanosomal drugs (benznidazole or nifurtimox) [24]. Compulsory testing of blood donors and vector and ingestion control are the most effective preventive strategies. There are no recommended vaccination strategies or chemoprophylaxis for immunocompetent patients.

The effects of immunomodulatory drugs on the dynamics of *T. cruzi* are not yet known, as there is only experimental evidence [21]. Evidence of the role of TNF- $\alpha$  in the chronic phase is sparse [27]. An important question is whether treatment with immunobiological drugs affects long-term outcomes in chronic phase trypanosomiasis [27,28]. Some evidence indicates that TNF- $\alpha$  and interferon- $\delta$  are important for macrophage activation. However, other studies have established that TNF- $\alpha$  blockade with infliximab decreases the histopathological damage in infected rats [29]. A study showed that the use of infliximab, a strong immunosuppressor, leads to low C-C chemokine receptor type 5 (CCR5) modulation and improves inflammation without interfering with parasitic control in murine models [22]. On the other hand, infection in CCR5-/- mice results in increased parasitemia, mortality, and macrophage and T cell influx into cardiac tissue. Thus, it is believed that the total absence of both TNF receptor 1 (TNFR1) and CCR5 signaling has a negative effect on the cells that control parasite entry into cardiac tissue, while a partial reduction in these pathways could promote benign effects on cardiomyopathy. It appears that the TNF/TNFR1 pathway plays a crucial role in the extravasation of inflammatory cells into the cardiac tissue [22].

Most cases of Chagas reactivation among immunosuppressed patients have been reported in HIV patients and transplant patients [27]. In contrast, there is no evidence of an increased risk of clinical reactivation of Chagas disease in patients taking etanercept or adalimumab for PsA, as determined by blood PCR [21]. It seems that the degree of immunosuppression is less important than the target of immunosuppression for the risk of Chagas disease reactivation. Cows et al. [30] observed an increase in the PCR-quantifiable *T. cruzi* DNA after the third infliximab infusion, but other studies did not confirm this result. In a case report of chagasic megacolon in a patient using anti-TNF therapy, the authors considered the relationship between Chagas disease and the medication to be unlikely, as the average time to develop this chronic complication is 20–30 years [21].

Chagas disease should be considered in patients staying for more than 3 months in endemic areas, in patients whose mothers were born in an endemic area, and in patients who have received a blood transfusion in endemic areas [31]. In these abovementioned situations, clinical evaluation and serological testing should be performed before starting immunosuppression [31]. In immunosuppressed patients with symptomatic Chagas disease (acute primary infection or reactivation), trypanocidal treatment with benznidazole or nifurtimox is indicated. Treatment with trypanocidal drugs is also reasonable for asymptomatic immunosuppressed patients with detectable parasitemia [25]. The frequency and necessity of Chagas disease evaluation in already immunosuppressed patients who were not properly screened depends on epidemiological factors that are similar to those indicated for patients who have not yet begun immunosuppression therapy. In immunosuppressed patients with chronic disease and no previous trypanocidal treatment, clinical and parasitological monitoring is mandatory [24]. Some references recommend trypanocidal treatment for all patients receiving immunosuppressive drugs who have been diagnosed with chronic Chagas disease, as a prophylactic method. The benefit of preventing future reactivations must be considered.

#### Malaria

Although malaria incidence is falling, more than 200 million cases of malaria are reported per year, mostly in Africa [32]. Malaria is caused by parasites of the genus *Plasmodium*, which are transmitted by the bite of mosquito vectors [33]. After infection and a latent period, the clinical manifestations of malaria include malaise and mild fever. In the next stage, the simultaneous rupture of red blood cells

leads to the typical paroxysms constituted by fever, sweating, and cold stages [34]. Parasites multiply in erythrocytes, a process during which they alter the cell membrane, making them the target of splenic clearance and leading to hemolysis. Red blood cell rupture leads to the release of proinflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$  [35].

Benign tertian malaria is caused by *Plasmodium vivax* and is represented by a regular 48-h cycle and rare severe manifestations. *Plasmodium ovale* causes ovale malaria, which is clinically similar to but usually less severe than *P. vivax* disease. *Plasmodium malariae* causes quartan malaria and is characterized by more severe paroxysms and a longer duration (72 h) of cold and fever stages than other manifestations. *Plasmodium falciparum* causes malignant tertian malaria and is characterized by irregular paroxysms less than 48 h in duration. Severe or fatal complications of *P. falciparum* malaria can occur at any stage of the disease [34]. Problems related to the occlusion of visceral vessels are responsible for most complications. Disseminated intravascular coagulation can also occur [34].

Conventional light microscopy of blood smears is used for diagnosis. Molecular biology techniques have also been described [34]. Malaria is a life-threatening condition, and infections in which *P. falciparum* or *Plasmodium knowlesi* is confirmed or cannot be ruled out are considered medical emergencies [34]. The prompt diagnosis of malaria and treatment are imperative to avoid undesirable complications. Several drugs for the treatment of malaria can be used, and the effectiveness of these drugs depends on the stage of the disease. The most important action for malaria prevention is vector avoidance. Chemoprophylaxis with atovaquone-proguanil, doxycycline, mefloquine, primaquine, or tafenoquine is performed in patients who visit endemic areas, depending on local recommendations [34]. There is no vaccination scheme recommended in clinical practice.

Antimalarials have considerable immunomodulatory effects and no immunosuppressant effect and are largely used to control CIMIDs. Quinine synthetic forms, chloroquine and hydroxychloroquine, inhibit lymphocyte proliferation and may prevent joint damage [36]. Other DMARDs with low and high immunosuppressive action also have an inhibitory effect on *Plasmodium* proliferation. *In vitro* studies have shown that methotrexate, azathioprine, and mycophenolic acid are potentially useful for the treatment of malaria [37–39]. We can conclude that patients taking these drugs are probably not at a great risk of developing malaria, but can actually be protected from the disease. The effects of medication dosages still need to be defined [40].

TNF appears to play many roles in the pathophysiology of malaria. At lower concentrations, it has an antimalarial effect, and is thus important in defending against parasitemia. Higher concentrations lead to increased vascular release of nitric oxide, causing interference with neurotransmission and vasodilation, and increasing the risk of cerebral edema [41]. Some authors have shown that the use of murine monoclonal antibodies directed against TNF in the treatment of *Plasmodium* infections with the involvement of central nervous system is beneficial [41]. However, some case reports have described intense parasitemia and disease reactivation with therapeutic doses of infliximab and adalimumab [35,42,43]. Thus, patients using anti-TNF biologicals should be cautioned to avoid malaria-endemic areas because of the high degree of immunosuppression involved. No specific regimens of chemoprophylaxis exist for patients with drug-induced immunosuppression.

### Viral infections

#### Arbovirosis (dengue, Zika, and Chikungunya)

The increasing incidence and widening geographic distribution of arbovirosis pose important public health challenges [44]. Dengue, Zika, and Chikungunya fever have acquired epidemic behavior. In addition, previously unrecognized clinical manifestations of these diseases are being described. This problem is well exemplified by the magnitude of congenital abnormalities generated by Zika virus infection. These diseases are considered very difficult to control because of their urban transmission chain in a tropical climate.

Dengue is a febrile infection caused by viruses of the family *Flaviviridae* and is transmitted through the bite of the *Aedes aegypti* mosquito. There are 4 types of dengue, as the disease-causing virus has 4 serotypes: DEN-1, DEN-2, DEN-3, and DEN-4 [33]. Clinically, dengue can occur as an inapparent infection, classical dengue fever, hemorrhagic fever, or dengue shock syndrome [33].

Please cite this article as: Shu Kurizky P et al., Opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients, Best Practice & Research Clinical Rheumatology, <https://doi.org/10.1016/j.berh.2020.101509>

Classical dengue resembles influenza and is characterized by fever, retro-orbital pain, skin rash, vomiting, and joint pain. The onset of dengue hemorrhagic fever is similar to that of the classic form, but a sudden onset of vascular leakage, thrombocytopenia, mental confusion, and difficulty breathing may occur and progress to shock [45]. Dengue hemorrhagic fever is an immune-mediated disease. The immune response eliminates the virus, but also induces shock syndrome. Previous infection and consequently preexisting antibodies to different types of dengue virus are considered risk factors for bleeding. In a study with mice, Astrasheuska et al. observed a large contribution of TNF in triggering hemorrhagic symptoms and shock; the authors suggested that the use of *anti*-TNF therapy could be beneficial [45].

Little is known about the prognosis of dengue in patients using immunosuppressants. A case report described hemorrhagic dengue in a child who was treated with infliximab and azathioprine [46]. A study evaluating the records of 293 patients treated with immunobiologics for different autoimmune diseases in Martinique found 8 cases of classical dengue, 1 probable case, and no cases of hemorrhagic fever [47].

Zika virus has been neglected for over 60 years because of previous low incidence rates, geographic restriction, and the lack of recognition. However, since 2007, this infection has been reported in the Pacific Islands, Latin America, USA, and Southeast Asia [48]. In addition to mosquito transmission, sexual and transplacental transmissions have been reported, making the control of epidemic more complicated [48]. Recently, it has been observed that infected pregnant women can transmit the virus through the placenta, causing congenital malformations. In addition, some infected adults may develop severe neurological complications, including Guillain-Barre syndrome and meningoencephalitis. Some cases of death have also been related to the virus; most of these patients were immunosuppressed for the treatment of diseases such as SLE [49].

Chikungunya virus is epidemically found in Africa and Asia and has recently affected America. *A. aegypti* and *Aedes albopictus* are the main vectors, and the clinical picture is characterized by fever, headache, myalgia, skin rash, and symmetric polyarthritides. Some patients may experience musculoskeletal symptoms for up to 5 years [50]. In chronic arthritis related to Chikungunya, the medical authorities in endemic countries advise clinicians to ascertain the possibilities of coexisting RA or spondyloarthritis [51].

The differential diagnosis of dengue, Zika, and Chikungunya is not easy. Testing for IgM antibodies against dengue and Chikungunya viruses can be useful. Molecular detection of circulating viruses can also be done, but is rarely available for clinical decision-making in acute cases. To date, specific antiviral drugs are not available for treatment or prophylaxis [44]. A recombinant, live, attenuated, tetravalent dengue vaccine (CYD-TDV; three-dose schedule: 0, 6, and 12 months) is already commercially available [52]. There are no clinically available vaccines for Zika or Chikungunya. Patients treated at any degree of immunosuppression who live in endemic regions or patients visiting these regions, must always be advised about protective measures because vaccines with live pathogens are not recommended.

#### *Yellow fever*

Yellow fever is still prevalent in Africa, South America, and Central America, with an annual estimate of 84,000 to 170,000 severe cases. The disease can be transmitted in different ways depending on the interaction of the mosquito and human host: a sylvatic cycle (transmission in the jungle), intermediate cycle (transmission in the African savannah), and urban cycle (transmission in cities) [53].

Yellow fever is a serious disease caused by a flavivirus of the *Flaviviridae* family and is found in nonhuman primates. Transmission is maintained by bites of *Aedes* or *Hemagogus* mosquito species [33,53]. Clinical manifestations can vary in intensity, as some patients are asymptomatic, and some will present with malaise, fever, back pain, and myalgia [53]. A minority of patients (15%) develop symptoms of severe disease, including bleeding diatheses, renal failure, cardiovascular instability, liver failure, and neurological complications [53]. The diagnosis of the disease relies on the demonstration of IgM antibodies and/or molecular techniques. No specific antiviral therapies are available [53]. The most important measures for disease prevention are vector avoidance and environmental control. The yellow fever vaccine formed by live and attenuated viruses is a safe strategy for disease control and is used in populations living in or visiting endemic areas.

Although there are no concrete data on yellow fever infections in patients using immunosuppressants of any degree, there is ongoing discussion about vaccination in this population. It is agreed that vaccination with live virus (the only currently available approach) is contraindicated in patients using immunosuppressants because of the risk of severe vaccine-related disease [54]. However, Oliveira et al. evaluated 31 patients who were inadvertently revaccinated for yellow fever during the use of immunosuppressants, such as methotrexate, leflunomide, and immunobiologicals. The protective immune response to the virus at 2 years after vaccination proved to be effective [55]. This result was also observed in other studies [56,57]. Yellow fever vaccination is still considered unsafe for immunosuppressed patients until new data are available.

#### *Mycobacterial infections*

##### *Leprosy*

Leprosy is a public health problem in many countries, such as Brazil, India, Nepal, Myanmar, Madagascar, and Mozambique, and over 208,000 new cases were diagnosed in 2018 [58]. Leprosy is a chronic infectious disease caused by *M. leprae*. The clinical manifestations of the disease are strongly dependent on host-pathogen interactions [59]. Depending on the degree of cellular immune response, the disease is divided into two poles: the tuberculoid pole, which is represented by a well-formed granuloma with few bacilli, and the lepromatous pole, which is characterized by less organized lesions and a high number of bacilli [20]. There are intermediate clinical forms, also known as dimorphic or borderline leprosy, with clinical characteristics of both poles.

The diagnosis of leprosy is based on clinical evaluation. According to the World Health Organization, a case of leprosy is defined by one or more of the following: (1) hypopigmented skin lesions with the loss of sensation; (2) impairment or involvement of the peripheral nerves, as demonstrated by a) definite loss of sensation, b) weakness of the hands/feet or face, or c) autonomic function disorders, such as anhidrosis (dry skin); (3) the presence of visible deformities; and (4) signs of the disease, with a demonstrated presence of bacilli in a skin smear or histopathological confirmation, and the need for leprosy treatment, as decided by a clinician [60]. However, clinical evaluation is not always precise [61]. Complementary techniques are not useful for screening situations [59]. The treatment of leprosy involves the long-term use of antibiotics, mainly rifampicin, dapsone, and clofazimine. Leprosy reactions are managed with corticosteroids and thalidomide. Bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccination is used for the prophylaxis of household contacts in several endemic countries [61]. Additionally, different regimens of chemoprophylaxis, usually using schemes containing rifampicin have been studied, but their use as a public health measure is still under debate [62].

Few cases have been reported in patients using immunosuppressors. The manifestations of leprosy after a short period of immunobiological treatment can reflect a previous subclinical infection as the typical incubation period of *M. leprae* infection is 3–5 years [63,64]. Importantly, in most cases of leprosy in patients using immunobiologics, patients had previously used other immunosuppressants, such as methotrexate and corticosteroids. Methotrexate is known to inhibit the development of contact hypersensitivity and tuberculin hypersensitivity [65]. The drug affects the induction of granuloma formation due to lepromin exposure. This inhibition of reactivity is relatively long, persisting even after drug discontinuation [65].

Some immunosuppressed patients develop multibacillary forms. Other reports related to other autoimmune diseases, mainly RA, have demonstrated the development of paucibacillary forms [66,67] or leprosy reactions [64,67]. Leprosy reactions are characterized by malaise and exacerbation of pre-existing lesions usually accompanied by neuritis edema, occurring in 40% of borderline patients [64]. The onset of disease after discontinuation of immunobiologicals can be interpreted as a result of the rapid restoration of immunity transiently affected by immunosuppressive treatment, similar to that in patients with leprosy and HIV after receiving antiretroviral treatment (Fig. 2) [64].

There is a complex relationship between leprosy and rheumatological diseases, particularly RA. First, chronic immunosuppressive treatment can reduce host protection. The suppression of clinical manifestations can result in asymptomatic, highly transmissible, and multibacillary leprosy. Second, leprosy can mimic RA manifestations, including polyarthritis, and produce false-positive results for diagnostic antibodies (anticyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor) [68]. In endemic regions,



Fig. 2. Leprosy type I reactive state as the first manifestation of leprosy after infliximab discontinuation.

leprosy should be cautiously ruled out and periodically screened for inpatients requiring immunosuppression. Leprosy usually involves an asymmetrical mononeuritis multiplex. Third, leprosy reactions can reproduce diverse rheumatological manifestations, including vasculitis and arthralgia. Specific leprosy treatment is the most common triggering factor for leprosy reactions. Bacillus destruction exposes antigens and ultimately results in autoimmune reactions. Other factors, such as vaccination, viral coinfections, and pregnancy, can also be triggering factors for leprosy reactions. As mentioned earlier, in some immunosuppressed patients, leprosy reactions are the first clinical manifestation after the discontinuation of immunosuppressors [69].

On the other hand, new cases of leprosy reactions that are nonresponsive to corticosteroids and thalidomide have been managed with other immunosuppressors, including immunobiological drugs, particularly TNF- $\alpha$  blockers [70]. This advance is a logical association because TNF is an important cytokine involved in the pathogenesis of leprosy reactions. Although reports have suggested a beneficial effect of TNF- $\alpha$  blockers in leprosy neuropathy, we must remember that leprosy is a demyelinating disease and that these medications can induce exacerbation of demyelinating conditions [71]. While this side effect has not been observed in the treatment of leprosy reactions with TNF blockers, additional evidence is necessary for safety purposes. New drugs, such as the IL-17A inhibitor secukinumab, show no evidence of increased *Mycobacterium tuberculosis* infections and theoretically may be a safer option for patients at risk of leprosy [72]. To our knowledge, no evidence of the effectiveness and safety of these drugs in leprosy reactions has been published. There are no specific recommendations for leprosy treatment in immunosuppressed patients. Additionally, the target of the immunosuppressive treatment seems to be more relevant than the degree of the immunosuppressive treatment. The BCG vaccine, a live attenuated vaccine, is contraindicated in immunosuppressed patients.

#### Fungal infections

Pneumocystosis, zygomycosis, aspergillosis, and candidiasis are global concerns and well-described pathologies in organ transplant recipients and HIV-infected patients. Immunosuppression for CIMIDs is also related to an increased risk of fungal diseases. In the United States, the incidence and severity of histoplasmosis have been positively associated with TNF inhibitors [73]. In line with that of other tropical diseases, the risk of fungal infections in medication-induced immunosuppressed patients is rising. Targets of newly developed drugs, e.g., IL-17, regulate systemic antifungal immunity, and patients receiving those drugs are likely to be at an increased risk of developing all types of fungal diseases [74].

#### Paracoccidioidomycosis

The geographical distribution of paracoccidioidomycosis is restricted to South America, and the incidence ranges from 0.7 to 40 cases/100,000 inhabitants [75]. This disease is a systemic mycosis

caused by *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* [75]. The clinical manifestations of the disease can be divided into two forms. The chronic form represents more than 80% of cases and affects mostly the lungs. Children and young adults may acquire the acute/subacute form that manifests as fever, disseminated lymphadenopathy, and hepatosplenomegaly [75]. Immunocompromised patients can present with atypical clinical manifestations, including simultaneous involvement of the lungs and reticuloendothelial system. Verrucous and molluscum contagiosum-like lesions can also occur. In endemic areas, clinical and laboratory investigation for paracoccidioidomycosis is required before the initiation of anti-TNF therapy [75].

#### *Disseminated strongyloidiasis*

Disseminated strongyloidiasis is characterized by massive multiplication of larvae, typically in immunocompromised hosts. Fever and respiratory symptoms are the most common clinical manifestations [76]. The use of corticosteroids is the main trigger for the spread of *Strongyloides stercoralis* [77]. Treatment for disseminated strongyloidiasis can be performed by oral ivermectin at 200 µg/kg/day for 2 weeks, with cure confirmed by negative stool tests (expert opinion) [78], and interruption of immunosuppression is recommended. Control strategies to prevent transmission and complications of this serious parasitic disease should be reinforced in immunosuppressed patients, but screening tests for strongyloidiasis are recommended in endemic regions before immunosuppression begins [79]. Some guidelines recommend the institution of chemoprophylaxis before the initiation of corticosteroids in immunosuppressive doses [80].

#### *Ectoparasitosis*

The most prevalent ectoparasitoses are scabies, pediculosis, tungiasis and hookworm-related cutaneous larva migrans. Although immunosuppression can lead to an increased susceptibility to ectoparasite infestation, it can also mask symptoms, resulting in serious infestations and delayed diagnosis. The dissemination of these diseases is controlled by environmental intervention.

Scabies and pediculosis are still considered relevant health concerns [81]. Immunosuppressed patients are naturally more susceptible to ectoparasitosis and are also more susceptible to complications, such as secondary infections. Severe infestations exemplified by crusted scabies have been reported in patients using immunosuppressors and immunobiologics [82]. It is probable that medication-induced immunosuppression reduces secondary inflammation and symptoms generated by ectoparasitosis, reducing itching complaints, which can result in significant delays in the precise diagnosis of the disease.

Tungiasis is an ectoparasitosis caused by *Tunga penetrans* and is geographically distributed throughout Africa, Central America, and South America [81]. The disease has been reported in travelers returning from countries where disease is endemic. Tungiasis is caused by the penetration of the female flea in the skin and subcutaneous tissue to form papules. Sparse lesions can be treated with extraction, but disseminated cases may need topical and systemic medications. Environmental control is essential for prevention.

#### **Other tropical infections**

We have discussed relevant information related to some of the most important tropical infections occurring in immunosuppressed individuals. Many other infections, mostly related to food and water consumption such as echinococcosis and infections, such as *M. ulcerans* infections and endemic treponematoses, which occur in more restricted and poorer environments, must always also be considered.

A consensus promoted by the Italian and Spanish societies of rheumatology concluded that no laboratory preventive screening is necessary for nontuberculosis mycobacterial diseases, brucellosis, babesiosis, cysticercosis, hepatitis E virus, or HTLV-1 in asymptomatic migrants coming from endemic areas before the initiation of immunobiological drugs [31]. On the other hand, candidates for biological

treatment coming from countries with a high prevalence of multidrug-resistant tuberculosis and with a positive latent tuberculosis test should be evaluated by infectious disease specialists [31].

### Chemoprophylaxis for opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients

Immunosuppressed patients should not receive live vaccines, making chemoprophylaxis an important tool for disease prevention. Malaria, Chagas disease, leprosy, and disseminated strongyloidiasis are examples of infections for which immunosuppressed patients can benefit from chemoprophylaxis.

For malaria (Table 2), recommendations for chemoprophylaxis depend on local recommendations, and no specific regimens exist for drug-induced immunosuppression. For Chagas disease, trypanocidal treatment can be applied in patients with asymptomatic chronic Chagas disease who are also taking immunosuppressors. Chemoprophylaxis for leprosy has been studied in household contacts, but conflicting results exist [62,83]. Chemoprophylaxis for disseminated strongyloidiasis using ivermectin and albendazole is recommended for patients using high-dose corticosteroids in endemic environments, where early and sensitive detection of infection is not possible [84].

### Vaccination

Ideally, vaccination should be performed before initiating immunosuppressors (Table 2). This approach prevents severe side effects of vaccination with live attenuated pathogens and provides improved protection. Because of the severity of some rheumatological diseases, this approach is not always possible.

**Table 2**

Considerations for the most important tropical infections regarding vaccination and chemoprophylaxis in patients receiving immunosuppressive therapy.

Disease	Vaccination	Chemoprophylaxis	Other types of prevention
Leishmaniasis	Experimental	Not available	Vector avoidance and vector and animal reservoir control in periurban/urban areas
Chagas disease	Not available	Trypanocidal treatment for patients receiving immunosuppressive drugs who have been diagnosed with chronic Chagas disease	Vector and ingestion contamination control Compulsory testing for blood donors
Malaria	Controversial utility	Depends on local country recommendations: atovaquone-proguanil, doxycycline, mefloquine, primaquine or tafenoquine	Vector avoidance
Arbovirosis	Dengue: CYD-TDV - implementation questions remain unsolved. Chikungunya and Zika: experimental	Not available	Vector control
Yellow fever	Before the initiation of immunosuppressive therapy	Not available	Vector avoidance and vector control in periurban/urban areas
Leprosy	BCG - before the initiation of immunosuppressive therapy for household contacts of leprosy patients	Different regimens using rifampicin, ofloxacin, minocycline, or moxifloxacin	Early treatment of leprosy
Disseminated strongyloidiasis	Experimental	Ivermectin, albendazole	A sensitive parasitological exam is mandatory before immunosuppressive therapy initiation

Legend: CYD-TDV: recombinant, live, attenuated, tetravalent dengue vaccine with a three-dose schedule: 0, 6, and 12 months; BCG: bacille Calmette-Guerin.

Please cite this article as: Shu Kurizky P et al., Opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients, Best Practice & Research Clinical Rheumatology, <https://doi.org/10.1016/j.berh.2020.101509>

BCG is a live attenuated vaccine derived from a *Mycobacterium bovis* strain. In some countries, BCG is recommended for household contacts of leprosy patients. The vaccine is contraindicated in immunosuppressed patients, and no recommendations exist for the discontinuation of immunosuppressive medication for the purpose of vaccination.

Administration of the yellow fever vaccine has been a safe strategy for disease control for more than 80 years. The vaccine is constituted by a live and attenuated virus form and should not be administered to immunosuppressed patients. Thus, in endemic areas, vaccination before the initiation of immunosuppression is strongly recommended.

A recombinant, live, attenuated, (CYD-TDV; three-dose schedule: 0, 6, and 12 months) is already commercially available [52]. Additional dengue vaccines are already in phase 3 trials. The cost effectiveness of dengue vaccination in endemic countries is still being studied, particularly the necessity of serological screening before vaccine administration. The development of effective Zika and Chikungunya vaccines is still being pursued by the scientific community.

### Necessity of discontinuing immunosuppression for infection treatment

Considering that almost all tropical infections can have their clinical courses drastically changed by the use of potent immunosuppressors, immediate suspension of the involved immunosuppressor appears to be a logical decision. The temporary cessation of immunosuppression is certainly appropriate for leishmaniasis, malaria, yellow fever, and disseminated strongyloidiasis, which have effective cures and short treatment durations (Table 3).

**Table 3**

Possible benefits, risks, and clinical considerations regarding the discontinuation of immunosuppressive therapy after the diagnosis of the most important tropical infections.

Disease	Beneficial effects of discontinuing immunosuppression	Risks of discontinuing immunosuppression	Considerations
Leishmaniasis	Improved treatment response	Leishmaniasis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome	As the treatment of leishmaniasis is performed in relatively short periods, most studies recommend that immunosuppressors should be discontinued and reinitiated after curing leishmaniasis
Chagas disease	Improved treatment response in the acute phase	Possible increased risk of chronic complications, such as cardiac and gastrointestinal Chagas disease	<i>Anti</i> -TNF drugs appear to control cardiac inflammation without posing an increased risk of disease reactivation in chronic Chagas disease
Malaria	Uncertain	Uncertain	Several immunosuppressors show anti- <i>Plasmodium</i> effects
Arbovirosis	Improved treatment response	Possible control of dengue hemorrhagic fever	
Yellow fever	Improved treatment response	—	
Leprosy	Improved treatment response	Occurrence of reactive states	As multidrug therapy for leprosy is considered bactericidal, immunosuppression can be maintained, especially in the first months of treatment, when reactive states are most common
Disseminated strongyloidiasis	Improved treatment response	—	Gram-negative bacterial sepsis is a possible complication of disseminated strongyloidiasis, making immunosuppressive treatment discontinuation mandatory

TNF: tumor necrosis factor.

Please cite this article as: Shu Kurizky P et al., Opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients, Best Practice & Research Clinical Rheumatology, <https://doi.org/10.1016/j.berh.2020.101509>

For chronic infections, infections that need long treatment courses, those that involve immune reconstitution inflammatory syndromes, and those that present a high risk of reactivation, the risk of infectious complications needs to be weighed against the risk of autoimmune disease reactivation.

This decision can be challenging for chronic Chagas disease and leprosy. In chronic Chagas disease, some medications, particularly TNF blockers, do not seem to have any deleterious effects on the risk of disease activation and may possibly help in the control of cardiac and gastrointestinal inflammation. In leprosy cases, in which multidrug therapy is considered bactericidal, the sudden interruption of immunosuppression can lead to reactive states. Future studies specifically addressing this issue are necessary.

### Future perspectives and final considerations

Improved access to CIMIDs in developing countries makes the study of opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients an essential task. More severe clinical presentations of tropical infections make the association with immunosuppression a separate topic for clinical management and safety considerations.

Broadened screening for infections in patients under medication-induced immunosuppression, and an improved prevention strategy including vaccination and chemoprophylaxis may avoid undesirable adverse events. In addition, regional recommendations, including the use of new and safer drugs, must be developed or improved.

### Summary

Immunosuppression increases the risk of opportunistic infections. Special attention must be directed to endemic tropical infections, such as leishmaniasis, Chagas disease, malaria, arbovirolosis, yellow fever, leprosy, paracoccidioidomycosis, disseminated strongyloidiasis, and ectoparasitosis. In the present article, we aim to review evidence-based aspects of the most important opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients. We also aim to review important aspects of vaccination, chemical prophylaxis, and treatment for these infections in people with medication-induced immunosuppression.

#### Practice points. Leishmaniasis

- Immunosuppression is a recognized factor that influences the onset and reactivation of leishmaniasis, particularly in severe cases.
- In most reported cases, immunosuppression was stopped immediately after the leishmaniasis diagnosis was made.
- Reinstating immunosuppression after curing leishmaniasis appears to be safe.

#### Research agenda. Leishmaniasis

- The development of new immunosuppressors that do not increase the risk of leishmaniasis is an important goal for the treatment of patients living in endemic areas.
- New prophylactic alternatives, including vaccination, are interesting and important protective measures for severe leishmaniasis prevention in immunosuppressed individuals.
- An improved understanding of the epidemiology and immunological mechanisms of leishmaniasis in immunocompromised patients will inform safer selection of immunosuppressive drugs in endemic regions.

Please cite this article as: Shu Kurizky P et al., Opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients, *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, <https://doi.org/10.1016/j.berh.2020.101509>

## ARTICLE IN PRESS

14

P. Shu Kurizky et al. / Best Practice &amp; Research Clinical Rheumatology xxx (xxxx) xxx

**Practice points. Chagas disease**

- Clinical evaluation and serological testing should be performed before starting immunosuppression in patients living or staying for more than 3 months in endemic areas, in patients whose mothers were born in an endemic area, and in patients who have received a blood transfusion in endemic areas.
- Treatment with trypanocidal drugs is reasonable for asymptomatic immunosuppressed patients with detectable parasitemia.
- In immunosuppressed patients with chronic disease and no previous trypanocidal treatment, clinical and parasitological monitoring is mandatory.
- Some references recommend trypanocidal treatment for all patients, receiving immunosuppressive drugs, who have been diagnosed with chronic Chagas disease. The benefit of preventing future reactivations must be considered.

**Research agenda. Chagas disease**

- In regions endemic to Chagas diseases, new observational studies must evaluate whether immunosuppressors, especially TNF- $\alpha$  blockers, increase the risk of reactivation in chronic Chagas disease patients.
- New research should also evaluate whether immunomodulators can control inflammation without interfering with parasitic control, to reduce the risk of cardiac and gastrointestinal complications in chronic Chagas disease.

**Practice points. Malaria**

- After infection and a latent period, the simultaneous rupture of red blood cells leads to the typical malaria paroxysms constituted by fever, sweating, and cold stages.
- Malaria is a life-threatening condition, and infections in which *P. falciparum* or *P. knowlesi* are confirmed or cannot be ruled out are considered medical emergencies.
- It is unclear whether patients taking methotrexate, azathioprine, or mycophenolic acid are at increased risk of developing malaria.
- Patients using *anti*-TNF biologicals should be cautioned to avoid malaria-endemic areas.

**Research agenda. Malaria**

- Some evidence suggests that the use of *anti*-TNF agents in the treatment of *Plasmodium* infections with central nervous system involvement is beneficial, although this finding needs to be further studied.
- New observational studies must assess the real risk and magnitude of malaria in patients using immunosuppressants, particularly immunobiologicals.

Please cite this article as: Shu Kurizky P et al., Opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients, Best Practice & Research Clinical Rheumatology, <https://doi.org/10.1016/j.berh.2020.101509>

## ARTICLE IN PRESS

P. Shu Kurizky et al. / Best Practice & Research Clinical Rheumatology xxx (xxxx) xxx

15

**Practice points. Arbovirosis**

- The increasing disease incidence and widening geographic distribution of arbovirosis are important public health problems in the 21st century.
- Arbovirosis is considered very difficult to control the disease because of the urban transmission chain in tropical climates.
- The differential diagnosis of dengue, Zika, and Chikungunya is difficult.

**Research agenda. Arbovirosis**

- Preclinical and clinical trials are necessary to assess whether immunosuppression, including *anti*-TNF therapy, has beneficial effects in the treatment of dengue hemorrhagic fever.
- Safer immunosuppressants must be developed and applied in regions endemic to arbovirosis.

**Research agenda. Yellow fever**

- Future studies must assess the real risk of yellow fever and the clinical disease manifestations in patients using immunomodulatory drugs.
- New recommendations for prophylaxis, including vaccination, must be developed.

**Practice points. Leprosy**

- Leprosy in the immunosuppressed patient can be minimally symptomatic with multibacillary disease or can be characterized by severe leprosy reactions upon sudden immunosuppression discontinuation.
- There is a complex relationship between rheumatological diseases, particularly RA and leprosy because leprosy can mimic rheumatological disease manifestations, and leprosy reactive states can lead to the development of rheumatological manifestations, including vasculitis and arthralgia.

**Research agenda. Leprosy**

- New controlled trials must evaluate whether immunosuppression discontinuation is beneficial after leprosy diagnosis to assess the risks of treatment failure and of inducing a leprosy reactive state.
- Immunobiological drug use for the treatment of reactive states must be better studied to assess its effectiveness and side effect profile.

Please cite this article as: Shu Kurizky P et al., Opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients, Best Practice & Research Clinical Rheumatology, <https://doi.org/10.1016/j.berh.2020.101509>

**Funding statement**

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Ministério da Saúde, MS-SCTIE-Decit No. 22/2019, Brazil.

**Conflicts of interest**

LM has received personal or institutional support from Abbvie, Janssen, Pfizer, and Roche, and has delivered speeches at events related to this work and sponsored by Abbvie, Janssen, Pfizer, Roche, and UCB. Financial competing interest: None.

**Nonfinancial competing interest**

None.

**References**

- [1] Jörg S, Grohme DA, Erzler M, et al. Environmental factors in autoimmune diseases and their role in multiple sclerosis. *Cell Mol Life Sci* 2016;73:4611–22.
- [2] Bayry J, Radstake TR. Immune-mediated inflammatory diseases: progress in molecular pathogenesis and therapeutic strategies. *Expet Rev Clin Immunol* 2013;9:297–9.
- [3] Youinou P, Pers JO, Gershwin ME, Shoenfeld Y. Geo-epidemiology and autoimmunity. *J Autoimmun* 2010;34:J163–7.
- [4] Al Maini M, Adelowo F, Al Saleh J, et al. The global challenges and opportunities in the practice of rheumatology: white paper by the World Forum on Rheumatic and Musculoskeletal Diseases. *Clin Rheumatol* 2015;34:819–29.
- [5] Bühler S, Eperon G, Ribi C, et al. Vaccination recommendations for adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases. *Swiss Med Wkly* 2015;145:w14159.
- [6] Sueki H, Mizukawa Y, Aoyama Y. Immune reconstitution inflammatory syndrome in non-HIV immunosuppressed patients. *J Dermatol* 2018;45:3–9.
- [7] Pileggi GS, Henrique Da Mota LM, Kakehasi AM, et al. Brazilian recommendations on the safety and effectiveness of the yellow fever vaccination in patients with chronic immune-mediated inflammatory diseases. *Adv Rheumatol* 2019;59:1–15.
- [8] McMichael C. Climate change-related migration and infectious disease. *Virulence* 2015;6:548–53. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1021539>.
- [9] Illescas-Montes R, Corona-Castro CC, Melguizo-Rodríguez L, et al. Infectious processes and systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2019;158:153–260.
- [10] Carranza-Tamayo CO, Assis TSM de, Neri ATB, et al. Prevalence of Leishmania infection in adult HIV/AIDS patients treated in a tertiary-level care center in Brasília, Federal District, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009;103:743–8.
- [11] Gomes KWP, Benevides AN, Vieira FJF, et al. Leishmaniose tegumentar em paciente com espondilite anquilosante utilizando adalimumabe. *Rev Bras Reumatol* 2012;52:447–52.
- [12] Van Griensven J, Carrillo E, López-Vélez R, et al. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:286–99.
- [13] Gomes CM, de Moraes OO, Roselino AM, et al. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol* 2014;89:701–9.
- [14] Ranjan P, Kumar V, Ganguly S, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with visceral leishmaniasis: varied presentation. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2016;32:351–4.
- [15] Sevilha-Santos L, dos Santos Júnior ACM, Medeiros-Silva V, et al. Accuracy of qPCR for quantifying Leishmania kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect* 2018;25:242–7.
- [16] Santana IU, Dias B, Nunes EAS, et al. Visceral leishmaniasis mimicking systemic lupus erythematosus: case series and a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum* 2015;44:658–65.
- [17] Reina D, Cerdà D, Güell E, et al. Visceral leishmaniasis in a rheumatoid arthritis patient receiving methotrexate. *Reumatol Clínica* 2017;13:354–6.
- [18] de Souza RM, de Andrade Junior HF, Duarte MIS, et al. Reactivation of cutaneous and mucocutaneous tegumentary leishmaniasis in rheumatoid arthritis patients: an emerging problem? *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2017;59:e6.
- [19] Rakotonarivo L, Lons-Danic D, Janier M. Plurifocal cutaneous leishmaniasis during treatment with ustekinumab. *JAAD Case Reports* 2018;4:298–300.
- [20] Kurizky PS, Gomes CM, Cesetti MV, et al. Cross-sectional screening study for leishmania DNA and antibodies in biologic-treated psoriasis patients living in an area endemic for leishmaniasis. *Br J Dermatol* 2019;181:1337–9.
- [21] Navarrete-Dechent C, Majerson D, Torres M, et al. Use of tumor necrosis factor alpha (TNF  $\alpha$ ) antagonists in a patient with psoriasis and Chagas disease. *An Bras Dermatol* 2015;90:S171–4.
- [22] Kroll-Palhares K, Silvério JC, Da Silva AA, et al. TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8 + T lymphocytes and promotes heart tissue damage during Trypanosoma cruzi infection: beneficial effects of TNF- $\alpha$  blockade. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103:375–85.
- [23] Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Valerio L, et al. Immunosuppression and Chagas disease: experience from a non-endemic country. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:854–60.
- [24] Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet* 2018;391:82–94.

Please cite this article as: Shu Kurizky P et al., Opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients, *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, <https://doi.org/10.1016/j.berh.2020.101509>

## ARTICLE IN PRESS

P. Shu Kurizky et al. / *Best Practice & Research Clinical Rheumatology xxx (xxxx) xxx*

17

- [25] Pinazo MJ, Espinosa G, Cortes-Lletget C, et al. Immunosuppression and Chagas disease: a management challenge. *PLoS Neglected Trop Dis* 2013;7:e1965.
- [26] Dias JCP, Ramos AN, Gontijo ED, et al. 2nd Brazilian consensus on Chagas disease, 2015. *Rev Soc Bras Med Trop* 2016;49:3–60.
- [27] Pérez AR, Fontanella GH, Nocito AL, et al. Short treatment with the tumour necrosis factor- $\alpha$  blocker infliximab diminishes chronic chagasic myocarditis in rats without evidence of *Trypanosoma cruzi* reactivation. *Clin Exp Immunol* 2009;157:291–9.
- [28] Rodríguez-Angulo H, Thomas LE, Castillo E, et al. Role of TNF in sickness behavior and allodynia during the acute phase of Chagas' disease. *Exp Parasitol* 2013;134:422–9.
- [29] Rodríguez-Angulo H, García O, Castillo E, et al. Etanercept induces low QRS voltage and autonomic dysfunction in mice with experimental Chagas disease. *Arq Bras Cardiol* 2013;101:205–10.
- [30] Vacas AS, Gomez-Santana LV, Torre AC, Galimberti RL. Reactivation of Chagas-Mazza disease during treatment with infliximab. *An Bras Dermatol* 2017;92:899–900.
- [31] Bartalesi F, Scirè CA, Requena-Méndez A, et al. Recommendations for infectious disease screening in migrants to Western Europe with inflammatory arthropathies before starting biologic agents. Results from a multidisciplinary task force of four European societies (SIR, SER, SIMET, SEMTSI) facing the lar. *Clin Exp Rheumatol* 2017;35:752–65.
- [32] World Health Organization. WHO | the World malaria report 2018. 2018.
- [33] Ministério da Saúde do Brasil. Indicadores de Vigilância em Saúde descritos segundo a variável raça/cor, Brasil. *Bol Epidemiol* 2017;48:1–35.
- [34] Garcia LS. Malaria. *Clin Lab Med* 2010;30:93–129.
- [35] Geraghty EM, Ristow B, Gordon SM, Aronowitz P. Overwhelming parasitemia with *Plasmodium falciparum* infection in a patient receiving infliximab therapy for rheumatoid arthritis. *Clin Infect Dis* 2007;44:e82–4.
- [36] Ben-Zvi I, Kivity S, Langevitz P, Shoenfeld Y. Hydroxychloroquine: from malaria to autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012;42:145–53.
- [37] Dar O, Khan MS, Adagu I. The potential use of methotrexate in the treatment of falciparum malaria: in vitro assays against sensitive and multidrug-resistant falciparum strains. *Jpn J Infect Dis* 2008;61:210–1.
- [38] Bobbala D, Koka S, Geiger C, et al. Azathioprine favourably influences the course of malaria. *Malar J* 2009;8:10–2.
- [39] Veletzky L, Rehman K, Lingscheid T, et al. In vitro activity of immunosuppressive drugs against *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 2014;13:1–4.
- [40] Chilengi R, Juma R, Abdallah AM, et al. A phase I trial to evaluate the safety and pharmacokinetics of low-dose methotrexate as an anti-malarial drug in Kenyan adult healthy volunteers. *Malar J* 2011;10:1–9.
- [41] Kwiatkowski D, Molyneux ME, Stephens S, et al. Anti-TNF therapy inhibits fever in cerebral malaria. *Q J Med* 1993;86(2):91–8.
- [42] Shin SY, Seong GM, Kim YR, et al. An atypical case of *Plasmodium vivax* malaria after initiating adalimumab therapy. *J Rheum Dis* 2012;19:160.
- [43] Haeseleer C, Martiny D, Van Laethem Y, et al. Reactivation of *Plasmodium* infection during a treatment with Infliximab: a case report. *Int J Infect Dis* 2019;91:101–3.
- [44] Espinal MA, Andrus JK, Jauregui B, et al. Emerging and reemerging aedes-transmitted arbovirus infections in the region of the Americas: implications for health policy. *Am J Publ Health* 2019;109:387–92.
- [45] Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking TM, Ignatyev G. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;35:33–42.
- [46] Carvalho MA, Dias JT, Satrapa DAP, et al. Dengue hemorrhagic fever in a child with early-onset fistulizing Crohn disease under infliximab and azathioprine treatment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016;62:e7–9.
- [47] Deligny C, de Bandt M, Dehlinger V, et al. Dengue fever in patients under biologics. *J Clin Virol* 2014;61:442–3.
- [48] Chan JFW, Zhang AJ, Chan CCS, et al. Zika virus infection in dexamethasone-immunosuppressed mice demonstrating disseminated infection with multi-organ involvement including orchitis effectively treated by recombinant type I interferons. *EBioMedicine* 2016;14:112–22.
- [49] Pan American Health Organisation. Neurological Syndrome, Congenital Malformations, and Zika Virus Infection. Implications for public health in the Americas. 2015.
- [50] Mathew AJ, Ganapati A, Kabeerdoss J, et al. Chikungunya infection: a global public health menace. *Curr Allergy Asthma Rep* 2017;17:13.
- [51] Marques CDL, Duarte ALBP, Ranzolin A, et al. Recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and treatment of Chikungunya fever. Part 1 – diagnosis and special situations. *Rev Bras Reumatol* 2017;57:421–37.
- [52] Arredondo-García JL, Hadinegoro SR, Reynales H, et al. Four-year safety follow-up of the tetravalent dengue vaccine efficacy randomized controlled trials in Asia and Latin America. *Clin Microbiol Infect* 2018;24:755–63.
- [53] McGuinness I, Beckham JD, Tyler KL, Pastula DM. An overview of yellow fever virus disease. *The Neurohospitalist* 2017;7:157–8.
- [54] Croce E, Hatz C, Jonker EF, et al. Safety of live vaccinations on immunosuppressive therapy in patients with immune-mediated inflammatory diseases, solid organ transplantation or after bone-marrow transplantation - a systematic review of randomized trials, observational studies and case re. *Vaccine* 2017;35:1216–26.
- [55] Oliveira ACV, Mota LMH, Santos-Neto LL, et al. Seroconversion in patients with rheumatic diseases treated with immunomodulators or immunosuppressants, who were inadvertently revaccinated against yellow fever. *Arthritis Rheum* 2015;67:582–3.
- [56] Friedman MA, Winthrop KL. Vaccines and disease-modifying antirheumatic drugs: practical implications for the rheumatologist. *Rheum Dis Clin N Am* 2017;43:1–13.
- [57] Nash ER, Brand M, Chalkias S. Yellow fever vaccination of a primary vaccinee during adalimumab therapy. *J Trav Med* 2015;22:279–81.
- [58] World Health Organization. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique. hebdomadaire 2019;94:389–412.
- [59] Gurung P, Gomes CM, Vernal S, Leeflang MMG. Diagnostic accuracy of tests for leprosy: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2019;25:1315–27.

Please cite this article as: Shu Kurizky P et al., Opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients, *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, <https://doi.org/10.1016/j.berh.2020.101509>

## ARTICLE IN PRESS

18

*P. Shu Kurizky et al. / Best Practice & Research Clinical Rheumatology xxx (xxxx) xxx*

- [60] Global Leprosy Strategy 2016–2020. Accelerating towards a leprosy-free world. monitoring and evaluation guide. New Delhi: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia. 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [61] Limeira OM, Gomes CM, Morais OOD, et al. Active search for leprosy cases in midwestern Brazil: a serological evaluation of asymptomatic household contacts before and after prophylaxis with Bacillus Calmette-Guérin. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2013;55:173–7.
- [62] Mieras LF, Taal AT, van Brakel WH, et al. An enhanced regimen as post-exposure chemoprophylaxis for leprosy: pep+++. *BMC Infect Dis* 2018;18:506.
- [63] Vilela Lopes R, Barros Ohashi C, Helena Cavaleiro L, et al. Development of leprosy in a patient with ankylosing spondylitis during the infliximab treatment: reactivation of a latent infection? *Clin Rheumatol* 2009;28:615–7.
- [64] Scollard DM, Joyce MP, Gillis TP. Development of leprosy and type 1 leprosy reactions after treatment with infliximab: a report of 2 cases. *Clin Infect Dis* 2006;43:e20.
- [65] Goihman-Yahr M, Raffel S, Ferraresi RW. Effects of methotrexate upon the experimental Mitsuda Reaction\*\*From the departments of medical microbiology and Dermatology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305. *J Invest Dermatol* 1969;53:217–22.
- [66] Luch P, Urruticoechea A, Lluich J, et al. Development of leprosy in a patient with rheumatoid arthritis during treatment with etanercept: a case report. *Semin Arthritis Rheum* 2012;42:127–30.
- [67] Oberstein EM, Kromo O, Tozman EC. Type I reaction of Hansen's disease with exposure to adalimumab: a case report. *Arthritis Care Res* 2008;59:1040–3.
- [68] de Andrade TCPC, Vieira BC, Soares CT, et al. Lepromatous leprosy simulating rheumatoid arthritis – report of a neglected disease. *An Bras Dermatol* 2017;92:389–91.
- [69] Camacho ID, Valencia I, Rivas MP, Burdick AE. Type 1 leprosy reaction manifesting after discontinuation of adalimumab therapy. *Arch Dermatol* 2009;145:349–51.
- [70] Mitra D. A randomized controlled trial of anti-TNF  $\alpha$  bio-similar adalimumab vs. Prednisolone in the management of leprosy patients with new type 1 lepra reaction. *Open Forum Infect Dis* 2017;4:S675.
- [71] Andreadou E, Kemanetzoglou E, Brokalaki C, et al. Demyelinating disease following anti-TNF $\alpha$  treatment: a causal or coincidental association? Report of four cases and review of the literature. *Case Rep Neurol Med* 2013;2013:671935.
- [72] Kammüller M, Tsai TF, Griffiths CEM, et al. Inhibition of IL-17A by secukinumab shows no evidence of increased Mycobacterium tuberculosis infections. *Clin Transl Immunol* 2017;6:e152.
- [73] Vergidis P, Avery RK, Wheat LJ, et al. Histoplasmosis complicating tumor necrosis factor- $\alpha$  blocker therapy: a retrospective analysis of 98 cases. *Clin Infect Dis* 2015;61:409–17.
- [74] Bär E, Whitney PG, Moor K, et al. IL-17 regulates systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK Cells. *Immunity* 2014;40:117–27.
- [75] de Almeida JN, Peçanha PM, Colombo AL. Paracoccidioidomycosis in immunocompromised patients: a literature review. *J Fungi* 2019;5:1–11.
- [76] Geri G, Rabbat A, Mayaux J, et al. Strongyloides stercoralis hyperinfection syndrome: a case series and a review of the literature. *Infection* 2015;43:691–8.
- [77] Buonfrate D, Requena-Mendez A, Angheben A, et al. Severe strongyloidiasis: a systematic review of case reports. *BMC Infect Dis* 2013;13:1–10.
- [78] Krolewiecki A, Nutman TB. Strongyloidiasis: a neglected tropical disease. *Infect Dis Clin* 2019;33:135–51.
- [79] Albonico M, Becker SL, Odermatt P, et al. StrongNet: an international network to improve diagnostics and access to treatment for strongyloidiasis control. *PLoS Neglected Trop Dis* 2016;10:e0004898.
- [80] da Saúde Ministério. Diretrizes para a vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional. 2016.
- [81] Diaz JH. The epidemiology, diagnosis, management, and prevention of ectoparasitic diseases in travelers. *J Trav Med* 2006;13:100–11.
- [82] Pipitone MA, Adams B, Sheth A, Graham TB. Crusted scabies in a patient being treated with infliximab for juvenile rheumatoid arthritis [14]. *J Am Acad Dermatol* 2005;52:719–20.
- [83] Lockwood DNJ, Krishnamurthy P, Kumar B, Penna G. Single-dose rifampicin chemoprophylaxis protects those who need it least and is not a cost-effective intervention. *PLoS Neglected Trop Dis* 2018;12:e0006403.
- [84] de Souza JN, Inês EDJ, Santiago M, et al. Strongyloides stercoralis infection in patients with systemic lupus erythematosus: diagnosis and prevention of severe strongyloidiasis. *Int J Rheum Dis* 2016;19:700–5.

Please cite this article as: Shu Kurizky P et al., Opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients, *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, <https://doi.org/10.1016/j.berh.2020.101509>

APÊNDICE C – RELATO DE CASO - Qualis Capes B1 – FI 1,498



## Case Report

# The challenge of concomitant infections in the coronavirus disease 2019 pandemic era: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection in a patient with chronic Chagas disease and dimorphic leprosy

*Patricia Shu Kurizky*<sup>[1],[2],[3]</sup>, *Selma Regina Penha Silva Cerqueira*<sup>[2]</sup>,  
*Débora Vilela Cunha*<sup>[1]</sup>, *Cleandro Pires de Albuquerque*<sup>[4]</sup>, *Rodrigo Barbosa Aires*<sup>[2]</sup>,  
*Lícia Maria Henrique da Mota*<sup>[2],[4]</sup> and *Ciro Martins Gomes*<sup>[1],[2],[3],[5]</sup>

[1]. Hospital Universitário de Brasília, Serviço de Dermatologia, Brasília, DF, Brasil.

[2]. Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Pós-graduação em Ciências Médicas, Brasília, DF, Brasil.

[3]. Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Laboratório de Dermatômico, Brasília, DF, Brasil.

[4]. Hospital Universitário de Brasília (HUB), Serviço de Reumatologia, Brasília, DF, Brasil.

[5]. Universidade de Brasília, Núcleo de Medicina Tropical, Brasília, DF, Brasil.

### Abstract

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) was first officially described in Brazil on February 26<sup>th</sup>, 2020. The accumulation of reports of concomitant infections with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and pathogens that cause diseases endemic to tropical countries, such as dengue and chikungunya fever, has started to draw attention. Chagas disease and leprosy remain public health problems in many developing countries, such as Brazil. In this manuscript, we describe a case of concomitant leprosy, Chagas disease, and COVID-19, highlighting the cutaneous manifestations of SARS-CoV-2 infection and the clinical behavior of household contacts who previously received prophylactic Bacillus Calmette-Guérin vaccines.

**Keywords:** Coinfections. COVID-19. Leprosy. Chagas disease.

### INTRODUCTION

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) was first officially described in São Paulo, Brazil on February 26<sup>th</sup>, 2020, and since then, the country has experienced a concerning increase in the incidence of COVID-19. As of June 10<sup>th</sup>, 2020, 772,416 positive cases had been identified, with 39,680 deaths<sup>1</sup>. The growing number of reports of concomitant infections with SARS-CoV-2 and pathogens that cause diseases endemic to tropical countries, such as dengue and chikungunya fever, has drawn attention<sup>2</sup>. Chagas disease and leprosy continue to remain public health problems in many developing countries, including Brazil<sup>3</sup>. In this manuscript, we describe a case of concomitant leprosy, chronic Chagas disease, and

COVID-19, highlighting the cutaneous manifestations of SARS-CoV-2 infection and the clinical behavior of household contacts who had previously received prophylactic Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccines. Patient inclusion was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of Universidade de Brasília after informed consent was obtained (95411718.2.0000.0030).

### CASE REPORT

The patient, a 43-year-old female resident of Paranoá, in the Federal District of midwestern Brazil, was diagnosed with dimorphic leprosy in 2010 via positive smear microscopy and the presence of asymmetric multiple mononeuritis. She started treatment with multibacillary multidrug therapy (MDT-MB) in August 2010. However, she experienced multiple interruptions in treatment due to adverse reactions, until the therapy was finally terminated in April 2020 after the administration of dapsone caused hemolytic anemia. She was also diagnosed with Chagas disease in 2013 via serology (chemiluminescence), and because she had cardiac involvement and arrhythmia, she required a pacemaker

**Corresponding author:** Patricia Shu Kurizky.

**e-mail:** patyshu79@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-5759-2727>

**Received** 22 July 2020

**Accepted** 7 October 2020

as well as treatment with propranolol (80 mg/day) and Marevan (5 mg/day). The patient was scheduled to start a monthly treatment regimen with rifampicin, ofloxacin, and minocycline. However, she returned in May 2020 with complaints of fatigue, odynophagia, anosmia, ageusia, and headache for the prior 3 days. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for SARS-CoV-2 was performed from a nasopharyngeal swab sample, and the result was positive. Her condition progressed, and she developed diarrhea and rectal bleeding in addition to cheilitis and painful, ulcerated lesions on her genital (Figure 1) and oral mucosae; however, the patient did not experience worsening of her leprosy symptoms, nor did she develop reactional states. No fever or respiratory symptoms were observed. The patient lived with her husband, who was also using MDT-MB treatment for leprosy, and her daughter, who had received BCG vaccine chemoprophylaxis in January 2020. Although her husband and daughter were classified as close household contacts, neither presented with symptoms, nor did they test positive for SARS-CoV-2 using RT-PCR or anti-SARS-CoV-2 antibodies using serology.



FIGURE 1: Ulcerated vulvar lesion.

## DISCUSSION

Leprosy is a chronic, infectious, granulomatous disease that affects the skin and peripheral nerves and is caused by *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepromatosis*. The majority (90%) of current leprosy cases are found in Brazil, India, Nepal, Myanmar, Madagascar, and Mozambique, and 80% of the

cases that occur in the Americas are concentrated in Brazil<sup>4</sup>. There are no current data regarding cases of concomitant COVID-19 and leprosy. However, information about the possible effects of these concomitant diseases and the effects of the drugs used for the treatment of either COVID-19 or leprosy may be important. Another important focus is the possible increase of the frequency and intensity of the reactional state, as would be expected in cases in which leprosy patients contract other viral infections<sup>5</sup>. Leprosy reactions are characterized by malaise and the exacerbation of preexisting lesions, with subsequent erythema and pain that are usually accompanied by neuritis and severe edema of the extremities, occurring in 40% of borderline lepromatous patients<sup>5</sup>.

In the present case, the patient was in the chronic phase of Chagas disease, characterized by congestive cardiac failure, arrhythmia (not controlled by drugs), and right bundle branch block, which were treated with a pacemaker, propranolol, and an anticoagulant<sup>6</sup>.

Recent data from the COVID-19 pandemic have shown that the virus can affect the cardiovascular system. The damage due to COVID-19 is probably multifactorial, and can result from an imbalance between high metabolic demand and low cardiac reserve, systemic inflammation, and/or thrombogenesis. Direct cardiac damage from the virus also occurs, primarily in patients with cardiovascular risk factors or preexisting cardiovascular diseases<sup>7</sup>.

Although the patient was classified as having borderline leprosy and Chagas cardiomyopathy, she did not experience a recrudescence of leprosy symptoms, worsening of previous cardiovascular manifestations, or a severe case of COVID-19. Although the vast majority of patients with COVID-19 have a good clinical outcome, we hypothesize that leprosy treatment, due to its immunomodulatory properties, could also have protected this patient. Moreover, exposure to *M. leprae* itself, due to its immunogenic similarities to *M. bovis*, could conceivably confer protection against the severe manifestations of COVID-19, given that the BCG vaccine has already been postulated to possess such properties<sup>8</sup>. These hypotheses are worth testing directly in future studies.

The present patient also developed mucosal manifestations, likely related to SARS-CoV-2 infection, as reported elsewhere. Initial studies from China reported low frequencies of cutaneous manifestations in COVID-19 patients (0.2%), but reports are increasing, including acro-ischemia, chilblain-like eruptions, petechiae or purpuric rash, chickenpox-like rash, urticaria, erythema multiforme, maculopapular rash, mottling, and pityriasis rosea-like rash<sup>8</sup>. Ulcerative mucosal lesions, similar to those seen in our patient, were also described by Carreras-Presas et al<sup>9</sup>. These mucosal ulcers are common primary lesions observed in other viral infections, such as herpes and hand, foot, and mouth disease. It is worth noting that our patient had no fever or cough but initially presented with mucosal manifestations.

It is important to highlight the hypothesis raised by the scientific community that the BCG vaccine may mitigate the effects of COVID-19, as it could explain why the patient's daughter did not contract COVID-19 despite being in close contact with her. Recent studies have demonstrated an inversely proportional relationship between the number of COVID-19 cases in countries with widespread BCG vaccine use and the relatively high numbers

of COVID-19 cases in countries that have suspended the universal administration of the BCG vaccine, such as Italy, Spain, and the United States<sup>10</sup>. Interestingly, in Brazil, the BCG vaccine, in addition to being standard for newborns, is also used as prophylaxis for leprosy in household contacts. It is possible that a specific sub-analysis of this particular coinfection could add further information about the natural history of COVID-19 and leprosy.

#### AUTHORS' CONTRIBUTION

PSK: data collection, data analysis and interpretation, drafted and critical revision of the article, approved final version of the article; SRPSC: data collection, drafted and critical revision of the article, approved final version of the article; DC: data collection, approved final version of the article; RMA: data analysis and interpretation, drafted and critical revision of the article, approved final version of the article; CPA: data collection, approved final version of the article; LMHM: data collection, data analysis and interpretation, drafted and critical revision of the article, approved final version of the article; CMG: data collection, data analysis and interpretation, drafted and critical revision of the article, approved final version of the article.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### REFERENCES

1. Ministério da Saúde do Brasil. COVID19 - Painel Coronavirus 2020 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2020 [updated 04/16/2020; cited 06/16/2020]. Available from: <https://covid.saude.gov.br>.
2. Ribeiro VST, Telles JP, Tuon FF. Arboviral diseases and COVID-19 in Brazil: Concerns regarding climatic, sanitation and endemic scenario. 2020. *Journal of Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/jmv.26079>.
3. Ministério da Saúde do Brasil. Boletim epidemiológico de Hanseníase 2020 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2020 [updated 04/16/2020; cited 2020 06/11/2020]. Available from: <https://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2020/boletim-epidemiologico-de-hansenia-se-2020>.
4. Kurizky PS, Santos-Neto LL, Aires RB, Mota LMH, Gomes CM. Opportunistic tropical infections in immunosuppressed patients. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2020;101509. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2020.101509>. Online ahead to print.
5. Araújo MG. Hanseníase no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(3):373-82.
6. Perez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet*. 2018;391(10115):82-94.
7. Guo T, Fan Y, Chen M, Wu X, Zhang L, He T, et al. Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol*. 2020; 27(5):1-8.
8. Gisondi P, Piaserico S, Conti A, Naldi L. Dermatologists and SARS-CoV-2: The impact of the pandemic on daily practice. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020;34(6):1196-1201.
9. Carreras-Presas CM, Sánchez JA, López-Sánchez AF, Jané-Salas E, Pérez MLS. Oral vesiculobullous lesions associated with SARS-CoV-2 infection. *Oral Dis*. 2020. <https://doi.org/10.1111/odi.13382> Online ahead of print.
10. Ozdemir C, Kucuksezzer UC, Tamay ZU. Is BCG vaccination affecting the spread and severity of COVID-19? *Allergy*. 2020;75(7):1824-27.



APÊNDICE D – PROTOCOLO TARGET - Qualis Capes B2 – FI 1,25

## Protocol

## Molecular and Cellular Biomarkers of COVID-19 Prognosis: Protocol for the Prospective Cohort TARGET Study

Patricia Kurizky<sup>1,2\*</sup>, MD, PhD; Otávio T Nóbrega<sup>1\*</sup>, PhD; Alexandre Anderson De Sousa Munhoz Soares<sup>1\*</sup>, MD, PhD; Rodrigo Barbosa Aires<sup>1\*</sup>, MD; Cleandro Pires De Albuquerque<sup>1,2\*</sup>, MSc, MD; André Moraes Nicola<sup>1\*</sup>, MD, PhD; Patricia Albuquerque<sup>3\*</sup>, PhD; Andréa Teixeira-Carvalho<sup>4\*</sup>, PhD; Luciana Ansaneli Naves<sup>1,2\*</sup>, MD, PhD; Wagner Fontes<sup>5\*</sup>, MD, PhD; Isabelle Souza Luz<sup>5</sup>, BS; Liza Felicioni<sup>6\*</sup>, PhD; Ana Paula Monteiro Gomides<sup>7\*</sup>, MD, PhD; Dayde Lane Mendonça-Silva<sup>2,8\*</sup>, PhD; Laila Salmen Espindola<sup>1,8\*</sup>, PhD; Olindo Assis Martins-Filho<sup>4\*</sup>, PhD; Sheila Maria Barbosa de Lima<sup>9\*</sup>, PhD; Licia Maria Henrique Mota<sup>1,2\*</sup>, MD, PhD; Ciro Martins Gomes<sup>1,2\*</sup>, MD, PhD

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina, University of Brasília, Brasília, Brazil

<sup>2</sup>Hospital Universitário de Brasília, University of Brasília, Brasília, Brazil

<sup>3</sup>Faculdade de Ceilândia, University of Brasília, Brasília, Brazil

<sup>4</sup>Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-Minas, Belo Horizonte, Brazil

<sup>5</sup>Instituto de Ciências Biológicas, University of Brasília, Brasília, Brazil

<sup>6</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>7</sup>Centro Universitário de Brasília, Brasília, Brazil

<sup>8</sup>Faculdade de Ciências da Saúde, University of Brasília, Brasília, Brazil

<sup>9</sup>Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

\*these authors contributed equally

### Corresponding Author:

Patricia Kurizky, MD, PhD

Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina

University of Brasília

Laboratório de Dermatocologia - Faculdade de Medicina da UnB

Campus Universitário Darcy Ribeiro

Brasília, 70910-900

Brazil

Phone: 55 61 98114 8432

Email: [patyshu79@gmail.com](mailto:patyshu79@gmail.com)

### Abstract

**Background:** Since the beginning of the COVID-19 pandemic, the world's attention has been focused on better understanding the relation between the human host and the SARS-CoV-2 virus, as its action has led to hundreds of thousands of deaths.

**Objective:** In this context, we decided to study certain consequences of the abundant cytokine release over the innate and adaptive immune systems, inflammation, and hemostasis, comparing mild and severe forms of COVID-19.

**Methods:** To accomplish these aims, we will analyze demographic characteristics, biochemical tests, immune biomarkers, leukocyte phenotyping, immunoglobulin profile, hormonal release (cortisol and prolactin), gene expression, thromboelastometry, neutralizing antibodies, metabolic profile, and neutrophil function (reactive oxygen species production, neutrophil extracellular trap production, phagocytosis, migration, gene expression, and proteomics). A total of 200 reverse transcription polymerase chain reaction-confirmed patients will be enrolled and divided into two groups: mild/moderate or severe/critical forms of COVID-19. Blood samples will be collected at different times: at inclusion and after 9 and 18 days, with an additional 3-day sample for severe patients. We believe that this information will provide more knowledge for future studies that will provide more robust and useful clinical information that may allow for better decisions at the front lines of health care.

**Results:** The recruitment began in June 2020 and is still in progress. It is expected to continue until February 2021. Data analysis is scheduled to start after all data have been collected. The coagulation study branch is complete and is already in the analysis phase.

**Conclusions:** This study is original in terms of the different parameters analyzed in the same sample of patients with COVID-19. The project, which is currently in the data collection phase, was approved by the Brazilian Committee of Ethics in Human Research (CAAE 30846920.7.0000.0008).

**Trial Registration:** Brazilian Registry of Clinical Trials RBR-62zdkk; <https://ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-62zdkk>

**International Registered Report Identifier (IRRID):** DERR1-10.2196/24211

(*JMIR Res Protoc* 2021;10(3):e24211) doi: [10.2196/24211](https://doi.org/10.2196/24211)

## KEYWORDS

COVID-19; TARGET; cytokine profile; neutrophil function; thromboelastometry; neutralizing antibodies; metabolomics; proteomics; biomarker; prognosis; design; cohort; virus; immunology; immune system; genetics

## Introduction

COVID-19 emerged in the city of Wuhan, Hubei, China and spread worldwide over the next several months [1]. Originally reported by the World Health Organization (WHO) as a pneumonia outbreak of undetermined origin, COVID-19 had its epidemiological status revised by the WHO as a Public Health Emergency of International Concern by the end of January 2020 and as a pandemic at the beginning of March 2020 [2]. The etiologic agent was identified as a new coronavirus of the *Betacoronavirus* genus, named SARS-CoV-2, due to its structural similarity to severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-CoV), which also accounted for an outbreak in China in 2002-2003 [3]. The disease is characterized by fever, cough, and dyspnea, and can progress to pulmonary failure and lead to liver, heart, and kidney damage. Clinical management of severe cases requires respiratory assistance [4].

Angiotensin converting enzyme-2 (ACE2) mediates SARS-CoV-2 (and other coronaviruses) entry via clathrin-mediated endocytosis into type-2 pneumocytes and macrophages of the lung milieu [5,6]. ACE2 is a membrane-bound enzyme that converts active angiotensin II to inactive angiotensin (1-7). Thus, ACE2 blocks the unfavorable effects of angiotensin II action, including classic vasoconstriction in addition to inflammation and thrombosis. SARS-CoV-2 binding markedly impairs ACE2 catalytic activity by competitive inhibition, with increased *in situ* pulmonary inflammation and coagulation as detrimental outcomes of weakened counter regulation of the angiotensin II/AT1 receptor axis [7].

Hence, COVID-19 resembles a hyperimmune syndrome defined by potentially lethal hypercytokinemia due to overproduction of a set of proinflammatory mediators, including interleukins (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL7), granulocyte colony stimulating factor, interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), which culminates in multi-organ failure [8,9]. In addition, the Th17-type response plays an important role in severe cases due to an additional proinflammatory overflow resulting from supraphysiological IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  levels that contribute to edema formation [10]. The role of cortisol and prolactin in the modulation of the immune system has long been described [11,12], but their participation (if any) in the COVID-19-related “cytokine storm” remains unknown. Moreover, given the intimate interplay of inflammation with blood clotting, severe

patients usually show a hypercoagulable profile that leads to an increased frequency of pulmonary thromboembolism, deep vein thrombosis, and even heart and brain ischemia events [13,14].

In this context, it is also no surprise that the first treatment that reduced COVID-19 mortality, in a large randomized controlled trial (RECOVERY [Randomised Evaluation of COVID-19 Therapy]) [12,15], was dexamethasone, a corticosteroid [12]. However, it also showed that the effect seems to depend on the clinical stage of the disease, highlighting the need for further investigations into the course of the inflammatory response. Other anti-inflammatory treatments such as tocilizumab, an IL-6 receptor-blocking humanized antibody used to treat rheumatoid arthritis, were used (out of compassion) in patients with severe COVID-19 in China and Italy [16-18], with some clinical improvement. Similarly, another drug under evaluation is baricitinib, a JAK2 inhibitor approved for myeloproliferative neoplasms and rheumatoid arthritis that reduces Th17-type cytokine secretion by blocking AP2-associated protein kinase 1 [19]. However, the clinical efficacy of baricitinib against COVID-19 has yet to be proven. These studies support the assumption that a cytokine “storm” not only plays a role in COVID-19 pathophysiology but also has predictive prognostic value to monitor the evolution of mild and severe cases.

New metabolomics protocols can characterize metabolic pathways and provide a broad view of the impact of SARS-CoV-2 on the body. Both metabolome and proteome composition are dynamic and reflect genome expression under specific conditions [20-22]. Furthermore, these innovative combination protocols can help in understanding the metabolic profile of a given patient or group of patients [23] from urine, saliva, and blood samples [24]. The chemical profile substantially contributed to biological and medical research, leading to advancements in clinical medical practice [23].

This paper describes the design and rationale of a multicenter prospective cohort study aimed at evaluating the molecular and cellular immune signature of COVID-19 by assessing serum inflammatory mediators and regulatory chemokines of Brazilian patients with different clinical forms of the disease.

## Methods

### Study Design and Population

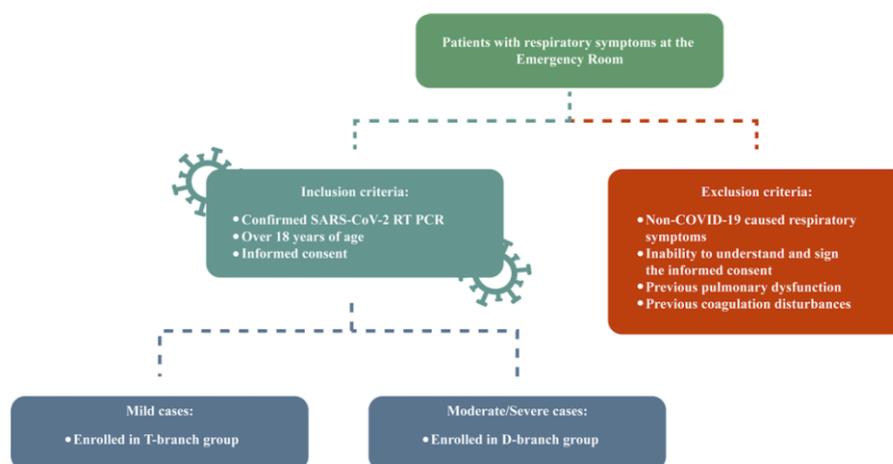
TARGET is registered in the Brazilian Clinical Trials database with registry code RBR-62zdkk and constitutes a multicenter, prospective cohort study of consecutive COVID-19 cases,

consisting of participants recruited from secondary and tertiary health care facilities in Brazil, namely, the University Hospital of Brasília (University of Brasília [UnB]) and the public regional hospitals of Asa Norte, Gama, Santa Maria, and Taguatinga (Brasília, Distrito Federal). Clinical procedures will be conducted according to a standard protocol approved by local institutional review boards under accession number CAAE 30846920.7.0000.0008, with participants included after voluntary signing of an informed consent form. The study protocol follows the recommendations of the STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) statement for observational studies [16].

### Recruitment

Inclusion criteria will include the following: laboratory confirmation of COVID-19 by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR; KIT Molecular SARS-CoV2 [E/RP]; Bio-Manguinhos), a signed informed consent form, and older than 18 years. The exclusion criteria are as follows: patients with inconclusive, unavailable, or solely serological laboratory diagnosis of COVID-19; a dementia condition (Alzheimer, Parkinson, vascular frontotemporal, Lewy body, or others); schizophrenia or schizoaffective disorders with psychotic characteristics; and patients with previously known congenital hemorrhagic diseases or thrombophilia or use of anticoagulants (for coagulation tests; Figure 1).

**Figure 1.** Inclusion and exclusion criteria flowchart. The T-branch group is patients referred to the emergency room with mild or moderate forms of COVID-19 not requiring hospitalization. The D-branch group is patients referred to the emergency room with severe or critical forms of COVID-19 requiring hospitalization.



### Clinical Assessment Protocol

The clinical evaluation aims to identify the signs and symptoms associated with COVID-19 and monitor the status (mild/moderate or severe/critical) of the disease. Clinical assessments include identification of comorbidities, COVID-19-associated symptoms and treatment, use of medications in general, clinical chemistry findings, and life support regimen care. Severe cases are defined for the purposes

of the study by dyspnea (respiratory rate >30 breaths per minute) coupled with any of the following criteria: pulsed wave oxygen saturation <93% at rest,  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$  mmHg, respiratory failure requiring mechanical ventilation, multiple organ failure, shock, or admission to the intensive care unit. Patients who do not meet the criteria for severe/critical forms will be considered mild/moderate cases. No asymptomatic patients will be included (Textbox 1 and Table 1).

**Textbox 1.** Components being assessed for characterization of the following domains: symptoms, comorbidities, treatments, biochemical profile, immune biomarkers, and leukocyte phenotype and functionality in the TARGET protocol.

<p><b>Symptoms</b></p> <p>Fever, chills, sneezing, sore throat, headache, cough, coryza, anosmia, dysgeusia, diarrhea, asthenia, nausea, vomit, dizziness, and others</p> <p><b>Comorbidities</b></p> <p>Pulmonary chronic disease, chronic cardiopathy, hypertension, diabetes, chronic kidney disease, pregnancy, neoplasms, smoking, alcohol ingestion, psoriasis, immunodepression, HIV, Dengue, hanseniasis, Zika virus, chikungunya, Chagas disease, yellow fever, leishmaniasis, malaria, H1N1, and others</p> <p><b>Previous medications</b></p> <p>Angiotensin converting enzyme inhibitors, angiotensin II receptor antagonists, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and others</p> <p><b>Treatments aimed at COVID-19</b></p> <p>Clinical support, dexamethasone, enoxaparin, chloroquine, antibiotics, ivermectin, nitazoxanide, lopinavir, ritonavir, remdesivir, immunoglobulin, plasmapheresis, anti-IL6, JAK inhibitor, and others</p> <p><b>Biochemical tests</b></p> <p>Leukocyte, lymphocyte and platelet counts, ferritin, lactate dehydrogenase, troponin, creatine kinase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and creatinine</p> <p><b>Hormone evaluation</b></p> <p>Prolactin and cortisol</p> <p><b>Thorax computed tomography</b></p> <p>Ground-glass opacity (&lt;25%, 25-50%, &gt;50%)</p> <p>Consolidation</p> <p><b>Serum immune biomarkers</b></p> <p>Chemokines: CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, and CXCL10; inflammatory cytokines: IL-1<math>\beta</math>, IL-6, TNF-<math>\alpha</math>, IL-12p70, IFN-<math>\gamma</math>, IL-17A, and IL-15; regulatory cytokines: IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, and IL-13; and cell growth factors: IL-2, IL-7, FGF-basic, PDGF, VEGF, G-CSF, and GM-CSF</p> <p><b>Gene expression assays</b></p> <p>IFN-<math>\gamma</math>, IL-12, IL-17a, TNF-<math>\alpha</math>, IL-6, IL-4, IL-5, IL-10, IL-1b, RANTES, MCP-1, MIP, MIG, IP-10, and IL-8</p> <p><b>Leukocyte phenotyping</b></p> <p>CD3, CD4, CD8, HLA-DR, CD25, CD19, CD5, CD27, CD38, PD-1, CD28, CD14, CD16, and CD56</p> <p><b>Leukocyte functionality</b></p> <p>IL-1<math>\beta</math>, IL-6, TNF-<math>\alpha</math>, IFN-<math>\alpha</math>, IL-5-PE, and IL-10</p> <p><b>Metabolomic analysis</b></p> <p>Metabolic profile/pathways</p> <p><b>Neutrophils</b></p> <p>Isolation, reactive oxygen species production, phagocytosis, neuroendocrine tumors production, migration assay, neutrophil proteomics</p>
---

**Table 1.** The TARGET protocol will collect information about a series of characteristics and tests along the clinical evolution of patients with COVID-19. At each time point, the following data will be assessed.

Data registered	Day 0	Day 3	Day 9	Day 18
Age, gender, weight, and height	3 <sup>a</sup>	— <sup>b</sup>	—	—
Symptoms	3	3	3	3
Contact with SARS-CoV-2 patient	3	—	—	—
Reverse transcription polymerase chain reaction	3	—	—	—
Time of symptoms	3	—	—	—
Comorbidities	3	—	—	—
Medications in use	3	3	3	3
SpO <sub>2</sub>	3	3	3	3
Thorax computed tomography	3	3	3	3
Biochemical tests	3	3	3	3
Supplementary oxygen	3	3	3	3
Mechanical ventilation	3	3	3	3
Death	3	3	3	3
COVID-19 treatment	3	3	3	3
Immune biomarkers	3	3	3	—
Leukocyte phenotyping	3	3	3	—
Cortisol/prolactin levels	3	3	3	3
Immunoglobulin profile	—	3	—	—
D-dimer	—	—	3	—
Thromboelastometry	—	—	3	—
Neutralizing antibodies	—	—	—	3
Metabolomic analysis	3	3	3	3
Gene expression	—	3	3	—
Neutrophils	—	—	3	—

<sup>a</sup>Indicates data was registered at this time point.

<sup>b</sup>Indicates data was not registered at this time point.

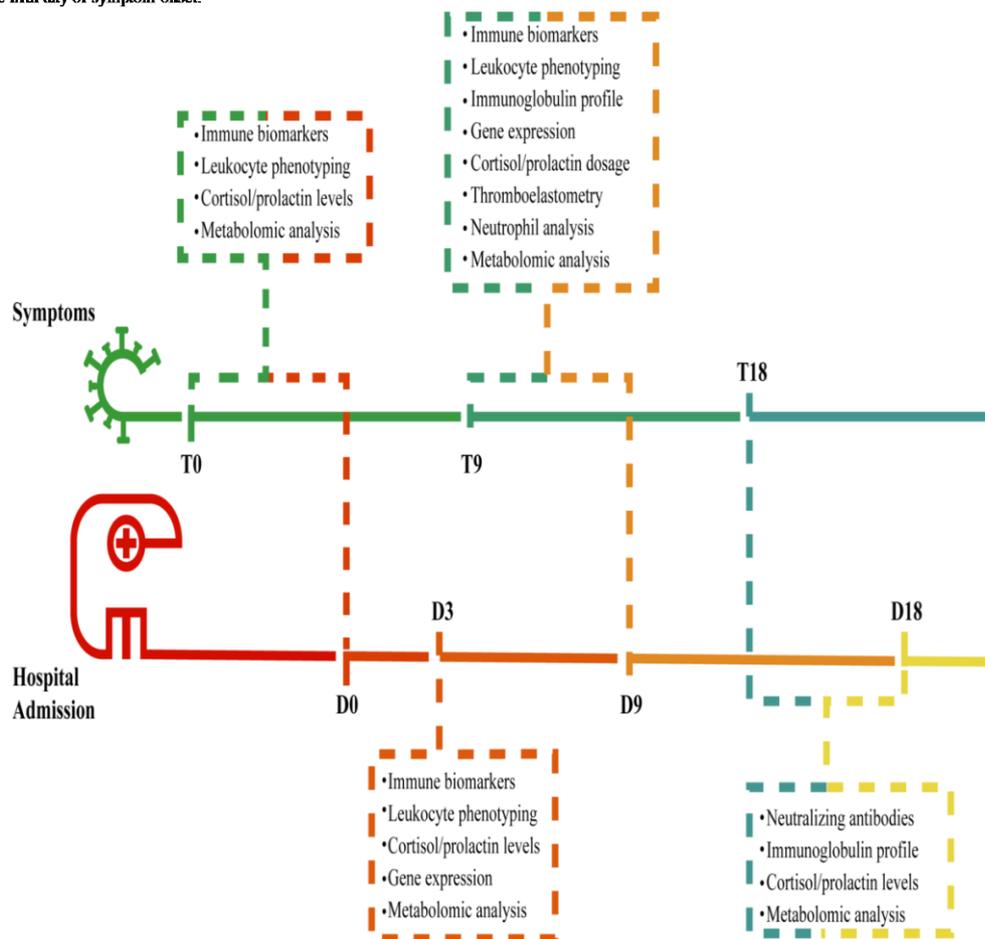
### Timeline

The TARGET protocol comprises two arms, referred to as the timeline (T)-branch and the days of hospitalization (D)-branch. For the purposes of this study, the T-branch refers to patients with mild/moderate forms that did not require hospitalization. The D-branch refers to patients with severe/critical forms who required hospital admission. Patients on the T-branch will be analyzed on days 0, 9, and 18 (T0, T9, and T18), while patients on the D-branch will be analyzed on days 0, 3, 9, and 18 (D0, D3, D9, and D18; [Figure 1](#)).

### Biological Samples

The TARGET protocol encompasses the collection of blood samples in four different types of containers. For these purposes, whole peripheral blood samples will be collected in vacuum tubes without an anticoagulant (10 mL) to obtain serum samples for metabolomic and biochemical analysis, in sodium citrate (5 mL) for coagulation assays, and in heparin (10 mL) to obtain plasma samples and to isolate polymorphonuclear and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Samples will be collected at distinct time points as follows: day 0, at inclusion by confirmation of COVID-19; day 3, within 2-4 days after inclusion; day 9, within 7-10 days after inclusion; and day 18, within 15-20 days after inclusion ([Figure 2](#)).

**Figure 2.** Timeline showing the times of blood tests and the analysis performed. The upper line represents the duration of symptoms, a parameter used in the group of patients enrolled for prospective follow-up, composed primarily of patients who will evolve with mild conditions. The lower line represents the blood test dates in the hospitalized group: patients who have already entered the study with moderate to severe conditions, usually from the fifth day of symptom onset.



#### Preanalytical Sample Handling and Preprocessing

The whole blood samples will be processed to obtain serum or plasma samples and PBMC batches. Tubes will be centrifuged at 1900 g for 10 minutes at 22 °C to obtain serum or heparinized plasma and processed immediately within-facility for routine PBMC isolation and cryopreservation [17].

#### Clinical Biochemistry and Hematologic Analysis

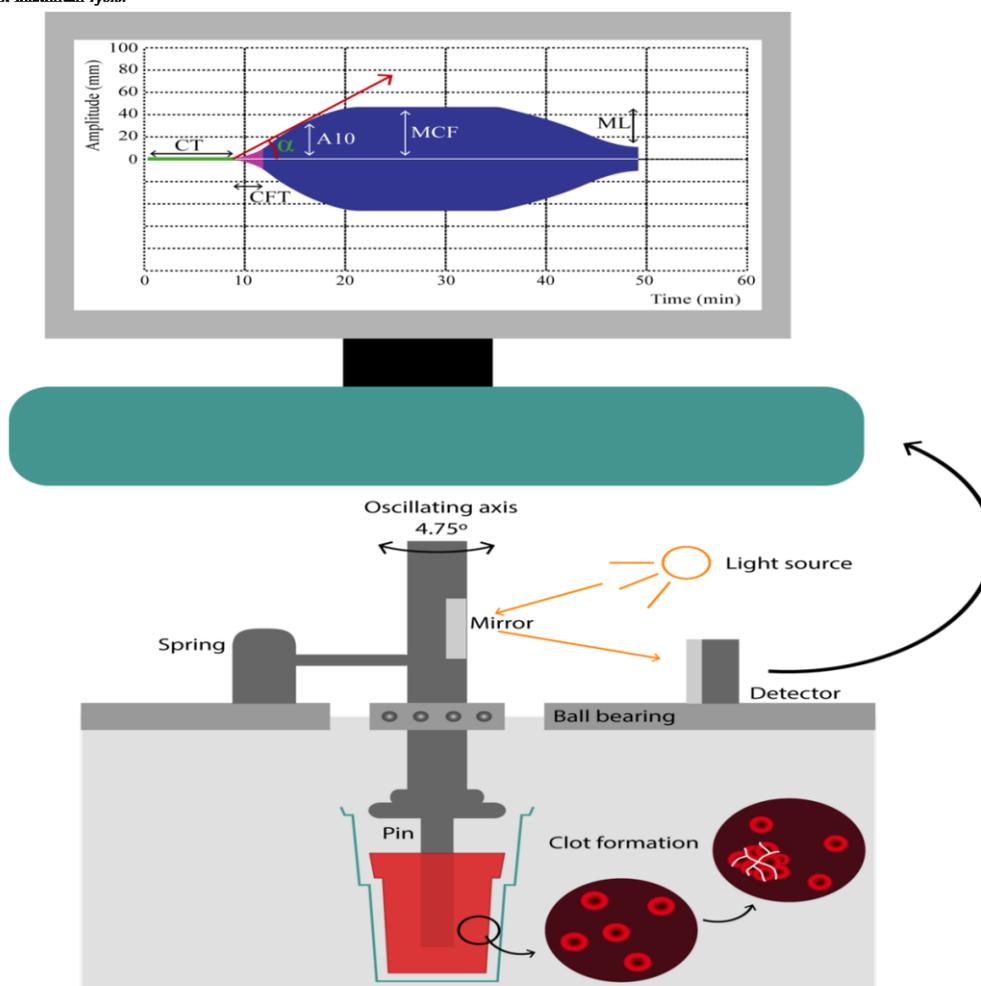
Plasma samples obtained in ethylenediamine tetraacetic acid will be immediately analyzed at local clinical laboratory facilities. Biochemical analysis will be performed with a Rocas Cobas E411 system using compatible reagents to assess the levels of ferritin, troponin T, creatine kinase, creatinine, aspartate aminotransferase, and alanine aminotransferase. All

procedures will be performed according to the manufacturer's recommendations. Cortisol and prolactin in serum samples will be quantified at the Sabin Medicina Diagnóstica (Brasília, Brazil) using the chemiluminescent method (Siemens, Advia Centaur). Hematological analyses will be performed using whole blood obtained in sodium citrate tubes in an ABBOTT Cell Dyn 3700 analyzer or equivalent with samples from days 0, 9, and 18.

The coagulation profile will be assessed at the DASA Laboratory (Brasília, Brazil) by thromboelastometry tests carried out within a 3-hour interval after blood collection [13,25] as follows: extrinsic system assay (EXTEM), intrinsic system assay (INTEM), fibrinogen assay (FIBTEM), and nonactivated

coagulation assay (NATEM; ROTEM, Werfen, Barcelona, Spain; Figure 3).

**Figure 3.** Thromboclastometry method for clot evaluation. A pin that spins around its own axis is put in contact with a citrated blood sample inside a cuvette. After recalcification and addition of a specific activator (depending upon the test), the clotting starts, and as it gets firmer, the spinning capacity of the axis is reduced, which is transformed by the system in a graphic representation of the clot, with increasing amplitude. As the fibrinolysis starts, the clot becomes less firm, which is represented as decreasing amplitude on the monitor. The extrinsic system assay (EXTEM)'s activator is thromboplastin and evaluates the extrinsic activation of coagulation. The intrinsic system assay's activator is elagic acid and evaluates the intrinsic activation of coagulation. The fibrinogen assay's activator is the same as EXTEM plus cytochalasin D, which inhibits platelet activity. This depicts only the participation of fibrinogen in the clot. The nonactivated coagulation assay is recalcified blood and is a nonactivated evaluation of coagulation. Circulating tissue factors, such as those expressed on monocytes in inflammatory states, will start the coagulation process. CT is the time frame from activation until an amplitude of 2 mm and represents thrombin formation. CFT represents the dynamic formation of thrombin and is the time frame between 2 mm and 20 mm of clot amplitude. A10 represents the clot amplitude 10 minutes after initiation and is directly related to MCF, enabling the clinic to make important decisions. MCF is the maximum amplitude of the clot and represents its main constituents, namely, fibrinogen and platelets. ML represents the percentage of clot reduction after initiation of fibrinolysis. Therefore, 60 minutes after initiation, thromboclastometry depicts important information about every phase of the coagulation process. A10: amplitude in 10 minutes; CFT: coagulation formation time; CT: coagulation time; MCF: maximum clot firmness; ML: maximum lysis.



### Assessment of Molecular and Cellular Immunological Biomarkers

Serum biomarkers will be assessed using the Luminex Bio-Plex Pro platform set for 27 human immune mediators (Bio-Rad Laboratories, California) for the simultaneous assessment of the following analytes: chemokines (CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, and CXCL10), proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-17A, and IL-15) and regulatory cytokines (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, and IL-13), and cell growth factors (IL-2, IL-7, FGF-basic, PDGF, VEG, G-CSF, and GM-CSF). All procedures will follow the manufacturer's recommendations, with levels obtained at days 0, 3, and 9.

The expression levels of immune mediators will be assessed by TaqMan quantitative RT-PCR (qRT-PCR) assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) for each transcript, with retro-transcription set up with 1 ng/ $\mu$ L of RNA from PBMCs and from neutrophils. The reactions will be carried out on a QuantStudio 3 Thermal Cycler (Applied Biosystems, CA) in standard mode [26]. Alternatively, qRT-PCR experiments for selected genes will be based on the SYBR Green (family of dyes for molecular biology) detection methodology using the SYBR Green PCR Master Mix and universal cycling conditions on the ABI Prism 7000 Sequence Detection System. Expression levels will be assessed on days 3 and 9.

Immunophenotypic/functional profiles of circulating leukocytes will be assessed upon short-term culture in vitro. The cell suspension will be stained with distinct panels of monoclonal antibodies comprising CD3, CD4, CD8, HLA-DR, CD25, CD19, CD5, CD27, CD38, PD-1, CD28, CD14, CD16, and CD56 for cell surface analysis, and IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-5-PE, and IL-10 for evaluation of intracytoplasmic functional status. Cells will be run on a FORTRESSA flow cytometer (BD Bioscience, CA). An average of 100,000 cells will be analyzed per sample. The phenotypic/functional parameters will be assessed using FlowJo software (BD, New Jersey). Leukocyte phenotyping will be obtained at days 0, 3, and 9.

The immunoglobulin profile will be assessed by multiplexed PCR using cryopreserved PBMCs [19,27]. Sequencing libraries will be produced and sequenced using the Illumina MiSeq 2x300 bp platform. For each sample, 1 million reads corresponding to IgG and IgA will be produced. The reads will be processed using pRESTO [28], Ig heavy chain genes will be annotated using the MIXCR platform [29], and clonotypes will be determined as described in [30]. The immunoglobulin profile will be assessed in samples obtained on day 3.

### Neutrophil Evaluation Experimental Design and Groups

Neutrophils will be obtained from healthy donors and from patients at two different times, T9/T18 and D9/D18. Neutrophils isolated from each donor will be divided into two aliquots and incubated in buffer (control group) or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; activated group). Cells from each group will be submitted to the functional and molecular analyses described in the following sections.

### Neutrophil Isolation and In Vitro Activation

Cell isolation will be performed from peripheral venous blood by centrifugation in Percoll gradients, as previously described [27]. The remaining erythrocytes will be removed by hypotonic lysis. Samples containing >95% neutrophils and >98% viable neutrophils will be prepared in 50% autologous plasma and divided into aliquots for control or activation in PMA [28].

### Evaluation of Reactive Oxygen Species Production and Phagocytosis

The isolated neutrophils, after incubation in each condition, will be tested for reactive oxygen species production as described by Tahir et al [29].

### Evaluation of Neutrophil Extracellular Traps Production

At the final 20 minutes of incubation in each condition, an aliquot of neutrophils will be removed and incubated with SYTOX green (high-affinity nucleic acid stain; 10  $\mu$ M/L) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue-fluorescent DNA stain; 1  $\mu$ g/mL). Fluorescence readings will be performed both by fluorescence microscopy and on a spectrophotometer [30].

### Real-time Migration Assay

Neutrophils from each condition will be applied to the upper chamber of a xCELLigence Real-Time Cell Analysis instrument and dynamically measured regarding the migration toward the chemoattractant N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (potent polymorphonuclear leukocyte chemotactic factor) [31].

### Neutrophil Proteomics

Neutrophils obtained in all experimental conditions will be subjected to cell lysis by ultrasound cavitation and then trypsin digested. Eluted peptides will be subjected to capillary chromatography in a two-column online vented system. The fractions will be eluted directly into the ionization chamber of an Orbitrap Elite mass spectrometer to be analyzed in data-dependent acquisition mode. The 20 most intense ions will be selected for high-energy collision dissociation fragmentation, and the fragments will be analyzed in the ion-trap detector. Mass spectra will be analyzed for protein quantification and identification using the Progenesis and Peaks software packages, as well as in-house developed R scripts for statistical analysis [32].

### Metabolomic Profiling

We will aim to analyze each serum sample collected from mild (T-branch group) and severe (D-branch group) case patients and healthy volunteers at each time point in the same manner (Figures 1 and 2). Untargeted metabolomics will be performed using a Bruker UPLC-PDA-QqTOF (ultra-performance liquid chromatography photodiode array quadrupole-quadrupole-time-of-flight) compact (UPLC-MS/MS). The obtained data will be used to build molecular networking using the Global Natural Products Social Molecular Networking platform, which gives a better overview of the metabolic profile and group compound classes in clusters. For statistical validation of the metabolite differences between the groups, the data will be processed in MZmine and analyzed

by means of chemometric tools, as provided by the MetaboAnalyst platform. Based on this broad chemical outline, specific metabolites will be quantitatively analyzed using targeted metabolomics using a CLAE Quadrupole/Quadrupole. This approach will be used to validate and quantify specific components of interest, such as metabolites involved in the glycolytic and hexosamine pathways, and tricarboxylic acid cycle, among other possible biomarkers.

#### Sample Size Calculation

The sample size calculation was based on the assumption that 20% of patients who are critically ill have elevated TNF- $\alpha$  levels compared to 5% of patients who are noncritically ill [8]. TNF levels will be normalized according to the study population. Based on a bilateral 95% significance level, a power of 80%, and a case-control ratio of 1, a sample size of 200 patients can be predicted.

#### Statistical Analysis

Clinical and demographic data between groups of patients (severe vs nonsevere) as well as treatment profiles and differences in successive time points will be compared. To compare mean values of soluble biomarkers between groups, the *t* student test (or analysis of variance with post hoc test for multiple groups) or the nonparametric Mann-Whitney (or Kruskal-Wallis for multiple groups) test will be used as appropriate, according to the observed sample distribution features. The SAS 9.3 software (SAS Institute Inc) will be used with a significance level set at .05. The main binary outcomes will be analyzed by the estimation of relative risks using a log-binomial generalized model or by the area under the curve using trapezoidal methods. All personnel conducting laboratory procedures will be blinded regarding the patient status (severity of COVID-19). Receiver operating characteristic curves will determine cutoff points at which individual or combined scores of the molecular and cellular biomarkers become informative of the progression of COVID-19 cases, according to optimal sensitivity and specificity to identify the signature that best characterizes each clinical status.

## Results

This protocol is in the data collection phase. Study recruitment started in June 2020. At the end of July 2020, 30 T-branch and 85 D-branch patients were enrolled.

We expected to complete all patient inclusion by June 2020, but with the continuous increase in COVID-19 cases in Brazil, the authors decided to continue including patients until February 2021.

Data analysis is scheduled to start after all inclusion data have been collected.

The coagulation study branch, with thromboelastometry, has already been completed. Preliminary results confirm deregulation in initiation of the hemostasis process. The results are currently being analyzed and prepared for publication.

## Discussion

This TARGET protocol was designed to standardize the evaluation of cellular and molecular immune biomarkers to evaluate their potential as prognosis tools during COVID-19 infection at different degrees of clinical severity. As the host immune response impacts COVID-19 progression, understanding the behavior of immune biomarkers at the different phases of the illness constitutes a crucial step in the identification of patients who will deteriorate and those who will benefit most from treatment. A simultaneous comprehensive assessment of the different aspects of the immune response was the approach adopted for this protocol.

An early study in China showed that the elevation of certain biomarkers such as D-dimer, together with inflammatory markers including ferritin, was associated with the worst outcomes after SARS-CoV-2 infection [33]. These measurements have been incorporated in some clinical practice centers, but their course during disease and actual value in prognosis are not yet fully described. Higher levels of a series of other interleukins were also described in severe forms of the disease [34], contributing to the concept of a cytokine storm, but their exact significance remains unclear. A thorough evaluation of different immune aspects could help to clarify their role.

Less information regarding the cellular immune response has been published, but its role is progressively gaining more attention from the scientific community, as some evidence notes that humoral immunity does not appear to be sufficiently developed after the first SARS-CoV-2 infection [35]. A simultaneous evaluation of these two kinds of immune responses in the TARGET study could help to understand this interface.

Thromboembolism is a recurrent finding among patients with COVID-19, which has made thromboprophylaxis a vital part of the available supportive treatment options. Unfortunately, there is considerable uncertainty about the degree of coagulation derangement, the possible association with the inflammatory response elicited including neutrophil extracellular traps [36], and the consequences of these alterations [13]. Further knowledge is needed to better understand COVID-19-associated coagulopathy to provide frontline clinicians with better treatment options to manage the ensuing clinical manifestations.

A metabolomics study of serum from patients with COVID-19 annotated 941 metabolites. The authors identified metabolic patterns in severe cases that could be used to propose diagnostic models capable of predicting progression to severe infection and assist in the treatment strategy [37]. Observed changes in the lipid profile (>100 lipids) cause liver damage, as reflected by abnormal serum levels of bilirubin and bile acids [37]. Another study revealed the consequences of treating patients with SARS-CoV with methylprednisolone. Disturbances in the serum lipid profile 12 years post infection were associated with long-term systemic damage caused by high doses of methylprednisolone [38]. Metabolomics is therefore a powerful tool for identifying and monitoring the prognosis and markers at different stages of a disease, particularly for unknown infections [24].

Similarly, neutrophil functional and molecular assays have been performed in patients with COVID-19 [39], clearly indicating the participation of these cells in the pathogeny, although no specific molecular model has yet been proposed [40]. Therefore, the proteomic approach coupled with further analysis at the transcription and functional level will provide evidence to correlate neutrophil activity to the disease severity and time course.

Only two treatments have shown substantial beneficial effects to date in randomized trials in COVID-19, with both exhibiting heterogeneity of treatment effect between subgroups. A preliminary report from Beigel et al [41] showed that remdesivir shortened the median recovery in a trial from 15 days in the placebo group to 11 days, but those on mechanical ventilation were less likely to benefit. On the other hand, dexamethasone

demonstrated a reduction in mortality at 28 days, but mainly in those on mechanical ventilation [42]. One possible explanation for these findings is that an adequate immune response to stop viral replication is needed at the onset of the disease. The excess of inflammation presenting is detrimental. As the time when these treatments are initiated could be key, immune biomarkers that signal phases of disease to guide the timing of treatments could be extremely useful in clinical practice.

In summary, TARGET is a translational study that aims to verify the role of cellular and molecular immune biomarkers in the prognosis of COVID-19, opening up avenues for their use in clinical practice. The results that will be achieved are not meant to be restricted to the description of the disease pathophysiology, but to form a basis for future clinical studies that will ultimately help the clinicians on the front line.

### Acknowledgments

The authors thank the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), under process no. 88887.506611/2020-00 and 88887.504420/2020-00 and Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), under process no. REDE-00140-16. The authors thank the ArboControl Brazil Project funded by the Ministry of Health, under process no. TED 74/2016 and TED 42/2017 for financial support. The study has been supported by Hospital Universitário de Brasília (HuB) from Universidade de Brasília (UnB), Hospital Regional da Asa Norte (HIRAN). LAN, LFF, OTN, WF and OAMF thank the CNPq for PQ-fellowship Program. The funders had no contribution in the study design, data collection and analysis, decision to publish or manuscript preparation. We thank the “Nucleus of Support on Research from Institute Sabin – Brasília for performing hormonal tests and sample pre-analytical handling, the DASA Laboratory for performing the ROTEM analysis and the Werfen Medical for supplying reagents for ROTEM analysis.

### Conflicts of Interest

None declared.

### References

- Guo Y, Cao Q, Hong Z, Tan Y, Chen S, Jin H, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Mil Med Res* 2020 Mar 13;7(1):11 [FREE Full text] [doi: [10.1186/s40779-020-00240-0](https://doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0)] [Medline: [32169119](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32169119/)]
- Wang TT, Moon HS, Le A, Panchal N. Proceedings of the OMS COVID-19 response conference. *J Oral Maxillofac Surg* 2020 Aug;78(8):1268-1274 [FREE Full text] [doi: [10.1016/j.joms.2020.05.003](https://doi.org/10.1016/j.joms.2020.05.003)] [Medline: [32422192](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32422192/)]
- Yang Y, Peng F, Wang R, Yang M, Guan K, Jiang T, et al. The deadly coronaviruses: the 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China. *J Autoimmun* 2020 May;109:102434 [FREE Full text] [doi: [10.1016/j.jaut.2020.102434](https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102434)] [Medline: [32143990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32143990/)]
- Aggarwal S, Garcia-Telles N, Aggarwal G, Lavie C, Lippi G, Henry BM. Clinical features, laboratory characteristics, and outcomes of patients hospitalized with coronavirus disease 2019 (COVID-19): early report from the United States. *Diagnosis (Berl)* 2020 May 26;7(2):91-96. [doi: [10.1515/dx-2020-0046](https://doi.org/10.1515/dx-2020-0046)] [Medline: [32352401](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32352401/)]
- Conner SD, Schmid SL. Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 2002 Mar 04;156(5):921-929 [FREE Full text] [doi: [10.1083/jcb.200108123](https://doi.org/10.1083/jcb.200108123)] [Medline: [11877461](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11877461/)]
- Verdecchia P, Cavallini C, Spanevello A, Angeli F. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection. *Eur J Intern Med* 2020 Jun;76:14-20 [FREE Full text] [doi: [10.1016/j.ejim.2020.04.037](https://doi.org/10.1016/j.ejim.2020.04.037)] [Medline: [32336612](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32336612/)]
- Sodhi CP, Wohlford-Lenane C, Yamaguchi Y, Prindle T, Fulton WB, Wang S, et al. Attenuation of pulmonary ACE2 activity impairs inactivation of des-Arg bradykinin/BKB1R axis and facilitates LPS-induced neutrophil infiltration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2018 Jan 01;314(1):L17-L31 [FREE Full text] [doi: [10.1152/ajplung.00498.2016](https://doi.org/10.1152/ajplung.00498.2016)] [Medline: [28935640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28935640/)]
- 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. *Lancet* 2020 Feb 15;395(10223):497-506 [FREE Full text] [doi: [10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)] [Medline: [31986264](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31986264/)]
- Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ, HLH Across Speciality Collaboration, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020 Mar 28;395(10229):1033-1034 [FREE Full text] [doi: [10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)] [Medline: [32192578](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32192578/)]

10. Wu D, Yang XO. TH17 responses in cytokine storm of COVID-19: an emerging target of JAK2 inhibitor Fedratinib. *J Microbiol Immunol Infect* 2020 Jun;53(3):368-370 [FREE Full text] [doi: [10.1016/j.jmii.2020.03.005](https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.005)] [Medline: [32205092](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32205092/)]
11. Bennardo F, Buffone C, Giudice A. New therapeutic opportunities for COVID-19 patients with Tocilizumab: possible correlation of interleukin-6 receptor inhibitors with osteonecrosis of the jaws. *Oral Oncol* 2020 Jul;106:104659 [FREE Full text] [doi: [10.1016/j.oraloncology.2020.104659](https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104659)] [Medline: [32209313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32209313/)]
12. RECOVERY Collaborative Group, Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M, Bell JL, et al. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19. *N Engl J Med* 2021 Feb 25;384(8):693-704 [FREE Full text] [doi: [10.1056/NEJMoa2021436](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2021436)] [Medline: [32678530](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32678530/)]
13. Mortus JR, Manck SE, Brubaker LS, Loor M, Cruz MA, Trautner BW, et al. Thromboelastographic results and hypercoagulability syndrome in patients with coronavirus disease 2019 who are critically ill. *JAMA Netw Open* 2020 Jun 01;3(6):e2011192 [FREE Full text] [doi: [10.1001/jamanetworkopen.2020.11192](https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.11192)] [Medline: [32501489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32501489/)]
14. Zhang C, Wu Z, Li J, Zhao H, Wang G. Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. *Int J Antimicrob Agents* 2020 May;55(5):105954 [FREE Full text] [doi: [10.1016/j.ijantimicag.2020.105954](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105954)] [Medline: [32234467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32234467/)]
15. Xu X, Han M, Li T, Sun W, Wang D, Fu B, et al. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020 May 19;117(20):10970-10975 [FREE Full text] [doi: [10.1073/pnas.2005615117](https://doi.org/10.1073/pnas.2005615117)] [Medline: [32350134](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32350134/)]
16. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP, STROBE Initiative. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: guidelines for reporting observational studies. *Int J Surg* 2014 Dec;12(12):1495-1499 [FREE Full text] [doi: [10.1016/j.ijsu.2014.07.013](https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2014.07.013)] [Medline: [25046131](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25046131/)]
17. Fuss IJ, Kanof ME, Smith PD, Zola H. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol* 2009 Apr;Chapter 7:Unit7.1. [doi: [10.1002/0471142735.im0701s85](https://doi.org/10.1002/0471142735.im0701s85)] [Medline: [19347849](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19347849/)]
18. Favalli EG, Biggoggero M, Maioli G, Caporali R. Baricitinib for COVID-19: a suitable treatment? *Lancet Infect Dis* 2020 Sep;20(9):1012-1013 [FREE Full text] [doi: [10.1016/S1473-3099\(20\)30262-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30262-0)] [Medline: [32251638](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32251638/)]
19. McDaniel JR, DeKosky BJ, Tanno H, Ellington AD, Georgiou G. Ultra-high-throughput sequencing of the immune receptor repertoire from millions of lymphocytes. *Nat Protoc* 2016 Mar;11(3):429-442. [doi: [10.1038/nprot.2016.024](https://doi.org/10.1038/nprot.2016.024)] [Medline: [26844430](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26844430/)]
20. Yang PL. Chapter 14 - metabolomics and lipidomics: yet more ways your health is influenced by fat. In: Katze MG, Korth MJ, Law GL, Nathanson N, editors. *Viral Pathogenesis: From Basics to Systems Biology*. Cambridge, MA: Academic Press; 2016:181-198.
21. Santos MCD, Morais CLM, Nascimento YM, Araujo JMG, Lima KMG. Spectroscopy with computational analysis in virological studies: a decade (2006-2016). *Trends Analyt Chem* 2017 Dec;97:244-256 [FREE Full text] [doi: [10.1016/j.trac.2017.09.015](https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.015)] [Medline: [32287542](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32287542/)]
22. Deng W, Rao J, Chen X, Li D, Zhang Z, Liu D, et al. Metabolomics study of serum and urine samples reveals metabolic pathways and biomarkers associated with pelvic organ prolapse. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2020 Jan 01;1136:121882. [doi: [10.1016/j.jchromb.2019.121882](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121882)] [Medline: [31809960](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31809960/)]
23. Kouskounvekaki I, Panagiotou G. Navigating the human metabolome for biomarker identification and design of pharmaceutical molecules. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011. [doi: [10.1155/2011/525497](https://doi.org/10.1155/2011/525497)] [Medline: [20936122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20936122/)]
24. Martín-Blázquez A, Diaz C, González-Flores E, Franco-Rivas D, Jiménez-Luna C, Melguizo C, et al. Untargeted LC-HRMS-based metabolomics to identify novel biomarkers of metastatic colorectal cancer. *Sci Rep* 2019 Dec 27;9(1):20198. [doi: [10.1038/s41598-019-55952-8](https://doi.org/10.1038/s41598-019-55952-8)] [Medline: [31882610](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31882610/)]
25. Calatzis AGK, Spannagel M, Vorweg M. Targeted treatment of acute haemostatic disorders. ROTEM Analysis. URL: [https://www.rotem.de/wp-content/uploads/2016/09/ROTEM\\_Analysis\\_delta\\_platelet\\_EN\\_2016-09-website.pdf](https://www.rotem.de/wp-content/uploads/2016/09/ROTEM_Analysis_delta_platelet_EN_2016-09-website.pdf) [accessed 2020-07-20]
26. Zhang T, Li L, Shang Q, Lv C, Wang C, Su B. Circulating miR-126 is a potential biomarker to predict the onset of type 2 diabetes mellitus in susceptible individuals. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;463(1-2):60-63. [doi: [10.1016/j.bbrc.2015.05.017](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.017)] [Medline: [25986735](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25986735/)]
27. Carvalho LO, Aquino EN, Neves ACD, Fontes W. The neutrophil nucleus and its role in neutrophilic function. *J Cell Biochem* 2015 Sep;116(9):1831-1836. [doi: [10.1002/jcb.25124](https://doi.org/10.1002/jcb.25124)] [Medline: [25727365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25727365/)]
28. Aquino EN, Neves ACD, Santos KC, Uribe CE, Souza PEN, Correa JR, et al. Proteomic analysis of neutrophil priming by PAF. *Protein Pept Lett* 2016;23(2):142-151. [doi: [10.2174/0929866523666151202210604](https://doi.org/10.2174/0929866523666151202210604)] [Medline: [26631175](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26631175/)]
29. Tahir M, Arshid S, Fontes B, Castro MS, Luz IS, Botelho KLR, et al. Analysis of the effect of intestinal ischemia and reperfusion on the rat neutrophils proteome. *Front Mol Biosci* 2018;5:89. [doi: [10.3389/fmolb.2018.00089](https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00089)] [Medline: [30555831](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30555831/)]
30. Hule GP, Bargir UA, Kulkarni M, Kambli P, Taur P, Desai M, et al. Does pioglitazone lead to neutrophil extracellular traps formation in chronic granulomatous disease patients? *Front Immunol* 2019;10:1739. [doi: [10.3389/fimmu.2019.01739](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01739)] [Medline: [31428088](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31428088/)]
31. Cano PM, Vargas A, Lavoie J. A real-time assay for neutrophil chemotaxis. *Biotechniques* 2016;60(5):245-251 [FREE Full text] [doi: [10.2144/000114416](https://doi.org/10.2144/000114416)] [Medline: [27177817](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27177817/)]

32. Cury N, Silva R, Andre M, Fontes W, Ricart C, Castro M, et al. Root proteome and metabolome reveal a high nutritional dependency of aluminium in *Qualea grandiflora* Mart. (Vochysiaceae). *Plant Soil* 2019 Nov 14;446(1-2):125-143. [doi: [10.1007/s11104-019-04323-3](https://doi.org/10.1007/s11104-019-04323-3)]
33. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020 Mar 28;395(10229):1054-1062 [FREE Full text] [doi: [10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)] [Medline: [32171076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32171076/)]
34. Velavan TP, Meyer CG. Mild versus severe COVID-19: laboratory markers. *Int J Infect Dis* 2020 Jun;95:304-307 [FREE Full text] [doi: [10.1016/j.ijid.2020.04.061](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.061)] [Medline: [32344011](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32344011/)]
35. Siracusano G, Pastori C, Lopalco L. Humoral immune responses in COVID-19 patients: a window on the state of the art. *Front Immunol* 2020;11:1049. [doi: [10.3389/fimmu.2020.01049](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01049)] [Medline: [32574261](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32574261/)]
36. Middleton EA, He X, Denorme F, Campbell RA, Ng D, Salvatore SP, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood* 2020 Sep 03;136(10):1169-1179 [FREE Full text] [doi: [10.1182/blood.2020007008](https://doi.org/10.1182/blood.2020007008)] [Medline: [32597954](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32597954/)]
37. Song L, Yin Q, Kang M, Ma N, Li X, Yang Z, et al. Untargeted metabolomics reveals novel serum biomarker of renal damage in rheumatoid arthritis. *J Pharm Biomed Anal* 2020 Feb 20;180:113068. [doi: [10.1016/j.jpba.2019.113068](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113068)] [Medline: [31884392](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31884392/)]
38. Wu Q, Zhou L, Sun X, Yan Z, Hu C, Wu J, et al. Altered lipid metabolism in recovered SARS patients twelve years after infection. *Sci Rep* 2017 Aug 22;7(1):9110. [doi: [10.1038/s41598-017-09536-z](https://doi.org/10.1038/s41598-017-09536-z)] [Medline: [28831119](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28831119/)]
39. Didangelos A. COVID-19 hyperinflammation: what about neutrophils? *mSphere* 2020 Jun 24;5(3). [doi: [10.1128/mSphere.00367-20](https://doi.org/10.1128/mSphere.00367-20)] [Medline: [32581077](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32581077/)]
40. Laforge M, Elbin C, Frère C, Hénadi M, Massaad C, Nuss P, et al. Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. *Nat Rev Immunol* 2020 Sep;20(9):515-516 [FREE Full text] [doi: [10.1038/s41577-020-0407-1](https://doi.org/10.1038/s41577-020-0407-1)] [Medline: [32728221](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32728221/)]
41. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kalil AC, ACTT-1 Study Group Members. Remdesivir for the treatment of Covid-19 - final report. *N Engl J Med* 2020 Nov 05;383(19):1813-1826 [FREE Full text] [doi: [10.1056/NEJMoa2007764](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2007764)] [Medline: [32445440](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32445440/)]
42. RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone for COVID-19: preliminary findings. *Drug Ther Bull* 2020 Sep;58(9):133. [doi: [10.1136/dtb.2020.000045](https://doi.org/10.1136/dtb.2020.000045)] [Medline: [32690491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32690491/)]

#### Abbreviations

ACE2: angiotensin converting enzyme-2  
 CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
 D: days of hospitalization  
 EXTEM: extrinsic system assay  
 FIBTEM: fibrinogen assay  
 IFN- $\gamma$ : interferon-gamma  
 INTEM: intrinsic system assay  
 MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1  
 NATEM: nonactivated coagulation assay  
 PBMC: peripheral blood mononuclear cells  
 PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate  
 qRT-PCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction  
 RECOVERY: Randomised Evaluation of COVID-19 Therapy  
 RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction  
 SARS-CoV: severe acute respiratory syndrome-related coronavirus  
 STROBE: Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology  
 T: timeline  
 TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor-alpha  
 UnB: University of Brasília  
 UPLC-PDA-QqTOF: ultra-performance liquid chromatography photodiode array  
 quadrupole-quadrupole-time-of-flight  
 WHO: World Health Organization

*Edited by G Eysenbach; submitted 09.09.20; peer-reviewed by A Allam, E Soto Vega; comments to author 02.12.20; revised version received 13.12.20; accepted 19.02.21; published 04.03.21*

*Please cite as:*

*Kurizky P, Nóbrega OT, Soares AADSM, Aires RB, Albuquerque CPD, Nicola AM, Albuquerque P, Teixeira-Carvalho A, Naves LA, Fontes W, Luz IS, Felicori L, Gomides APM, Mendonça-Silva DL, Espindola LS, Martins-Filho OA, de Lima SMB, Mota LMH, Gomes CM*

*Molecular and Cellular Biomarkers of COVID-19 Prognosis: Protocol for the Prospective Cohort TARGET Study*

*JMIR Res Protoc 2021;10(3):e24211*

URL: <https://www.researchprotocols.org/2021/3/e24211>

doi: [10.2196/24211](https://doi.org/10.2196/24211)

PMID: [33661132](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33661132/)

©Patricia Kurizky, Otávio T Nóbrega, Alexandre Anderson De Sousa Munhoz Soares, Rodrigo Barbosa Aires, Cleandro Pires De Albuquerque, André Moraes Nicola, Patrícia Albuquerque, Andréa Teixeira-Carvalho, Luciana Ansaneli Naves, Wagner Fontes, Isabelle Souza Luz, Liza Felicori, Ana Paulo Monteiro Gomides, Dayde Lane Mendonça-Silva, Laila Salmen Espindola, Olindo Assis Martins-Filho, Sheila Maria Barbosa de Lima, Licia Maria Henrique Mota, Ciro Martins Gomes. Originally published in JMIR Research Protocols (<http://www.researchprotocols.org>), 04.03.2021. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work, first published in JMIR Research Protocols, is properly cited. The complete bibliographic information, a link to the original publication on <http://www.researchprotocols.org>, as well as this copyright and license information must be included.

## ANEXO A – Parecer da CONEP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP**

## DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Biomarcadores imunológicos como preditores de prognóstico em pacientes com formas leves e graves de COVID-19

**Pesquisador:** PATRICIA SHU KURIZKY

Área Temática:

**Versão:** 3

**CAAE:** 30846920.7.0000.0008

**Instituição Proponente:** EMPRESA BRASILEIRA DE SERVICOS HOSPITALARES - EBSEH

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.077.252

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos “Apresentação do Projeto”, “Objetivo da Pesquisa” e “Avaliação dos Riscos e Benefícios” foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (“PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1536698.pdf”, datado de 14/04/2020).

## INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde declarou a pandemia de COVID-19 em 12 de março de 2020.<sup>1</sup> A doença se caracteriza por febre, tosse, dispneia, podendo evoluir para edema e falência pulmonar, além de ter danos hepático, cardíaco e renais.<sup>2</sup> O manejo clínico é

principalmente sintomático, entretanto casos graves podem necessitar de assistência respiratória.<sup>1</sup> O SARS-CoV-2, patógeno responsável pelo quadro, liga-se às células epiteliais alveolares, entrando via enzima conversora da angiotensina-2, e assim, ativa o receptor toll-like-7 (TLR-7).<sup>3,4</sup> A ativação do TLR-7 leva a produção de alfa-interferon, TNF-a, e à secreção de IL-12 e IL-6. Isso resulta na formação de células T citotóxicas CD8-específicas e células T-helper CD4, levando à formação de células B antígeno-específicas e produção de anticorpos.<sup>4</sup> Essa resposta imune adaptativa controla a infecção viral e determina o restabelecimento clínico.<sup>4</sup> Ao mesmo tempo, parece que quando o organismo não é capaz de produzir uma resposta adaptativa adequada ao vírus, a inflamação persistente induzida pela imunidade inata leva a uma liberação excessiva de citocinas (cytokine storm).<sup>2-4</sup> *Hung et al* sugeriram que essa “tempestade” de citocinas se manifestaria por altos níveis de IL-1b, IL-2, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IP10, MCP1, MIP1A e MIP1B. Comparado com os pacientes não internados em unidades intensivas, os pacientes críticos tendem a apresentar níveis mais altos de IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, IP10, MCP1, MIP1A e TNF $\alpha$ .<sup>5</sup> Outro estudo avaliando pacientes com COVID-19 mostrou uma diminuição das células CD4 e CD8, mas um aumento na proporção de células Th17.<sup>6</sup> A diferenciação de células Th17 se dá pelo estímulo de IL-6 e IL-23. Estudo de *Jing Liu et al*, ainda a ser publicado, sugeriu que casos graves mostrariam uma diminuição sustentada na proporção de linfócitos quando comparado com os casos moderados, além de mostrarem também diminuição de células T CD8 e aumento de citocinas inflamatórias no sangue periférico (IL-6, IL-10, IL-2 e IFN- $\gamma$ ).<sup>3</sup> A IL-6 apresenta um papel central na inflamação aguda.<sup>3</sup> Ela pode ser produzida por quase todas as células estromais e do sistema imune, como linfócitos B, T, macrófagos, monócitos, células dendríticas, mastócitos e outras células não linfocitárias, como fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, células mesangiais glomerulares e células tumorais.<sup>3</sup> Os principais ativadores da expressão da IL-6 são a IL-1B e o fator de necrose tumoral (TNF-a), mas também pode ocorrer pelos receptores Toll-like, prostaglandinas, adipocinas, resposta ao estresse e outras citocinas.<sup>3</sup> Nas fases iniciais da inflamação infecciosa, a IL-6 é produzida por monócitos e macrófagos, estimulados pelos receptores Toll-like. Essa expressão aguda de IL-6 tem um papel central na defesa do organismo ao estimular várias populações celulares.<sup>3</sup> Além disso, a resposta do tipo TH17 parece ter um papel importante nos casos graves de COVID-19.<sup>2</sup> A IL-1b e TNF $\alpha$  estimulam a resposta de Th17, promovendo permeabilidade vascular e

extravasamento. As células Th17 produzem IL-17, GM-CSF, IL-21 e IL-22. Dentre estas, a IL-17 tem amplo efeito pró-inflamatório na indução de citocinas G-CSF (responsáveis pela granulopoiese e recrutamento de neutrófilos), IL-1b, IL-6, TNFa (esses 3 últimos envolvidos em sintomas inflamatórios, como a febre), quimiocina KC, MIP2A, IL-8, IP10, MIP3A (atraem e recrutam mais infiltrado imune); e metaloproteinases da matriz (participando do dano tecidual e remodelamento).<sup>2</sup> Já a IL-22 estimula a produção de mucina, fibrinogênio, proteínas antiapoptóticas, amiloide A sérico e proteína ligadora LPS, podendo assim contribuir para a formação do edema encontrado nos pacientes com SARS-CoV-22 e SARS-CoV.2 Finalmente, *Xu et al* mostraram que o sangue periférico de pacientes com COVID-19 grave apresentava um alto número de células Th17 CCR6<sup>+</sup>, reforçando a importância destas células na fisiopatogenia da doença.<sup>7</sup> Considerando que até o momento não há uma droga específica para o tratamento de COVID-19, uma gama de terapias direcionadas ao hospedeiro têm sido potencialmente redirecionada para suprir essa ausência.<sup>1</sup> O tocilizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado que atua bloqueando os receptores de interleucina-6 (IL-6), usado no tratamento da artrite reumatoide e arterite de células gigantes, e recentemente empregado (por compaixão) no tratamento de pacientes com quadros graves de COVID19 na China e na Itália.<sup>1,3</sup> O estudo chinês avaliou 21 pacientes, não havendo complicações com o uso da medicação nem história de piora da doença ou morte, sendo que todos os pacientes apresentaram melhora clínica. Os autores defenderam que o fato do tocilizumabe ter um baixo risco de infecções favorece seu uso e a limitação principal do estudo foi que a IL-6 foi quantificada no sangue periférico apenas antes do tratamento.<sup>3</sup> Outra droga sugerida foi o Fedratinibe (SAR302503, TG101348), um inibidor da JAK2, aprovada pelo FDA para neoplasias mieloproliferativas, que age na produção das citocinas das células Th17, entretanto ainda não existem estudos mostrando sua ação no COVID-19.<sup>2</sup> Outro inibidor da JAK, aprovado no Brasil, e que tem sido estudado é o Baricitinibe. Além de diminuir a cascata inflamatória potencializada pelas citocinas, essa droga também seria capaz de diminuir a entrada e aglomeração intracelular do vírus nas células do hospedeiro, em especial nas células pulmonares, pelo bloqueio da proteína quinase 1 associada a AP2 (AAK1).<sup>8</sup> Esses dados apoiam a hipótese que uma “tempestade” de citocinas apresente um papel importante nos casos graves, de forma que a neutralização de fatores inflamatórios chaves na síndrome de liberação de citocinas teria grande valor na redução da mortalidade de casos graves.

## HIPÓTESE

Qual o perfil de citocinas e quimiocinas séricas encontrado nos pacientes portadores de COVID-19 brasileiros?

Existe relação entre o perfil de citocinas e quimiocinas apresentado e a gravidade do quadro de COVID-19?

## METODOLOGIA

Estudo analítico prospectivo com pacientes e profissionais de saúde do Hospital Universitário de Brasília, que tenham diagnóstico de COVID-19. Esses pacientes serão submetidos a coleta de sangue no dia 1, 3, 10 e 15. O sangue será processado para obtenção plasma e de células mononucleares do sangue periférico, que serão avaliados quanto à presença de quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento, à expressão de biomarcadores fenotípicos de memória, produção de citocinas intracitoplasmáticas bem como, quantificação do nível de expressão de genes para citocina.

## CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Capacidade de compreensão e preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
Diagnóstico de COVID-19

## CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

Doença mental orgânica, funcional ou oligofrenia, que comprometam a qualidade da informação fornecida pelo paciente

Objetivo da Pesquisa:

## OBJETIVO PRIMÁRIO

Analisar a resposta imune celular por meio da assinatura de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e reguladoras em pacientes brasileiros com COVID-19.

## OBJETIVO SECUNDÁRIO

- Relacionar os dados obtidos com a gravidade do quadro apresentado pelo paciente.

- Avaliar o perfil fenotípico / funcional de subpopulações de células mononucleares circulantes. Analisar a expressão de genes envolvidos na resposta inata e adaptativa ao COVID-19
- Analisar o repertório da região hipervariável de imunoglobulinas
- Avaliar a presença de anticorpos neutralizantes desencadeados pela doença e possível imunidade contra reinfeção

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

#### RISCOS

Por se tratar de trabalho envolvendo coleta de sangue, os pacientes estão expostos ao risco de flebite, equimoses e hematomas nos locais da punção. A escolha de profissionais bem treinados pode diminuir a ocorrência de efeitos. O uso de luvas e materiais estéreis descartáveis evita a ocorrência de possíveis infecções associadas ao procedimento.

#### BENEFÍCIOS

Alguns estudos têm focado a relação entre os níveis séricos das quimiocinas e das citocinas inflamatórias e o quadro crítico de falência respiratória nos pacientes com COVID-19, avaliando seus papéis como biomarcadores. Um biomarcador, conforme definição do US National Institutes of Health, é um fator que pode ser medido objetivamente e que serve como marcador de processos biológicos fisiológicos ou patológicos ou de respostas farmacológicas de intervenções terapêuticas. Os biomarcadores apresentam aplicações clínicas importantes no diagnóstico, estadiamento ou classificação da doença, bem como no monitoramento da resposta ao tratamento. Este estudo visa esclarecer a assinatura de quimiocinas e citocinas envolvidas na patogênese do COVID-19 em pacientes brasileiros e analisar sua relação com a gravidade do quadro, auxiliando na avaliação de fatores prognósticos e na escolha de tratamentos personalizado. O trabalho também vai auxiliar no esclarecimento da possível obtenção de imunidade pós-infecção.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda 1

Inclusão de 4 centros coparticipantes para auxiliar na captação dos pacientes:

- Hospital Regional da Asa Norte
- Hospital Regional de Taguatinga
- Hospital Regional do Gama
- Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes (HUCAM - UFES).

Inclusão dos exames de dosagem de prolactina e cortisol, relacionados às alterações do sistema imune; e da tromboelastometria, para avaliar formação de coágulos, descrita nas formas graves da doença. As alterações estão presentes na nova versão do projeto e TCLE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram identificados óbices éticos na emenda.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Situação: Emenda aprovada.

Continuação do Parecer: 4.077.252

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMACOES_BASICAS_155977_2_E1.pdf	01/06/2020 14:04:16		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	EndocrinoPROJETOCITOCINACOVID.docx	01/06/2020 13:59:12	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	telecovidcitocina.docx	27/05/2020 14:36:50	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	anuenciahrg.pdf	26/05/2020 14:14:15	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	anuenciahnan.pdf	19/05/2020 15:44:55	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	anuenciahrt.pdf	19/05/2020 15:43:02	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	anuenciahucam.pdf	19/05/2020 15:42:40	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	anuenciabiorrepositorioIRR.pdf	27/04/2020 21:27:06	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	CARTARESPOSTABiomarcadores.docx	27/04/2020 13:31:49	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	biomarcadoresfreconcordancia.pdf	14/04/2020 08:57:21	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Folha de Rosto	Biomarcadores.pdf	14/04/2020 08:51:59	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Declaração de concordância	AnuenciaFIOCRUZcovid.pdf	11/04/2020 10:17:21	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Orçamento	orcamentocitocinacovid.docx	08/04/2020 16:13:05	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Cronograma	cronogramabiomarcadores.docx	08/04/2020 16:12:28	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

BRASILIA, 09 de  
Junho de 2020

---

**Assinado por:  
Jorge Alves de  
Almeida Venancio  
(Coordenador(a))**

## ANEXO B – Ficha Clínica

Ficha Clínica

Pront. \_\_\_\_\_ Data de preenchimento da ficha \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: 1.( ) Masc 2.( )Fem

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ idade atual : \_\_\_\_\_

Tel: \_\_\_\_\_

Cep: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Comorbidades: ( ) Doença pulmonar crônica ( ) Cardiopatia crônica ( ) HAS

( ) Diabetes ( ) Doença Renal crônica ( )Gestação ( ) Neoplasia ( )Tabagismo ( ) Etilismo ( )

Psoríase ( ) imunodepressão ( ) HIV ( ) dengue ( ) hanseníase ( ) zika ( ) chicungunya

( ) doença de Chagas ( ) febre amarela ( ) leishmaniose ( ) malária ( ) H1N1 ( ) Nenhuma ( )

Outras

Outras comorbidades: \_\_\_\_\_

Medicamentos (na última semana): ( ) IECA ( ) BRA ( ) Ibuprofeno ( ) Outros AINEs ( )

imunossupressor - se sim: qual: \_\_\_\_\_ ( ) Nenhum medicamento

( ) Outros medicamentos

Outros medicamentos em uso: \_\_\_\_\_

O paciente tem sintomas: ( ) Sim / ( ) Não / Assintomático

Data do início dos sintomas: \_\_\_\_\_

Duração: \_\_\_\_\_ (dias)

Que sintomas vem apresentando: ( ) Febre ( ) Tosse ( ) Falta de ar (dispneia)

( ) Coriza ( ) Espirros ( ) Cefaleia ( ) Diarreia ( ) Dor de garganta (odinofagia)

( ) Astenia ( ) Diminuição do paladar (ageusia) ( ) Diminuição do olfato (anosmia)

( ) Náuseas ( ) Vômitos ( ) Tonturas (vertigem) ( ) Outros sintomas

Outros sintomas: \_\_\_\_\_

Houve contato domiciliar com pessoa com COVID-19 suspeita ou confirmada nos últimos 14 dias: Não  sim

O contactante domiciliar teve confirmação laboratorial da COVID-19: Não  Não sabe  sim

Qual a data do início dos sintomas do contactante domiciliar: (se houver mais de um contactante domiciliar com COVID-19, lançar a data mais antiga) \_\_\_\_\_

Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_ Saturação de O<sub>2</sub>: \_\_\_\_\_

Confirmação do diagnóstico de COVID-19  sim  não

Método: RT-PCR  sorologia

TC:  vidro fosco <25%  vidro fosco 25-50%  vidro fosco > 50%  consolidação

Achados laboratoriais:

Anemia  Linfopenia  Leucopenia  trombocitopenia  elevação de ferritina  elevação de DHL  elevação de troponina  elevação de CPK  elevação de transaminases  elevação da creatinina

Paciente em:  Isolamento domiciliar  Pronto-Socorro  Internação hospitalar

Observações:

\_\_\_\_\_

Tratamento para COVID-19:

apenas suporte  corticoide  enoxaparina  cloroquina  antibiótico – qual: \_\_\_\_\_

ivermectina  nitazoxanida  antiviral (lopinavir / ritonavir / remdesivir)  imunoglobulina  plasmaférese  anti-IL6 (tocilizumabe)  inibidor de JAK

outro – qual: \_\_\_\_\_

Houve necessidade de ventilação mecânica do paciente?  Sim  Não  Não sabe

Houve necessidade de oxigênio suplementar:  Sim  Não  Não sabe

Houve óbito do paciente por COVID-19:  Sim  Não  Não sabe

**Ficha D7:**

Data de preenchimento da ficha: \_\_\_\_\_

Houve resolução dos sintomas: ( ) sim ( ) não ( ) não se aplica

Surgiram novos sintomas: ( ) sim ( ) não

Se sim, quais: ( ) febre ( ) tosse ( ) dispneia ( ) coriza ( ) espirros ( ) cefaleia ( ) diarreia  
( ) odinofagia ( ) astenia ( ) ageusia ( ) anosmia ( ) náuseas ( ) vômitos ( ) tonturas ( ) outros

Saturação de O<sub>2</sub>: \_\_\_\_\_

Confirmação do diagnóstico de COVID-19 ( ) sim ( ) não

Método: RT-PCR ( ) sorologia ( )

TC: ( ) vidro fosco <25% ( ) vidro fosco 25-50% ( ) vidro fosco > 50% ( ) consolidação

Achados laboratoriais:

Anemia ( ) Linfopenia ( ) Leucopenia ( ) trombocitopenia ( ) elevação de ferritina ( ) elevação de DHL ( ) elevação de troponina ( ) elevação de CPK ( ) elevação de transaminases ( ) elevação da creatinina ( )

Paciente em: ( ) Isolamento domiciliar ( ) Pronto-Socorro ( ) Internação hospitalar

Houve mudança do tratamento para COVID-19: ( ) não ( ) sim – qual:

( ) apenas suporte ( ) corticoide ( ) enoxaparina ( ) cloroquina ( ) antibiótico – qual: \_\_\_\_\_

( ) ivermectina ( ) nitazoxanida ( ) antiviral (lopinavir / ritonavir / remdesivir) ( )  
imunoglobulina ( ) plasmaférese ( ) anti-IL6 (tocilizumabe) ( ) inibidor de JAK

( ) outro – qual: \_\_\_\_\_

Houve necessidade de ventilação mecânica do paciente? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe

Houve necessidade de oxigênio suplementar: ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe

Houve óbito do paciente por COVID-19: ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe

**Ficha D15**

Data de preenchimento da ficha: \_\_\_\_\_

Houve resolução dos sintomas: ( ) sim ( ) não ( ) não se aplica

Surgiram novos sintomas: ( ) não ( ) sim

Se sim, quais: ( ) febre ( ) tosse ( ) dispneia ( ) coriza ( ) espirros ( ) cefaleia ( ) diarreia ( ) odinofagia ( ) astenia ( ) ageusia ( ) anosmia ( ) náuseas ( ) vômitos ( ) tonturas ( ) outros

Saturação de O<sub>2</sub>: \_\_\_\_\_

TC: ( ) vidro fosco <25% ( ) vidro fosco 25-50% ( ) vidro fosco > 50% ( ) consolidação

Achados laboratoriais:

Anemia ( ) Linfopenia ( ) Leucopenia ( ) trombocitopenia ( ) elevação de ferritina ( ) elevação de DHL ( ) elevação de troponina ( ) elevação de CPK ( ) elevação de transaminases ( ) elevação da creatinina ( )

Paciente em: ( ) Isolamento domiciliar ( ) Pronto-Socorro ( ) Internação hospitalar ( ) alta

Houve mudança do tratamento para COVID-19: ( ) não se aplica ( ) não ( ) sim – qual:

( ) apenas suporte ( ) corticoide ( ) enoxaparina ( ) cloroquina ( ) antibiótico – qual: \_\_\_\_\_

( ) ivermectina ( ) nitazoxanida ( ) antiviral (lopinavir / ritonavir / remdesivir) ( ) imunoglobulina ( ) plasmaférese ( ) anti-IL6 (tocilizumabe) ( ) inibidor de JAK

( ) outro – qual: \_\_\_\_\_

Houve necessidade de ventilação mecânica do paciente? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe

Houve necessidade de oxigênio suplementar: ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe

Houve óbito do paciente por COVID-19: ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sabe

## ANEXO C - TCLE

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – via do paciente**

Participação no Projeto “Biomarcadores imunológicos como preditores de prognóstico em pacientes com formas leves e graves de COVID-19”

**I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA**

1.Nome do paciente:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE N° : ..... SEXO : .M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... N° ..... APTO: .....

BAIRRO:.....CIDADE .....

CEP:.....

TELEFONES: DDD(.....).....

EMAIL: .....

Convido você a participar do estudo chamado “Biomarcadores imunológicos como preditores de prognóstico em pacientes com formas leves e graves de COVID-19”.

O objetivo desse estudo é avaliar a diferença do sistema de defesa dos pacientes com as formas leves e graves da infecção por COVID-19.

O estudo trata apenas de coleta de informações e coleta de amostra de sangue. O seu sangue será analisado para avaliar as alterações do seu sistema imune, sendo necessário a coleta de 12 ml de sangue, o equivalente a 1 colher de sopa, em até 4 momentos: no primeiro dia, no sétimo dia e no 15º dia do quadro de infecção pelo COVID-19, caso você esteja apenas em isolamento em casa, ou no primeiro dia, no terceiro dia, no sétimo dia e no décimo quinto dia, caso você precise ficar internado pelo quadro de COVID-19. O sangue coletado será utilizado nas seguintes análises: a) biomarcadores imunológicos circulantes, b) perfil fenotípico e funcional de leucócitos, c) repertório de imunoglobulinas e d) quantificação de anticorpos neutralizantes. As 3 primeiras análises têm como objetivo avaliar as células e anticorpos produzidos pelo organismo contra o COVID-19. A quantificação de anticorpos neutralizantes avalia se há possibilidade de imunidade após a infecção. Essas análises não fazem parte do tratamento da sua doença, sendo usadas apenas para os fins desta pesquisa.

Não existem muitas informações a respeito da diferença do sistema de defesa de pacientes que evoluem com a forma leve e a forma grave de COVID-19. Assim este estudo é importante para

que se possa conhecer um pouco mais sobre esses efeitos. Isso pode ser útil para que os médicos possam ter mais informações no futuro na escolha do melhor tratamento de cada paciente.

Entretanto, o seu tratamento para a doença não será modificado pela pesquisa e não serão testados novos remédios para a doença por essa pesquisa. Seu atendimento não será prejudicado, independentemente de sua decisão de participar ou não da pesquisa. A pesquisa se restringirá ao preenchimento de uma ficha clínica e a coleta de exames de sangue nas datas citadas acima, mas você seguirá no fluxo assistencial (atendimento de rotina do serviço), com acompanhamento médico e realização de exames necessários para sua recuperação, independente de optar por participar ou não desta pesquisa.

Por se tratar de trabalho envolvendo coleta de sangue, os pacientes estão expostos ao risco de hematomas e infecção nos locais da punção. A escolha de profissionais bem treinados pode diminuir a ocorrência de efeitos. O uso de luvas e materiais estéreis descartáveis evita a ocorrência de possíveis infecções associadas ao procedimento. O paciente pode se sentir desconfortável quanto à possibilidade de exposição de seus dados, porém a informação obtida será de uso científico e não será divulgada para outros fins. Todos os dados referentes aos pacientes são confidenciais, e isso será garantido através do anonimato (não identificação) do participante quando do repasse dos dados, os quais serão utilizados exclusivamente para os fins deste estudo. Em nenhum momento haverá liberação de identidade ou quaisquer dados que possam levar à sua identificação.

A sua participação neste estudo é totalmente voluntária, garantindo-se ao profissional plena liberdade de se recusar a participar. Uma vez que você aceite participar do estudo, permanecerá com o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento, sem nenhuma penalização.

Todas as despesas da pesquisa serão de responsabilidade do pesquisador, de forma que você não arcará com qualquer custo referente aos procedimentos e exames do estudo. Fica garantido o acesso aos resultados dos exames ao seu médico ou ao próprio participante sempre que solicitado e/ou indicado. O participante lesado terá direito a solicitar indenização diante de eventuais danos decorrente diretamente da pesquisa.

Para qualquer dúvida ou esclarecimento adicional, você pode entrar em contato com o Dra. Patricia Shu Kurizky, pelo telefone 20285324, ou contactá-lo diretamente no endereço SGAN 604/605, Avenida L2 Norte, Hospital Universitário de Brasília, Ambulatório de Dermatologia, CEP:70919970. A dra. poderá ser encontrada no corredor vermelho, sala B, às sextas feiras, das 8h às 12 horas. Poderá ser feito contato também com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, que tem como objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa e contribuir para o desenvolvimento da pesquisa dentro

dos padrões éticos. Esse contato pode ser feito através do telefone 31071918 ou pelo email cepfm@unb.br, ou pessoalmente no endereço: Faculdade de Medicina da UnB - Campus Universitário Darcy Ribeiro – Asa Norte – DF cep 70910-900, de 8:30-12:30 e de 14:30-16h de segunda a sexta-feira.

Afirmo que recebi uma via deste termo de consentimento para ler antes de assiná-lo, que os detalhes do projeto foram explicados e que mantereí uma cópia deste consentimento em meu poder.

---

Assinatura do participante ou representante

---

Assinatura do Pesquisador

Data

Data

**Termo de Consentimento livre e esclarecido de autorização para coleta, depósito,  
armazenamento e utilização de material biológico humano – via do paciente**

Projeto “Biomarcadores imunológicos como preditores de prognóstico em pacientes com formas leves e graves de COVID-19”

O (A) Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa Biomarcadores imunológicos como preditores de prognóstico em pacientes com formas leves e graves de COVID-19.

Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte de sangue e seus componentes. A utilização do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa, ou se o Sr. (a) concordar, em outras pesquisas futuras.

O (A) Sr. (a) será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar, podendo retirar, a qualquer momento, o seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador.

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e privacidade, sendo que os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos e após esse tempo serão destruídos. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Hospital Universitário de Brasília e a outra será fornecida a (o) Sr. (a).

Caso haja danos decorrentes dos riscos desta pesquisa, o pesquisador assumirá a responsabilidade pelo ressarcimento e pela indenização.

Afirmo que recebi uma via deste termo de consentimento para ler antes de assiná-lo, que os detalhes do projeto foram explicados e que mantereí uma cópia deste consentimento em meu poder.

---

Assinatura do participante ou representante

---

Assinatura do Pesquisador

Data

Data

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – via do pesquisador

Participação no Projeto “Biomarcadores imunológicos como preditores de prognóstico em pacientes com formas leves e graves de COVID-19”

#### I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

1.Nome do paciente:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO:.....CIDADE .....

CEP:.....

TELEFONES: DDD(.....).....

EMAIL: .....

Convido você a participar do estudo chamado “Biomarcadores imunológicos como preditores de prognóstico em pacientes com formas leves e graves de COVID-19”.

O objetivo desse estudo é avaliar a diferença do sistema de defesa dos pacientes com as formas leves e graves da infecção por COVID-19.

O estudo trata apenas de coleta de informações e coleta de amostra de sangue. O seu sangue será analisado para avaliar as alterações do seu sistema imune, sendo necessário a coleta de 12 ml de sangue, o equivalente a 1 colher de sopa, em até 4 momentos: no primeiro dia, no sétimo dia e no 15º dia do quadro de infecção pelo COVID-19, caso você esteja apenas em isolamento em casa, ou no primeiro dia, no terceiro dia, no sétimo dia e no décimo quinto dia, caso você precise ficar internado pelo quadro de COVID-19. O sangue coletado será utilizado nas seguintes análises: a) biomarcadores imunológicos circulantes, b) perfil fenotípico e funcional de leucócitos, c) repertório de imunoglobulinas e d) quantificação de anticorpos neutralizantes. As 3 primeiras análises têm como objetivo avaliar as células e anticorpos produzidos pelo organismo contra o COVID-19. A quantificação de anticorpos neutralizantes avalia se há possibilidade de imunidade após a infecção. Essas análises não fazem parte do tratamento da sua doença, sendo usadas apenas para os fins desta pesquisa.

Não existem muitas informações a respeito da diferença do sistema de defesa de pacientes que evoluem com a forma leve e a forma grave de COVID-19. Assim este estudo é importante para que se possa conhecer um pouco mais sobre esses efeitos. Isso pode ser útil para que os médicos possam ter mais informações no futuro na escolha do melhor tratamento de cada paciente.

Entretanto, o seu tratamento para a doença não será modificado pela pesquisa e não serão testados novos remédios para a doença por essa pesquisa. Seu atendimento não será prejudicado, independentemente de sua decisão de participar ou não da pesquisa. A pesquisa se restringirá ao preenchimento de uma ficha clínica e a coleta de exames de sangue nas datas citadas acima, mas você seguirá no fluxo assistencial (atendimento de rotina do serviço), com acompanhamento médico e realização de exames necessários para sua recuperação, independente de optar por participar ou não desta pesquisa.

Por se tratar de trabalho envolvendo coleta de sangue, os pacientes estão expostos ao risco de hematomas e infecção nos locais da punção. A escolha de profissionais bem treinados pode diminuir a ocorrência de efeitos. O uso de luvas e materiais estéreis descartáveis evita a ocorrência de possíveis infecções associadas ao procedimento. O paciente pode se sentir desconfortável quanto à possibilidade de exposição de seus dados, porém a informação obtida será de uso científico e não será divulgada para outros fins. Todos os dados referentes aos pacientes são confidenciais, e isso será garantido através do anonimato (não identificação) do participante quando do repasse dos dados, os quais serão utilizados exclusivamente para os fins deste estudo. Em nenhum momento haverá liberação de identidade ou quaisquer dados que possam levar à sua identificação.

A sua participação neste estudo é totalmente voluntária, garantindo-se ao profissional plena liberdade de se recusar a participar. Uma vez que você aceite participar do estudo, permanecerá com o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento, sem nenhuma penalização.

Todas as despesas da pesquisa serão de responsabilidade do pesquisador, de forma que você não arcará com qualquer custo referente aos procedimentos e exames do estudo. Fica garantido o acesso aos resultados dos exames ao seu médico ou ao próprio participante sempre que solicitado e/ou indicado. O participante lesado terá direito a solicitar indenização diante de eventuais danos decorrente diretamente da pesquisa.

Para qualquer dúvida ou esclarecimento adicional, você pode entrar em contato com o Dra. Patricia Shu Kurizky, pelo telefone 20285324, ou contactá-lo diretamente no endereço SGAN 604/605, Avenida L2 Norte, Hospital Universitário de Brasília, Ambulatório de Dermatologia, CEP:70919970. A dra. poderá ser encontrada no corredor vermelho, sala B, às sextas feiras, das 8h às 12 horas. Poderá ser feito contato também com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, que tem como objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa e contribuir para o desenvolvimento da pesquisa dentro dos padrões éticos. Esse contato pode ser feito através do telefone 31071918 ou pelo email [cepfm@unb.br](mailto:cepfm@unb.br), ou pessoalmente no endereço: Faculdade de Medicina da UnB - Campus

Universitário Darcy Ribeiro – Asa Norte – DF cep 70910-900, de 8:30-12:30 e de 14:30-16h de segunda a sexta-feira.

Ao concordar em participar da pesquisa, em relação ao armazenamento das amostras coletadas no biorrepositório:

- Concordo que minhas amostras sejam armazenadas neste biorrepositório
- Não concordo que minhas amostras sejam armazenadas neste biorrepositório e que somente os exames aqui propostos podem ser realizados, com descarte imediato das amostras após processamento.

Obs\_ Sobre as amostras contidas no biorrepositório, qualquer processamento não previsto neste projeto só será feito após aprovação por este Comitê de Ética em Pesquisa e após consentimento assinado por você.

Afirmo que recebi uma via deste termo de consentimento para ler antes de assiná-lo, que os detalhes do projeto foram explicados e que mantereí uma cópia deste consentimento em meu poder.

---

Assinatura do participante ou representante

---

Assinatura do Pesquisador

Data

Data

**Termo de Consentimento livre e esclarecido de autorização para coleta, depósito, armazenamento e utilização de material biológico humano – via do pesquisador**

Projeto “Biomarcadores imunológicos como preditores de prognóstico em pacientes com formas leves e graves de COVID-19”

O (A) Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa Biomarcadores imunológicos como preditores de prognóstico em pacientes com formas leves e graves de COVID-19.

Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte de sangue e seus componentes. A utilização do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa, ou se o Sr. (a) concordar, em outras pesquisas futuras.

O (A) Sr. (a) será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar, podendo retirar, a qualquer momento, o seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador.

O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e privacidade, sendo que os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos e após esse tempo serão destruídos. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Hospital Universitário de Brasília e a outra será fornecida a (o) Sr. (a).

Caso haja danos decorrentes dos riscos desta pesquisa, o pesquisador assumirá a responsabilidade pelo ressarcimento e pela indenização.

Afirmo que recebi uma via deste termo de consentimento para ler antes de assiná-lo, que os detalhes do projeto foram explicados e que manterei uma cópia deste consentimento em meu poder.

---

Assinatura do participante ou representante

---

Assinatura do Pesquisador

Data

Data