



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Gabriela Batista Cordeiro Deckmann

Avaliação de danos ao DNA e alterações nucleares em leucócitos de indivíduos com diagnóstico de COVID-19

Florianópolis
2024

Gabriela Batista Cordeiro Deckmann

Avaliação de danos ao DNA e alterações nucleares em leucócitos de indivíduos com diagnóstico de COVID-19

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientador(a): Prof. Dr. Sharbel Weidner Maluf

Florianópolis

2024

Deckmann, Gabriela Batista Cordeiro

Avaliação de danos ao DNA e alterações nucleares em leucócitos de indivíduos com diagnóstico de COVID-19 / Gabriela Batista Cordeiro Deckmann ; orientador, Sharbel Weidner Maluf, 2024.

69 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Dano de DNA. 3. Micronúcleo. 4. SARS-CoV-2. 5. Ensaio cometa. I. Maluf, Sharbel Weidner. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Gabriela Batista Cordeiro Deckmann

Avaliação de danos ao DNA e alterações nucleares em leucócitos de indivíduos com diagnóstico de COVID-19

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 30 de julho de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a Claudia Regina dos Santos, Dr^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a Maria Luiza Bazzo, Dr^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Farmácia.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Sharbel Weidner Maluf, Dr
Orientador

Florianópolis, 2024

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi elaborado com o auxílio de múltiplas mãos, que dedicaram de várias formas o seu tempo, as habilidades técnicas, o ensino, a paciência e o zelo na realização de cada etapa até a sua conclusão.

Agradeço imensamente a Deus, que é o meu guia de vida e o meu auxílio na busca do equilíbrio entre os estudos, família, trabalho, saúde, lazer, vida pessoal e espiritual.

Aos pacientes envolvidos na pesquisa eu sou grata, pois dispuseram do seu tempo e atenção, ainda que em meio à enfermidade, para responder as perguntas do questionário e permitir a coleta do material utilizado.

Aos meus pais Bento e Valéria, pelos seus esforços para que eu chegasse até aqui.

Agradeço pelo auxílio incansável do meu amado esposo Gustavo Henrique Deckmann, pelo apoio incondicional e pela dedicação diária à nossa família, ao nosso lar e à realização os nossos sonhos.

Ao professor Dr. Sharbel Weidner Maluf, pela oportunidade em dar continuidade ao projeto já iniciado durante a pandemia da covid-19. Agradeço pela paciência durante o meu processo de aprendizado, pelo apoio, pelos ensinamentos, atenção e discussões por todo período de execução deste trabalho. Agradeço também à Prof^ª Juliana Dal-Ri Lindenau, que conduziu parte da coleta de dados, como também aos colegas que fizeram parte da coleta e processamento das amostras.

À Natali Silva Cardoso, por ter me acolhido no laboratório, por ter dedicado o seu tempo em tantas etapas deste trabalho, pelo seu envolvimento nas técnicas, nas análises estatísticas, pelos ensinamentos teóricos comigo compartilhados, pela persistência, curiosidade, pelo compartilhar do dia-a-dia e conversas de força e encorajamento.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Citogenética e Estabilidade Genômica por todo o aprendizado, pelo auxílio na realização das técnicas laboratoriais, pelo zelo com os produtos deste trabalho e também pelas boas risadas e o compartilhar da rotina, que tornaram as minhas manhãs mais leves.

Aos membros da banca examinadora, a Prof^ª Dr^a Cláudia Regina dos Santos e a Prof^ª Dr^a M^a Luiza Bazzo, agradeço pelas sugestões e feedbacks que engrandeceram o trabalho desde a qualificação e à Prof^ª Dr^a Flávia Martinello, por estar à disposição em caso de intercorrências.

Ao programa de Pós-Graduação em Farmácia (PGFAR), o que inclui a coordenação, docentes, secretaria e colegas de turma, que compartilharam as salas de aula, os cafés nos intervalos e os trabalhos em equipe.

Quando você contempla a elegância e a beleza da ciência que está se desdobrando em nosso entendimento da estrutura do DNA e na complexidade da célula, a assinatura de Deus se torna quase inconfundível. O DNA é como a linguagem de Deus (*Collins, 2006*).

RESUMO

A pandemia de covid-19, causada pela infecção por SARS-CoV-2, teve início em dezembro de 2019 na província de Wuhan, China. Teve duração de três anos e se espalhou por mais de 200 países, obtendo uma taxa de mortalidade de 3,4%. Os sintomas mais comuns incluem tosse, febre alta, vômito, diarreia, perdas de olfato e paladar. Indivíduos em estado crítico podem apresentar falência respiratória, danos cardíacos, choque séptico e falência múltipla de órgãos. O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA da família Coronaviridae, que dentre as suas proteínas estruturais está a proteína spike, responsável pela entrada do vírus nas células que possuem o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), com destaque para as células do tecido pulmonar. A ativação do sistema imune e liberação de citocinas e quimiocinas tem sido relatada como a principal característica na gravidade da covid-19. O estresse oxidativo integra a cascata inflamatória, sendo responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio, que também desempenham um papel crítico no dano celular pela indução ao dano no DNA celular. Este trabalho objetiva avaliar o dano de DNA em leucócitos do sangue periférico de indivíduos diagnosticados com covid-19 no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU – UFSC). Trata-se de um estudo transversal, retrospectivo, analítico, descritivo e comparativo de alterações nucleares em sangue periférico. As análises foram conduzidas a partir de um total de 57 amostras pertencentes ao grupo caso e 43 amostras do grupo controle. As amostras foram submetidas ao Ensaio Cometa, que estima o Índice Total de Dano (ITD) e à Técnica de micronúcleos com bloqueio da citocinese celular (CBMN cytome), que permitem a análise de frequências de micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PNP) e brotos nucleares (NBud). Houve predominância do sexo masculino (61,4%) e idade média de $51,49 \pm 16,34$ anos. Hipertensão e diabetes foram as comorbidades mais prevalentes, representando 47,37% e 26,32% da população. Quanto à classificação dos casos, 28,07% moderados, 24,56% leves, 22,81% graves e 3,51% foram fatais. Houve diferença entre o grupo caso e controle quanto ao índice de dano total pelo Ensaio cometa, obtendo aumento de dano no grupo caso quando comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$). Quanto à técnica CBMN cytome, houve um aumento de NBuds ($p < 0,001$) de PNP ($p < 0,0001$), mas não de MN ($p = 0,6101$). Foi encontrada correlação positiva entre a idade e a frequência de NBuds. Não foi encontrada relação entre o dano de DNA e a prática regular de atividades físicas, hábitos alimentares saudáveis, tabagismo e classificação final dos casos. Os indivíduos com covid-19 apresentaram dano de DNA antes e após o sistema de reparo do DNA celular. Este trabalho não apenas contribui para o entendimento dos efeitos celulares da covid-19, mas traz à discussão o seu potencial de mutagenicidade, podendo ter contribuição com o desenvolvimento do câncer, embora seja esta uma condição clínica de origem multifatorial.

Palavras-chave: Dano de DNA, COVID-19, SARS-CoV-2, Ensaio cometa.

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic, caused by the SARS-CoV-2 virus, began in December 2019 in Wuhan, China. It lasted for three years, spreading to over 200 countries, and had a mortality rate of 3.4%. The most common symptoms include cough, high fever, vomiting, diarrhea, and olfactory and taste disorders. Critically ill individuals may experience respiratory failure, cardiac damage, septic shock, and multiple organ failure. SARS-CoV-2 is an RNA virus that belongs to the Coronaviridae family. Its surface is involved with spike proteins, responsible for viral entry into cells possessing the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor, notably in pulmonary tissue cells. Activation of the immune system and the release of cytokines and chemokines are prime characteristics in the severity of the disease. Oxidative stress is part of the inflammatory cascade and is responsible for the production of reactive oxygen species. These species play a critical role in cellular damage and can induce DNA damage. We aimed to assess DNA damage in peripheral blood leukocytes of individuals diagnosed with COVID-19 at the Polydoro Ernani de São Thiago University Hospital (HU – UFSC). It was a cross-sectional, retrospective, analytical, descriptive, and comparative study of nuclear alterations in peripheral blood. We conducted analysis on a total of 57 samples from the case group and 43 samples from the control group. We performed a Comet Assay to estimate the DNA Damage Index, and the Cytokinesis-Block Micronucleus (CBMN cytome) assay to estimate micronucleus (MN), nucleoplasmic bridge (NPB), and nuclear bud (NBud) frequencies. Males were predominant (61.4%), and the average age was 51.49 ± 16.34 years. Hypertension and diabetes were the most prevalent comorbidities, representing 47.37% and 26.32% of the population. 28.07% of cases were classified as moderate, 24.56% mild, 22.81% severe, and 3.51% of cases were fatal. We found a significant difference between the case and control groups regarding the total damage index by the Comet Assay, with increased damage in the case group compared to the control group ($p < 0.0001$). Concerning the CBMN cytome technique, there was an increase in NBuds ($p < 0.001$) and NPBs ($p < 0.0001$), but not in MNi ($p = 0.6101$). We found positive correlation between age and NBud frequency. There was no association between DNA damage and regular physical activity, healthy eating habits, smoking, and final case classification. Individuals with COVID-19 exhibited DNA damage before and after the cellular DNA repair system. This study not only contributes to understanding the cellular effects of COVID-19 but also raises the discussion about its potential mutagenicity, potentially contributing to cancer development, although this is a clinical condition with multifactorial origins.

Keywords: DNA damage; COVID-19; SARS-CoV-2; CBMN *cytome*; Comet assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura e genoma do SARS-CoV-2	20
Figura 2 – Representação estrutural da subunidade S1 da proteína spike.....	21
Figura 3 – Fisiopatologia da covid-19.....	22
Figura 4 – Representação esquemática dos danos causados ao DNA.....	26
Figura 5 – Classificação da intensidade dos danos de DNA pelo ensaio cometa	30
Figura 6 – Alterações nucleares visualizadas a partir do ensaio CBMN cytome.....	31
Figura 7 – Alterações encontradas pela técnica CBMN cytome	33
Figura 8 – Fluxograma com os valores amostrais dos grupo caso e controle.....	41
Figura 9 – Comorbidades relatadas no grupo caso.....	44
Figura 10 - Classificação final dos casos.....	45
Figura 11 - Índice total de dano de DNA obtido pelo ensaio cometa nos grupos avaliados.....	46
Figura 12 - Frequência de micronúcleos nos grupos caso e controle.....	47
Figura 13 - Frequência de pontes nucleoplasmáticas nos grupos caso e controle.....	47
Figura 14 - Frequência de brotos nucleares nos grupos caso e controle.....	48
Figura 15 - Relação entre a presença de comorbidades no grupo caso e dano de DNA.....	49
Figura 16 - Correlação entre a presença de brotos nucleares no grupo caso e idade.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização dos grupos caso e controle por sexo e idade	42
Tabela 2 – Caracterização da população avaliada (grupo caso).....	43
Tabela 3 – Correlações entre as variáveis avaliadas no grupo caso.....	50
Tabela 4 – Correlações entre as variáveis avaliadas no grupo controle	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBMN Cytome	Técnica de micronúcleos com bloqueio da citocinese celular
Covid-19	Coronavirus Disease 2019
DDR	Mecanismo de resposta ao dano de DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPC	Ligação cruzada entre fitas de DNA e proteínas
DSB	Quebra de fita dupla
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
ERO	Espécie reativa de oxigênio
HU - UFSC	Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago
IHR	<i>International Health Regulations</i>
ITD	Índice total de dano
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
MN	Micronúcleo
NBud	Broto nuclear
NOX	NADPH oxidase
OMS	Organização Mundial da Saúde ok
ORF	Quadro de leitura aberta
PNP	Ponte nucleoplasmática
RBD	Domínio de ligação ao receptor
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA +	Fita de RNA de sentido positivo
RT – PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Virus</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SCGE	Ensaio cometa
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
sECA2	ECA2 solúvel
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
SSB	Quebra de fita simples
TMPRSS2	Serina protease transmembrana 2
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivo geral	17
1.1.2 Objetivos específicos	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 COVID-19	18
2.1.1 A estrutura do vírus SARS-COV-2	19
2.1.2 Fisiopatologia da doença	19
2.1.3 Indução ao estresse oxidativo e o papel das espécies reativas de oxigênio	23
2.2 DO ESTRESSE OXIDATIVO À INSTABILIDADE GENÔMICA: A INFLUÊNCIA DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO DANO DE DNA	24
2.2.1 A origem das EROs e sua importância no equilíbrio das funções vitais	24
2.2.3 Relação entre covid-19 e doenças crônicas	27
2.3 MUTAGENICIDADE E GENOTOXICIDADE.....	28
2.3.1 Avaliação de genotoxicidade através do Ensaio Cometa	29
2.3.2 O ensaio CBMN cytome e a avaliação dos biomarcadores da mutagenicidade	30
2.3.2.1 <i>Micronúcleo (MN)</i>	31
2.3.2.2 <i>Pontes nucleoplasmáticas (PNPs)</i>	32
2.3.2.3 <i>Brotos nucleares (NBuds)</i>	32
2.3.3 Estudos recentes sobre a relação entre SARS-CoV-2 e dano de DNA	33
3 METODOLOGIA	34
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	34
3.2 CASUÍSTICA.....	34
3.2.1 Desenho amostral	34
3.2.2 Critérios de inclusão e exclusão para o grupo caso e controle	35
3.3 DADOS CLÍNICOS	35
3.4 COLETAS, PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS.....	36
3.5 CBMN CYTOME	37
3.5.1 Cultura celular	37
3.5.2 Preparação das lâminas	37

3.5.3 Análise das lâminas	37
3.6 ENSAIO COMETA.....	38
3.6.1 Preparação das lâminas	38
3.6.2 Eletroforese de célula única	38
3.6.3 Coloração das lâminas.....	39
3.6.4 Leitura das lâminas	39
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
4 RESULTADOS	40
4.1 PERFIL DA POPULAÇÃO AVALIADA	41
4.2 MARCADORES DA INSTABILIDADE GENÔMICA	45
4.2.1 Ensaio cometa	45
4.2.2 Técnica de micronúcleos com bloqueio da citocinese celular (CBMN Cytome).....	46
4.3 CORRELAÇÕES	50
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO A.....	64
ANEXO B.....	67

1 INTRODUÇÃO

A ameaça contínua à saúde humana apresentada pelos surtos de coronavírus tem despertado grande preocupação global, não apenas devido à sua virulência, mas também ao seu potencial de causar emergências de saúde pública e impactar a economia mundial. Antes do surto de SARS-CoV-2 (do inglês, *Severe Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), que resultou na pandemia da covid-19 (do inglês, *Coronavirus Disease 2019*), houve dois casos anteriores que deixaram marcas na saúde pública: o primeiro ocorreu em 2002, com o surto de SARS-CoV (do inglês, *Severe Acute Respiratory Virus*), e o segundo em 2012, com o MERS-CoV (do inglês, *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*). Ambos foram marcados por uma alta taxa de letalidade, respectivamente 10% e 35%, evidenciando a gravidade dessas infecções respiratórias (KIRTIPAL; BHARADWAJ; KANG, 2020).

O advento da covid-19 marcou o terceiro grande surto de coronavírus, desencadeando a mais recente pandemia que afetou mais de 200 países. Sendo responsável por aproximadamente 776 milhões de óbitos no mundo até o mês de agosto de 2024 (WHO, 2024), a covid-19 representou uma ameaça sem precedentes à saúde global, desencadeando uma grave crise de saúde pública. Após três anos de disseminação, em maio de 2023, o Comitê de Emergência da *International Health Regulations* (IHR), setor da Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu que a covid-19 não constituía mais uma emergência de saúde pública de importância internacional (WHO, 2023).

A infecção por SARS-CoV-2 resulta na desregulação de diversas vias celulares, como as ligadas à resposta imune, inflamação, estresse oxidativo, metabolismo do RNA, homeostase, regulação do ciclo celular, senescência, autofagia e apoptose. Recentemente, tem sido observado que SARS-CoV-2 pode causar danos ao DNA da célula hospedeira e que interage de maneira complexa com o mecanismo de resposta ao dano de DNA (DDR). Desta forma, este trabalho explora a relação entre a instabilidade genômica e a infecção por SARS-CoV-2, examinando os mecanismos patológicos subjacentes já relatados em literatura e fazendo uso de técnicas laboratoriais que permitem visualizar o dano de DNA antes e após o sistema de reparo do DNA celular.

OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o dano de DNA em leucócitos do sangue periférico de indivíduos diagnosticados com covid-19 no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU – UFSC).

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Determinar os índices de quebra de fita simples, dupla e alterações estruturais sensíveis ao pH alcalino das fitas de DNA, a partir do ensaio cometa em amostras de sangue periférico de indivíduos com diagnóstico de covid-19 e controles;
- b) Determinar as frequências de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares, obtidos a partir da técnica CBMN cytome (*do inglês, Cytokinesis-block micronucleus cytome*) em amostras de sangue periférico de indivíduos diagnosticados com covid-19 e controles;
- c) Verificar a associação entre os danos ao DNA, fatores clínicos, sociodemográficos e a gravidade da doença.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 COVID-19

Os surtos de coronavírus são uma ameaça contínua à saúde humana devido à sua virulência e seu potencial de eclosão de emergências, o que afeta também a economia global. Antes do surto de SARS-CoV-2, houve dois casos anteriores que causaram graves consequências respiratórias. O primeiro, em novembro de 2002, iniciado em Foshan, na China, se tornou uma infecção global em 2003 e obteve uma taxa de letalidade de 10% no mundo. Uma década depois, o vírus MERS-CoV causou a segunda epidemia em Jeddah, na Arábia Saudita, com uma taxa de letalidade de 35%. A covid-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, foi o terceiro grande surto, gerando a mais recente pandemia. Essa foi iniciada em dezembro de 2019 na província de Wuhan, China (KIRTIPAL; BHARADWAJ; KANG, 2020).

Os sintomas mais comuns incluem tosse, febre alta, vômito e diarreia. Perdas de olfato e paladar também foram identificados como sintomas específicos da infecção, especialmente nos países ocidentais. Por isso, os sintomas respiratórios da covid-19 podem ser confundidos com os da rinite alérgica e do resfriado comum. As manifestações de pele incluem erupções vesiculares, urticária e erupções maculopapulares, necrose e outras formas de vasculite. Essas manifestações são mais comuns entre europeus e norte-americanos. (ZHANG et al., 2022).

Com base na apresentação dos sintomas, a infecção por SARS-CoV-2 pode ser categorizada em casos assintomáticos, leves, moderados, graves e críticos. O indivíduo assintomático permanece sem febre e não apresenta nenhum sintoma. Quem tem sintomas leves a moderados pode apresentar pneumonia leve, enquanto em pacientes graves são detectados sintomas como tosse, dispneia, infiltrados no tórax e aumento da frequência respiratória. Indivíduos em estado crítico podem apresentar falência respiratória, danos cardíacos, choque séptico e falência múltipla de órgãos (PRADHAN et al., 2021).

É relatado que a doença se espalhou por mais de 200 países e foi responsável por uma taxa de mortalidade de 3,4%. A pandemia durou três anos e no dia 5 de maio de 2023, após a 15ª reunião do Comitê de Emergência da *International Health Regulations* (IHR), foi estabelecido que a covid-19 passou a ser um problema de saúde conhecido e contínuo e que não se constitui mais uma emergência de saúde pública de importância mundial (WHO, 2013; WORLDOMETERS, 2023).

2.1.1 A estrutura do vírus SARS-COV-2

SARS-COV-2 é o sétimo membro dos coronavírus que infectam humanos após MERS-COV e SARS-COV e faz parte do gênero BetaCov, na sub-família Coronavirinae da família Coronaviridae. Proteínas estruturais e não estruturais no genoma do vírus são codificadas nas sequências do quadro de leitura aberta (do inglês *open reading frame*, ou ORF).

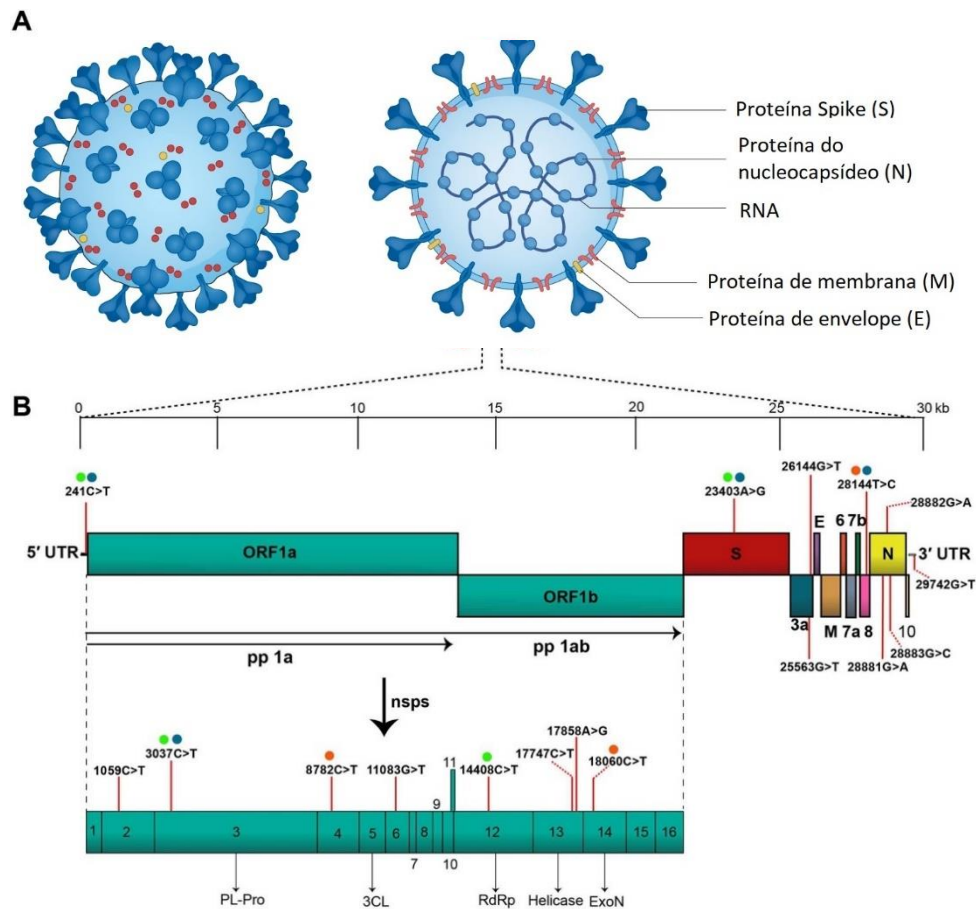
Dentre as proteínas codificadas, estão a proteína S (do inglês *spike*), que são projeções de cerca de 9 a 12 nm do envelope viral que fornece uma estrutura em forma de coroa se visualizada ao microscópio eletrônico. Também são codificadas as proteínas do envelope (E), de membrana (M) e do nucleocapsídeo viral (N), sendo essa responsável pela proteção do RNA viral (Figura 1) (KIRTIPAL; BHARADWAJ; KANG, 2020; ABULSOUND et al., 2023).

O sequenciamento do genoma de SARS-CoV-2 revelou que se trata de um vírus formado por uma fita simples de RNA de sentido positivo não segmentada. Esse material está envolto em partículas de simetria icosaédrica, com um diâmetro de 80 – 220 nm. O seu genoma contém cerca de 29.903 nucleotídeos, com duas regiões não traduzíveis nas terminações 5' e 3' e 12 ORFs que codificam 27 proteínas. O principal ORF (ORF1/ab) compreende cerca de 70% do genoma da terminação 5' (ABULSOUND et al., 2023; RAHIMI; MIRZAZADEH; TAVAKOLPOUR, 2021) (Figura 1).

2.1.2 Fisiopatologia da doença

A proteína spike de SARS-CoV-2 possui dois domínios na subunidade S1: o domínio de ligação ao receptor (RBD, do inglês *receptor-binding domain*) e um domínio N-terminal (NTD) (Figura 2) (MENDIOLA-SALAZAR et al., 2024). O vírus entra nas células hospedeiras através do RBD (receptor-binding domain) da proteína spike, aos receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) presentes no epitélio respiratório. Após essa ligação, a serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2) do hospedeiro ativa a subunidade S2 da proteína spike, facilitando a entrada do vírus na célula e permitindo a sua posterior replicação. Os receptores da ECA2 também estão presentes em outros órgãos, como o esôfago superior, os enterócitos do íleo, as células do miocárdio, as células tubulares proximais dos rins e as células uroteliais da bexiga, sugerindo o desenvolvimento de suas disfunções no curso da infecção por SARS-CoV-2 (CASCELLA et al., 2021). O vírus também é provavelmente patogênico no tecido testicular, expressando preocupações sobre a fertilidade em homens jovens (JASICZEK et al., 2024).

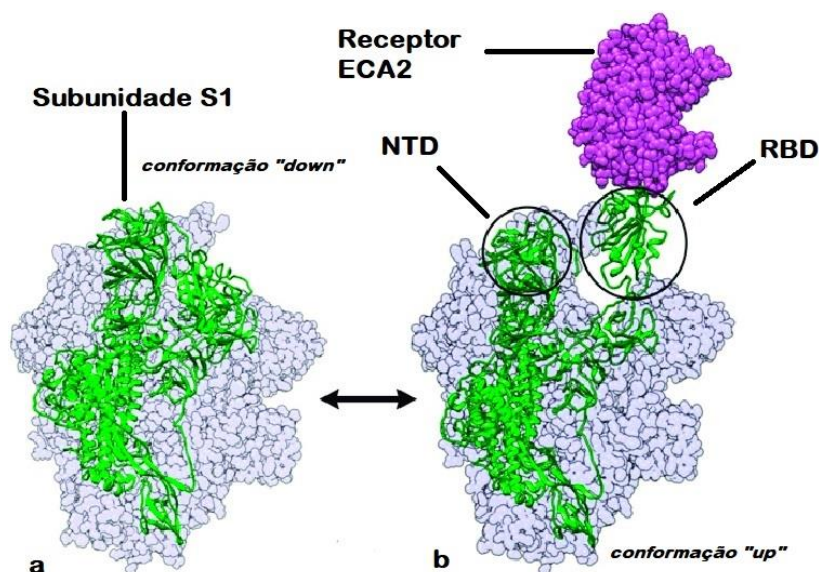
Figura 1 – Estrutura e genoma do SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de Rahimi, Mirzazadeh e Tavakolpour (2021)

Legenda: **(A)** Estrutura de SARS-CoV-2: O vírion é encoberto pelas proteínas spike (S), proteínas de membrana (M) e de envelope (E). O RNA é cercado por proteínas do nucleocapsídeo (N) fosforiladas dentro de bicamadas fosfolipídicas. **(B)** Representação esquemática do genoma de SARS-CoV-2: Compreende 29.903 nucleotídeos, sendo as regiões 5'UTR e 3'UTR não traduzíveis (do inglês, *untranslated region*). As regiões ORF1a/b codificam 16 proteínas não estruturais (indicada na figura por nsps, do inglês *non-structural proteins*), ou para replicação. Também são indicados os quatro genes que codificam as proteínas estruturais (S, E, M, N) e seis proteínas acessórias: ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 e ORF10.

Figura 2: Representação estrutural da subunidade S1 da proteína spike



Fonte: Adaptado de Ray, Le e Andricioaei (2021)

Figura 2: Representação estrutural da subunidade S1 da proteína spike em sua conformação (a) "down", na qual o sítio de ligação de RBD ao receptor celular ECA-2 está bloqueado e em sua conformação (b) "up", quando o RBD está numa conformação na qual permite a interação com o receptor ACE2 humano. NTD: domínio n-terminal, constituinte da subunidade S1 da proteína spike.

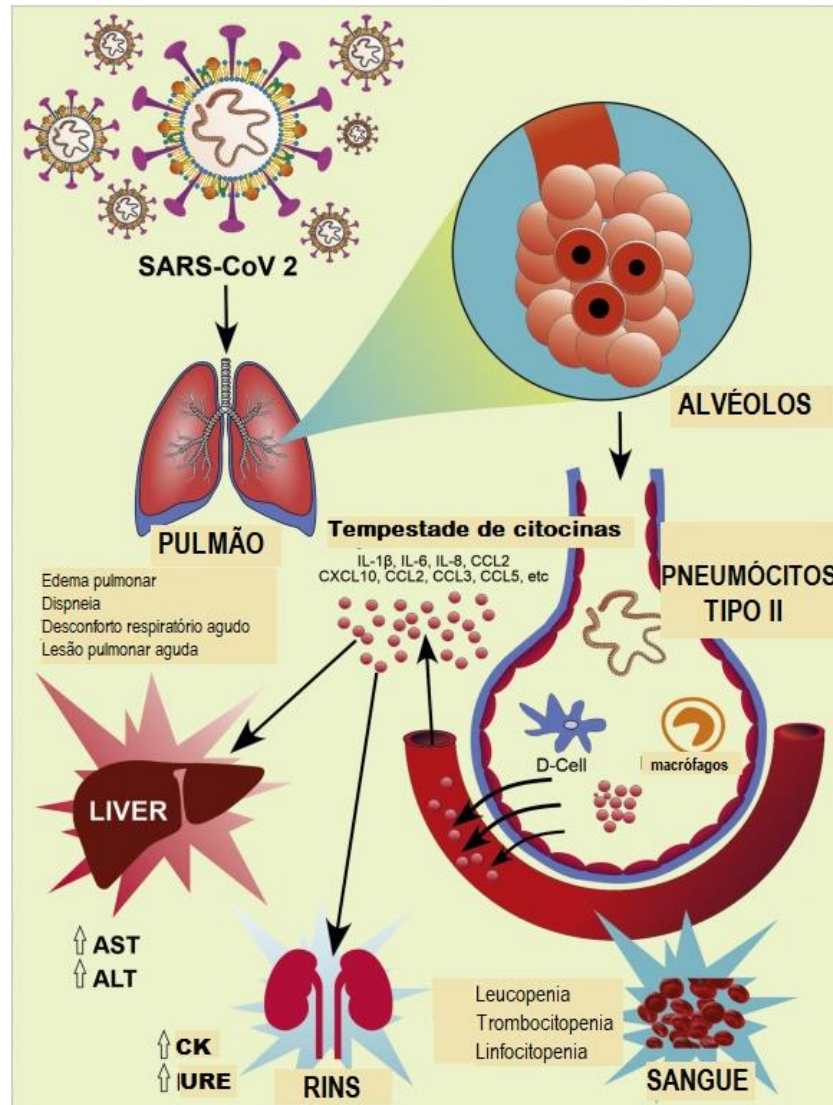
Após a infecção por SARS-CoV-2, o sistema imunológico é ativado por meio do recrutamento de células T, macrófagos e células dendríticas. Essas células imunológicas secretam moléculas, citocinas e quimiocinas para combater a infecção viral. A liberação de citocinas tem sido relatada como a principal característica na gravidade da covid-19 (TIAN et al., 2021) (Figura 3).

As características de uma resposta leve à liberação de citocinas na infecção incluem aumento da temperatura corporal, mialgia, artralgia, náuseas, erupções cutâneas e outros sintomas semelhantes aos da gripe. Ao passo em que a ativação de células de defesa acontece, o organismo inicia também processos de reparação compensatória para restaurar os tecidos danificados (WANG et al., 2020).

A "tempestade de citocinas" (também conhecida como "tempestade de inflamação") refere-se a uma hiperativação descontrolada de células imunes, citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α) e quimiocinas (KALYANARAMAN, 2021). Na covid-19, a tempestade de citocinas é mais comum em pacientes com sintomas graves a críticos, promovendo dano alveolar difuso caracterizado pela formação de membrana hialina e infiltração de linfócitos intersticiais (WANG et al., 2020). Idade, sexo e comorbidades preexistentes, incluindo câncer,

diabetes e doenças cardiovasculares, são os principais fatores de risco para pacientes com covid-19 (TIAN et al., 2021).

Figura 3. Fisiopatologia da covid-19



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

Figura 3: Fisiopatologia da covid-19. A proteína RBD da subunidade S1 das proteínas spikes se ligam ao receptor ECA2 humano, particularmente em pneumócitos tipo 2 do tecido pulmonar, causando lesão tecidual. Os receptores ECA2 expressos em outros tecidos como mucosa oral, células endoteliais vasculares, trato gastrointestinal, rim coração, também ficam propensos à invasão pelo SARS-CoV-2. Além disso, o vírus ativa a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro. A desregulação descontrolada à resposta imune contra a infecção pode causar a liberação excessiva de mediadores pró-inflamatórios e levar à tempestade de citocinas, causando danos prejudiciais a nível sistêmico

Um vírus de RNA pode causar danos ao DNA de várias maneiras, apesar de seu material genético ser composto por RNA. Por exemplo, pela indução de uma resposta imune que leva à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), ou pela inflamação crônica, mantendo as células sob estresse oxidativo através da produção constante de mediadores inflamatórios e

EROs, aumentando a probabilidade de danos ao DNA e prejudicando a capacidade das células de reparar esses danos de maneira eficaz. Também podem interferir nos mecanismos de reparo de DNA da célula hospedeira, sequestrando proteínas essenciais para a replicação e manutenção do DNA, redirecionando-as para suportar a replicação viral. Esses mecanismos podem resultar em consequências celulares que podem incluir mutações, transformação celular e carcinogênese (GRAND, 2023).

2.1.3 Indução ao estresse oxidativo e o papel das espécies reativas de oxigênio

Como a ECA2 é um receptor essencial para a entrada de SARS-CoV-2 nas células hospedeiras, considera-se que a ECA2 solúvel (sECA2) liberada no fluido extracelular poderia se ligar aos vírions circulantes, possivelmente reduzindo a infectividade do vírus. No entanto, estudos revelaram que a atividade plasmática sECA2 está positivamente correlacionada com a gravidade e a mortalidade da covid-19. Acredita-se que a infecção por SARS-CoV-2 possa levar à redução da expressão de ECA2, principalmente devido ao progresso do dano pulmonar. Isso resulta no aumento da angiotensina II pela enzima ECA, causando a hiperativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Essa hiperativação pode agravar o dano pulmonar ao intensificar a resposta inflamatória, provocando uma tempestade de citocinas e ativando o sistema NADH/NADPH oxidase, exacerbando o vasoespasma. Durante a evolução da doença, a diminuição da ECA2 pode favorecer o edema, a inflamação e o estresse oxidativo (JASICZEK et al., 2024).

A redução da expressão de ECA2 e a subsequente hiperativação do SRAA não apenas agravam o dano pulmonar através da tempestade de citocinas, mas também estão diretamente ligados à produção aumentada de EROs. A ativação do sistema NADH/NADPH oxidase é um dos principais mecanismos pelos quais a inflamação induzida pela covid-19 exacerba o estresse oxidativo. As EROs desempenham um papel crítico no dano celular e na progressão da inflamação, tornando-se um ponto central na compreensão da patogênese da covid-19.

2.2 DO ESTRESSE OXIDATIVO À INSTABILIDADE GENÔMICA: A INFLUÊNCIA DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO DANO DE DNA

2.2.1 A origem das EROs e sua importância no equilíbrio das funções vitais

As EROs são moléculas ou íons formados pela redução incompleta de um elétron do oxigênio (CHEN; AZAD; GIBSON, 2009). Participam ativamente na regulação da homeostase celular e atuam como principais moduladores da disfunção celular, contribuindo para a fisiopatologia das doenças. As EROs são subprodutos de inúmeras reações enzimáticas em vários compartimentos celulares, incluindo o citoplasma, a membrana celular, o retículo endoplasmático, as mitocôndrias e os peroxissomos, como parte da função metabólica basal (FORRESTER et al., 2018).

Os três produtos primários são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO^{\cdot}), chamados de EROs porque são compostos contendo oxigênio com propriedades reativas. $O_2^{\cdot-}$ e HO^{\cdot} são comumente chamados de “radicais livres”. A partir deles, outras espécies reativas serão formadas em reações subsequentes (COLLIN, 2019).

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é utilizado pelo sistema imunológico e é produzido em grandes quantidades pelas NADPH oxidases nos fagócitos, como parte do mecanismo dependente de oxigênio usado para destruir microrganismos invasores. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma molécula instável e um forte agente oxidante que pode interferir no metabolismo celular normal a depender da quantidade presente. Ao contrário do ânion superóxido, o H_2O_2 é lipossolúvel e pode difundir-se livremente dentro e fora das células e através dos tecidos para outros locais onde pode exercer suas ações oxidativas. Já o radical hidroxila (HO^{\cdot}) é uma das espécies de oxigênio mais reativas devido ao seu alto potencial de redução, em comparação com outras espécies de oxigênio. É cancerígeno e reage indiscriminadamente, com constantes de velocidade extremamente altas, com quase todos os tipos de moléculas encontradas nas células vivas, incluindo lipídios, aminoácidos, nucleotídeos e açúcares (HRYCAY; BANDIERA, 2015).

A sinalização de EROs pode participar de processos fisiológicos vitais quando em níveis baixos a regulares no nosso organismo, como cascatas de sinalização molecular, ativação de processos como renovação celular e também como parte do sistema imune, atuando como primeira linha de defesa e no controle de respostas inflamatórias (METCALFE; OLSSON, 2021). Entretanto, as EROs não são produzidas apenas de forma endógena. A exposição a

diversos fatores exógenos é diretamente relacionada à produção dessas moléculas, como por exemplo a poluição do ar e da água, exposição ao álcool, tabaco, metais pesados, solventes industriais, pesticidas, luz ultravioleta, temperaturas elevadas e medicamentos como o paracetamol, doxorrubicina e metronidazol (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2014).

2.2.2 Instabilidade genômica

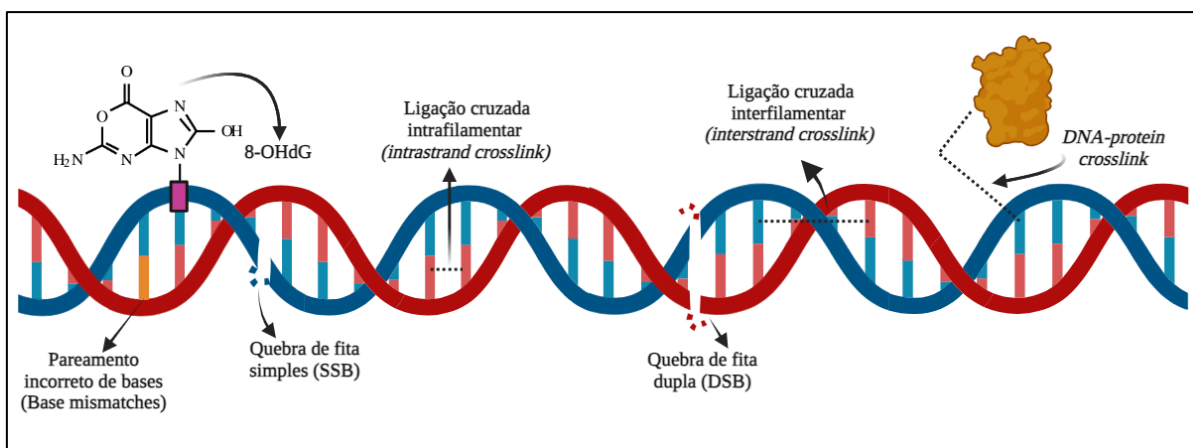
Quando em níveis desregulados, as EROs contribuem para o desenvolvimento de diversas patologias como câncer, doenças cardiovasculares e doenças neurológicas. No câncer, as mutações no DNA causadas pelas EROs incluem modificações de base, rearranjo de sequências de DNA, codificação incorreta de lesões de DNA, duplicações de genes e ativação de oncogenes. Foram também verificadas em várias células vasculares alterações na expressão das enzimas NOX 1, 2, 4 e 5, contribuindo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BRIEGER et al., 2012).

É estimado que o genoma humano comum passa por cerca de 100.000 alterações por dia em condições fisiológicas normais. Ainda, a integridade do nosso organismo é constantemente desafiada por inúmeros fatores exógenos e endógenos, que possuem a capacidade de gerar danos no DNA. Os fatores externos mais comuns são: luz solar, radiação ionizante, produtos químicos, poluentes e muitos agentes usados na terapêutica clínica (LUPSKI, 2022; SCHEIJEN; WILSON, 2022).

Os danos em RNA, lipídios e proteínas podem ser recuperados por degradação e renovação celular. Os danos ao DNA, entretanto, são considerados os mais ameaçadores para a função orgânica e para a saúde. O impacto dos fatores externos pode modificar definitivamente a composição de estruturas macromoleculares e a eficácia de processos bioquímicos. Ainda, a molécula de DNA possui uma instabilidade intrínseca, principalmente na forma de amina da citosina para a uracila, ou perda de bases purinas ou pirimidinas, criando um sítio abásico sem informações de codificação (LUPSKI, 2022; SCHEIJEN; WILSON, 2022).

As quebras de fitas simples de DNA (do inglês, *single-strand breaks*, SSBs) são as lesões endógenas e exógenas mais comuns, que ocorrem em milhares de células por dia. Elas podem surgir de forma direta, através do ataque de espécies reativas de oxigênio, ou de forma indireta, através de intermediários normais do mecanismo de reparo por excisão de bases de DNA (CALDECOTT, 2004) (Figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática dos danos causados ao DNA



Fonte: Criado em BioRender.com

Legenda: Representação esquemática de danos ao DNA por diferentes fontes. Estão ilustrados o pareamento incorreto de bases, quebras de fita simples e de fita dupla, 8-Hidroxi-2-desoxiguanosina e crosslinks.

Já as quebras de fita dupla de DNA (do inglês, *double-strand breaks*, DSBs) (Figura 4) ocorrem quando as forquilhas de replicação encontram lesões bloqueadoras, como as geradas pelas EROs, levando ao colapso da forquilha. Dentre vários outros mecanismos, o estresse físico também pode causar DSBs quando cromossomos dicêntricos são puxados para os pólos opostos durante a mitose. A exposição a agentes que danificam o DNA, como radiação ionizante, também desencadeia DSB direta e indiretamente por meio da produção de EROs; agentes químicos e luz UV formam lesões bloqueadoras da replicação, como adutos de alquila, dímeros de pirimidina e ligações cruzadas (SHRIVASTAV; HARO; NICKOLOFF, 2007).

A 8-Hidroxi-2-desoxiguanosina (Figura 4) é utilizada como marcador biológico de estresse oxidativo, pois resulta de uma modificação no DNA causada pelo radical hidroxila. Este radical oxida a guanosina ou a timina, formando 8-hidroxi-2-desoxiguanosina e timinaglicol, respectivamente (LEE; KOO; MIN, 2004).

Os tipos de lesões mais frequentes são as de modificações de bases, quebras de fitas simples e de fita dupla. Outros tipos de lesões são as ligações cruzadas (do inglês *crosslinks*, como iremos chamar neste trabalho) entre fitas de DNA (do inglês, *DNA-DNA crosslinks*) e entre fitas de DNA e proteínas (do inglês, *DNA-protein crosslinks*, DPCs). A primeira se refere a uma ligação covalente entre regiões da mesma fita do DNA (*DNA intrastrand crosslinks*) ou entre fitas opostas do DNA (*DNA interstrand crosslinks*) (IDE *et al*, 2018) (Figura 4).

O DNA celular está associado a um conjunto de proteínas que estão relacionadas ao seu enovelamento e a processos celulares como transcrição e replicação, interferindo por exemplo no desenovelamento do DNA e na atividade das RNA polimerases em sua tradução. Desta forma, quando a célula é exposta a agentes que causam danos ao DNA, os intermediários das

reações que acontecem podem reagir com essas proteínas, formando ligações covalentes cruzadas entre o DNA e as proteínas (do inglês, *DNA-protein crosslinks*, DPCs) (IDE *et al.*, 2018) Quando essas ligações são formadas e não são corrigidas, as funções das proteínas podem ficar comprometidas, podendo gerar mutagenicidade, senescência, morte celular, gênese tumoral e envelhecimento acelerado (BARKER; WEINFELD; MURRAY, 2005).

As DPCs podem ser formadas a partir de uma ampla variedade de agentes, como a exposição à luz ultravioleta, a aldeídos, a metais pesados e a quimioterápicos, por exemplo. Desta forma, podem ser classificadas de acordo com a sua origem. As DPCs não enzimáticas são desencadeadas por agentes reativos (ex: EROs), que de forma não específica fazem uma ligação entre proteínas da cromatina com o DNA. Já as DPCs enzimáticas formam as ligações com o DNA como parte da sua própria função habitual. Entretanto, ambos os tipos são induzidos através de processos endógenos ou exógenos e podem estar relacionados também a processos fisiológicos normais (BARKER; WEINFELD; MURRAY, 2005).

A falha em reparar corretamente os danos citados, ou o reparo inadequado, pode levar à morte celular ou a alterações cromossômicas em larga escala, como deleções, translocações e fusões cromossômicas, aumentando a instabilidade do genoma, uma característica marcante das células cancerígenas. As células são naturalmente capazes de ativar complexos de reparo de DNA, entretanto, quando o dano é extenso, as vias de sinalização podem induzir a apoptose para evitar a propagação de células com genomas altamente instáveis (SHRIVASTAV; HARO; NICKOLOFF, 2007).

2.2.3 Relação entre covid-19 e doenças crônicas

Os danos causados pela covid-19 podem também estimular o desenvolvimento de doenças crônicas. Pesquisas sugerem que, nas apresentações moderadas a graves, a infecção se torna uma doença endotelial. As citocinas são sinais-chave que mudam a função endotelial do modo de homeostase para o modo defensivo (JARROTT *et al.*, 2022).

Os mecanismos responsáveis por causar complicações tardias estão relacionados à própria fisiopatologia da doença, que inclui o dano tecidual e o papel do receptor da ECA2 no ingresso de SARS-CoV-2 nas células. Desta forma, sugere-se que o dano tecidual seja o mecanismo primário da infecção, o que irá posteriormente contribuir para as complicações a longo prazo da doença. Entretanto, há diversos outros mecanismos pelos quais o vírus age em prol da disfunção sistêmica no organismo (DESAI *et al.*, 2022).

Uma das descobertas mais valiosas da virologia e da oncologia foi a relação entre os vírus e o câncer. Por algumas espécies de vírus apresentarem potencial cancerígeno, um dos principais desafios atualmente é a elucidação dos mecanismos que regulam a oncogênese de etiologia viral. SARS-CoV-2 vem sendo ultimamente sugerido como um vírus com provável potencial oncogênico, porém, ainda há controvérsias. Por um lado, o vírus pode atuar na reprogramação metabólica de forma a estimular a replicação celular. Entretanto, foi também observada uma resposta imune antitumoral em alguns pacientes portadores de linfoma, podendo então portar um potencial oncolítico (COSTANZO; GIGLIO; ROVIELLO, 2023).

De forma semelhante aos oncovírus, tem sido sugerido que SARS-CoV-2 pode promover a progressão do câncer por meio da alteração de vias metabólicas centrais em células tumorais, como o metabolismo que envolve o carbono, nitrogênio e ácidos nucleicos. Foi encontrado em fluidos biológicos que o vírus afetou negativamente o proteoma através da regulação da expressão de proteínas relacionadas ao colesterol e que regula positivamente proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos. Por conseguinte, SARS-CoV-2 poderia promover uma alteração metabólica em células tumorais de forma a manter vias com alta produção de energia (por exemplo, a glicólise) para manter a taxa de replicação (COSTANZO; GIGLIO; ROVIELLO, 2023; LI; REN; CAO, 2022).

2.3 MUTAGENICIDADE E GENOTOXICIDADE

As genotoxinas químicas exógenas podem entrar no organismo por meio da via oral, do trato gastrointestinal, do sistema respiratório e através da pele. Esses produtos ou os seus metabólitos podem ser absorvidos pelo organismo e, através dos fluidos biológicos, atingir os linfócitos em seus locais onde estão armazenados, como o sistema circulatório, linfático, medula óssea, linfonodos, baço e timo. Ao passo em que são absorvidas e começam a circular no organismo, elas podem ser ativadas ou detoxificadas, influenciando assim o grau pelo qual os linfócitos são expostos ao risco de dano de DNA (FENECH et al., 2016).

Caso as genotoxinas atinjam locais de hematopoiese como a medula óssea, elas podem causar dano ao DNA de células-tronco ou outras células precursoras pelas quais os linfócitos e outros leucócitos são derivados. Essas células particularmente são mais sensíveis a agentes que causam danos durante a fase S do ciclo celular. Após a maturação na medula óssea, a maioria dos linfócitos pode permanecer inativa com pouco tempo de vida (tempo de meia vida de semanas a meses), enquanto outras que foram destinadas a alguma função de defesa podem ter um tempo de vida mais prolongado, meia vida de meses a anos. Ambos os tipos celulares

circulam pelo organismo e podem se acumular nos linfonodos e no baço. Em teoria, os linfócitos com maior tempo de vida acumulam muito mais dano ao DNA devido ao seu tempo de exposição. A quantidade de danos acumulados depende do tipo de genotoxina, do tempo de exposição e de como a célula responde a este fator. Sendo assim, são várias as formas pelas quais um dano ao DNA celular pode ocorrer (FENECH et al., 2016).

O termo "mutação" denota alterações duradouras na estrutura ou quantidade do material genético de um organismo, resultando em modificações hereditárias em sua função. Essas mudanças podem abranger tanto mutações gênicas quanto alterações cromossômicas estruturais e numéricas. Sendo assim, o termo "mutagenicidade" refere-se ao dano causado na estrutura do DNA após a ação do sistema de reparo celular, podendo torná-lo permanente e hereditário (WHO, 2000). Para a avaliação da mutagenicidade causada por SARS-CoV-2 neste trabalho, foi realizada a técnica Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese Celular (do inglês, *Cytokinesis-block micronucleus cytome assay*, CBMN Cytome), que será descrita posteriormente.

A genotoxicidade, por outro lado, refere-se ao dano no DNA que pode ser visualizado antes da ação do sistema de reparo, ou seja, um dano que pode ser corrigido por processos de reparo do DNA ou outros mecanismos celulares conhecidos, ou resultar na morte celular, sem necessariamente gerar alterações permanentes na estrutura ou no conteúdo informativo da célula sobrevivente ou de sua prole (SILVA, ERDTMANN, ALBUQUERQUE, 2003; WHO, 2000; FENECH et al., 2016). Para a avaliação da genotoxicidade causada por SARS-CoV-2, neste trabalho foi realizado o Ensaio Cometa.

2.3.1 Avaliação de genotoxicidade através do Ensaio Cometa

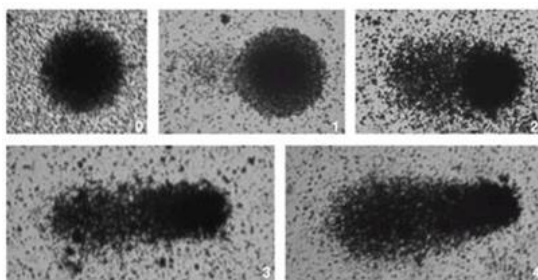
Dentre as técnicas tradicionais para avaliação de dano no DNA, o Ensaio Cometa (do inglês, *Commet Assay*) se destaca devido à sua praticidade e baixo custo, em que o resultado pode ser obtido em apenas um dia. O método é também chamado de ensaio de eletroforese em célula única (do inglês *Single Cell Gel Electrophoresis Assay*, ou SCGE), é uma técnica quantitativa, rápida e visual usada para mensurar dano de DNA em células eucarióticas em meio alcalino (SILVA, ERDTMANN, ALBUQUERQUE, 2003).

O princípio básico é a migração, em eletroforese, dos fragmentos de DNA de baixo peso molecular carregados negativamente em direção ao ânodo, deixando uma cauda que lembra a imagem de um cometa no curso dessa migração. Se o DNA estiver rompido (o que chamamos de clastogênese) ou quebrado, a migração irá ocorrer. Caso contrário, o DNA continua empacotado e não migra devido ao seu tamanho, não formando a cauda aparente. A

extensão da migração irá indicar a quantidade de quebras de DNA existentes na célula. É possível detectar SSBs e DSBs de lesões em sítios alcali-sensíveis e de SSB em sítios de reparo por excisão de bases. Sendo assim, caracteriza-se por uma técnica que avalia a genotoxicidade, que corresponde ao dano de DNA que ainda pode ser reparado (OLIVE; BANÁTH, 2006; SILVA, ERDTMANN, ALBUQUERQUE, 2003).

Aqui falar sobre a classificação (figura 5).

Figura 5 - Classificação da intensidade dos danos de DNA pelo ensaio cometa



Fonte: Adaptado de MALUF, S.W, 2011

Legenda: A figura mostra os 4 tipos de intensidade do dano, sendo 0 - ausência de dano, 1 - células com dano mínimo, 2 - células com dano médio, 3 - células com dano intenso e 4 - células com dano máximo

2.3.2 O ensaio CBMN cytome e a avaliação dos biomarcadores da mutagenicidade

O termo CBMN Cytome vem do inglês *Cytokinesis-block micronucleus cytome assay*, traduzido em português para “Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese Celular”. Essa técnica permite avaliar o dano ao DNA já estabelecido após a ação do sistema de reparo e verificar danos de DNA, citostase e citotoxicidade. Verifica-se dano de DNA em células binucleadas a partir da visualização de micronúcleo (MN), pontes nucleoplasmáticas (PNPs) e brotos nucleares (NBuds, do inglês *nuclear buds*) (Figura 6) (FENECH et al., 2010).

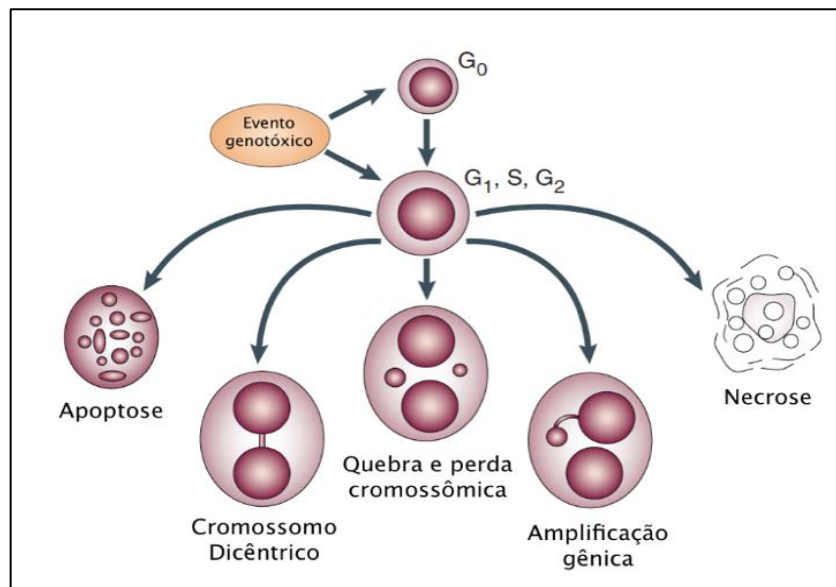
Quando os danos são irreparáveis após a replicação do DNA e as tentativas de reparo terem ocorrido, os fragmentos danificados não são incorporados corretamente nos núcleos das células filhas na divisão celular subsequente, sendo visualizados nas formas mencionadas e ilustradas na figura 6 (FENECH et al., 2010). Sendo assim, essa análise é considerada uma avaliação da mutagenicidade, permitindo informações sobre os efeitos de agentes genotóxicos e a integridade do material genético (SILVA, ERDTMANN, HENRIQUES, 2003).

Os biomarcadores de genotoxicidade desempenham um papel crucial na avaliação da instabilidade genômica, fornecendo informações específicas sobre diferentes tipos de danos no

DNA e suas consequências. Uma frequência elevada de micronúcleos pode ser considerada como um indicador de perda ou quebra de cromossomos. Os brotos nucleares são indicativos de amplificação gênica e/ou remoção de complexos de reparo de DNA não resolvidos. Por fim, as pontes nucleoplasmáticas são indicadores de reparo inadequado do DNA e/ou fusões de extremidades teloméricas, evidenciando possíveis danos e instabilidade no genoma (LUZHNA; KATHIRIA; KOVALCHUK, 2013).

Ao compreender o significado de cada biomarcador, torna-se possível uma análise mais abrangente dos efeitos genotóxicos de substâncias químicas, contribuindo para o monitoramento ambiental e a proteção da saúde humana.

Figura 6 – Alterações encontradas pela técnica CBMN cytome



Fonte: Adaptado de Fenech *et. al.*, 2007

Legenda: A figura demonstra os eventos gerados por eventos citotóxicos visualizados através da técnica CBMN cytome. Podemos observar os eventos de apoptose, necrose, e a formação de micronúcleo através de quebras e perdas cromossômicas, buds nucleares através da amplificação gênica e ponte a partir de cromossomos dicêntricos.

2.3.2.1 Micronúcleo (MN)

Os MN são pequenos corpos extranucleares formados durante a anáfase que se originam a partir de fragmentos cromossômicos acêntricos, fragmentos de cromátides acêntricas ou cromossomos inteiros que não foram incluídos nos núcleos das células filhas. Isso porque não se ligaram adequadamente às proteínas do fuso durante o processo de divisão na anáfase. Assim como os núcleos celulares, os MN possuem morfologia semelhante ao núcleo

de origem, porém menores em tamanho (FENECH *et al.*, 2010; JUNEJA *et al.*, 2019) (Figura 7b,c). Os micronúcleos em linfócitos de pessoas saudáveis, não expostas anormalmente a agentes genotóxicos, normalmente se originam de fragmentos de cromossomos acêntricos ou perdas de cromossomos inteiros. Essa formação irá depender da idade e do gênero, sendo mais comuns com o avanço da idade e geralmente mais elevados em mulheres em comparação com homens (FENECH *et al.*, 2011).

As quebras de fita dupla no DNA podem resultar em trocas de material genético entre cromossomos e cromátides, especialmente quando a via de reparo recombinacional homólogo é disfuncional devido a defeitos em genes como BRCA1 e BRCA2. Micronúcleos podem se formar se as enzimas da via de junção de extremidades não homólogas estiverem danificadas. O reparo simultâneo de danos em bases próximas em fitas opostas do DNA, como 8-oxo-desoxiguanosina ou uracila, pode levar a quebras de fita dupla e formação de micronúcleos. Além disso, micronúcleos podem também se formar após a ruptura de PNPs durante a telófase, podendo também originar brotos nucleares (NBuds) (FENECH *et al.*, 2011).

2.3.2.2 Pontes nucleoplasmáticas (PNPs)

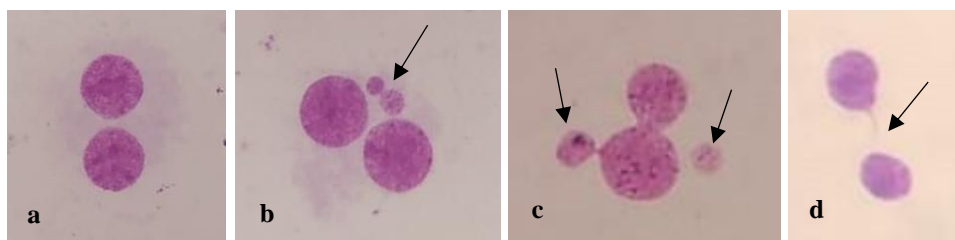
As PNPs (Figura 7d) têm origem na presença prévia de cromossomos dicêntricos, os quais surgem devido a falhas no reparo de quebras cromossômicas ou a fusões das extremidades dos telômeros. Durante a anáfase da divisão celular, os centrômeros dos cromossomos dicêntricos são segregados para os pólos opostos da célula, levando à formação das PNPs com as regiões cromossômicas não segregadas. Caso a ponte cromossômica não se rompa durante a anáfase, a membrana nuclear envolve os núcleos filhos juntamente com a porção cromossômica não segregada, resultando na formação de uma PNP (FENECH *et al.*, 2007).

2.3.2.3 Brotos nucleares (NBuds)

Os NBuds são estruturas nucleares que se assemelham a MNs, mas diferem por estarem ligados ao núcleo por uma estrutura que conecta os núcleos, de tamanho estreito ou largo (Figura 7c). Essa formação ocorre durante a fase S do ciclo celular, possivelmente como resultado de processos de reparo do DNA que levaram à formação de DNA amplificado em excesso. Para que o excesso seja eliminado, acontece a recombinação entre regiões homólogas em sequências amplificadas, resultando na formação de mini-círculos de DNA acêntrico e

atelomérico. A formação de NBuds também pode ocorrer após a quebra de PNPs entre dois núcleos, onde as porções restantes podem retrair-se em direção aos núcleos, levando à formação de NBuds (FENECH *et al*, 2007).

Figura 7 – Alterações nucleares visualizadas a partir do ensaio CBMN cytome



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: A figura mostra algumas alterações nucleares provocadas por eventos citotóxicos através da técnica de micronúcleo com bloqueio da citocinese celular. A imagem “a” retrata uma célula binucleada sem alterações. A figura “b” mostra dois micronúcleos (MN). A figura “c” revela um bud nuclear (seta à esquerda) e um micronúcleo (seta à direita). A figura “d” sinaliza uma ponte nucleoplasmática numa célula binucleada.

2.3.3 Estudos recentes sobre a relação entre SARS-CoV-2 e dano de DNA

Durante o tempo de execução desta pesquisa, alguns estudos sobre danos de DNA em pacientes com covid-19 foram publicados. Em 2022, Mihaljevic e colaboradores mensuraram o dano de DNA através do ensaio cometa com uma amostra de 24 pacientes na Sérvia. Eles encontraram que os pacientes com covid-19 apresentaram um nível significativamente mais alto de dano ao DNA do que o grupo controle. Também encontraram correlação positiva entre dano ao DNA e marcadores inflamatórios. Dentre os fatores que contribuíram para o potencial genotóxico, estiveram o tabagismo, a farmacoterapia administrada durante a internação (antibióticos, antiinflamatórios esteroidais, anticoagulantes e antivirais) e radiografias de tórax.

No ano de 2023, Basaran e colaboradores também executaram um ensaio cometa e encontraram maiores taxas de dano de DNA (94,9% maior que no grupo controle) em uma amostra de 50 pacientes que haviam sido atendidos no *Health Sciences University Ümraniye Training and Research Hospital*, na Turquia. Foi também avaliada a relação entre o aumento do dano de DNA com maior estresse oxidativo, encontrando relação direta entre ambos. Bektemur e colegas (2023) fizeram um estudo semelhante com 150 voluntários na *University of Health Sciences Turkiye*, também na Turquia. Eles reportaram que os indivíduos que foram infectados com SARS-COV-2 estavam mais susceptíveis ao dano de DNA do que o grupo controle. Enquanto nos pacientes com covid-19 havia uma queda nas defesas antioxidantes, foi

observado estímulo ao estresse oxidativo e à inflamação. Desta forma, a indução ao estresse oxidativo, inflamação e dano de DNA em pacientes com covid-19 podem ter valor preditivo no prognóstico e auxiliar o desenvolvimento de estratégias de tratamento da doença.

Buscando desvendar o mecanismo molecular envolvido no dano de DNA em pacientes com covid-19, Gioia e colaboradores (2023) encontraram que SARS-CoV-2 expressa proteínas que modificam o metabolismo dos nucleotídeos. Os fatores virais ORF 6 e NSP 13 promoveram a degradação da CHK 1 (checkpoint kinase 1), uma enzima envolvida na regulação do mecanismo de DDR (do inglês, *DNA damage response*, resposta ao dano ao DNA). A redução dos níveis de CHK1 resulta no acúmulo de rNTPs (ribonucleotídeo trifosfato) que são provavelmente necessários à replicação viral. Entretanto, o acúmulo de rNTPs parece ocorrer às custas de dNTPs (desoxirribonucleotídeo trifosfato), que foram detectados em níveis baixos após a infecção por SARS-CoV-2, que resultou numa replicação de DNA prejudicada, levando ao dano de DNA. Também foi constatado que as quebras de DNA se acumularam porque não foram reparadas com eficácia. Estes achados sugerem que SARS-CoV-2 induz ao dano de DNA e impede o seu reparo, causando o envelhecimento celular e o crescimento da inflamação.

3 METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (Projeto 32858820.0.0000.0121; Parecer: 4.164.291). Os participantes foram esclarecidos a respeito do estudo e, aceitando os termos, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A).

3.2 CASUÍSTICA

3.2.1 Desenho amostral

Este estudo adotou uma abordagem transversal, retrospectiva, analítica, descritiva e comparativa de alterações nucleares em sangue periférico de indivíduos diagnosticados com covid-19 e indivíduos saudáveis. As análises foram conduzidas a partir de um total de 57 amostras pertencentes ao grupo caso e 43 amostras do grupo controle que foram submetidos ao processamento e análise posteriores.

3.2.2 Critérios de inclusão e exclusão para o grupo caso e controle

Para serem incluídos no estudo, os participantes precisavam ser maiores de 18 anos e terem sido diagnosticados com covid-19 confirmado por técnica RT-PCR realizada no Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia da Universidade Federal de Santa Catarina (LBMMS/CCS/UFSC), em parceria com o Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU - UFSC).

Os indivíduos do grupo controle precisavam ser maiores de 18 anos e que não haviam sido diagnosticados com covid-19. Os dados referentes às amostras desse grupo foram obtidos a partir do biobanco do Laboratório de Citogenética e Estabilidade Genômica (LACEG) do HU-UFSC, que são disponibilizados para pesquisa por aprovação ética.

3.3 DADOS CLÍNICOS

Para uma compreensão abrangente do estado de saúde dos participantes do grupo caso, foram realizadas perguntas a partir de um questionário detalhado, destinado aos indivíduos do grupo caso (ANEXO B). As perguntas dos questionários foram a respeito de dados sociodemográficos, histórico de saúde e hábitos de vida, listadas no Quadro 1.

Os tópicos mencionados no quadro 1 foram cuidadosamente agrupados, avaliados e as respostas fornecidas foram utilizadas para análise estatística e avaliação dos fatores associados ao estado de saúde dos indivíduos, garantindo a confidencialidade e anonimato das informações pessoais dos participantes.

Quadro 1 – Dados socioeconômicos, demográficos e de saúde coletados no questionário

Dados Demográficos e socioeconômicos	Histórico de Saúde	Estilo de vida
Sexo	Presença de Doença Arterial Coronariana	Prática de exercícios físicos
Idade	Histórico de Colesterol e/ou Triglicérides elevados	Etilismo
Data de preenchimento	Presença de coagulopatias	Alcoolismo
Principal ocupação	Presença de Hipertensão arterial	Ingestão de alimentos saudáveis
Informações Socioeconômicas	Presença de Diabetes	
Estado civil	Presença de Doença Pulmonar	
Nível de escolaridade	Histórico de doença respiratória viral recente	
	Diagnóstico de câncer	
	Presença de Problemas hormonais	
	Outras doenças ou problemas de saúde não mencionados	
	Hábito de realizar a vacina da gripe	

3.4 COLETAS, PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

As coletas dos materiais biológicos do grupo caso foram realizadas por profissionais treinados, sendo necessário apenas 1 tubo heparinizado de 4 mL de sangue total, sendo realizada ao longo de um período de seis meses, entre setembro de 2020 e abril de 2021. As amostras foram encaminhadas para o laboratório de genética e estabilidade genômica do HU-UFSC para a realização dos ensaios e análises, armazenadas a 4°C e processadas conforme as técnicas do Ensaio Cometa e Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese Celular (CBMN cytome).

No que tange ao grupo controle, as amostras já haviam sido coletadas de indivíduos saudáveis, que haviam consentido participar do biobanco, processadas e armazenadas da mesma forma que as amostras do grupo caso.

3.5 TÉCNICA DE MICRONÚCLEOS COM BLOQUEIO DA CITOCINESE CELULAR

3.5.1 Cultura celular

Para cada amostra, foi preparado um tubo falcon contendo 5 mL de meio de cultura com RPMI suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e 2% de fitohemaglutinina. Em seguida, foram adicionadas 10 gotas de sangue total heparinizado em capela de fluxo laminar.

Os tubos foram colocados em estufa a 37°C. Após 44 horas, foi adicionado citocalasina B (6 µg/mL) e ao final das 72 horas, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm durante 6 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado lentamente (gota a gota) 5 mL de uma solução hipotônica de KCL 0,075 M (que havia sido previamente aquecida a 37°C), deixando agir por 7 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de solução fixadora de metanol e ácido acético (3:1) e homogeneizado. Os tubos foram centrifugados novamente e o sobrenadante descartado. Essa etapa foi repetida mais uma vez, e o material ficou armazenado em geladeira por no mínimo 10 minutos, até a confecção das lâminas.

3.5.2 Preparação das lâminas

Inicialmente, as lâminas foram lavadas com álcool 70% e deixadas no congelador por alguns minutos para formar uma camada de gelo e permitir que o material se espalhasse por elas.

Em seguida, foi realizada uma lavagem das hemácias com centrifugações (1500 rpm por 7 minutos) seguida da adição de 5 mL de solução fixadora até o sobrenadante se tornar límpido. No último descarte, aproximadamente 1 mL do sobrenadante foi mantido no tubo e ressuspenso. Foram gotejadas cerca de duas a quatro gotas em cada lâmina (sendo duas lâminas por paciente). Após secagem a temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com solução de giemsa 10% por 8 minutos.

3.5.3 Análise das lâminas

As lâminas foram analisadas de forma cega, em microscópio óptico no aumento de 200 vezes e para a confirmação das estruturas em 1000 vezes. Os eventos de micronúcleos

(MNs), *Buds* nucleares e pontes nucleoplasmáticas (PNPs) foram contados após a análise de 1000 linfócitos binucleados (500 células em cada lâmina por amostra).

Os testes estatísticos para comparação entre grupos e análises de correlação foram escolhidos de acordo com a distribuição e a independência dos grupos. Para as análises de correlação, os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.6 ENSAIO COMETA

3.6.1 Preparação das lâminas

O primeiro passo foi realizar uma pré-cobertura das lâminas com agarose de ponto de fusão normal (Normal Melting Point ou NMP). A agarose foi diluída em água, aquecida em forno de micro-ondas e colocada em cubetas, nas quais as lâminas, que já haviam sido previamente lavadas, foram mergulhadas. Em seguida, foram levadas à estufa por 50°C por 2 horas e posteriormente armazenadas em um local seco.

Estando as lâminas prontas para uso, a agarose de baixo ponto de fusão (LMP – Low Melting Point) foi aquecida até aproximadamente 37°C em micro-ondas. Em um *eppendorf*, foi pipetado 95 µL de agarose LMP e 5 µL de sangue heparinizado, homogeneizando a mistura e rapidamente aspirando-a para dispor o conteúdo sobre a lâmina pré-coberta. Em seguida, foi colocada uma lamínula, com a finalidade de misturar as duas camadas e evitar a formação de bolhas de ar.

As lâminas foram dispostas horizontalmente em uma câmara úmida na geladeira por aproximadamente 5 minutos para a solidificação da agarose, seguindo para a retirada cuidadosa das lamínulas após esse tempo. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em uma cubeta contendo solução de lise gelada (composta por solução mãe, DMSO e Triton x-100) por um período de 2 horas.

3.6.2 Eletroforese de célula única

A eletroforese foi realizada em no mínimo 24 horas após as lâminas estarem na solução de lise. O tampão alcalino foi preparado com NaOH, EDTA 200 mM e água destilada em pH 10 e utilizado a 4°C.

As lâminas foram retiradas da solução de lise e posicionadas na cuba de eletroforese. O tampão alcalino foi adicionado e mantido em contato com as lâminas por 20 minutos para

que houvesse a separação das cadeias de DNA para que ficassem prontas para migrar em direção ao ânodo. Seguiu-se então para a eletroforese, que foi realizada sob as condições de 25 V e 300 mA (ajustado através do volume de tampão) por 20 minutos em geladeira. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas cuidadosamente da cuba e lavadas 3 vezes com tampão de neutralização (Tris 0,4M, pH 7,5), tendo como duração 5 minutos cada lavagem. Em seguida, as lâminas foram lavadas 3 vezes com água destilada e deixadas para secar por no mínimo 2 horas a 37°C.

Para a fixação, as lâminas foram mergulhadas por 10 minutos em solução fixadora (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco heptahidratado 5% e glicerol 5%), lavadas 3 vezes com água destilada e colocadas para secar por no mínimo 2 horas a 37°C.

Para cada eletroforese foi acrescentada ao menos uma lâmina de amostra tratada com H₂O₂ 10 µM para ser utilizada como controle positivo (seguindo os mesmos passos que as demais lâminas).

3.6.3 Coloração das lâminas

O método escolhido para a coloração foi o descrito por Nadin e colaboradores (2001), o método de coloração de prata. Inicialmente, as lâminas foram hidratadas por 5 minutos com água destilada. A Solução de Coloração foi preparada imediatamente antes do uso a partir da mistura das soluções A (carbonato de sódio 5%) e B (nitrato de amônio 0,02%, nitrato de prata 0,02%, ácido tungstosilícico 0,1%, formaldeído 0,05%). Em seguida, as lâminas foram colocadas em cubetas contendo a Solução de Coloração por 15 minutos, sendo agitadas manualmente a cada 5 minutos. Após atingir uma coloração acinzentada (quando ficaram visivelmente coradas), as lâminas foram lavadas com água destilada e colocadas na solução de parada (ácido acético 1%) por 5 minutos. Foram lavadas novamente com água destilada e depois deixadas em temperatura ambiente até secagem, sendo posteriormente armazenadas até a análise.

3.6.4 Leitura das lâminas

As células foram observadas em microscópio óptico no aumento de 200 vezes, sendo analisadas 50 células por indivíduo. A identificação das lâminas foi por enumeração, para

manter a análise cega do pesquisador. A leitura das margens das lâminas foi evitada devido a possibilidade de a migração estar prejudicada nesses locais.

A intensidade do dano de DNA foi classificada em 4 tipos, sendo 0 – ausência de dano, 1 – células com dano mínimo, 2 – células com dano médio, 3 – células com dano intenso e 4 – células com dano máximo. Os valores de 0 a 4 dos 100 núcleos analisados são somados, o que irá resultar no valor individual, podendo variar de 0 a 400 unidades arbitrárias (U.A.) e expresso como valor em índice total de dano (ITD).

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado o software GraphPad Prism 8 para a análise dos dados estatísticos. Para a distribuição das variáveis e a verificação da normalidade, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados dos grupos caso e controle foram comparados entre si de acordo com a distribuição da variável, sendo o teste t mais apropriado em variáveis com distribuição paramétrica e U de Mann Whitney nas variáveis não paramétricas.

O teste de Spearman foi escolhido para a análise das correlações, que foram classificadas de acordo com os valores de ρ , sendo: 0,0 \mid 0,25 ou $-$ 0,25 \mid 0,0 fraca, 0,25 \mid 0,50 ou $-$ 0,50 \mid $-$ 0,25 regular, 0,50 \mid 0,75 ou $-$ 0,75 \mid $-$ 0,50 moderada e 0,75 \mid 1,0 ou $-$ 1,0 \mid $-$ 0,75 forte. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados quantitativos foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) ou mediana (mínimo – máximo), enquanto os qualitativos foram expressos como frequência absoluta ou relativa (%).

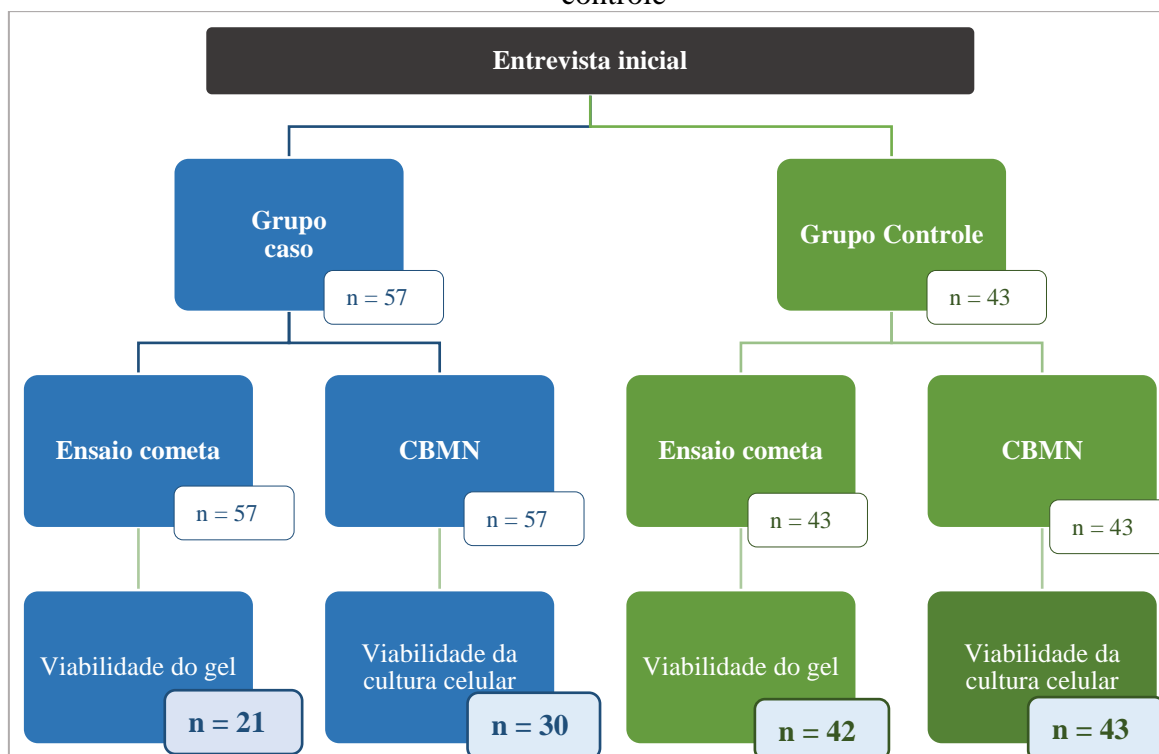
4 RESULTADOS

Os resultados mostram inicialmente uma tabela comparativa (Tabela 1) entre os grupos caso e controle, destacando o pareamento adequado quanto ao sexo e à idade. A seguir, é descrito o perfil geral da população avaliada (grupo caso), detalhando os fatores sociais, demográficos, hábitos de vida e comorbidades. Além disso, é apresentada a classificação final de gravidade dos casos, baseada nos sintomas e complicações registrados em prontuário durante o tempo de internação hospitalar.

Para as análises descritivas iniciais, foram considerados 57 participantes do grupo caso. No entanto, para as análises subsequentes (avaliação dos marcadores da instabilidade genômica), foram selecionadas apenas as amostras que apresentavam melhor viabilidade para o estudo. Assim, na análise do ensaio cometa, foram utilizadas 21 amostras do grupo caso e 42

amostras do grupo controle. Para a análise CBMN Cytome, foram utilizadas 30 amostras do grupo caso e 43 amostras do grupo controle (figura 8).

Figura 8 – Fluxograma indicando o valor amostral inicial e final do grupo caso e do grupo controle



Fonte: Elaborado pela autora

Legenda: Fluxograma ilustrando o número amostral após a realização das técnicas descritas e seleção das amostras viáveis para análise. Os indivíduos de ambos os grupos foram entrevistados. O grupo caso continha inicialmente um $n = 57$, mas as amostras que não estavam adequadas para análise foram excluídas do estudo após a realização do ensaio cometa e CBMN, resultando num $n = 21$ e $n = 30$, respectivamente. O grupo controle continha inicialmente um $n = 43$ e da mesma forma que o grupo caso, as amostras que não estavam adequadas para a análise foram excluídas do estudo, resultando num $n = 42$ para o ensaio cometa e sem alterações para o CBMN Cytome.

4.1 PERFIL DA POPULAÇÃO AVALIADA

Os grupos caso e controle foram pareados por sexo e idade. A tabela 1 descreve o perfil de ambos os grupos em frequências relativas e absolutas, média, desvio padrão e valor de p . Foi utilizado o teste de qui-quadrado, obtendo um valor de $p = 0,4272$, indicando que não há diferença entre sexo nos grupos caso e controle. Também foi comparada a idade dos indivíduos com o teste não paramétrico de Mann-Whitney, obtendo um valor de $p = 0,3641$, indicando também que não há diferença de idade entre os grupos caso e controle.

Tabela 1 – Caracterização dos grupos caso e controle por sexo e idade

Grupo caso x grupo controle			
	Grupo caso	Grupo controle	p
Sexo	n = 57 (%; n)	n = 43 (%; n)	0,4272
Feminino	38,6; 22	46,51; 20	
Masculino	61,4; 35	53,49; 23	
Idade (anos)			p
			0,3641
Média ± DP (mín – máx)	51,49 ± 16,34 20 - 90	48,09 ± 14,66 22 - 73	

Fonte: elaborado pela autora

Legenda: Tabela com comparação do perfil dos grupos caso e controle quanto à idade. Os valores estão representados como frequência relativa (%) e absoluta (n) no sexo ou mediana. DP: Desvio padrão. O valor de p foi calculado mediante os testes estatísticos qui-quadrado, U de Mann-Withney e teste t para amostras independentes.

As informações sobre o perfil da população do grupo caso estão descritas na tabela 2. São mencionados em frequências relativas e absolutas os dados referentes ao sexo, idade, escolaridade, estado civil, ocupação principal, tabagismo, etilismo, presença de doenças associadas e prática de atividade física regular.

Tabela 2 – Caracterização geral da população avaliada (grupo caso)

Apresentação do perfil geral – grupo caso		
Idade (anos)		
(média ± DP*)	51,49 ± 16,34	
(mínimo – máximo)	(20 – 90)	
Sexo	%	n
Feminino	38,6	22
Masculino	61,4	35
Escolaridade		
Fundamental incompleto	3,51	2
Fundamental completo	12,28	7
Ensino médio incompleto	8,77	5
Ensino médio completo	36,84	21
Superior incompleto	8,77	5
Superior completo	17,54	10
Pós-graduação	10,53	6
Analfabeto	1,75	1
Estado civil		
Casado(a)/ união consensual	52,63	30
Solteiro(a)	24,56	14
Separado(a)/ divorciado(a)	19,30	11
Viúvo(a)	3,51	2
Ocupação principal		
Desempregado	7,02	4
Do lar	7,02	4
Aposentado	22,81	13
Outro	63,16	36
Tabagismo		
Sim	1,75	1
Não	64,91	37
Ex-tabagista	33,33	19
Etilismo		
Sim	0,00	0
Não	89,47	51
Ex-etilista	10,53	6
Presença de doenças associadas		
Sim	68,42	39
Não	31,58	18
Prática atividade física regular		
Sim	59,65	34
Não	40,35	23

Fonte: elaborado pela autora

Legenda: Tabela com descrição do perfil dos participantes do grupo caso.

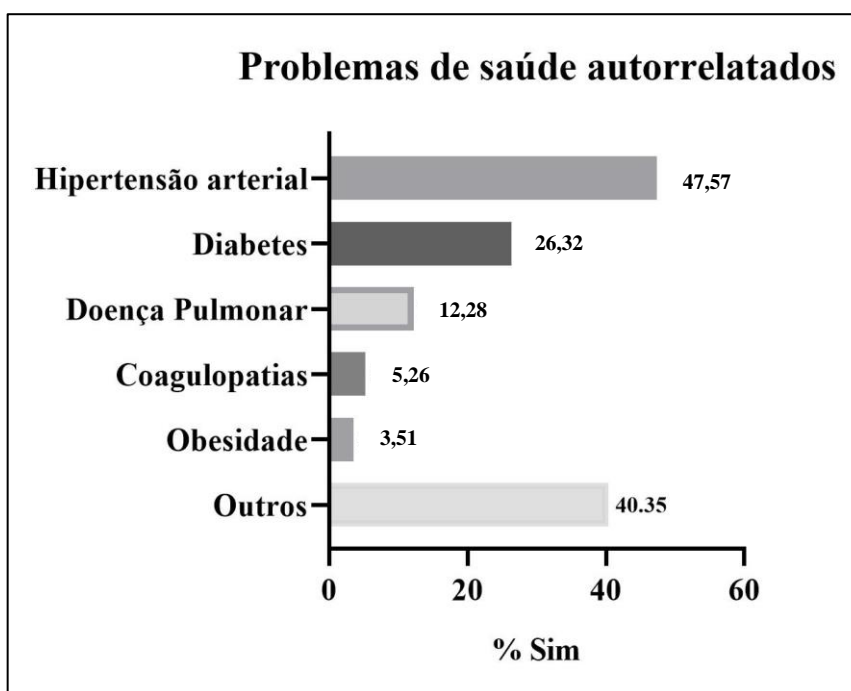
Os valores estão representados como frequência relativa (porcentagem - %) e valor absoluto (n).

No grupo caso, foi observado que 61,4% dos indivíduos eram do sexo masculino, com uma média de idade de $51,49 \pm 16,34$ (mínima de 20 anos e máxima de 90 anos). Ensino médio completo foi o nível de escolaridade mais prevalente (36,84%) e das profissões levantadas, 22,81% eram aposentados e 63,16% do grupo apresentava profissões diversas, como técnico de enfermagem, enfermeiro(a), fisioterapeuta, vigilante, professor, pescador, padeiro, gerente de vendas, dentre outros. Pouco mais da metade dos indivíduos (52,63%) eram casados ou em união consensual.

Quando questionados sobre presença de doenças associadas, 68,42% dos indivíduos referiram ser portador de alguma comorbidade. Destes hipertensão e diabetes foram as mais

prevalentes, representando 47,37% e 26,32% da população, respectivamente (figura 9). Os outros problemas de saúde autodeclarados foram muito variados, sendo citados, por exemplo, enxaqueca, gota, transtorno bipolar, depressão, entre outros, não obtendo representatividade estatística.

Figura 9 – Comorbidades relatadas no grupo caso



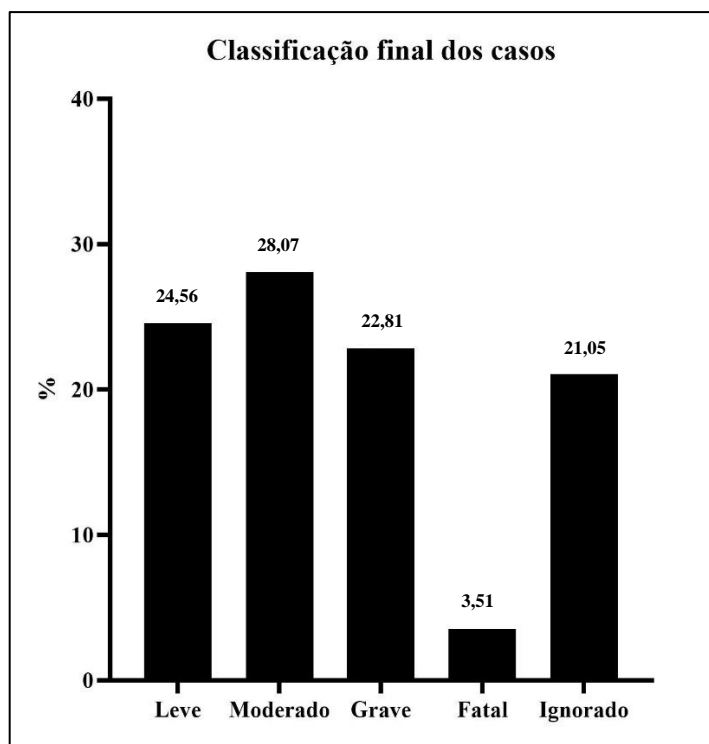
Fonte: elaborado pela autora

Legenda: Problemas de saúde autorrelatados pelos indivíduos em frequências relativas, com destaque para hipertensão arterial (47,37%) e diabetes (26,32%).

Com relação ao estilo de vida, 33,33% indivíduos se declararam ativos no que se trata de condicionamento físico e 19,30% como sedentários. Apenas um indivíduo foi registrado como fumante ativo e 33,33% como ex-fumantes. Nenhum dos indivíduos era etilista e 10,53% eram ex-etilistas. No que tange a alimentação, a maioria classificou como saudável (54,39%).

A classificação final do quadro dos indivíduos (figura 10) foi realizada pela autora deste trabalho de acordo com as complicações registradas em prontuário. Os casos variaram entre leve, moderado, grave ou fatal. Os indivíduos que tiveram a classificação ignorada foram decorrentes da ausência das informações necessárias em prontuário para classificação.

Figura 10 – Classificação final dos casos



Fonte: elaborado pela autora

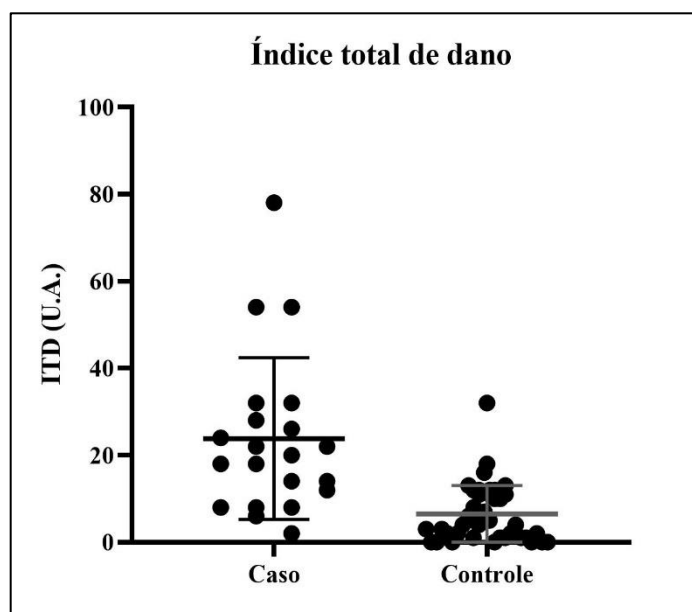
Legenda: Classificação final do quadro dos indivíduos. A maioria dos casos foram moderados (28,07%), seguida pelos casos leves (24,56%) e graves (22,81%). 3,51% dos casos foram fatais e 21,05% ignorados.

4.2 MARCADORES DA INSTABILIDADE GENÔMICA

4.2.1 Ensaio cometa

Para o ensaio cometa, 21 indivíduos foram avaliados no grupo caso e 42 indivíduos no grupo controle. Foi realizado a comparação entre ambos os grupos no que tange o ITD através teste não paramétrico para amostras independentes de Mann-Whitney, obtendo um valor de $p < 0,0001$. Os valores foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.). Grupo caso ($n = 21$): média $23,81 \pm 18,55$, mediana 20 (mín 2 - máx 78); Grupo controle ($n = 42$): média $6,48 \pm 6,58$, mediana 4 (mín 0 - máx 32) (Figura 11).

Figura 11 – Índice total de dano de DNA obtido pelo ensaio Cometa nos grupos avaliados



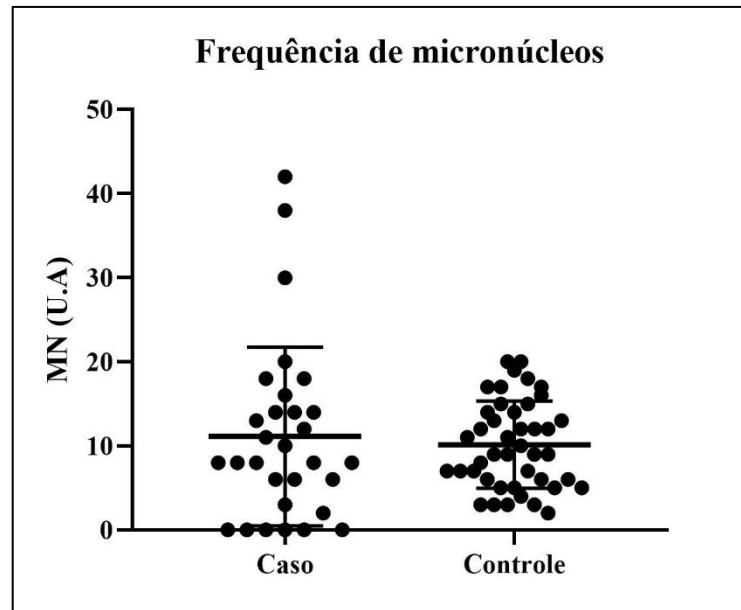
Fonte: elaborado pela autora

Legenda: Scatter plot representado com média e DP. As linhas horizontais internas representam as médias e as externas representam o desvio padrão (DP). Os valores foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.) Grupo caso (n = 21): média $23,81 \pm 18,55$, mediana 20 (2 - 78); grupo controle (n = 42): média $6,48 \pm 6,58$, mediana 4 (0 - 32); $p < 0,0001$.

4.2.2 Técnica de micronúcleos com bloqueio da citocinese celular (CBMN Cytome)

Para o ensaio CBMN Cytome, 30 indivíduos foram avaliados no grupo caso e 43 indivíduos no grupo controle. Foi realizada a comparação entre ambos os grupos no que tange as frequências de micronúcleo fazendo uso do teste t para amostras independentes (paramétrico), obtendo um valor de $p = 0,6101$ (Figura 12). Para comparar as frequências de pontes nucleoplasmáticas, foi realizado o teste não paramétrico para amostras independentes Mann-Whitney, obtendo um valor de $p < 0,0001$ (Figura 13). O mesmo teste foi aplicado para comparar as frequências de brotos nucleares entre os grupos caso e controle, obtendo um valor de $p < 0,0001$ (Figura 14).

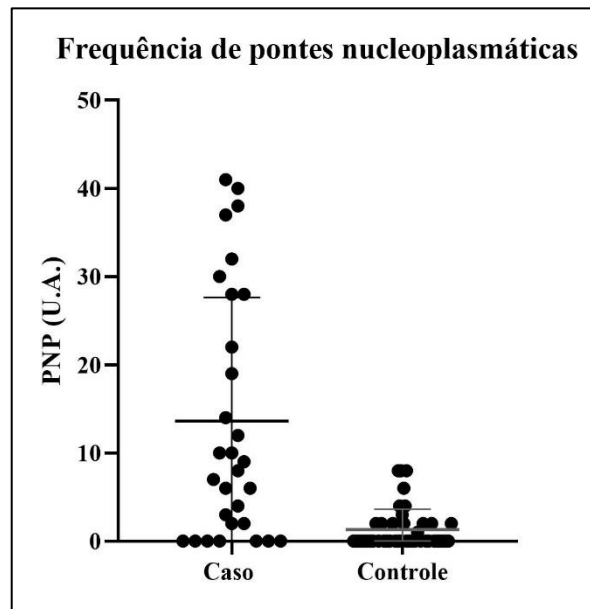
Figura 12 – Frequência de micronúcleos nos grupos caso e controle



Fonte: elaborado pela autora

Legenda: Scatter plot representado com média e DP. As linhas horizontais internas representam as médias e as externas representam o DP. Grupo caso (n = 30): média $11,10 \pm 10,63$, mediana 8 (0 - 42). Grupo controle (n = 43): média $10,14 \pm 5,19$; mediana 9 (2 - 20); $p = 0,6101$.

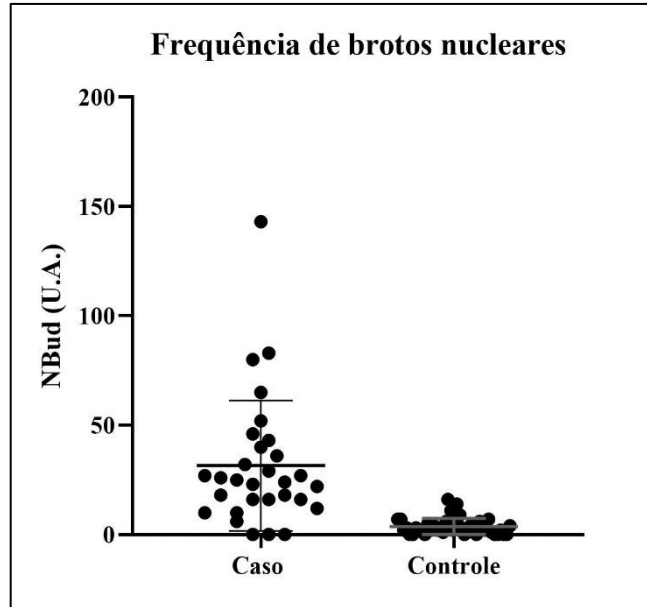
Figura 13 – Frequência de pontes nucleoplasmáticas nos grupos caso e controle



Fonte: elaborado pela autora

Legenda: Scatter plot representado com média e DP. As linhas horizontais internas representam as médias e as externas representam o DP. Grupo caso (n = 30): média $13,60 \pm 14,05$, mediana 8 (0 - 41). Grupo controle (n = 43): média $1,30 \pm 2,3$, mediana 0 (0 - 8); $p < 0,0001$.

Figura 14 – Frequência de brotos nucleares nos grupos caso e controle

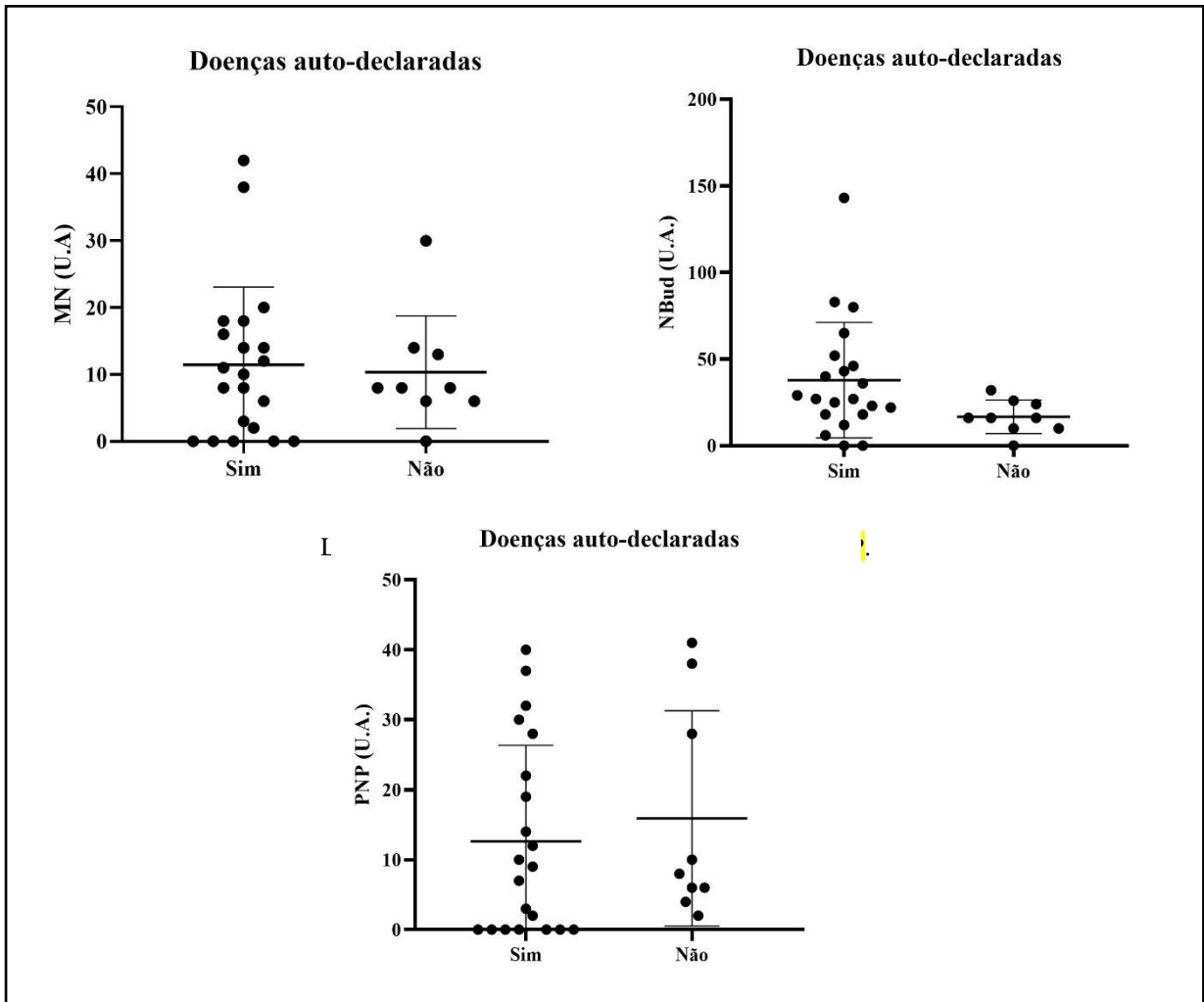


Fonte: elaborado pela autora

Legenda: Scatter plot representado com média e DP. As linhas horizontais internas representam as médias e as externas representam o DP. Grupo caso (n = 30): Média $31,5 \pm 29,81$; mediana 24 (0 - 143). Grupo controle (n = 43): média $3,63 \pm 3,73$, mediana 3 (0 - 16); $p < 0,0001$.

Foi verificado se houve relação entre o dano de DNA (ITD, MN, PNP, NBud) e a prática regular de atividade física, tabagismo e hábitos de alimentação saudáveis e não foi encontrada nenhuma relação. Também foi verificada a relação com a presença de doenças associadas (figura 15), tendo este destaque na relação com NBud, com $p = 0,0343$. Também foi visualizado que o dano de DNA não teve relação significativa com a classificação final dos casos.

Figura 15 – Relação entre a presença de comorbidades no grupo caso e dano de DNA



Fonte: elaborado pela autora

Legenda: a) relação entre a presença de comorbidades e micronúcleo (MN), com $p = 0,8668$; b) relação entre a presença de comorbidades e pontes nucleoplasmáticas (PNP), com $p = 0,3997$; c) relação entre a presença de comorbidades e brotos nucleares (NBud), com $p = 0,0343$, apresentando diferença de distribuição de dano no grupo “com comorbidades” quando comparado ao grupo “sem comorbidades”

4.3 CORRELAÇÕES

Foram realizadas correlações de Spearman entre o grupo caso e as variáveis MN, PNP, NBud, ITD e idade (Tabela 3). Houve correlação positiva entre NBud e idade com $p = 0,001$ (Figura 14) e correlação negativa entre ITD e idade, com $p = 0,009$.

Tabela 3 – Correlações entre as variáveis avaliadas no grupo caso

	MN	PNP	NBud	ITD	idade
MN	---	0,313	-0,038	-0,347	0,060
PNP		---	0,148	0,096	-0,189
NBud			---	-0,441	0,556**
ITD				---	-0,557*
idade					---

Fonte: elaborado pela autora

Legenda: os valores expressos na tabela correspondem ao coeficiente de correlação de Spearman (ρ) (**): a correlação é significativa no nível $p \leq 0,01$; (*): a correlação é significativa no nível $p \leq 0,05$.
 MN: Micronúcleos; PNP: Pontes Nucleoplasmáticas; NBud: brotos nucleares; ITD: Índice total de dano (ensaio cometa).

A Tabela 4 mostra as correlações de Spearman encontradas no grupo controle entre as variáveis MN, PNP, NBud, ITD e idade. Houve correlação positiva entre MN e PNP com $p = 0,006$, correlação positiva entre MN e NBud, com $p = 0,001$, correlação positiva entre idade e MN, com $p = 0,001$ e correlação positiva entre PNP e NBud, com $p < 0,001$.

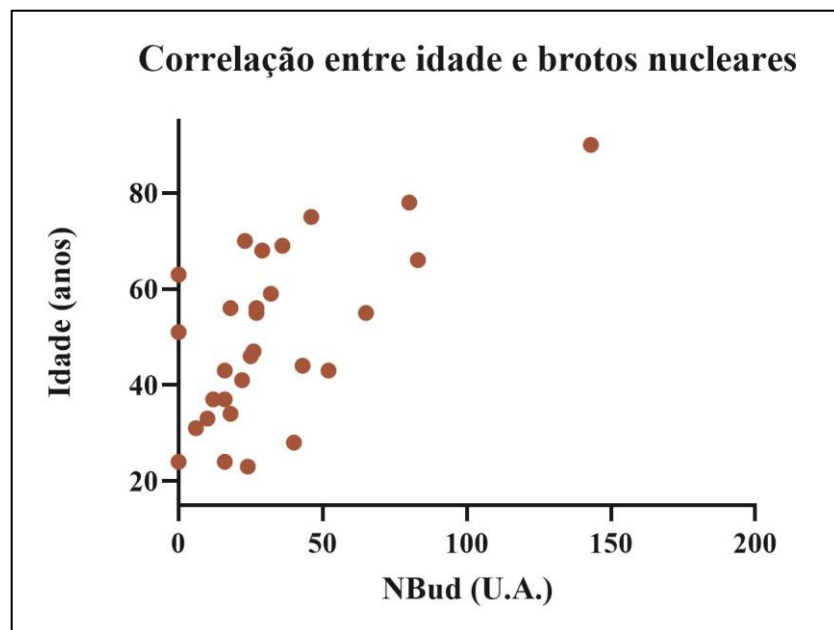
Tabela 4 – Correlações entre as variáveis avaliadas no grupo controle

	MN	PNP	NBud	ITD	Idade
MN	---	0,411	0,499**	0,242	0,485**
PNP		---	0,615	0,183	-0,022
NBud			---	0,209	-0,042
ITD				---	-0,134
ID					---

Fonte: elaborado pela autora

Legenda: os valores expressos na tabela correspondem ao coeficiente de correlação de Spearman (ρ) (**): a correlação é significativa no nível $p \leq 0,01$; (*). MN: Micronúcleos; PNP: Pontes Nucleoplasmáticas; NBud: brotos nucleares; ITD Índice total de dano (ensaio cometa).

Figura 16 – Correlação entre a presença de brotos nucleares no grupo caso e idade



Fonte: elaborado pela autora

Legenda: Gráfico de dispersão mostrando a correlação entre idade (anos) e NBud (U.A.). Observa-se que, quanto maior a idade, maior a quantidade de NBuds detectados no grupo caso

5 DISCUSSÃO

A pandemia de covid-19 desencadeou uma série de desafios não apenas para a saúde pública, mas também para a compreensão dos mecanismos biológicos subjacentes aos danos causados pela infecção. Até o momento, foram relatados diversos mecanismos pelos quais o SARS-CoV-2 faz uso para gerar dano celular nas células afetadas. O estudo do dano ao DNA nos pacientes infectados ainda permanece pouco explorado na literatura atual, provavelmente devido ao fato de ser um vírus de RNA, cujos mecanismos de replicação acontecem no citoplasma celular. Entretanto, os mecanismos intracelulares podem levar posteriormente a danos ao DNA celular (GRAND, 2023). Esse trabalho avaliou danos ao DNA em pacientes infectados com SARS-CoV-2 utilizando as técnicas de Ensaio Cometa e de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese Celular, sendo a última técnica relacionada ao dano de DNA estabelecido após a ação do sistema de reparo celular, ainda não relatada em literatura em pacientes acometidos com covid-19.

Os grupos caso e controle foram adequadamente pareados por idade ($p = 0,3641$) e sexo ($p = 0,4272$), indicando que não houve diferença destas variáveis entre os grupos caso e controle. Isso nos permite uma boa interpretação das análises que foram realizadas, obtendo precisão nas comparações entre os grupos. Observa-se que houve prevalência do sexo masculino (61,4%) no grupo caso, com média de idade de 51,49 anos. Hipertensão e diabetes foram as comorbidades mais prevalentes, representando 47,37% e 26,32% da população, respectivamente. Richardson e colaboradores (2020), em um estudo realizado em Nova Iorque envolvendo 5.700 pacientes hospitalizados com covid-19, encontraram uma população com um perfil semelhante: média de idade de 63 anos, maioria do sexo masculino (60,3%); 56,6% dos pacientes com hipertensão e 33,8% com diabetes. A classificação final dos casos obteve maioria como moderados (28,07%), seguida pelos casos leves (24,56%) e graves (22,81%). Os casos fatais corresponderam 3,51% e 21,05% tiveram o desfecho ignorado.

O ensaio cometa foi o método utilizado neste trabalho para avaliar o dano de DNA antes da ação do sistema de reparo celular nos pacientes diagnosticados com covid-19, sendo o índice total de dano (ITD) mensurado em unidades arbitrárias (U.A.) e classificado de acordo com o tamanho da cauda. O ITD do grupo caso obteve uma média de $23,81 \pm 18,55$ U.A.; o grupo controle com uma média de $6,48 \pm 6,58$ U.A., indicando que houve diferença entre os grupos quanto ao índice de dano total com aumento de dano no grupo caso quando comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$). Essa diferença também foi encontrada por Bektemur *et al* (2023), Doğan *et al* (2023), Basaran *et al* (2023) e Gioia *et al* (2023), indicando que o ITD é

maior em pacientes com covid-19. O ensaio cometa detecta principalmente quebras de fita simples, que é um tipo de lesão que geralmente é restaurada pelo sistema de reparo. Já o ensaio CBMN Cytome reflete as lesões após a ação do sistema de reparo, que se consolidam com a formação de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares (MALUF et al., 2007).

Considerando a técnica CBMN Cytome, o dano de DNA foi avaliado através das frequências de MN, NBud e PNP, quantificadas em unidades arbitrárias (U.A.). Foi verificado que não houve diferença entre o grupo caso e o grupo controle quanto à frequência de MN ($p = 0,6101$), porém houve diferença significativa na frequência de NBuds ($p < 0,0001$) e PNP ($p < 0,0001$). Houve uma dificuldade significativa em obter o crescimento celular adequado, podendo ter afetado na visualização efetiva dos danos celulares. Esta dificuldade pode ser atribuída à ação direta do vírus nas células, que pode interferir no seu desenvolvimento. A fitohemaglutinina, utilizada para estimular a divisão celular neste estudo pode não ter sido eficaz devido à presença viral, comprometendo assim o processo de proliferação celular necessário para a análise precisa dos micronúcleos. Passos e Maluf (2020) também relataram falhas na proliferação de linfócitos T após estimulação *in vitro* em pacientes infectados pelo vírus HIV, destacando a complexidade da interação entre o vírus e o sistema imunológico celular. Diversos mecanismos interligados, como inflamação, estresse oxidativo e genotoxicidade, pelos quais SARS-CoV-2 pode desencadear o dano de DNA (GIOIA *et al*, 2023) podem dificultar a proliferação de linfócitos. Desta forma, a frequência de MN, assim como de PNP e NBuds, pode ter sido prejudicada devido à dificuldade em obter o crescimento celular ideal.

Os altos níveis de PNP encontrados no grupo caso podem ter ocorrido devido ao efeito clastogênico (quebra de cromossomos) da infecção viral, responsável pela formação de PNP. As PNP originam-se de cromossomos dicêntricos resultantes de quebras de DNA mal reparadas ou fusões de extremidades de telômeros e amplificação genética (REICHHOLD et al., 2008). Já a frequência elevada de NBuds no grupo caso com relação ao grupo controle pode estar relacionada à citotoxicidade causada pelo vírus, pelos medicamentos e pelas EROs geradas durante a infecção viral. O estresse oxidativo gera radicais livres que causam danos ao material genético nas células do epitélio pulmonar e em células circulantes no organismo.

Sabe-se que a covid-19 tem ampla relação com a inflamação do trato respiratório, sendo os tabagistas considerados como um grupo de risco para a doença. Entretanto, no grupo caso, foi verificado que não houve relação entre o dano de DNA com o tabagismo. Este achado se deve provavelmente devido ao grupo ter apenas um tabagista ativo e 33,33% ($n = 19$) ex-tabagistas. Esse resultado contradiz Mihaljevic *et al* (2022), que encontraram relação

significativa entre ITD e tabagismo em pacientes com covid-19. Entretanto, Hoffmann e Speit (2005) fizeram um estudo de ensaio cometa e micronúcleo em fumantes pesados (uso de mais de 20 cigarros por dia) e foi verificado que não houve dano de DNA significativo no grupo caso. Foi analisada a relação entre o dano de DNA e a prática regular de atividades físicas e hábitos alimentares saudáveis, não encontrando relação entre esses e os índices de ITD, MN, PNP e NBud. Também não foi encontrada a relação entre a classificação final dos casos e o dano de DNA.

Dentre as correlações realizadas no grupo caso, foi encontrada correlação positiva entre a idade e NBuds, mostrando que quanto maior a idade, maior a quantidade de brotos nucleares encontrados nas células dos indivíduos do grupo caso. Houve correlação negativa entre ITD e idade, revelando que, quanto menor a idade, maior o ITD. Já no grupo controle, houve correlação positiva entre MN, PNP e NBud entre si e entre a idade e MN, mostrando que quanto maior a idade, maior a quantidade de MN, e conseqüentemente maior quantidade de PNPs e NBuds.

Algumas limitações estiveram presentes. A coleta das amostras foi realizada durante a pandemia, em que o contato com os indivíduos deveria ser breve e o entrevistador deveria estar também garantindo a sua segurança. Sendo assim, alguns itens do questionário aplicado não puderam ser preenchidos de forma completa. Também foi observada dificuldade em obter crescimento celular adequado, o que pode ter interferido nas análises referentes ao ensaio CBMN Cytome. Embora com limitações foi identificado que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle no que tange a genotoxicidade e mutagenicidade.

Desde o início da pandemia de COVID-19, a evolução de SARS-CoV-2 tem resultado em várias variantes do vírus, cada uma com características genéticas e comportamentais distintas. Essas variantes, surgidas a partir de mutações no material genético do vírus, têm implicações significativas na transmissibilidade, na gravidade da doença e na eficácia das intervenções terapêuticas e vacinas. As variantes de preocupação, como a Alfa, Beta, Gama, Delta e Ômicron, foram associadas a surtos localizados e ondas globais de infecção, desafiando os esforços de controle da pandemia. A identificação dessas variantes é crucial, pois elas podem influenciar a resposta imunológica dos pacientes, mas também o grau e o tipo de dano ao DNA causado pelo vírus. O projeto "Implantação e execução de Programa preventivo de Testagem diagnóstica contra COVID-19 na Universidade Federal de Santa Catarina", implementado no ano de 2022, teve como um dos objetivos a identificação das variantes genômicas de SARS-CoV-2 que prevaleceram durante o período de junho de 2020 a novembro de 2022 em

Florianópolis. Foi verificado que no período correspondente ao presente estudo, as variantes B.1.1.28, Zeta e Gamma foram prevalentes.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram discutidos meios pelos quais a infecção por SARS-CoV-2 pode desencadear o dano de DNA, tendo destaque a inflamação, geração de espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo. O ensaio cometa permitiu identificar os danos acometidos em leucócitos antes do sistema de reparo celular, e o ensaio CBMN Cytome, após a ação desse sistema. Não apenas SARS-CoV-2 é responsável pelos índices encontrados, mas também todo o contexto de internação hospitalar, o que envolve a administração de medicamentos e complicações durante a internação.

Foi elucidado que os indivíduos com covid-19 apresentaram dano de DNA antes e após o sistema de reparo do DNA celular, evidenciado pelos ensaios cometa e de micronúcleo com bloqueio da citocinese celular. Entretanto, fatores como comorbidades, tabagismo, hábitos alimentares e prática de exercícios físicos não estiveram relacionados com dano. A idade dos participantes esteve relacionada apenas com a frequência de brotos nucleares, em que percebemos uma tendência de aumento de nBuds com o aumento da idade.

Este trabalho, portanto, não apenas contribui para o entendimento dos efeitos celulares da covid-19, corroborando com informações já relatadas em literatura, mas também traz à discussão que a covid-19 tem o potencial de mutagenicidade, já visualizado em pacientes que desenvolveram doenças crônicas após a infecção viral, podendo também ter contribuição com o câncer, embora seja uma condição clínica de origem multifatorial.

REFERÊNCIAS

- ABULSOUD, Ahmed I. *et al.* Mutations in SARS-CoV-2: insights on structure, variants, vaccines, and biomedical interventions. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 157, n. 113977, p. 1-20, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113977>.
- BARKER, S; WEINFELD, M; MURRAY, D. DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences. Mutation Research/Reviews In **Mutation Research**, [S.L.], v. 589, n. 2, p. 111-135, mar. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2004.11.003>.
- BASARAN, M. Mert *et al.* Effects of COVID-19 Disease on DNA Damage, Oxidative Stress and Immune Responses. **Toxics**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 386, 18 abr. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxics11040386>
- BEKTEMUR, Guven *et al.* Oxidative stress, DNA damage, and inflammation in COVID-19 patients. **Northern Clinics Of Istanbul**, [S.L.], v. 3, n. 10, p. 335-340, jun. 2023. Kare Publishing. <http://dx.doi.org/10.14744/nci.2022.00947>.
- BRIEGER, Katharine *et al.* Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Medical Weekly**, [S.L.], v. 142, n. 3334, p. 1-14, 17 ago. 2012. SMW Supporting Association. <http://dx.doi.org/10.4414/smw.2012.13659>.
- CALDECOTT, Keith W. DNA single-strand breaks and neurodegeneration. **Dna Repair**, [S.L.], v. 3, n. 8-9, p. 875-882, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.04.011>
- CASCELLA, Marco *et al.* Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). Treasure Island: Statpearls Publishing, 2021. 21 p. Disponível em: <https://apps.dtic.mil/sti/pdfs/AD1127230.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2024.
- CHEIJEN, Elle E. M.; WILSON, David M. Genome Integrity and Neurological Disease. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 8, p. 4142, 8 abr. 2022. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23084142>

- CHEN, Y; AZAD, M B; GIBSON, S B. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death & Differentiation*, [S.L.], v. 16, n. 7, p. 1040-1052, 1 maio 2009. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2009.49>.
- COLLIN, Fabrice. Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 20, n. 10, p. 2407, 15 maio 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20102407>.
- COLLINS, Francis Sellers. **The Language of God**: a scientist presents evidence for belief. New York: Free Press, 2006. 294 p.
- COSTANZO, Michele; GIGLIO, Maria Anna Rachele de; ROVIELLO, Giovanni Nicola. Deciphering the Relationship between SARS-CoV-2 and Cancer. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 9, p. 7803, 25 abr. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24097803>.
- DESAI, Amar D. *et al.* Long-term complications of COVID-19. **American Journal Of Physiology-Cell Physiology**, [S.L.], v. 322, n. 1, p. 1-11, 1 jan. 2022. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00375.2021>.
- DOĞAN, Hasan *et al.* Clinical Investigation of Leukocyte DNA Damage in COVID-19 Patients. **Current Issues In Molecular Biology**, [S.L.], v. 45, n. 2, p. 963-974, 19 jan. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cimb45020062>.
- FENECH, M. *et al.* Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 125-132, 16 dez. 2010. <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/geq052>.
- FENECH, Michael *et al.* Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. **Mutation Research/Reviews In Mutation Research**, [S.L.], v. 770, p. 12-25, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.04.008>.

FENECH, Michael. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, [S.L.], v. 2, n. 5, p. 1084-1104, maio 2007. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.77>.

FLORIANÓPOLIS. UNIDADE DE COMUNICAÇÃO SOCIAL – HU/UFSC. Taxa de mortalidade na UTI Covid do HU/UFSC cai para 20%. 2021. Disponível em:
<https://noticias.ufsc.br/2021/08/taxa-de-mortalidade-na-uti-covid-do-huufsc-cai-para-20/>.
Acesso em: 20 ago. 2023.

FORRESTER, Steven J. et al. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. **Circulation Research**, [S.L.], v. 122, n. 6, p. 877-902, 16 mar. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.117.311401>.

GIOIA, Ubaldo *et al.* SARS-CoV-2 infection induces DNA damage, through CHK1 degradation and impaired 53BP1 recruitment, and cellular senescence. **Nature Cell Biology**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 550-564, 9 mar. 2023. <http://dx.doi.org/10.1038/s41556-023-01096-x>

GRAND, Roger J. SARS-CoV-2 and the DNA damage response. **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 104, n. 11, p. 1-21, 10 nov. 2023. Microbiology Society.
<http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.001918>.

HOFFMANN, Heike; SPEIT, Günter. Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [S.L.], v. 581, n. 1-2, p. 105-114, mar. 2005.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.11.015>.

HRYCAY, Eugene G.; BANDIERA, Stelvio M. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. **Cytochrome P450 Function And Pharmacological Roles In Inflammation And Cancer**, [S.L.], p. 35-84, 2015. Elsevier.
<http://dx.doi.org/10.1016/bs.apha.2015.03.003>.

IDE, Hiroshi *et al.* DNA–protein cross-links: formidable challenges to maintaining genome integrity. **Dna Repair**, [S.L.], v. 71, p. 190-197, nov. 2018. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.024>.

JARROTT, Bevyn et al. "LONG COVID" - A hypothesis for understanding the biological basis and pharmacological treatment strategy. **Pharmacology Research & Perspectives**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-10, 13 jan. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/prp2.911>

JASICZEK, Jakub et al. Role of the RAAS in mediating the pathophysiology of COVID-19. **Pharmacological Reports**, [S.L.], v. 76, n. 3, p. 475-486, 23 abr. 2024. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1007/s43440-024-00596-3>.

JUNEJA, Saurabh *et al.* Utility of DNA-specific stains in micronuclei assay as a marker of genotoxicity in oral potentially malignant disorders and oral squamous cell carcinoma. **Journal Of Cytology**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 111, 2019. http://dx.doi.org/10.4103/JOC.JOC_230_16

KALYANARAMAN, Balaraman. Reactive oxygen species, proinflammatory and immunosuppressive mediators induced in COVID-19: overlapping biology with cancer. **Rsc Chemical Biology**, [S.L.], v. 2, n. 5, p. 1402-1414, 2021. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d1cb00042j>.

KEVADIYA, Bhavesh D. et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. **Nature Materials**, [S.L.], v. 20, n. 5, p. 593-605, 15 fev. 2021. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1038/s41563-020-00906-z>.

KIRTIPAL, Nikhil; BHARADWAJ, Shiv; KANG, Sang Gu. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. **Infection, Genetics And Evolution**, [S.L.], v. 85, p. 104502, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104502>.

LAI, Chih-Cheng *et al.* Long COVID: an inevitable sequela of sars-cov-2 infection. **Journal Of Microbiology, Immunology And Infection**, [S.L.], v. 56, n. 1, p. 1-9, fev. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2022.10.003>.

LEE, J.; KOO, N.; MIN, D. B.. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 21-33, jan. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x>.

LI, Ying-Shuang; REN, Hua-Cheng; CAO, Jian-Hua. Correlation of SARS CoV 2 to cancer: carcinogenic or anticancer? (review). **International Journal Of Oncology**, [S.L.], v. 60, n. 4, p. 1-17, 28 fev. 2022. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2022.5332>.

LUPSKI, James R.. Biology in balance: human diploid genome integrity, gene dosage, and genomic medicine. **Trends In Genetics**, Houston, v. 6, n. 38, p. 554-571, jun. 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2022.03.001>

LUZHNA, Lidiya; KATHIRIA, Palak; KOVALCHUK, Olga. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. **Frontiers In Genetics**, [S.L.], v. 4, n. 131, p. 1-17, 2013. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2013.00131>.

MALUF, S.W.; RIEGEL, M. Citogenética Humana. Porto Alegre: Artmed, 2011

MALUF, Sharbel Weidner *et al.* DNA damage in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [S.L.], v. 626, n. 1-2, p. 180-184, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.10.002>.

MENDIOLA-SALAZAR, Xóchitl Andrea et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Enhances Carboxypeptidase Activity of Angiotensin-Converting Enzyme 2. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 25, n. 11, p. 6276, 6 jun. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25116276>.

METCALFE, Neil B.; OLSSON, Mats. How telomere dynamics are influenced by the balance between mitochondrial efficiency, reactive oxygen species production and DNA damage. **Molecular Ecology**, [S.L.], v. 31, n. 23, p. 6040-6052, 6 set. 2021. <http://dx.doi.org/10.1111/mec.16150>

MIHALJEVIC, Olgica et al. DNA damage in peripheral blood lymphocytes of severely ill COVID-19 patients in relation to inflammatory markers and parameters of hemostasis. **Mutagenesis**, [S.L.], v. 37, n. 3-4, p. 203-212, 1 maio 2022. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/geac011>.

OLIVE, Peggy L; BANÁTH, Judit P. The comet assay: a method to measure dna damage in individual cells. **Nature Protocols**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 23-29, jun. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.5>.

PHANIENDRA, Alugoju; JESTADI, Dinesh Babu; PERIYASAMY, Latha. Free Radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian Journal Of Clinical Biochemistry**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 11-26, 15 jul. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>.

PRADHAN, Madhulika et al. COVID-19: clinical presentation and detection methods. **Journal Of Immunoassay and Immunochemistry**, Raipur, v. 43, n. 1, p. 1, 6 ago. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15321819.2021.1951291>.

RAHIMI, Azadeh; MIRZAZADEH, Azin; TAVAKOLPOUR, Soheil. Genetics and genomics of SARS-CoV-2: a review of the literature with the special focus on genetic diversity and sars-cov-2 genome detection. **Genomics**, [S.L.], v. 113, n. 1, p. 1221-1232, jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.09.059>.

RAY, Dhiman; LE, Ly; ANDRICIOAEI, Ioan. Distant residues modulate conformational opening in SARS-CoV-2 spike protein. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 118, n. 43, p. 1-11, 11 out. 2021. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2100943118>.

REICHHOLD, Stefanie *et al.* No Acute and Persistent DNA Damage after an Ironman Triathlon. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, [S.L.], v. 17, n. 8, p. 1913-1919, 1 ago. 2008. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.epi-08-0293>.

RICHARDSON, Safiya *et al.* Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. **Jama**, [S.L.], v. 323, n. 20, p. 2052, 26 maio 2020. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.6775>.

RIEGER, K.; SCHIAVONE, S.; MILLER JR., F. J.; KRAUSE, K.-H. Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Medical Weekly**, [S. l.], v. 142, n. 3334, p. w13659, 2012. DOI: 10.4414/smw.2012.13659. Disponível em: <https://smw.ch/index.php/smw/article/view/1569>. Acesso em: 2 ago. 2023.

SAMUDRALA, Pavan Kumar *et al.* Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 883, p. 173375, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173375>.

SHRIVASTAV, Meena; HARO, Leyma P de; A NICKOLOFF, Jac. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. **Cell Research**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 134-147, 24 dez. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2007.111>.

SILVA, Juliana da; ERDTMANN, Bernardo; ALBUQUERQUE, João Antonio Pêgas. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003. 422 p.

TIAN, Mingfu *et al.* HIF-1 α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-13, 18 ago. 2021. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-021-00726-w>.

WANG, Jin *et al.* 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. **Journal Of Leukocyte Biology**, [S.L.], v. 108, n. 1, p. 17-41, 13 jun. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1002/jlb.3covr0520-272r>.

World Health Organization. Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the->

international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic. Acesso em: 02 ago. 2023.

World Health Organization. **Number of COVID-19 deaths reported to WHO (cumulative total)**. 2024. Disponível em: <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths>. Acesso em: 21 ago. 2024.

World Health Organization. **Hazard Identification and Characterization: Toxicological and Human Studies, of Environmental Health Criteria 240 (EHC 240)**: section 4.5 - genotoxicity. 2. ed. World Health Organization, 2020.

WORLDOMETERS. Coronavirus (COVID-19) Mortality Rate. 2023. Disponível em: <https://www.worldometers.info/coronavirus/coronavirus-death-rate/>. Acesso em: 24 ago. 2023.

ZHANG, Huan-Ping et al. Recent developments in the immunopathology of COVID-19. **Allergy**, [S.L.], v. 78, n. 2, p. 369-388, 5 dez. 2022. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/all.15593>.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO BIOREPOSITÓRIO

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada “Busca de marcadores genéticos e epigenéticos em pacientes com COVID-19: formação de um biorepositório”, que tem como objetivo geral formar um biorepositório de amostras de indivíduos com COVID-19 e indivíduos saudáveis para investigar o papel dos fatores genéticos e dos fatores ambientais sobre a expressão de genes relacionados com a resposta imune e com a metabolização e transporte de fármacos que podem ser importantes no tratamento da COVID-19. Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados dos projetos relacionados a este tema que serão desenvolvidos com a amostra que você disponibilizar permitirão compreendermos o que faz com que algumas pessoas tenham maior facilidade de desenvolver a doença do que outras e porque algumas pessoas respondem melhor aos medicamentos utilizados do que outras. Essas informações podem contribuir para uma melhor triagem de indivíduos de maior risco e uma melhor personalização de tratamentos em caso de novas infecções.

Para sua participação nesta pesquisa faremos uma coleta de sangue periférico e uma coleta com swab nasal (que é parecido com um cotonete). Nenhum dos dois procedimentos acarretará em dor, entretanto, você pode sentir um leve desconforto no momento da coleta e pode ficar com um hematoma no local da coleta do sangue. Mas não se preocupe, esta marca arroxeadada desaparecerá em poucos dias sem a necessidade de nenhuma ação de sua parte. Para diminuir a chance destes riscos, aconselhamos que você não carregue peso com o braço onde foi realizada a coleta. Também será realizada uma entrevista através de questionário semiestruturado, onde coletaremos informações sociodemográficas e hábitos de vida (coisas como fumar, beber, fazer atividade física, entre outras). Você pode se sentir um pouco constrangido ao longo da entrevista, por incômodo em falar ou, ainda, por mobilização emocional. Desta forma, os riscos serão minimizados, pois, você não precisará responder a qualquer pergunta ou fornecer quaisquer informações durante a entrevista se sentir-se desconfortável ou achar que a resposta trata-se de algo muito particular, contudo os pesquisadores estarão dispostos a lhe ouvir, interromper a entrevista se assim você desejar, retornando a coletar os dados sob sua anuência tão logo se sinta à vontade para continuá-la. Para alcançarmos os objetivos propostos, precisaremos coletar também algumas informações de seu prontuário médico, mas não se preocupe que olharemos somente as informações

pertinentes a esta pesquisa (efeitos adversos quando utilizou algum medicamento, resultados de exames clínicos, entre outros).

Você poderá interromper ou cancelar a coleta ou o preenchimento do questionário quando achar necessário, sem que isso acarrete em quaisquer represálias atuais ou futuras. Afinal, você não é obrigado a participar da pesquisa e a sua decisão de não participar ou de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento será respeitada. Caso você tenha interesse em saber sobre o andamento ou o resultado desta pesquisa, você pode entrar em contato com a pesquisadora principal cujo contato encontra-se ao final deste termo. Se decidir que não quer mais participar desta pesquisa, você também pode comunicar sua decisão para a pesquisadora principal e sua vontade será respeitada. Destacamos que sua participação nesta pesquisa não influenciará em nada no tratamento que você vem recebendo atualmente na unidade que em que você está internado e ou em tratamento no hospital.

Para alcançarmos os objetivos propostos nesta pesquisa, precisamos comparar pessoas infectadas com COVID-19 com pessoas não infectadas, e as amostras que forem coletadas serão armazenadas durante o período de desenvolvimento do trabalho. As amostras estarão sob responsabilidade da pesquisadora principal cujo contato está apresentado abaixo e ficarão armazenadas no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE) na Universidade Federal de Santa Catarina até a finalização dos objetivos desta pesquisa. Portanto, pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte de uma amostra de sangue periférico e de um swab nasal. A utilização do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa, ou se você concordar, em outras pesquisas futuras com temática relacionada à atual desde que devidamente aprovadas pelo CEP.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em eventos ou periódicos científicos, mas seu anonimato sempre será mantido. Contudo, destacamos que apesar de nossos esforços para manter os dados anônimos, sempre existe a possibilidade mesmo que remota de quebra de sigilo, ainda que involuntária e não intencional. Caso isso aconteça, serão tomadas as providências necessárias de acordo com a legislação.

A legislação brasileira não permite que você tenha qualquer compensação financeira pela sua participação nesta pesquisa, contudo, você não terá nenhuma despesa advinda da sua participação, já que a coleta e a entrevista serão realizadas enquanto você estiver no hospital. Entretanto, se você tiver despesas extraordinárias comprovadamente decorrentes da sua participação na pesquisa, as mesmas serão ressarcidas mediante apresentação de comprovante. Se ocorrer algum dano em decorrência de sua participação na pesquisa, você poderá solicitar indenização de acordo com a legislação vigente.

Se você tiver alguma dúvida a respeito da pesquisa, você pode entrar em contato com a pesquisadora responsável: Profa. Dra. Juliana Dal-Ri Lindenau, no Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética localizado no Campus Reitor João David Ferreira Lima - Bairro Córrego Grande, Florianópolis- SC, Brasil, telefone (048) 37219887, email: juliana.lindenau@ufsc.br.

Os aspectos éticos e a confidencialidade das informações fornecidas, relativos às pesquisas com seres humanos, serão respeitados de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras da Resolução N° 466, de 12 de dezembro de 2012 e Resolução N° 441 de 2011, aprovadas pelo Conselho Nacional de Saúde.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação na pesquisa, você poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEPSH/UFSC) da Universidade Federal de Santa Catarina: Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), Rua: Desembargador Vitor Lima, número 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC, CEP 88040-400, telefone (48) 3721-6094, e-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br. O CEPSH é um órgão colegiado interdisciplinar, deliberativo, consultivo e educativo, vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina, mas independente na tomada de decisões, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Eu, _____RG_____, confirmo que recebi todas as informações necessárias para entender porque e como este estudo está sendo realizado e nesses termos e considerando-me livre e esclarecido (a):

- () Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.
- () Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisas, desde que relacionadas com a temática da pesquisa atual e devidamente aprovadas pelo comitê de ética em pesquisas com seres humanos.

Este documento está redigido em duas vias, deverá ser assinado por você e pela pesquisadora e cada um deverá ficar com uma via. O mesmo deve ser rubricado em todas as suas páginas por todos os envolvidos (participante e pesquisador).

Florianópolis, ____ de _____ de ____.

Assinatura do (a) participante: _____

Assinatura do (a) pesquisador (a): _____

ANEXO B
QUESTIONÁRIO BIOREPOSITÓRIO COVID-19

Nome: _____ **Prontuário:** _____

Sexo: () F () M **Data de nascimento:** ___/___/___ **Data coleta:** ___/___/___

Telefone para contato: _____ **E-mail:** _____

Estado civil: () casado(a)/união consensual () solteiro(a) () Separado(a)/ divorciado(a)
() viúvo(a)

Grau de escolaridade: () fundamental incompleto () fundamental completo () ensino médio incompleto () ensino médio completo () superior incompleto () superior () pós-graduação

Qual é a sua principal ocupação (que gera maior renda): _____

Bloco Histórico de Saúde:

Entrevistador, leia as opções abaixo e em caso de categorias com mais de uma patologia possível, sublinhe a(s) condição(ões) apresentada(s) pelo participante. As questões sobre tratamento medicamentoso somente devem ser aplicadas aqueles participantes que responderam *Sim* na pergunta sobre a condição e se referem a situações atuais ou anteriores.

I.1) Doença arterial coronariana () Não () Sim Há quanto tempo? _____

I.1.1) Utiliza algum medicamento? () Não () Sim Qual? _____ Dose: _____

Há quanto tempo? _____ Efeitos adversos? _____

I.2) Colesterol e/ou Triglicérides alto (gordura no sangue) () Não () Sim

Há quanto tempo? _____

I.2.1) Utiliza algum medicamento? () Não () Sim Qual? _____ Dose: _____

Há quanto tempo? _____ Efeitos adversos? _____

I.3) Aneurisma, derrame ou acidente vascular cerebral () Não () Sim

Há quanto tempo? _____

I.3.1) Utiliza algum medicamento? () Não () Sim Qual? _____ Dose: _____

Há quanto tempo? _____ Efeitos adversos? _____

I.4) Coagulopatias (trombose, hemofilia, anemia falciforme, outras) () Não () Sim
 Há quanto tempo? _____

I.4.1) Utiliza algum medicamento? () Não () Sim Qual? _____ Dose: _____
 Há quanto tempo? _____ Efeitos adversos? _____

I.5) Hipertensão arterial/ pressão alta () Não () Sim
 Há quanto tempo? _____

I.5.1) Utiliza algum medicamento? () Não () Sim Qual? _____ Dose: _____
 Há quanto tempo? _____ Efeitos adversos? _____

I.6) Diabetes (açúcar no sangue) () Não () Sim Há quanto tempo?

I.6.1) Utiliza algum medicamento? () Não () Sim Qual? _____ Dose: _____
 Há quanto tempo? _____ Efeitos adversos? _____

I.7) Doença pulmonar (asma, enfisema, DPOC, outra) () Não () Sim Há quanto tempo?

I.7.1) Utiliza algum medicamento? () Não () Sim Qual? _____ Dose: _____
 Há quanto tempo? _____ Efeitos adversos? _____

I.8) Doença respiratória viral (gripe, resfriado comum, faringite, laringite, bronquite, bronquiolite, pneumonia)

() Não () Sim Com que frequência? _____ ou Há quanto tempo? _____

I.8.1) Utiliza algum medicamento? () Não () Sim Qual? _____ Dose: _____
 Há quanto tempo? _____ Efeitos adversos? _____

I.9) Costuma realizar a vacina da gripe? () Não () Sim Com que frequência? _____

I.10) Infecções sexualmente transmissíveis (AIDS, sífilis, clamídia, gonorreia, HPV, herpes genital, tricomoníase, outras)? () Não () Sim Há quanto tempo? _____

I.10.1) Utiliza algum medicamento? () Não () Sim Qual? _____ Dose: _____
 Há quanto tempo? _____ Efeitos adversos? _____

I.11) Doença causada por parasita (amebíase, giardíase, leishmaniose, malária, toxoplasmose, chagas, tricomoníase, esquistossomose, ascaridíase, teníase, outras)

() Não () Sim Há quanto tempo? _____

I.11.1) Utiliza algum medicamento? () Não () Sim Qual? _____ Dose: _____

Há quanto tempo? _____ Efeitos adversos? _____

I.12) Câncer () Não () Sim Há quanto tempo? _____ Qual? _____

I.12.1) Utiliza algum medicamento? () Não () Sim Qual? _____ Dose: _____

Há quanto tempo? _____ Efeitos adversos? _____

I.13) Problemas hormonais (hipo ou hipertireoidismo, osteoporose, menopausa, ovário policístico, carência de testosterona, obesidade, outras) () Não () Sim

Há quanto tempo? _____

I.13.1) Utiliza algum medicamento? () Não () Sim Qual? _____ Dose: _____

Há quanto tempo? _____ Efeitos adversos? _____

I.14) Outras doenças ou problemas de saúde? _____

I.15) Algum outro medicamento ou suplemento? (Informar nome, indicação, dose, frequência semanal e horário do dia. Entrevistador, dar atenção especial aos suplementos de vitamina D, C, ferro e ômega 3) ? _____

Bloco Estilo de Vida:

II.1) Atualmente, você pratica alguma atividade física de maneira regular (pelo menos 2 vezes por semana)? _____ **II.1.1) Se sim, qual (is):** () corrida () hidroginástica () caminhada () futebol () musculação () vôlei () ginástica () natação () outro (especifique) _____

II.1.2) Total de minutos dispendidos nestas atividades elencadas acima, por semana:

() 40-60 minutos/semana () 61-80 minutos/semana () 81-100 minutos/semana

() 100 ou mais minutos/semana

II.1.3) Como você classificaria seu nível de condicionamento físico?

Sedentário	Pouquíssimo Ativo	Pouco Ativo	Ativo	Bastante Ativo	Atleta

II.2) Você possui alguma limitação física (dor, lesão ou cirurgia nos ossos, músculos ou articulações) que limite e/ou impeça a prática de atividades físicas?

II.3) Você fuma ou já fumou? () Não () Sim, é fumante () Ex-fumante
() Fumante passivo

II.3.1) Se sim, em média quantos cigarros você fuma por dia? _____

II.3.2) Em caso de utilização de narguilé, com qual frequência? _____

II.4) Você bebe álcool ou já bebeu? () Não () Sim, socialmente () Alcoólatra
() Ex- Alcoólatra

II.4.1) Se sim, em média quanto você bebe por dia e qual bebida? _____

II.5) Você ingere frutas e verduras regularmente (todos os dias)? () Não () Sim

II.5.1) Se sim, em média quantas porções por dia? _____

II.5.2) Quantas porções são de frutas e vegetais ricos em vitamina C (laranja, limão, tangerina, tomate, brócolis, couve-flor, kiwi, batata doce, morangos, mamão...) por dia?

II.5.3) Quantas porções de leguminosas e oleaginosas (como feijão e castanhas) por dia?

II.6) Você ingere doces ou bebidas açucaradas regularmente (todos os dias)? () Não () Sim

II.6.1) Se sim, em média quantas porções por dia? _____

II.7) Você ingere frituras regularmente (todos os dias)? () Não () Sim

II.7.1) Se sim, em média quantas porções por dia? _____

II.8) De maneira geral, como você classificaria sua alimentação?

Nada saudável	Pouquíssimo Saudável	Pouco Saudável	Saudável	Muito Saudável

Bloco Informações da família:

III.1) Algum parente (primeiro grau) já teve problema respiratório? () Não () Sim () Não sabe informar

Qual condição? _____ Nível de parentesco: _____

III.2) Algum parente (primeiro grau) já teve problema de coagulação? () Não () Sim () Não sabe informar

Qual condição? _____ Nível de parentesco: _____

III.3) Algum parente (primeiro grau) já teve algum tipo de câncer? () Não () Sim () Não sabe informar

Qual condição? _____ Nível de parentesco: _____

Espaço extra:

Entrevistador, utilize este espaço para anotar qualquer outra informação relevante fornecida pelo participante

Nome do entrevistador:
