

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

HEIDI LUISE SCHULTE

**Caracterização clínica, epidemiológica e do perfil metabólico da
coinfecção SARS-CoV-2/DENV**

Orientadora: Laila Salmen Espindola

Coorientador: Norberto Peporine Lopes

Coorientador: Alan Cesar Pilon

BRASÍLIA

2024

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

HEIDI LUISE SCHULTE

**Caracterização clínica, epidemiológica e do perfil metabólico da
coinfecção SARS-CoV-2/DENV**

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

Orientadora: Laila Salmen Espindola
Coorientador: Norberto Peporine Lopes
Coorientador: Alan Cesar Pilon

BRASÍLIA
2024

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sc Schulte, Heidi Luise
 Caracterização clínica, epidemiológica e do perfil
 metabolômico da coinfeção SARS-CoV-2/DENV / Heidi Luise
 Schulte; orientador Laila Salmen Espindola; co-orientador
 Alan Cesar Pilon. -- Brasília, 2024.
 164 p.

 Tese(Doutorado em Ciências Médicas) -- Universidade de
 Brasília, 2024.

 1. COVID-19. 2. dengue. 3. coinfeção. 4. série de casos.
 5. perfil metabolômico. I. Espindola, Laila Salmen, orient.
 II. Pilon, Alan Cesar, co-orient. III. Título.

HEIDI LUISE SCHULTE

**Caracterização clínica, epidemiológica e do perfil metabólico da
coinfecção SARS-CoV-2/DENV**

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

Aprovada em 8 de outubro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Profa. Laila Salmen Espindola (Presidente)
Universidade de Brasília

Dr. Didier Stien
Centre National de la Recherche Scientifique/CNRS, França

Profa. Licia Maria Henrique da Mota
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Unesp/Araraquara

Dra. Fernanda de Bruycker Nogueira
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Laila Salmen Espindola, que me guiou e motivou desde a Graduação. Obrigada pela sabedoria, paciência, humanidade, comprometimento e amor pela ciência e educação.

Aos meus coorientadores, Prof. Alan Cesar Pilon e Prof. Norberto Peporine Lopes pelas inúmeras contribuições e dedicação a este trabalho e à minha formação, incluindo o deslocamento para a USP-RP que possibilitou a aquisição dos dados em CLAE-EM/EM utilizados nesta tese.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacognosia/UnB por me apoiarem e incentivarem todos os dias. Especialmente ao Prof. João Paulo Barreto Sousa, grande amigo, por todo apoio desde o Mestrado, com destaque para os ensinamentos sobre métodos analíticos, sem os quais esta tese não existiria; e à doutoranda Laís da Silva Morais, que é base de sustentação do Lab. Farmacognosia há mais de 10 anos, e possibilitou a extração dos metabólitos descritos nesta tese em poucas semanas.

À Profa. Lorena Albernaz por seu empenho e cuidado com todos os integrantes do Laboratório de Farmacognosia/UnB.

Aos membros da Banca Examinadora, Profs. Drs. Didier Stien, Licia Maria Henrique da Mota, Ian Castro-Gamboa e Fernanda de Bruycker Nogueira, por suas valiosas contribuições ao conteúdo e forma final deste trabalho.

À equipe do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília (PPGCM/UnB), especialmente às minhas colegas de doutoramento Gabriela, Maíra, Eliana e Francielle, heroicas médicas que salvaram inúmeras vidas ao longo da pandemia, enquanto contribuía também para a ciência.

Ao secretário Alessandro do PPGCM/UnB, por sua paciência e dedicação aos professores e estudantes, que possibilitaram o desenvolvimento e conclusão de dezenas de trabalhos.

Aos Professores do PPGCM/UnB, que em meio a pandemia, guiaram trabalhos transformadores.

Ao Prof. Olindo Assis Martins Filho por tantas oportunidades de contribuir em trabalhos de alto nível e pelos ensinamentos na arte da organização de informações.

À Universidade Católica de Brasília (UCB) pela oportunidade de ser professora, em especial às professoras Laís Flávia, Samara Haddad e Silvia Alcanfor que são docentes

brilhantes e lideranças incansáveis; e aos estudantes da UCB que me desafiam, inspiram e ensinam todos os dias.

Aos Profs. Drs., André Nicola, Denise Brentan e Ian Castro-Gamboa por suas valiosas contribuições ao trabalho durante a qualificação ao doutorado.

À Dr. Maria Eugenia Monge e equipe pela colaboração durante a *First School of Integrated Metabolomics 2023*, sediada no Instituto de Química (IQ) da Unesp, em Araraquara, e por permitir o uso do inovador *software* TidyMS.

Novamente, aos Profs. Ian Castro-Gamboa e Alan Pilon, por permitirem e acompanharem os essenciais deslocamentos para a Unesp/Araraquara. Aproveito para agradecer à FAPESP e ao INCT BioNat pelo financiamento destes deslocamentos. Agradeço também aos demais integrantes do NuBBE, que sempre me receberam com muito carinho.

À FAP-DF pela oportunidade de realizar visita técnica via Edital N° 07/2022 ao grupo liberado pela Dr. Madeleine Ernst no *Statens Serum Institut*, Copenhagen, Dinamarca. Também agradeço diretamente à Dr. Madeleine e sua equipe, que me receberam com muita gentileza e contribuíram muito com o pré-processamento dos dados desta tese, além de serem inspirações de seres humanos e pesquisadores.

Ao Projeto ArboControl (TED 74/2016 e TED 42/2017) - acordo de cooperação entre a UnB e o Ministério da Saúde, por viabilizar a execução deste trabalho.

À Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC) pela oportunidade de coordenar o projeto de extensão SBPC ViGiAa: SBPC vai à Escola treinando crianças vigilantes contra o *Aedes aegypti*. Aos professores e crianças da Escola Classe Córrego do Arrozal, uma escola que é um exemplo de dedicação e missão à formação de cidadãos.

A todos os professores da alfabetização ao ensino superior, que transformaram e transformam milhares de vidas, inclusive a minha.

Por fim, agradeço a todos os profissionais de saúde, aos quais devemos nossas vidas, e aos pacientes participantes da pesquisa clínica, que, mesmo em momento de grande fragilidade, possibilitaram a concretização de inúmeros estudos e o avanço da ciência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha família, especialmente à minha mãe Carla que lutou bravamente por 30 anos não só como mãe, mas como enfermeira, e que é minha principal fonte de amor, suporte e ensinamentos. Ao meu irmão Johannes e minha cunhada Giovana, pelo contínuo amor, apoio e incentivo ao longo de tantos anos.

Ao meu namorado Jorge, pelo amor, conforto, paciência e compreensão ao longo dessa jornada. Obrigada pelo apoio inabalável ao longo destes 10 anos.

À minha amiga/irmã Camila e sua família, que constantemente me acolhem emocionalmente e “residencialmente”, e são fontes de inspiração diárias. À amiga Mariana por toda a parceria e amizade inestimáveis ao longo dos últimos 11 anos.

Às amigas Patrícia e Aléxia também pelo apoio e acolhimento fundamentais para trilhar este caminho. *Also, to my friend Colin, who constantly supported me all the way from Vancouver.*

RESUMO

A pandemia de COVID-19 exacerbou os desafios de saúde pública nas regiões endêmicas de dengue, como o Distrito Federal, incluindo os casos de coinfeção por SARS-CoV-2 e DENV. No Capítulo I desta tese, foram descritos 13 casos de coinfeção SARS-CoV-2/DENV, diagnosticados entre abril e setembro de 2020 no Hospital Universitário de Brasília (HUB). Informações foram coletadas a partir de prontuários médicos hospitalares sobre os achados clínicos e laboratoriais mais relevantes, o processo diagnóstico, intervenções terapêuticas, bem como os desfechos e acompanhamento dos pacientes. Estes dados evidenciaram a dificuldade em distinguir entre as duas infecções, que compartilham sintomas e características laboratoriais comuns, atrasando o diagnóstico de coinfeção SARS-CoV-2/DENV e comprometendo o manejo clínico. A melhora clínica foi verificada em todos os pacientes em até 21 dias, não indicando piora do desfecho clínico em razão da coinfeção. No Capítulo II, a metabolômica não direcionada foi aplicada para identificar as diferenças metabólicas entre pacientes com dengue, coinfeção SARS-CoV-2/DENV, e COVID-19 (grave e não grave). Análises por PCA e PLS-DA mostraram uma separação clara entre os grupos, sugerindo alterações metabólicas distintas, com destaque para 31 metabólitos putativos incluindo aminoácidos, ácidos biliares e lipídios, como PA 40:3 e LPC 0:0/16:0, glicerofosfolipídios envolvidos na resposta inflamatória. Os pacientes coinfectados apresentaram um perfil metabólico mais semelhante ao de pacientes com dengue e COVID-19 não grave, sugerindo que a coinfeção não exacerba a resposta inflamatória ou agrava os desfechos clínicos. Até onde vai o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo experimental de coinfeção SARS-CoV-2/DENV. O Capítulo III reuniu artigos desenvolvidos durante o doutorado, abordando diversos aspectos da COVID-19 no Distrito Federal, no contexto da parceria entre o HUB e o Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UnB. Os estudos investigaram mediadores inflamatórios, perfil de coagulação, saúde mental de profissionais de saúde e coinfeções, como COVID-19/hanseníase. Este trabalho contribuiu para ampliar o conhecimento sobre essas doenças e coinfeções, incluindo a compreensão das alterações metabólicas na coinfeção SARS-CoV-2/DENV em comparação com infecções isoladas.

Palavras-chave: COVID-19, dengue, coinfeção, série de casos, perfil metabolômico

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic has exacerbated public health challenges in dengue-endemic regions, such as Federal District (Brazil), including cases of SARS-CoV-2 and DENV coinfection. In Chapter I of this thesis, 13 cases of SARS-CoV-2/DENV coinfection, diagnosed between April and September 2020 at the University Hospital of Brasília (HUB), were described. Information was collected from hospital medical records on the most relevant clinical and laboratory findings, the diagnostic process, therapeutic interventions, as well as patient outcomes and follow-up. These data highlighted the difficulty in distinguishing between the two infections, which share common symptoms and laboratory characteristics, delaying the diagnosis of SARS-CoV-2/DENV coinfection and compromising clinical management. Clinical improvement was observed in all patients within 21 days, indicating no worsening of clinical outcomes due to the coinfection. In Chapter II, untargeted metabolomics was applied to identify metabolic differences between patients with dengue, SARS-CoV-2/DENV coinfection, and COVID-19 (severe and non-severe). PCA and PLS-DA analyses showed a clear separation between the groups, suggesting distinct metabolic alterations, with emphasis on 31 putative metabolites including amino acids, bile acids, and lipids such as PA 40:3 and LPC 0:0/16:0, glycerophospholipids involved in the inflammatory response. Coinfected patients presented a metabolic profile more similar to that of dengue and non-severe COVID-19 patients, suggesting that coinfection does not exacerbate the inflammatory response or worsen clinical outcomes. To the best of our knowledge, this is the first experimental study of SARS-CoV-2/DENV coinfection. Chapter III compiled articles developed during the doctoral research, addressing various aspects of COVID-19 in the Federal District, in the context of the partnership between HUB and the Graduate Program in Medical Sciences at the University of Brasília (UnB). The studies investigated inflammatory mediators, coagulation profiles, mental health of healthcare professionals, and coinfections such as COVID-19/leprosy. This work contributed to expanding knowledge about these diseases and coinfections, including understanding the metabolic alterations in SARS-CoV-2/DENV coinfection compared to isolated infections.

Keywords: COVID-19, dengue, coinfection, case series, metabolic profile

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática sumarizando os objetivos dos Capítulos I, II e III desta tese.....	19
Figura 2. Sinais e sintomas descritos em prontuários hospitalares referentes à primeira avaliação clínica de pacientes com coinfeção por SARS-CoV-2/DENV (SCHULTE et al., 2021).....	34
Figura 3. Linha do tempo apresentando o diagnóstico inicial estabelecido nos 13 casos de coinfeção SARS-CoV-2/DENV notificados pelo Hospital Universitário de Brasília (HUB) entre abril e setembro de 2020. As divisões no eixo x (marcadas por pequenos triângulos) representam as semanas epidemiológicas. As linhas de fundo representam as curvas epidêmicas para dengue (linha azul) e COVID-19 (linha rosada), com base em relatórios oficiais do Ministério da Saúde do Brasil (MS, 2020a, 2020b; SCHULTE et al., 2021).	35
Figura 4. Diagrama do processo de preparo das amostras de soro desde o descongelamento até a análise final por CLAE-EM/EM, incluindo processo de extração dos metabólitos e evaporação das amostras até secura antes do transporte para a USP-RP.	49
Figura 5. Sistema de codificação padronizado para identificação de amostras biológicas coletadas pelo PPGCM-UnB. O exemplo se refere a uma amostra coletada no Brasil (BR), Distrito Federal (DF), mais especificamente no Hospital Universitário de Brasília (HUB), que é representado pelo número 01. Esta foi a primeira amostra de plasma (A1) coletada no HUB, já que foi registrada na primeira página do primeiro caderno de registros deste hospital.	55
Figura 6. Armazenamento e identificação das amostras de sangue periférico utilizando o código padronizado. (A) Organização das amostras em caixas para criotubos, onde cada caixa acomoda amostras de dois pacientes, cujos códigos estão fixados no exterior da caixa. As alíquotas de plasma foram marcadas com adesivos vermelhos, e as de soro, com adesivos amarelos, facilitando a identificação visual. (B) Exemplos da aplicação das etiquetas com código padronizado impresso em alíquotas mantidas em tubos <i>ependorf</i> e tubos de coleta..	56
Figura 7. Registro de pacientes e amostras em cadernos. (A) Capa do caderno de registros (livro ata) com identificação BR.DF01A, referente ao primeiro caderno de registro do HUB. (B) Termo de abertura do caderno BR.DF01A. (C) e (D) Exemplos do registro dos pacientes BR.DF02A040 e BR.DF02A077, nas páginas 40 e 77, respectivamente. Em cada página, são detalhados os diferentes tipos de amostras coletadas, incluindo soro e plasma, com as respectivas datas de coleta.....	57

Figura 8. Captura de tela do registro eletrônico das informações sobre as amostras coletadas e seus respectivos metadados, organizados em uma planilha Excel compartilhada entre os pesquisadores do PPGCM/UnB, com destaque para as amostras registradas do paciente BR.DF02A040.....	58
Figura 9. Representação esquemática das duas abordagens para obtenção de amostras de sangue utilizadas neste estudo e as proporções de amostras obtidas por cada abordagem dentro de cada grupo: CS (controles saudáveis), DENGUE, COINFECÇÃO, COVID-19 e COVID-19 grave.	59
Figura 10. Comparação entre os perfis cromatográficos obtidos para amostras coletadas diretamente pela equipe UnB e amostras obtidas pela rotina. (A) BPCs das amostras coletadas pela equipe da UnB; (B) BPCs das amostras obtidas na rotina hospitalar; (C) PCA mostrando a distribuição de três amostras obtidas pela UnB e três amostras obtidas pela rotina hospitalar para cada um dos grupos: CS, DENGUE, COINFECÇÃO, COVID-19 e COVID-19 grave. *BPC: <i>base peak chromatogram</i> ; PCA: análise de componentes principais.	61
Figura 11. Sintomas predominantes relatados nos grupos DENGUE, COINFECÇÃO, COVID-19 e COVID-19 grave. O diâmetro das circunferências é proporcional à porcentagem de pacientes de cada grupo que relataram o sintoma, conforme relatado na Tabela 3.	65
Figura 12. Fluxograma das etapas do processamento e análise dos dados metabolômicos. A aquisição dos dados foi realizada por CLAE-EM/EM, seguida do pré-processamento utilizando o <i>software</i> MZmine 3. Posteriormente, os dados foram anotados com auxílio de ferramentas como SIRIUS, GNPS, HMDB e MassBank. As etapas de visualização e análise estatística dos dados foram realizadas com os <i>softwares</i> PLS_Toolbox, MetaboAnalyst 6.0, GraphPad Prism e Excel.	67
Figura 13. Gráficos de PCA e PLS-DA resultantes da aplicação de diferentes métodos de processamento: (A) centralização na média (<i>mean centering</i>); (B) normalização por variável normal padrão (SNV) seguida de centralização na média; e (C) combinação de transformação log10, normalização por SNV e centralização na média. As análises foram realizadas com as 64 amostras de soro selecionadas para realizar as análises metabolômicas: 6 controles saudáveis (CS), 13 de DENGUE, 7 de COINFECÇÃO, 27 de COVID-19, e 11 de COVID-19 grave. Esta análise considerou os 878 <i>features</i> selecionadas após curadoria dos dados. Os valores de RMSEC e RMSECV apresentados em cada gráfico indicam a qualidade dos ajustes de cada modelo.	83
Figura 14. Gráficos de PCA e PLS-DA resultantes da aplicação de diferentes métodos de processamento: (A) autoescalonamento (<i>autoscaling</i>), (B) transformação log10 seguida de	

autoescalamento, e (C) combinação de transformação log10, normalização por variável normal padrão (SNV) e autoescalamento. As análises foram realizadas com as 64 amostras de soro selecionadas para realizar as análises metabolômicas: 6 controles saudáveis (CS), 13 de DENGUE, 7 de COINFEÇÃO, 27 de COVID-19, e 11 de COVID-19 grave. Esta análise considerou os 878 *features* selecionadas após curadoria dos dados. Os valores de RMSEC e RMSECV apresentados em cada gráfico indicam a qualidade dos ajustes de cada modelo.... 84

Figura 15. Gráficos tridimensionais de PCA (A) e PLS-DA (B) mostrando a distribuição das 64 amostras de soro UnB analisadas: 6 controles saudáveis (CS), 13 de DENGUE, 7 de COINFEÇÃO, 27 de COVID-19, e 11 de COVID-19 grave. As análises foram realizadas após o processamento dos dados com a combinação de log10+SNV+*autoscaling*. 89

Figura 16. Gráficos de PCA e PLS-DA resultantes da aplicação de diferentes métodos de processamento: (A) autoescalamento (*autoscaling*), (B) transformação log10 seguida de autoescalamento, e (C) combinação de transformação log10, normalização por SNV e autoescalamento. As análises foram realizadas com amostras de soro provenientes da rotina hospitalar: 12 controles saudáveis (CS), 8 de DENGUE, 2 de COINFEÇÃO, 10 de COVID-19, e 10 de COVID-19 grave. Os valores de RMSEC e RMSECV apresentados em cada gráfico indicam a qualidade dos ajustes de cada modelo. 91

Figura 17. Distribuição tridimensional das 64 amostras de soro analisadas por PLS-DA, considerando 31 metabólitos putativos. Os dados foram processados utilizando log10, SNV e *autoscaling*. 92

Figura 18. Análise de importância das variáveis para a discriminação entre grupos usando XGBoostDA. 94

Figura 19. Variação nos níveis de aminoácidos e derivados entre grupos de amostras de soro analisadas. (A) Mapa de calor representando as alterações em cada indivíduo, onde as cores variam de azul (baixa intensidade) a vermelho (alta intensidade). (B) Diagramas de caixa ilustrando a distribuição dos níveis destes metabólitos entre os diferentes grupos, destacando as diferenças estatisticamente significativas. *DF-leucina/isoleucina: N-(1-Desoxi-1-frutosil)leucina/isoleucina; CMHS-Arg: N2-(2-Carboximetil-2-hidroxissuccinol)arginina.... 95

Figura 20. Variação nos níveis de ácidos biliares entre grupos de amostras de soro analisadas. (A) Mapa de calor representando as alterações em cada indivíduo, onde as cores variam de azul (baixa intensidade) a vermelho (alta intensidade). (B) Diagramas de caixa ilustrando a distribuição dos níveis destes metabólitos entre os diferentes grupos, destacando as diferenças estatisticamente significativas. 99

Figura 21. Variação nos níveis de lipídios entre grupos de amostras de soro analisadas. (A) Mapa de calor representando as alterações em cada indivíduo, onde as cores variam de azul (baixa intensidade) a vermelho (alta intensidade). (B) Diagramas de caixa ilustrando a distribuição dos níveis destes metabólitos entre os diferentes grupos, destacando as diferenças estatisticamente significativas. 103

Figura 22. Gráfico de radar ilustrando um panorama geral das alterações metabólicas encontradas para cada grupo..... 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos casos de coinfeção por SARS-CoV-2/DENV (SCHULTE et al., 2021).	33
Tabela 2. Diagnóstico inicial; intervalo entre os diagnósticos inicial e final de coinfeção; intervenções terapêuticas; acompanhamento e desfecho de casos de COVID-19 e dengue (SCHULTE et al., 2021).....	37
Tabela 3. Dados clínicos dos pacientes dos quais foram coletadas amostras de soro para avaliação do perfil metabolômico separados por grupos (controles saudáveis, dengue, coinfeção SARS-CoV-2/ DENV, COVID-19 e COVID-19 grave).	64
Tabela 4. Tabela de metabólitos putativos, contendo informações sobre suas classes, fórmulas moleculares, tempos de retenção (tR), valores de m/z teórica e detectada, erro de m/z (em ppm), fragmentos obtidos na análise EM/EM, <i>softwares</i> de anotação utilizados com seus respectivos escores, referências bibliográficas e números de identificação internacional (HMDB, PubChem, CHEBI e/ou LipidMaps). As classes dos metabólitos e os valores de m/z teórica estão de acordo com os dados do repositório da plataforma RefMet.....	73
Tabela 5. Tabela comparativa das métricas de desempenho obtidas para PCA e PLS-DA utilizando diferentes métodos de processamento: <i>mean centering</i> , SNV + <i>mean centering</i> , log10 + SNV + <i>mean centering</i> , autoscaling, log10 + <i>autoscaling</i> , e log10 + SNV + <i>autoscaling</i> . As métricas avaliadas abrangem sensibilidade (Cal e CV), especificidade (Cal e CV), erro de Classificação (Cal e CV), RMSEC, RMSECV, R ² Cal, e R ² CV, para os grupos Controles Saudáveis (CS), DENGUE (DENG), COINFEÇÃO (COINF), COVID-19, e COVID-19 grave. Também são apresentados os valores médios de RMSEC, RMSECV, R ² Cal e R ² CV.	85
Tabela 6. Métricas de desempenho da PLS-DA após aplicação combinada de log10, normalização por SNV e autoescalamento aos 878 <i>features</i> , considerando três dimensões latentes (LV1, LV2 e LV3). As métricas avaliadas abrangem sensibilidade (Cal e CV), especificidade (Cal e CV), erro de classificação (Cal e CV), RMSEC, RMSECV, R ² Cal, e R ² CV, para os grupos Controles Saudáveis (CS), DENGUE, COINFEÇÃO (COINF), COVID-19, e COVID-19 grave. Também são fornecidos os valores médios para cada métrica.	87
Tabela 7. Métricas de desempenho da PLS-DA após aplicação combinada de log10, normalização por SNV e autoescalamento aos 31 <i>features</i> de metabólitos anotados, considerando três dimensões latentes (LV1, LV2 e LV3). As métricas avaliadas abrangem sensibilidade (Cal e CV), especificidade (Cal e CV), erro de classificação (Cal e CV), RMSEC,	

RMSECV, R^2 Cal, e R^2 CV, para os grupos Controles Saudáveis (CS), DENGUE, COINFECÇÃO (COINF), COVID-19, e COVID-19 grave. Também são fornecidos os valores médios para cada métrica.	93
Tabela 8. Metabólitos observados em níveis semelhantes nos casos de COINFECÇÃO e infecções isoladas.	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cal: *Calibration* (Calibração)

CLAE-EM/EM: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

COVID-19: *Coronavirus Disease 2019*

CS: Controles Saudáveis

CV: *Cross-Validation* (Validação Cruzada)

DF: Distrito Federal

DENV: Dengue Virus

HRT: Hospital Regional de Taguatinga

HRAN: Hospital Regional da Asa Norte

HUB: Hospital Universitário de Brasília

LPC: *Lysophosphatidylcholine* (lisofosfatidilcolina)

LPE: *Lysophosphatidylethanolamine* (Lisofosfatidiletanolamina)

MeCN: acetonitrila

MeOH: metanol

MS: Ministério da Saúde

m/z – Razão massa/carga

NS1: *Nonstructural protein 1* (proteína não estrutural 1)

OMS: Organização Mundial da Saúde

PA: *Phosphatidic Acid* (ácido fosfatídico)

PC: *Phosphatidylcholine* (Fosfatidilcolina)

PCA: *Principal Component Analysis* (análise de componentes principais)

PLS-DA: *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (análise discriminante por mínimos quadrados parciais)

ppm: partes por milhão

PS: *Phosphatidylserine* (fosfatidilserina)

RMSEC: *Root Mean Square Error of Calibration* (erro quadrático médio da calibração)

RMSECV: *Root Mean Square Error of Cross Validation* (erro quadrático médio da validação cruzada)

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa)

SARS-CoV-2: *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

SNV: *Standard Normal Variate* (variação normal padrão)

tR: Tempo de retenção

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1. COVID-19	20
2.1.1. COVID-19 e coinfeções	23
2.2. Dengue	25
2.2.1. Dengue e coinfeções	28
2.3. Metabolômica no estudo de COVID-19 e dengue	29
3. CAPÍTULO I	31
3.1. OBJETIVO GERAL	31
3.2. METODOLOGIA	31
3.3. RESULTADOS	34
3.4. DISCUSSÃO	38
3.5. CONCLUSÃO	45
4. CAPÍTULO II	46
4.1. OBJETIVO GERAL	46
4.2. METODOLOGIA	46
4.2.1. População de estudo	46
4.2.2. Amostras biológicas	47
4.2.3. Dados clínicos, sociais e epidemiológicos	48
4.2.4. Análise do perfil metabolômico	48
4.2.4.1. Preparação de amostras para análise em CLAE-EM/EM.....	48
4.2.4.2. Aquisição de dados em CLAE-EM/EM	49
4.2.4.3. Pré-processamento dos dados	50
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.3.3. Análises metabolômicas	65
4.3.3.1. Anotação dos dados	68
4.3.3.2. Visualização dos dados e análises estatísticas	80
4.4. CONCLUSÃO	111
5. CAPÍTULO III	112
5.1. OBJETIVO GERAL	112
5.2. ARTIGOS PUBLICADOS, SUBMETIDOS E EM ELABORAÇÃO ENVOLVENDO O ESTUDO DA COVID-19	112
5.2.1. COVID-19 e coinfeções	112
5.2.2. COVID-19 e mediadores imunológicos solúveis	114

5.2.3.	COVID-19 e os efeitos na gestação.....	114
5.2.4.	COVID-19 e coagulação.....	116
5.2.5.	COVID-19 e saúde mental.....	116
5.2.6.	COVID-19 e expressão gênica.....	117
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	118
7.	REFERÊNCIAS.....	120
ANEXO I	– Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa CAAE 34164820.6.0000.0030.....	141
ANEXO II	- Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa CAAE 30846920.7.0000.0008.....	148
ANEXO III	– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	157

1. INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, o Centro Chinês para Controle e Prevenção de Doenças (CDC-China) reportou um cluster de casos de pneumonia de causa desconhecida. Em janeiro de 2020, a causa foi associada a um novo vírus da família Coronaviridae, nomeado SARS-CoV-2 (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2*) (OMS, 2020; TAN et al., 2020). Em 11 de março do mesmo ano, a Organização Mundial da Saúde (OMS) caracterizou a doença causada pelo SARS-CoV-2, denominada COVID-19 (do inglês, *coronavirus disease 2019*), como uma pandemia. Desde então, foram registrados mais de 775 milhões de casos de COVID-19, incluindo pelo menos 7 milhões de óbitos, resultando em uma sobrecarga sem precedentes nos sistemas de saúde e transformando profundamente aspectos sociais e econômicos em escala global (OMS, 2020, 2024a).

No Brasil, bem como em outros países endêmicos de dengue, os primeiros casos de COVID-19 foram notificados durante um período epidêmico de dengue, levantando preocupações sobre os impactos da cocirculação de SARS-CoV-2 e DENV. Dentre as principais questões levantadas estavam: sobrecarga dos sistemas de saúde; possíveis atrasos no diagnóstico, tratamento e medidas de mitigação; subnotificação de casos; deterioração nas intervenções de vigilância e controle; agravamento das desigualdades sociais; e a possibilidade de coinfeções SARS-CoV-2/DENV e suas implicações no prognóstico dos pacientes (BUTT et al., 2020; CARDONA-OSPINA et al., 2020; MIAH; HUSNA, 2020; NACHER et al., 2020; OLIVE et al., 2020).

Em agosto de 2020, os primeiros casos de coinfeção SARS-CoV-2/DENV foram relatados na literatura. Tais relatos ressaltaram os desafios diagnósticos decorrentes da similaridade entre os sintomas dessas infecções, especialmente nos estágios iniciais, e do potencial de reatividade cruzada em testes sorológicos. Esses fatores dificultam a distinção entre dengue, COVID-19 e, em especial, a coinfeção, podendo resultar em atrasos ou erros no diagnóstico, o que compromete a eficácia do manejo clínico e das medidas preventivas (BICUDO et al., 2020; RAHMAN; RAHMAN, 2020; SADDIQUE et al., 2020). Adicionalmente, emergiram preocupações quanto ao impacto da coinfeção na gravidade das doenças, com a possibilidade de que tanto a COVID-19 quanto a dengue pudessem ser agravadas devido a uma resposta inflamatória intensificada ou a um comprometimento da função imunológica (CARDONA-OSPINA et al., 2020).

A fim de construir evidências mais robustas a respeito dos aspectos clínicos, epidemiológicos e sociais da coinfeção SARS-CoV-2/DENV, faz-se necessária a documentação contínua e detalhada das características clínicas e laboratoriais, abordagens diagnósticas, intervenções terapêuticas e desfechos clínicos dos casos de coinfeção. Além disso, existe uma demanda de investigar os aspectos fisiopatológicos da coinfeção em comparação com as infecções isoladas, já que essas informações são escassas na literatura (CARDONA-OSPINA et al., 2020; RAHMAN; RAHMAN, 2020). Estudos que avaliem os impactos fisiopatológicos de ambas as doenças ocorrendo simultaneamente são praticamente inexistentes, e mesmo as infecções por COVID-19 e dengue isoladamente continuam sob constante investigação.

Durante infecções virais, podem ocorrer diversas alterações no metabolismo do hospedeiro. Metabolismo é definido como o conjunto de reações bioquímicas dentro de um organismo que permitem manter a vida, crescer, reproduzir-se e responder ao ambiente. Os produtos e moléculas intermediárias das vias metabólicas são denominados metabólitos, e incluem pequenas moléculas como lipídios, açúcares, nucleotídeos e aminoácidos (TOUNTA et al., 2021).

Quando um vírus como o SARS-CoV-2 ou o DENV infecta um organismo, ele promove alterações no metabolismo celular do hospedeiro para favorecer sua replicação, resultando em mudanças significativas no perfil de metabólitos (TOUNTA et al., 2021). Um exemplo dessas alterações é a indução da glicólise anaeróbica em detrimento da glicólise aeróbica, estratégia que alguns vírus utilizam para atender às altas demandas energéticas necessárias para produzir novas partículas virais (MAYER et al., 2019).

Além disso, o perfil metabólico do hospedeiro também pode ser modificado como reflexo do processo inflamatório e do dano tecidual causados pela infecção viral. Durante o processo inflamatório, os níveis de lipídios podem sofrer alterações significativas, uma vez que esses compostos estão envolvidos na síntese de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos (ARCHAMBAULT et al., 2020).

Neste contexto, a metabolômica é uma área da ciência que vem se destacando na investigação da fisiopatologia de diversas doenças, incluindo infecções virais. A metabolômica é definida como a análise de todos os metabólitos em um determinado sistema biológico numa determinada condição (KLASSEN et al., 2017). Ao identificar metabólitos endógenos e exógenos em amostras biológicas, a metabolômica permite a detecção de alterações metabólicas qualitativas e quantitativas (ASHRAFIAN et al., 2021). Portanto, a análise metabolômica pode ser utilizada para ampliar o entendimento das interações entre hospedeiro

e patógenos, tanto destacando padrões metabólicos únicos de uma determinada condição quanto mostrando as similaridades entre as alterações metabólicas causadas por diferentes doenças, apontando assinaturas moleculares úteis para diagnóstico, tratamento e desenvolvimento de outros estudos (BYERS et al., 2019).

Tendo em vista a necessidade de investigar e documentar a coinfeção SARS-CoV-2/DENV, e o potencial da metabolômica clínica na investigação de infecções virais, este trabalho tem por objetivos: *(i)* no Capítulo I, descrever uma série de 13 casos de coinfeção SARS-CoV-2/DENV diagnosticados no Hospital Universitário de Brasília (HUB), detalhando desafios do diagnóstico e manejo clínico, bem como aspectos epidemiológicos, sociais e possíveis estratégias de prevenção; *(ii)* no Capítulo II, aplicar metabolômica não direcionada para caracterizar as diferenças entre o perfil metabólico de pacientes com dengue, coinfeção SARS-CoV-2/DENV, e COVID-19, incluindo a distinção entre COVID-19 não grave e grave.

Esta tese inclui ainda o Capítulo III, que reúne artigos elaborados a partir da colaboração entre estudantes, docentes e egressos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília (PPGCM/UnB) em diversos projetos conjuntos para a produção e ampliação de conhecimentos sobre o SARS-CoV-2, a COVID-19 e a pandemia. Dentre os projetos relacionados, destacam-se o TARGET (JARDIM-SANTOS et al., 2022; KURIZKY et al., 2021), PRODEST (FERNANDES et al., 2021), FORCE (BARROS-AREAL et al., 2022), e o estudo da COVID-19 no contexto de outras coinfeções, como com a hanseníase (MORAIS et al., 2021).

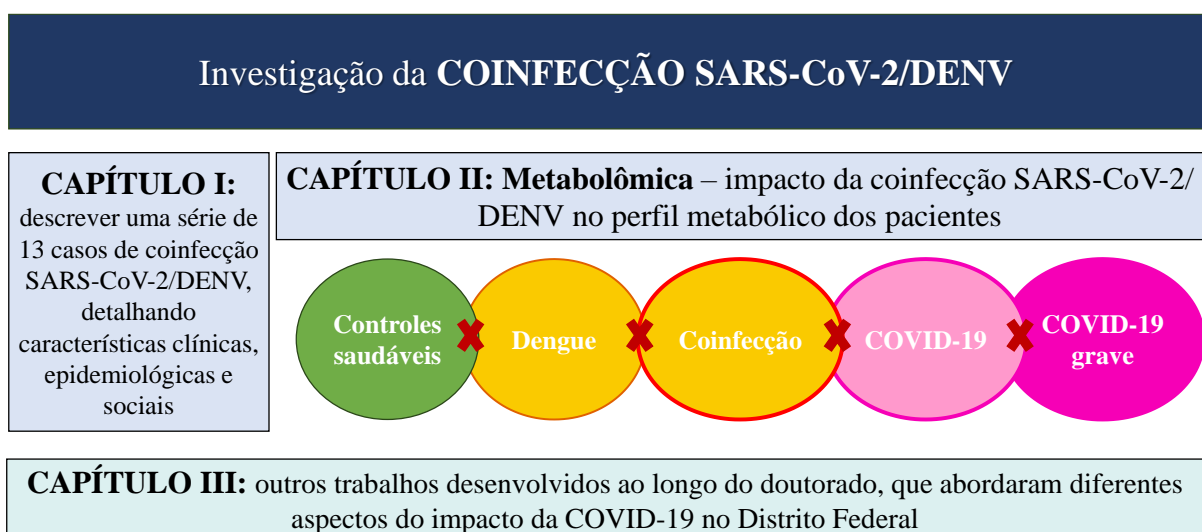


Figura 1. Representação esquemática resumando os objetivos dos Capítulos I, II e III desta tese.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. COVID-19

A COVID-19 é predominantemente transmitida por gotículas respiratórias expelidas quando uma pessoa infectada tosse, espirra, fala ou respira. Essas partículas podem alcançar os olhos, nariz ou boca de outra pessoa e causar a infecção. Também pode ocorrer transmissão por aerossóis, que são gotículas respiratórias menores, capazes de permanecer suspensas no ar por mais tempo, geralmente horas, e se deslocar por distâncias maiores. Este tipo de transmissão costuma ocorrer em ambientes fechados, mal ventilados ou lotados, onde as pessoas tendem a passar períodos de tempo mais extensos (MS, 2023; OMS, 2021).

A apresentação clínica da COVID-19 pode variar de completamente assintomática até a forma grave e óbito. Os sintomas mais comuns são febre, tosse e dificuldade respiratória (dispneia), mas também fadiga, mialgia, náuseas, vômitos, diarreia, cefaleia, fraqueza, rinorreia, dor de garganta, perda de olfato (anosmia) e de paladar (ageusia) (CDC, 2024; WIERSINGA et al., 2020). Contudo, uma série de complicações podem levar à progressão para forma grave ou mesmo ao óbito. Dentre elas estão pneumonia, síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), lesões no fígado e no coração, eventos trombóticos, doenças renais e neurológicas, além de sepse (MERAD et al., 2022).

Embora a fisiopatologia exata da COVID-19 permaneça sob constante investigação, a patogênese da doença grave tem sido fortemente associada a uma resposta imune desregulada (BHARDWAJ et al., 2021; DARIF et al., 2021; MERAD et al., 2022). Parte dessa desregulação está relacionada à incapacidade de montar uma resposta antiviral apropriada, devido a falhas na resposta imune inata – especialmente na resposta mediada por interferons (IFNs), bem como desequilíbrios na imunidade adaptativa. Essas disfunções atrasam o *clearance* viral e desencadeiam uma resposta inflamatória descontrolada, caracterizada pelo recrutamento de células imunes efetoras, que pode persistir mesmo após a eliminação do SARS-CoV-2 (MERAD et al., 2022; PERICO et al., 2021).

Uma resposta imune eficaz na limitação da replicação viral depende da produção atempada de IFNs tipo I (INF-I) pelas células hospedeiras. A liberação de INF-I deve acontecer no início da resposta imune inata contra vírus, quando células infectadas reconhecem o material genético viral através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os Toll-like (TLRs) e RIG-I-like (RLRs). A rápida produção e secreção de INF-I ativa genes antivirais tanto na célula infectada quanto em células vizinhas, induzindo um estado antiviral que restringe a

replicação e a disseminação do vírus (MERAD et al., 2022; SCHULTZE; ASCHENBRENNER, 2021).

Pacientes com mutações genéticas ou autoanticorpos que interferem nas vias dos INF têm maior predisposição para desenvolver apresentações mais graves da COVID-19. Um exemplo são indivíduos com mutações em loci que controlam a produção e amplificação de IFN tipo I dependente de TLR3 e IRF7 (ZHANG et al., 2020). Tais distúrbios atrasam a produção de INF-I, o que resulta em replicação viral descomedida e disseminação do vírus no hospedeiro (MERAD et al., 2022; SCHULTZE; ASCHENBRENNER, 2021). Como consequência, a secreção de IFN-I pode se prolongar excessivamente, induzindo produção contínua de quimiocinas. As quimiocinas, por sua vez, recrutam infiltrados celulares inflamatórios, contribuindo para liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias, exacerbação da inflamação e piores desfechos clínicos (LUCAS et al., 2020; MERAD et al., 2022).

Além do atraso na produção de INF-I, outras perturbações na imunidade inata foram relacionadas com a gravidade da COVID-19. Em pacientes com COVID-19 grave, observa-se severa redução de macrófagos alveolares, células que atuam como sentinelas nos pulmões e contribuem para uma resposta imunológica antiviral robusta (DELOREY et al., 2021; LIAO et al., 2020). Foi reportada também redução no número de células NK circulantes, acompanhada de disfunção destas células atribuída ao fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), uma citocina que regula negativamente a atividade de várias células do sistema imunológico, incluindo as células NK (WITKOWSKI et al., 2021).

Os desbalanços na resposta imune inata se refletem também na composição apropriada da resposta imune adaptativa. Em pacientes graves, é comum a redução no número de células dendríticas e a linfopenia profunda de células T, causada pelo sequestro dessas células nos tecidos ou pela apoptose induzida por citocinas pró-inflamatórias (MATHEW et al., 2020; WILK et al., 2020; ZHOU et al., 2020). Esse quadro pode comprometer a eficácia da eliminação viral mediada por células T. Mais além, defeitos nas respostas imunes do tipo 1 e uma resposta imunológica excessiva do tipo 2 têm sido associados a formas graves de COVID-19 (LUCAS et al., 2020), indicando que uma resposta imunológica adaptativa inadequada pode contribuir para o retardo da eliminação viral e progressão da doença (MERAD et al., 2022).

A eliminação tardia do vírus, resultante das disregulações imunológicas, culmina em um ciclo inflamatório exacerbado. Neste ciclo, a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e o contínuo recrutamento e ativação de células imunológicas se reforçam mutuamente, perpetuando a inflamação e agravando os danos teciduais (MERAD et al., 2022;

SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020; WILK et al., 2021). Em contraste, elementos essenciais para a manutenção da homeostase e a reparação tecidual, como os macrófagos alveolares, estão frequentemente depletados em pacientes graves, o que dificulta a recuperação dos tecidos afetados (DELOREY et al., 2021; LIAO et al., 2020).

Dano endotelial, hipercoagulação e embolismo arterial e venoso são complicações comuns nos casos graves de COVID-19. Embora os mecanismos exatos da hipercoagulabilidade ainda sejam incertos, acredita-se que possam resultar tanto de danos virais diretos na vasculatura quanto de respostas inflamatórias severas que alteram o endotélio vascular e induzem a ativação de plaquetas, monócitos e macrófagos. Esses, por sua vez, promovem a liberação de fatores de coagulação, como o fator tecidual e o fator VIII, levando à formação de coágulos (MERAD et al., 2022; PERICO et al., 2021).

Resultados de autópsias reforçam o grande acúmulo de células imunológicas ativadas, mesmo na ausência de infecção viral ativa substancial, sugerindo que a falência de órgãos é mais provavelmente resultado de um sistema imunológico hiperativado ou dano vascular (MERAD et al., 2022). O sucesso da dexametasona em melhorar os desfechos de pacientes com doença avançada também destaca a importância das respostas inflamatórias na patogênese da COVID-19, marcando uma diferença significativa em relação ao tratamento da gripe, onde o uso de esteroides é prejudicial (THE RECOVERY COLLABORATIVE GROUP, 2021). Desta forma, além do dano tecidual direto causado pelo vírus, a COVID-19 é caracterizada por uma resposta inflamatória local e sistêmica exacerbada, que pode persistir mesmo após a eliminação viral (MERAD et al., 2022).

Dentre os fatores de risco para COVID-19 grave, a idade é o mais significativo, com risco de letalidade aumentando consideravelmente após os 65 anos. A probabilidade de desenvolver a forma grave também é maior para indivíduos do sexo masculino (WILLIAMSON et al., 2020), possivelmente devido a uma imunidade inata mais intensa e ativação prejudicada das células T (TAKAHASHI et al., 2020). Diabetes, hipertensão, obesidade e doenças renais crônicas também são fatores de risco importantes, pois podem causar lesões inflamatórias crônicas que intensificam o ciclo inflamatório (MERAD et al., 2022).

Além das manifestações agudas da COVID-19, foram observados sintomas novos, recorrentes ou persistentes ocorrendo quatro ou mais semanas após a infecção inicial, caracterizando uma condição conhecida como COVID Longa. Uma porcentagem significativa dos sobreviventes da COVID-19 experimenta pelo menos uma seqüela pós-aguda de SARS-CoV-2 após seis meses (BLIDDAL et al., 2021). Os sintomas comuns incluem fadiga, dificuldades cognitivas, problemas cardiovasculares e variadas respostas inflamatórias (DESAI

et al., 2022). Hipóteses sobre a COVID-19 Longa apontam para fatores como reservatórios virais, autoimunidade e inflamação crônica como potenciais causadores da condição. Os aspectos imunológicos da COVID Longa, bem como outras dimensões da COVID-19, são alvo de investigações contínuas (MERAD et al., 2022).

2.1.1. COVID-19 e coinfeções

Durante a pandemia de COVID-19, coinfeções com SARS-CoV-2 emergiram como um tópico de interesse. Coinfeções são geralmente definidas como a presença concomitante de dois ou mais agentes infecciosos no mesmo hospedeiro, como bactérias, vírus, fungos ou parasitas. Essas coinfeções podem ocorrer de forma simultânea ou sequencial dentro de um curto período de tempo. No contexto do SARS-CoV-2, as coinfeções são tipicamente descritas como a detecção do SARS-CoV-2 juntamente com outros patógenos em um paciente, seja no momento do diagnóstico de COVID-19 ou durante o curso da doença (ADAMS et al., 2022; FELDMAN; ANDERSON, 2021; MUSUUZA et al., 2021).

A investigação da epidemiologia e dos achados e desfechos clínicos das coinfeções permite desenvolver estratégias de tratamento e controle eficazes, especialmente em populações de risco, bem como intervenções de saúde pública mais direcionadas, como estratégias de vacinação e priorização da alocação de recursos. Diversos casos de coinfeções, onde indivíduos foram infectados simultaneamente por SARS-CoV-2 e outros patógenos, como bactérias, fungos ou outros vírus, foram reportados na literatura (ALHUMAID et al., 2021; CHEKURI et al., 2021; KIM et al., 2020; LEÓN-FIGUEROA et al., 2022; MUSUUZA et al., 2021; OMAME; ABBAS; ONYENEGECHA, 2022; SWETS et al., 2022; TANGSATHAPORNPOONG; THISYAKORN, 2023; TEKLU, 2023).

Os patógenos coinfectantes mais comumente reportados incluem vírus respiratórios, como influenza e vírus sincicial respiratório (VSR) (LANSBURY et al., 2020; MUSUUZA et al., 2021; SWETS et al., 2022), e bactérias, como *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, e *Staphylococcus aureus* (ALHUMAID et al., 2021; MUSUUZA et al., 2021). Diferentes revisões sistemáticas com metanálise reportaram prevalência de coinfeções virais respiratórias variando de 3 a 10%, e coinfeções bacterianas variando entre 7 e 16%. Foram reportadas também coinfeções fúngicas, como aquelas causadas por espécies de *Candida*, com prevalência de 3-4% (ALHUMAID et al., 2021; LANSBURY et al., 2020; MUSUUZA et al., 2021).

De maneira geral, as revisões citadas, que incluem predominantemente pacientes hospitalizados, sugerem que as coinfeções frequentemente resultam em piores desfechos clínicos. As revisões e metanálises de Musuuza e colaboradores (2021) e Almuhaid e colaboradores (2021) encontraram associação entre coinfeções por SARS-CoV-2 e bactérias, fungos ou vírus respiratórios e aumento da mortalidade, quando comparadas a infecções por SARS-CoV-2 isoladamente (ALHUMAID et al., 2021; MUSUUZA et al., 2021).

As coinfeções bacterianas foram mais prevalentes que coinfeções fúngicas ou com outros vírus respiratórios. Coinfeções bacterianas aumentaram o tempo de internação hospitalar de pacientes com SARS-CoV-2, a necessidade de suporte ventilatório, a ocorrência de SDRA (síndrome do desconforto respiratório agudo), choque, lesões em múltiplos órgãos, e causaram formas mais graves de COVID-19 (ALHUMAID et al., 2021; MUSUUZA et al., 2021).

Sabe-se que infecções respiratórias, como a COVID-19, podem evoluir para quadros mais severos, incluindo pneumonia viral, particularmente em pacientes idosos ou com comorbidades, podendo também aumentar a suscetibilidade a infecções bacterianas secundárias (FELDMAN; ANDERSON, 2021; MIRZAEI et al., 2020). Isto se reflete nas altas taxas de uso de antimicrobianos em pacientes internados com infecção por SARS-CoV-2 para tratar coinfeções bacterianas documentadas ou presumidas (ALHUMAID et al., 2021; LANSBURY et al., 2020; MUSUUZA et al., 2021).

Ao comparar pacientes com coinfeções virais respiratórias com a infecções por SARS-CoV-2 isoladamente, não foi observada diferença significativa em termos de achados clínicos e desfecho, não havendo impacto na gravidade ou tempo de recuperação (ALHUMAID et al., 2021; MALTEZOU et al., 2023; MUSUUZA et al., 2021). Mais além, alguns estudos estimaram um risco geral menor de desfechos desfavoráveis para pacientes coinfectados, tanto com influenza (GUAN et al., 2021; MALTEZOU et al., 2023) quanto com outros vírus respiratórios (CHEKURI et al., 2021), em comparação com pacientes infectados apenas pelo SARS-CoV-2.

Também foram reportadas coinfeções com vírus não respiratórios, como vírus da hepatite (TEKLU, 2023); o vírus da imunodeficiência humana (VIH ou HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) (DANWANG et al., 2022); arbovírus, como vírus da dengue, Zika e chikungunya (ARIF et al., 2023; LEÓN-FIGUEROA et al., 2022; NUNEZ-AVELLANEDA et al., 2022); entre outros. Dentre as arboviroses, as coinfeções com o vírus da dengue (DENV) são as mais frequentemente reportadas, já que a dengue é a arbovirose mais prevalente

globalmente (RAAFAT; BLACKSELL; MAUDE, 2019). A coinfeção SARS-CoV-2/DENV será descrita em detalhes no Capítulo I.

2.2. Dengue

A dengue é uma doença viral prevalente em regiões de clima tropical e subtropical, causada pela infecção com o vírus da dengue (DENV). O DENV é um ortoflavivírus (gênero *Orthoflavivirus*, família Flaviviridae) composto por RNA de cadeia simples com polaridade positiva que possui quatro sorotipos antígenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (OMS, 2023a; POSTLER et al., 2023; WANG et al., 2020). Após recuperação de um episódio de dengue, acredita-se que seja adquirida imunidade contra aquele sorotipo. Entretanto, imunidade cruzada com outros sorotipos após recuperação é apenas parcial e temporária, desta forma, um indivíduo infectado com dengue ainda está sujeito a infecções subsequentes (OMS, 2024b).

A dengue é transmitida principalmente pela picada do mosquito fêmea da espécie *Aedes aegypti*, o mesmo vetor que transmite Zika e chikungunya (WANG et al., 2020). A nível global, é estimado que ocorram de 100 a 400 milhões de infecções por DENV anualmente, sendo a maior parte dos casos assintomáticos (BHATT et al., 2013; OMS, 2024). Em 2023, foi registrado um pico histórico de mais de 6,5 milhões de casos de dengue e 7300 mortes reportadas à OMS (OMS, 2024b). Entre janeiro e agosto de 2024, foram registrados mais de 11,4 milhões de casos, com mais de 28600 casos graves e 7000 mortes (OMS, 2024c). Dentre esses casos, mais de 6,2 milhões foram reportados no Brasil (MS, 2024a).

Diversos fatores estão ligados ao aumento da disseminação da epidemia de dengue, incluindo: a expansão da distribuição geográfica dos vetores (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*), especialmente para países que antes não tinham casos de dengue; os efeitos do El Niño e das mudanças climáticas, que resultam em temperaturas mais elevadas, maior pluviosidade e umidade; sistemas de saúde debilitados durante a pandemia de COVID-19; e as instabilidades políticas e econômicas em países que enfrentam crises humanitárias complexas e grandes movimentos populacionais (OMS, 2024b).

Pacientes com dengue podem apresentar diferentes intensidades de manifestações clínicas, desde sintomas moderados até complicações potencialmente fatais. Os sintomas mais comuns incluem febre alta, cefaleia intensa, dor retro-orbital, mialgia, artralgia, náuseas, vômitos, glândulas inchadas e erupções cutâneas. Estes sintomas geralmente aparecem entre 4 e 10 dias após a picada do mosquito e, em geral, estendem-se por 2 a 7 dias (OMS, 2024b).

Os sintomas graves da dengue geralmente surgem após cessamento da febre e abrangem dor abdominal intensa, vômitos persistentes, respiração rápida, sangramento nas gengivas ou no nariz, fadiga, agitação, sangue no vômito ou nas fezes, sede intensa, pele pálida e fria, e sensação de fraqueza (OMS, 2024b). A possibilidade de hemorragias na dengue grave fez com que tenha sido usado por muito tempo o termo “dengue hemorrágica”. Entretanto, com o monitoramento de um número maior de pacientes, observou-se que, embora a hemorragia esteja presente em alguns casos graves, um grupo ainda maior de pacientes apresenta outros indícios de agravamento da dengue, sem manifestações hemorrágicas significativas. Por isso, a OMS passou a utilizar, a partir de 2009, o termo “dengue grave” em vez de “dengue hemorrágica” (OMS, 2009).

O extravasamento de plasma sanguíneo é a principal característica fisiopatológica da dengue grave, sendo este considerado o principal fator associado ao grau de severidade da doença. O dano endotelial durante as infecções por DENV resulta em aumento da permeabilidade capilar - e conseqüente extravasamento de plasma - com mais frequência do que resulta em hemorragias manifestas. Esta efusão de plasma se manifesta em hemoconcentração e valores crescentes de hematócrito, podendo levar à falência circulatória. Para eventos hemorrágicos, contribuem, além do dano endotelial, a trombocitopenia (níveis anormalmente baixos de plaquetas), coagulopatia (alteração na coagulação) e coagulação intravascular disseminada (CID). Sendo assim, a dengue grave pode causar extravasamento de plasma e hemorragia, duas complicações que podem levar o paciente ao óbito em 12 a 24 horas, caso não tratadas apropriadamente (HALSTEAD; COHEN, 2015).

Várias hipóteses foram propostas para explicar as razões para o desenvolvimento da dengue grave. Estas incluem diferenças na virulência, suscetibilidade genética, desregulação de citocinas, e intensidade da resposta imunológica. Embora alguns pacientes com dengue grave tenham sido relatados sem exposição prévia ao DENV, a maioria dos casos é observada em indivíduos infectados previamente com outro sorotipo (WANG et al., 2020).

Muitos estudos associam a severidade da dengue ao fenômeno de potencialização dependente de anticorpos (*antibody-dependent enhancement*, ou ADE, em inglês) (WANG et al., 2020). Essa teoria foi descrita pela primeira vez quando se observou que infecções graves por DENV estavam relacionadas a infecções secundárias por sorotipos diferentes (MORENS, 1994). Após uma infecção primária por um sorotipo de DENV, o sistema imunológico produz anticorpos capazes de neutralizar uma infecção subsequente pelo mesmo sorotipo. No entanto, uma infecção secundária por um sorotipo diferente pode levar a um agravamento da doença (OMS, 2024b; WANG et al., 2020).

Os anticorpos gerados pela infecção primária são capazes de se ligar ao vírus de sorotipo distinto, mas não de neutralizá-lo efetivamente. Esses anticorpos, que reagem de forma cruzada, formam complexos vírus-anticorpos que facilitam a entrada do vírus em células com receptores Fc γ , como monócitos, macrófagos e células dendríticas. Esse processo potencializa a replicação viral, resultando em carga viral mais elevada e em manifestações mais severas da doença (TAYLOR et al., 2015; VAUGHN et al., 2000; WANG et al., 2020).

Como consequência da ADE, ocorre ativação amplificada dos complementos e acelerada produção de citocinas, especialmente citocinas pró-inflamatórias do tipo 1, como TNF- α e IFN- γ . Essas citocinas podem ter um efeito direto sobre as células endoteliais vasculares, alterando a permeabilidade dos vasos sanguíneos e levando ao extravasamento de plasma. Diversas citocinas e mediadores imunológicos, incluindo IL-6, IL-8 e VEGF-A, foram associados à gravidade da dengue por contribuírem para o aumento da permeabilidade vascular (WANG et al., 2020).

A trombocitopenia é comum tanto em casos moderados quanto graves. Contudo, a trombocitopenia grave é um indicativo importante da progressão para forma grave da dengue, ocorrendo no final da fase febril e início do extravasamento, e deixando os pacientes propensos a sangramentos espontâneos. O mecanismo exato desta queda nos níveis de plaquetas ainda é incerto, porém, presume-se que seja de origem imunológica (WANG et al., 2020).

Existem evidências de que a proteína NS1 do DENV e a imunidade humoral induzida por ela desempenham papéis importantes (WANG et al., 2020). Anticorpos contra NS1 podem reagir de forma cruzada com plaquetas humanas e células endoteliais, amplificando o dano endotelial (LIN et al., 2002, 2005). A NS1 também pode causar uma ruptura subsequente da integridade da camada endotelial por meio da ativação células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) via receptor do tipo Toll 4 (TLR4) (MODHIRAN et al., 2015). Além disso, a ligação da NS1 ao TLR4 nas plaquetas pode desencadear a ativação destas plaquetas, levando à agregação e adesão ao endotélio, bem como à sua fagocitose por macrófagos, resultando em trombocitopenia e hemorragia (CHAO et al., 2019).

Para o tratamento da dengue, não existem antivirais específicos. O tratamento consiste em cuidados de suporte. É essencial manter a hidratação adequada e evitar o uso de aspirina e outros anti-inflamatórios não esteroides devido às suas propriedades anticoagulantes. O controle da febre pode ser feito com acetaminofeno e banhos mornos. Em casos de dengue grave, é necessário monitoramento em unidade de terapia intensiva. Transfusões profiláticas de plaquetas não são benéficas e podem causar sobrecarga de fluidos, e o uso de corticosteroides não tem benefício comprovado e pode ser prejudicial, exceto em complicações autoimunes

como a linfocitose hemofagocítica ou a púrpura trombocitopênica imune (CDC, 2024a; OMS, 2024b).

2.2.1. Dengue e coinfeções

As coinfeções mais frequentemente reportadas com o DENV são coinfeções com SARS-CoV-2, outros arbovírus, como o vírus da chikungunya (CHIKV) (IREKEOLA et al., 2022; SALAM et al., 2018) e o vírus da Zika (ZIKV) (SIQUEIRA et al., 2020), ou com o *Plasmodium* ssp. (malária) (KOTEPUI; KOTEPUI, 2019; SALAM et al., 2018), devido aos perfis endêmicos semelhantes (SALAM et al., 2018). Também foram relatadas coinfeções com vírus da hepatite (SHAH; DEY, 2015), HIV (HOTTZ et al., 2019), entre outros.

Evidências de coinfeções dengue/chikungunya e dengue/malária foram encontradas em países da América Latina, África e Ásia (GEBREMARIAM et al., 2023; IREKEOLA et al., 2022; SALAM et al., 2018). Para a coinfeção dengue/chikungunya, foi estimada prevalência global de 2,5%, com maior prevalência na Ásia (IREKEOLA et al., 2022). Relatos de coinfeção dengue/malária foram mais frequentes na Índia e no Paquistão. Casos de coinfeção dengue/chikungunya/malária foram reportados na Índia, Serra Leoa e Nigéria (SALAM et al., 2018). Casos de coinfeção DENV/ZIKV foram mais frequentemente reportados no Brasil (SIQUEIRA et al., 2020).

Os estudos publicados sobre estas coinfeções trazem mais evidências sobre prevalência e distribuição geográfica do que sobre impactos nos desfechos clínicos. Não obstante, alguns autores sugerem agravamento do quadro clínico em pacientes coinfectados. Em alguns casos de coinfeção dengue/malária, foram observados níveis mais baixos de plaquetas e hemoglobina quando comparados com monoinfeções de dengue ou malária (MENDONÇA et al., 2015). Para coinfeção DENV/ZIKV, foi relatado potencial impacto na resposta imunológica dos pacientes coinfectados (BADOLATO-CORRÊA et al., 2018).

O Capítulo I desta tese descreve uma série de casos de coinfeção SARS-CoV-2/DENV diagnosticados no Distrito Federal, uma área com alta incidência tanto de dengue quanto de COVID-19, discutindo desafios do diagnóstico e manejo clínico, bem como aspectos epidemiológicos, sociais e possíveis estratégias de prevenção, tanto para esses casos quanto em um contexto mais amplo, considerando outras coinfeções SARS-CoV-2/DENV relatadas na literatura.

2.3. Metabolômica no estudo de COVID-19 e dengue

A metabolômica é definida como a análise de todos os metabólitos presentes em um sistema biológico sob determinadas condições. Esses metabólitos pertencem a diferentes classes químicas e possuem características físico-químicas variadas. Para capturar essa diversidade de metabólitos, são necessárias técnicas que permitam a detecção do maior número possível de metabólitos, como a ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (EM) (KLASSEN et al., 2017).

A espectrometria de massas é geralmente preferida em relação à RMN para estudos metabolômicos de aspectos fisiopatológicos de doenças. Isso se deve à sua maior sensibilidade, ampla cobertura metabólica e melhor adequação à análise de um grande número de amostras. A análise por EM é frequentemente precedida de uma separação cromatográfica, o que permite uma avaliação mais detalhada de amostras complexas. A combinação da separação cromatográfica com a alta sensibilidade da EM permite detecção de uma ampla gama de metabólitos em baixas concentrações, tornando a técnica eficaz na identificação de mudanças metabólicas sutis associadas a doenças. Apesar de fornecer informações quantitativas e estruturais precisas, a RMN possui menor sensibilidade e menor flexibilidade para trabalhos em grande escala (KLASSEN et al., 2017; TOUNTA et al., 2021).

Apesar da possibilidade de aplicação da metabolômica a diversas matrizes biológicas, como ar exalado, urina e saliva, o sangue periférico é frequentemente a matriz de escolha na maioria dos estudos. Embora sua coleta seja mais invasiva, o sangue periférico tende a refletir o estado fisiológico geral do organismo de maneira mais ampla e consistente, com menor suscetibilidade a contaminações, tornando amostras de plasma e soro opções mais confiáveis para a análise metabólica (ONOJA et al., 2023).

A metabolômica abrange duas abordagens principais: direcionada e não direcionada. A abordagem direcionada foca na quantificação de metabólitos específicos, previamente definidos, com base em uma hipótese estabelecida. Já a metabolômica não direcionada busca identificar variações no perfil metabólico geral entre grupos de amostras, como entre indivíduos saudáveis e doentes, geralmente por meio de análises qualitativas ou semiquantitativas. Por sua característica geradora de hipóteses, a abordagem não direcionada pode servir como base para estudos direcionados subsequentes (KLASSEN et al., 2017). Ambas as estratégias ajudam a revelar alterações nas vias metabólicas úteis para ampliar o entendimento de diferentes doenças, incluindo infecções (TOUNTA et al., 2021).

As análises metabolômicas geram grandes volumes de dados que necessitam de análises estatísticas multivariadas, onde cada metabólito representa uma variável. A análise de componentes principais (PCA), um método não supervisionado, reduz a dimensionalidade dos dados, facilitando a visualização de tendências e agrupamentos das amostras. Já a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), um método supervisionado, maximiza a separação entre grupos de amostras pré-definidos, identificando as variáveis que mais contribuem para a distinção entre esses grupos, sendo particularmente útil para apontar biomarcadores e indicar diferenças metabólicas específicas associadas a diferentes condições biológicas (JOLLIFE; CADIMA, 2016; TOUNTA et al., 2021; WORLEY; POWERS, 2013).

O metaboloma de pacientes com infecções virais tem sido investigado por estudos metabolômicos não direcionados. Um exemplo é estudo de Cui e colaboradores (2018), que comparou o perfil metabólico geral de amostras de soro de pacientes infectados com DENV com controles saudáveis, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (CLAE-EM/EM). As amostras foram coletadas em três estágios da doença: menos de 72 horas após o início, entre os dias 4 e 7, e entre as semanas 3 e 4. O estudo identificou várias vias metabólicas, incluindo a biossíntese de ácidos graxos e glicólise, que estavam reguladas positivamente durante os estágios agudos da dengue e retornaram aos níveis de controle após 3 a 4 semanas. Além disso, foram identificados diferentes fosfolipídios com ação moduladora da inflamação (CUI et al., 2018).

No contexto da COVID-19, a metabolômica tem sido amplamente utilizada para identificar biomarcadores associados à doença. Muitos estudos se concentraram na desregulação de aminoácidos, que pode ser parcialmente derivada da inflamação, dado que níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6), estão associados a alterações no metabolismo de aminoácidos. Outros estudos identificaram mudanças na expressão de lipídios em pacientes com COVID-19, como o aumento dos níveis de triglicerídeos e colesterol LDL, e a diminuição dos níveis de colesterol HDL, como resultado da resposta inflamatória desencadeada pela infecção. Menos frequentemente, outras características, como alterações nos ácidos biliares, também têm sido associadas à infecção por COVID-19 (ONOJA et al., 2023).

Embora existam estudos que investigam coinfeções de dengue e chikungunya, revelando vias metabólicas significativamente alteradas tanto nas coinfeções quanto nas infecções isoladas (SHRINET et al., 2016), até o momento, não foram identificados na literatura estudos que explorem a análise metabolômica de qualquer coinfeção envolvendo a COVID-19.

3. CAPÍTULO I

3.1. OBJETIVO GERAL

Descrever uma série de 13 casos de coinfeção por SARS-CoV-2/DENV diagnosticados no Hospital Universitário de Brasília (HUB), detalhando desafios do diagnóstico e manejo clínico, bem como aspectos epidemiológicos, sociais e possíveis estratégias de prevenção.

3.2. METODOLOGIA

Este é um estudo retrospectivo que apresenta 13 casos de coinfeção por SARS-CoV-2/DENV diagnosticados no Hospital Universitário de Brasília (HUB) entre abril e setembro de 2020. Os resultados deste estudo foram publicados na revista *BMC Infectious diseases* (IF = 3,7; QUALIS A3) sob o título: “SARS-CoV-2/DENV coinfection: a series of cases from Midwestern Brazil” (SCHULTE et al., 2021). Foi solicitada à revista autorização para utilização das figuras do artigo no documento de tese.

Neste trabalho, foram considerados coinfectados os indivíduos que receberam diagnóstico de COVID-19 e dengue dentro de um intervalo máximo de 15 dias, para garantir que houvesse sobreposição ou proximidade entre as fases agudas das duas doenças. Todos os pacientes incluídos neste estudo: (a) tiveram diagnóstico, dentro de no máximo 15 dias, de COVID-19 confirmado por RT-PCR (reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa) para SARS-CoV-2 e diagnóstico de dengue confirmado por NS1 (proteína não estrutural 1) reagente; ou por ELISA IgM (imunoglobulina M) reagente para o vírus da dengue (DENV) associado a sintomas fortemente sugestivos de dengue; (b) declararam residência no Distrito Federal; (c) tinham mais de 18 anos; (d) demonstraram capacidade de entender as informações contidas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os casos de coinfeção relatados aqui foram reportados pela equipe de profissionais de saúde do HUB participantes do estudo intitulado “Caracterização do perfil clínico, epidemiológico e de biomarcadores na coinfeção COVID-19 e doenças endêmicas no Brasil: estudo observacional, prospectivo”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (CEP/FS) da Universidade de Brasília (CAAE: 34164820.6.0000.0030). Todos os participantes do estudo assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo CEP/FS após terem recebido esclarecimentos sobre a proposta geral do estudo de forma oral e escrita.

A partir dos prontuários médicos, foram coletados os dados clínicos e laboratoriais considerados mais relevantes: 1) apresentação clínica (Síndrome Respiratória Aguda Grave – SRAG, ou Síndrome Febril Aguda Indiferenciada – SFA); 2) comorbidades; 3) necessidade de hospitalização; 4) contagem de plaquetas; 5) contagem de linfócitos; e 6) principais sinais e sintomas na primeira avaliação clínica (Tabela 1).

Adicionalmente, foram coletadas informações sobre o processo diagnóstico, desde o diagnóstico inicial até o diagnóstico final de coinfeção por SARS-CoV-2/DENV. Estas informações incluíram: atraso, em dias, entre o diagnóstico inicial e o diagnóstico final; detalhamento das intervenções terapêuticas, incluindo medidas farmacológicas, preventivas e de automedicação; acompanhamento e desfechos clínicos declarados pela equipe médica. Os casos descritos neste estudo foram numerados de 1 a 13 para garantir a confidencialidade dos dados clínicos.

3.2.1. Testes diagnósticos confirmatórios

3.2.1.1. RT-PCR para SARS-CoV-2

Para todos os pacientes, a infecção por SARS-CoV-2 foi confirmada por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) em amostras de *swab* nasofaríngeo. O kit High Pure Viral Nucleic Acid Version 18 (Roche Diagnostics®, Alemanha) foi usado para extração de RNA viral. A RT-PCR foi realizada em um sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems®, EUA) utilizando o kit Molecular SARS-CoV-2 (E/RP) - Bio-Manguinhos (Rio de Janeiro, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.1.2. Detecção do antígeno NS1

O teste de detecção do antígeno NS1 do DENV foi realizado usando teste rápido imunocromatográfico (ABBOTT-Alere® S.A., Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

3.2.1.3. Detecção de anticorpos IgM para DENV

Anticorpos IgM para DENV foram detectados usando ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) comercialmente disponível (Euroimmun®, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante.

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos casos de coinfeção por SARS-CoV-2/DENV (SCHULTE et al., 2021).

Caso	Sexo	Apresentação clínica	Teste diagnóstico COVID-19 / data	Teste diagnóstico dengue/ data	Comorbidades	Hospitalização	Contagem de plaquetas (/μL)	Contagem de linfócitos (/μL)	Principais sinais e sintomas na primeira avaliação clínica
1	M	SFA	RT-PCR+ 15/04/2020	NS1+ 05/04/2020	Diabetes Hipertensão	Não	84.000	2982	febre, mialgia, equimose dispneia (SpO ₂ = 95%)
2	F	SRAG	RT-PCR + 22/04/2020	NS1 + 20/04/2020		Sim	93.000	730	febre, tosse seca, dispneia, mialgia
3	F	SRAG	RT-PCR + 15/04/2020	IgM + 15/04/2020	Diabetes	Sim	169.000	2627	dispneia (SpO ₂ = 91%)
4	M	SRAG	RT-PCR+ 05/05/2020	NS1+ 30/04/2020	Hipopituitarismo Insuficiência adrenal	Não	110.000	3254	mialgia, equimose dispneia
5	F	SFA	RT-PCR + 08/05/2020	IgM + 05/05/2020	Gravidez	Sim	94.000	1500	dor retro-orbital, artralgia, mialgia
6	M	SFA	RT-PCR + 26/06/2020	NS1 + 26/06/2020		Não	-	-	febre
7	M	SRAG	RT-PCR + 18/07/2020	IgM + 18/07/2020	-*	Não	191.000	2200	tosse seca, dor de garganta
8	F	SRAG	RT-PCR + 17/07/2020	IgM + 23/07/2020		Não	238.000	1490	mialgia, congestão nasal, dispneia, fadiga, diarreia
9	M	SFA	RT-PCR + 12/07/2020	IgM + 12/07/2020		Não	180.000	1561	dor retro-orbital, mialgia, febre, anosmia, diarreia
10	F	SFA	RT-PCR + 22/07/2020	IgM + 22/07/2020	Gravidez Diabetes gestacional Gastrite crônica Depressão	Não	196.000	1500	febre, tosse seca, mialgia, dor de garganta, congestão nasal, diarreia, anosmia, ageusia, prurido
11	F	SFA	RT-PCR + 06/08/2020	NS1 + 30/07/2021	Tumor pituitário Hipopituitarismo	Não	50.000	3100	febre, mialgia e fadiga dispneia (SpO ₂ = 93%)
12	M	SFA	RT-PCR + 22/08/2020	IgM + 22/08/2020		Não	169.000	2327	mialgia
13	F	SRAG	RT-PCR+ 24/09/2020	NS1+ 12/09/2020		Sim	87.000	1450	febre, mialgia dispneia (SpO ₂ = 92%) sangramento uretral

SRAG = Síndrome Respiratória Aguda Grave; SFA = Síndrome Febril Aguda Indiferenciada; RT-PCR = reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa; IgM = imunoglobulina M; NS1 = proteína não-estrutural 1. *- = informação não disponível

3.3. RESULTADOS

Dos 13 casos de coinfeção relatados neste estudo (idades entre 27 e 79 anos), sete casos se referiam a pacientes do sexo feminino. Sete pacientes apresentaram Síndrome Febril Aguda Indiferenciada – SFA. Um total de 4 pacientes possuíam comorbidades: diabetes (n=1), diabetes e hipertensão (n=1), hipopituitarismo e tumor pituitário (n=1), hipopituitarismo e insuficiência adrenal (n=1). Ademais, 2 pacientes estavam grávidas (casos 5 e 10). Uma delas (caso 5) passou pelo trabalho de parto sem complicações enquanto em fase aguda da coinfeção SARS-CoV-2/DENV. A paciente número 10 apresentou diabetes gestacional, gastrite crônica e depressão, mas não teve nenhuma complicação relacionada à gestação até a décima semana gestacional.

Um total de seis pacientes apresentaram trombocitopenia e um paciente apresentou linfopenia. Em cinco casos, foi constatada alteração radiográfica de vidro fosco. Os sintomas mais frequentes foram mialgia, febre e dispnéia, seguidos de tosse seca e diarreia, conforme apresentado na Figura 2. Os aspectos clínicos e laboratoriais dos 13 pacientes estão apresentados na Tabela 1.

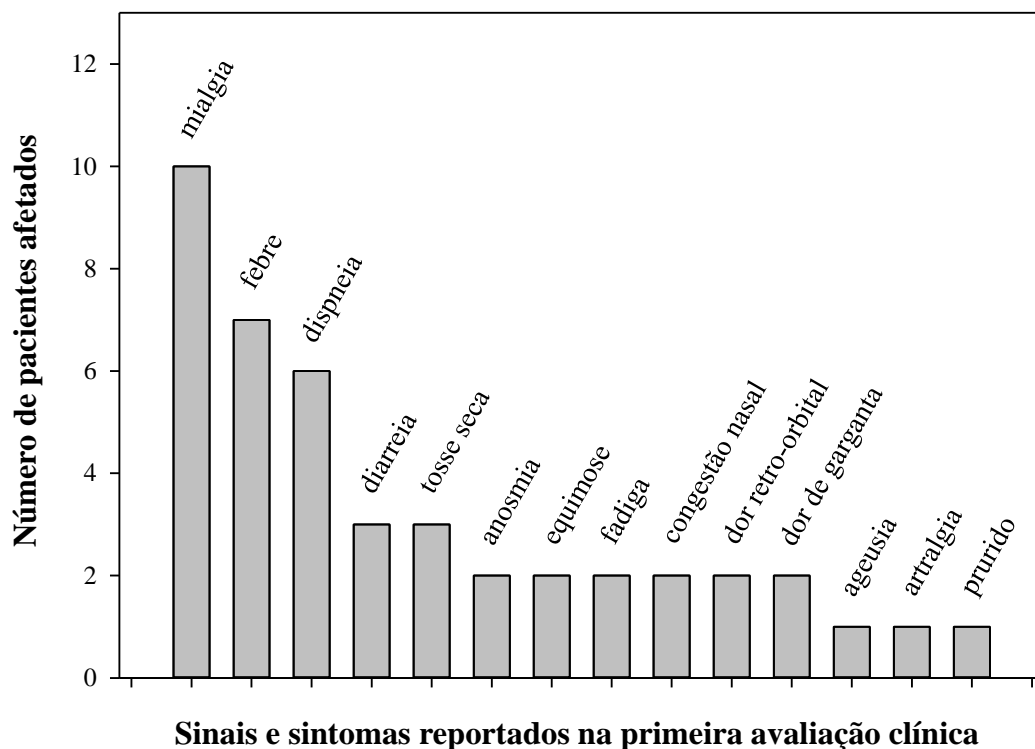


Figura 2. Sinais e sintomas descritos em prontuários hospitalares referentes à primeira avaliação clínica de pacientes com coinfeção por SARS-CoV-2/DENV (SCHULTE et al., 2021).

Conforme apresentado na Tabela 2, o diagnóstico inicial para seis dos 13 pacientes foi dengue, e somente após um período de atraso, variando de 2 a 12 dias, estes pacientes também foram diagnosticados com COVID-19. A suspeita de coinfeção com SARS-CoV-2 nestes pacientes foi levantada principalmente devido à persistência ou recidiva de febre, ou sintomas respiratórios.

Por outro lado, em um caso, o paciente foi inicialmente diagnosticado com COVID-19 e, 6 dias depois, também com dengue. Posteriormente, graças as observações dos casos de coinfeção no hospital HUB, seis casos receberam diagnóstico imediato de coinfeção SARS-CoV-2/DENV. Para o paciente do Caso 1, a hipótese inicial era, na verdade, uma reação à vacina contra a gripe, porém, a presença de equimose justificou uma investigação mais aprofundada que levou ao diagnóstico de dengue. A linha do tempo mostrada na Figura 3 detalha as variações no diagnóstico inicial para os casos de coinfeção relatados entre abril e setembro de 2020 no HUB. Quatro dos seis casos inicialmente diagnosticados como dengue ocorreram nos primeiros 2 meses da pandemia (Figura 3).

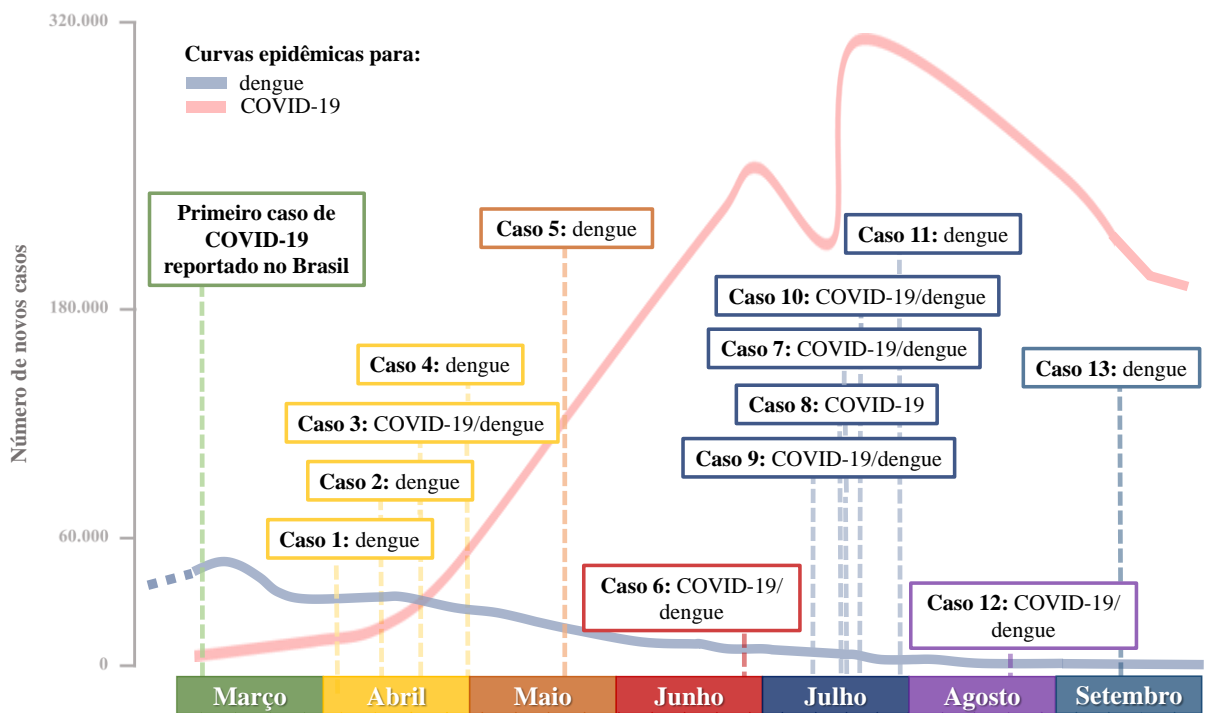


Figura 3. Linha do tempo apresentando o diagnóstico inicial estabelecido nos 13 casos de coinfeção SARS-CoV-2/DENV notificados pelo Hospital Universitário de Brasília (HUB) entre abril e setembro de 2020. As divisões no eixo x (marcadas por pequenos triângulos) representam as semanas epidemiológicas. As linhas de fundo representam as curvas epidêmicas para dengue (linha azul) e COVID-19 (linha rosada), com base em relatórios oficiais do Ministério da Saúde do Brasil (MS, 2020a, 2020b; SCHULTE et al., 2021).

Além de informações sobre o diagnóstico, a Tabela 2 resume as intervenções terapêuticas, as informações de acompanhamento e o desfecho clínico para os 13 casos de coinfeção. A intervenção farmacológica mais frequente foi o uso de analgésicos, como paracetamol e dipirona. Antibióticos foram usados em cinco casos; anticoagulantes foram usados em dois casos; o corticoide prednisona em um caso e hidroxicloroquina/cloroquina em um caso. Para os casos 5 e 11, nos quais os pacientes que já faziam uso prévio de prednisona para tratamento de hipopituitarismo, a dosagem de prednisona foi aumentada. Adicionalmente, dois pacientes se automedicaram com ivermectina. Medidas não farmacológicas também foram empregadas, como hidratação com infusão de cloreto de sódio 0,9% em três casos e suporte de oxigênio para um paciente.

No total, quatro pacientes foram hospitalizados. Uma das pacientes (caso 5) passou por duas hospitalizações: a primeira devido ao agravamento da dengue, e, em seguida, para o parto. Nenhum dos outros pacientes apresentou dengue com sinais de alerta ou dengue grave. Para os casos 3 e 13, o motivo da hospitalização foi o declínio da saturação de O₂ e, para o caso 2, o motivo foi a piora geral do quadro clínico. Para o caso 8, não foi possível realizar acompanhamento após o diagnóstico. Nenhum paciente foi transferido para uma unidade de terapia intensiva ou evoluiu para óbito. Todos os pacientes apresentaram melhora clínica dentro de um período que variou entre 4 e 21 dias.

Tabela 2. Diagnóstico inicial; intervalo entre os diagnósticos inicial e final de coinfeção; intervenções terapêuticas; acompanhamento e desfecho de casos de COVID-19 e dengue (SCHULTE et al., 2021).

Caso	Sexo	Diagnóstico inicial	Intervalo entre diagnósticos	Intervenções terapêuticas	Acompanhamento e desfecho
1	M	Dengue	10 dias	Analgésicos	Melhora clínica em 10 dias
2	F	Dengue	2 dias	Analgésicos	7 dias no hospital; não foi feito acompanhamento
				Hidratação com solução salina a 0,9% Amoxicilina com clavulonato Profilaxia para trombose com meias de compressão	
3	F	COVID-19/dengue	Nenhum	Analgésicos Enoxaparina 40 mg/dia	4 dias no hospital; não foi feito acompanhamento
4	M	Dengue	5 dias	Analgésicos Dosagem de prednisona aumentada de 5 para 15 mg por 5 dias, para evitar insuficiência adrenal	Melhora clínica em 15 dias
5	F	Dengue	3 dias	Hidroxicloroquina 400 mg 2 doses em 1 dia Cloroquina 450 mg por 1 dia Enoxaparina 40 mg/dia por 2 semanas Azitromicina 500 mg/dia por 5 dias Ceftriaxona 2 g/dia por 5 dias	2 hospitalizações (primeiro, devido ao agravamento da dengue; e depois, para o parto) Melhora clínica em 13 dias
6	M	COVID-19/dengue	Nenhum	Automedicação com ivermectina (6 mg/kg)	Melhora clínica em 4 dias
7	M	COVID-19/dengue	Nenhum	Analgésicos Hidratação com solução salina a 0,9%	Melhora clínica em 14 dias
8	F	COVID-19	6 dias	Azitromicina (500 mg) por 2 dias Automedicação com ivermectina (6 mg/kg)	-
9	M	COVID-19/dengue	Nenhum	Analgésicos	Melhora clínica em 4 dias
10	F	COVID-19/dengue	Nenhum	Analgésicos Prednisona 20 mg por 5 dias Hidratação com solução salina a 0,9%	Melhora clínica em 21 dias
11	F	Dengue	7 dias	Azitromicina (500 mg) por 5 dias Dosagem de prednisona aumentada de 5 para 20 mg por 7 dias	Recuperação pulmonar em 15 dias (paciente tinha 30% do pulmão comprometido)
12	M	COVID-19/dengue	Nenhum	Nenhum	Melhora clínica em 7 dias
13	F	Dengue	12 dias	Corticoides, Azitromicina (500 mg) Oxigênio nos primeiros 2 dias	5 dias no hospital; melhora clínica em 20 dias

*- = informação não disponível

3.4. DISCUSSÃO

O impacto global e multifacetado da pandemia de COVID-19 é incontestável, tendo acarretado milhões de mortes em todo o mundo (OMS, 2024a). Em regiões endêmicas de dengue, como a América Latina e o Sudeste Asiático, a situação é ainda agravada tanto pela ocorrência de arboviroses epidêmicas quanto por aspectos socioeconômicos (BUTT et al., 2020). Nestas regiões, casos de coinfeção SARS-CoV-2/DENV têm sido apontados como um desafiador problema de saúde pública (HARIADI et al., 2022; RIDWAN, 2020; SADDIQUE et al., 2020).

Os 13 casos de coinfeção descritos neste estudo, juntamente com outros casos descritos na literatura, evidenciam os desafios em alcançar o diagnóstico correto, uma vez que ambas as doenças compartilham sinais, sintomas e características laboratoriais semelhantes (BICUDO et al., 2020; LEÓN-FIGUEROA et al., 2022). Esses obstáculos no processo de diagnóstico não somente podem ser prejudiciais à condição do paciente, mas também aumentam a carga sobre o sistema de saúde, especialmente no contexto da pandemia de COVID-19, por se tratar de doenças com morbidade e mortalidade substanciais (BUTT et al., 2020).

O diagnóstico preciso de COVID-19 por si só já é um desafio significativo na prática clínica, já que é necessário diagnóstico diferencial em relação a influenza e outras infecções respiratórias. Tal desafio se refletiu no número de óbitos por doenças respiratórias notificados entre março e novembro de 2020 no Brasil. Neste período, houve aumento de 1225% na notificação de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e aumento de 40% na notificação de óbitos indeterminados (óbitos ligados a doenças respiratórias, mas não conclusivo) em relação ao mesmo período de 2019 (CRC NACIONAL, 2020). Neste sentido, a circulação concomitante de outras doenças febris endêmicas como a dengue complica ainda mais a diagnose.

A problemática do diagnóstico diferencial entre doenças febris fica evidente após a análise dos casos aqui relatados, onde a similaridade entre os sintomas nos estágios iniciais da COVID-19 e a dengue, ou a apresentação assintomática de um deles, retardaram o diagnóstico de infecções concomitantes (Tabela 2). Febre, mialgia, cefaleia, náuseas e fadiga são exemplos de sintomas compartilhados por ambas as doenças (CDC, 2024; OMS, 2024b). Mesmo a dor retro-orbital, um sintoma geralmente associado à dengue, vem sendo relatada em casos de COVID-19 (KADIANE-OUSSOU et al., 2020; RUIY et al., 2020).

No contexto desta série de casos, em que os casos de coinfeção começaram a ser registrados durante período epidêmico de dengue, a dengue foi, muitas vezes, o primeiro

diagnóstico contemplado pelos médicos (Figura 3), e a coinfeção com SARS-CoV-2 foi, portanto, determinada com atraso. No decorrer da pandemia, os profissionais de saúde passaram a considerar a possibilidade de infecções concomitantes no diagnóstico inicial, conforme destacado na Figura 3.

Como a dengue e a COVID-19 exigem manejos clínicos diferentes, o diagnóstico incorreto ou tardio pode acarretar graves consequências (BICUDO et al., 2020). O uso de anticoagulantes é especialmente preocupante, pois são frequentemente usados em pacientes com COVID-19 para proteção contra eventos trombóticos, mas devem ser evitados em todos os pacientes com dengue, pois podem aumentar o risco de trombocitopenia e eventos hemorrágicos (BHATIA; KAUL, 2017). Além disso, vários fatores, como hipertensão, diabetes, obesidade e idade avançada, que estão associados ao mau prognóstico na COVID-19 (GRASSELLI et al., 2020), também podem agravar a dengue. Alguns desses fatores estão presentes nos pacientes coinfectados relatados aqui bem como em outros casos relatados na literatura (LEÓN-FIGUEROA et al., 2022).

Alguns indícios clínicos e epidemiológicos podem auxiliar no diagnóstico diferencial. A sazonalidade de infecções respiratórias, em geral, difere da sazonalidade da dengue: as infecções respiratórias são mais frequentes no inverno (SVSA/MS, 2023), enquanto os casos de dengue se concentram no verão, com pico no primeiro semestre do ano, como consequência do aumento da precipitação característico dessa estação (MS, 2022a, 2024a). No entanto, os casos de COVID-19 no Brasil ainda não seguem um padrão sazonal claro (MS, 2024b), como comumente observado para influenza e outros vírus respiratórios. Devido aos poucos anos de circulação do SARS-CoV-2, à dinâmica da pandemia e às variadas intervenções implementadas ao longo dos anos, a avaliação da sazonalidade da COVID-19 é complicada, e sua projeção futura permanece incerta (MS, 2024b; TOWNSEND et al., 2023).

A trombocitopenia e leucopenia estão entre os achados laboratoriais mais reportados para casos de coinfeção (DALUGAMA; SENEVIRATNE, 2023; LEÓN-FIGUEROA et al., 2022; SCHULTE et al., 2021). Entretanto, estas alterações hematológicas são comuns em ambas as doenças (CHEN et al., 2020; DE OLIVEIRA et al., 2009), não contribuindo como fatores determinantes para o diagnóstico diferencial. Em contrapartida, derrames cavitários e sangramentos não são comumente observados na COVID-19, o que deve levantar suspeita de coinfeção, mesmo com opacidades pulmonares em vidro fosco claras típicas dessa infecção (CHUNG et al., 2020).

Além dos desafios relacionados ao diagnóstico diferencial, o foco no diagnóstico de COVID-19 durante a pandemia, além da demanda gerada pela quantidade e severidade dos

casos, pode ter contribuído para uma redução no número de casos de dengue diagnosticados, gerando subnotificação e atraso na implementação de intervenções terapêuticas vitais para tratamento de dengue, como hidratação por via oral ou por infusão de cloreto de sódio 0,9% (KALAYANAROOJ; ROTHMAN; SRIKIATKHACHORN, 2017).

Boletins epidemiológicos emitidos pelo Ministério da Saúde mostraram que, em 2020, houve diminuição no número de casos e mortes por dengue em comparação com o mesmo período em 2019. O Boletim Epidemiológico nº 36 sugere que tal diminuição pode ser atribuída à mobilização de equipes de vigilância epidemiológica estaduais para o enfrentamento da emergência da pandemia de COVID-19, ocasionando atraso ou subnotificação de casos das arboviroses (MS, 2020a), gerando consequente deterioração das medidas de vigilância e controle (OLIVE et al., 2020).

O potencial de subnotificação devido à priorização do controle da COVID-19 e à sobrecarga dos sistemas de saúde também foi relatado em outros países da América Latina (CARDONA-OSPINA et al., 2020; PLASENCIA-DUEÑAS; FAILLOC-ROJAS; RODRIGUEZ-MORALES, 2022), bem como em países do Sudeste Asiático (LU et al., 2021), com maior ênfase nas primeiras ondas da pandemia (LEÓN-FIGUEROA et al., 2022). Além das limitações operacionais, foi notável a resistência de muitas pessoas em procurar atendimento médico devido ao receio de contrair COVID-19 em hospitais ou outros centros de saúde (NACHER et al., 2020; OLIVE et al., 2020).

Simultaneamente, a redução da incidência de dengue em 2020 em diversos países endêmicos foi associada com as rigorosas medidas de proteção contra a COVID-19, que resultaram em restrições de mobilidade, especialmente em áreas não residenciais, reduzindo a exposição ao mosquito transmissor em espaços públicos, apesar da interrupção em programas de controle vetorial (CHEN et al., 2022).

Um entrave adicional ao diagnóstico e notificação de casos está relacionado à resposta sorológica dessas infecções. A baixa especificidade de alguns testes rápidos e kits comerciais para detecção de anticorpos IgM para DENV pode resultar em reatividade cruzada com anticorpos IgM para SARS-CoV-2 (YAN et al., 2020).

Neste sentido, seria preferível realizar o diagnóstico confirmatório via RT-PCR para DENV. No entanto, a confirmação por RT-PCR não é a abordagem mais comum na prática clínica. Isto se deve ao fato de que o manejo clínico da dengue é decidido baseando-se primordialmente em sinais e sintomas, não sendo essencial o conhecimento do sorotipo (MS, 2016), embora existam evidências de que as manifestações clínicas possam variar de acordo com o sorotipo (BALMASEDA et al., 2006). Adicionalmente, no Distrito Federal, os resultados

de RT-PCR são divulgados em até 12 dias úteis (LACEN, 2020), momento em que normalmente já ocorreu abrandamento dos sintomas da dengue (MS, 2016) e conhecimento do sorotipo não tem impacto no manejo clínico da doença.

Além disso, os testes IgM ELISA ou NS1 são frequentemente preferidos, pois são mais amplamente disponíveis e acessíveis em regiões endêmicas de dengue (CHAN; HOW; NG, 2017; LEÓN-FIGUEROA et al., 2022; OMS, 2009; SALAM et al., 2018; UDDIN et al., 2021). Em comparação ao teste de RT-PCR, a janela para a coleta de amostras sorológicas oferece mais flexibilidade, enquanto a maior estabilidade das imunoglobulinas facilita o transporte (OMS, 2009). Contudo, a detecção de anticorpos pelos testes de IgM é limitada nos primeiros dias de infecção, sendo a positividade mais comum após o sexto dia de sintomas (MS, 2013).

A detecção do antígeno NS1 é um método que favorece o diagnóstico na fase aguda da doença. Esse teste, direcionado a uma proteína específica do DENV chamada NS1 (antígeno não estrutural 1), que é liberada durante a replicação viral, apresenta alta sensibilidade nos primeiros dias de infecção, quando o vírus se replica ativamente no organismo, permitindo assim o diagnóstico precoce da dengue (ALCALÁ; LUDERT, 2023; MS, 2013). A proteína NS1 é encontrada nos quatro sorotipos do DENV, e o teste deve ser realizado idealmente até o quinto dia após o início dos sintomas. O ideal é que a amostra seja colhida no primeiro dia dos sintomas, o que frequentemente permite a liberação do resultado antes da defervescência da febre. Embora seu desempenho seja comparável ao do RT-PCR, o teste de NS1 não permite a identificação do sorotipo específico (MS, 2013).

Tanto para detecção de IgM quanto para NS1 existem testes rápidos por imunocromatografia. Este tipo de teste de baixo custo pode ser realizado fora do laboratório, em serviços de saúde, como por exemplo, farmácias e postos de saúde que estejam autorizados a realizar testagem. Porém, devido às diferenças nos valores de sensibilidade e de especificidade encontrados, recomenda-se a realização de exame laboratorial, utilizando os laboratórios de referência (MS, 2013).

Informações sobre os sorotipos circulantes podem ser obtidas nos boletins epidemiológicos regionais, que registram a identificação de sorotipos. Entre janeiro e setembro de 2020, estes boletins relataram 312 identificações do sorotipo DENV-1 e 16 de DENV-2 nas áreas onde residiam os pacientes incluídos no presente estudo (MS, 2020a). Não obstante, por ter relevância clínica e epidemiológica, a carência de identificação do sorotipo da dengue é uma limitação deste estudo (BALMASEDA et al., 2006). Um desenho experimental incorporando o teste RT-PCR para DENV deve ser considerado para estudos futuros.

Globalmente, foram relatados mais de 300 casos de coinfeção SARS-CoV-2/DENV, com maior concentração na América Latina e no Sudeste Asiático (AGUDELO-ROJAS et al., 2023; DALUGAMA; SENEVIRATNE, 2023; LEÓN-FIGUEROA et al., 2022; PANTIG et al., 2023). Uma proporção significativa dessas coinfeções foi reportada no Brasil, com pelo menos 78 casos relatados (LEÓN-FIGUEROA et al., 2022), tendo o primeiro caso de coinfeção SARS-CoV-2/DENV na América Latina sido reportado em Brasília (Distrito Federal, Brasil) por Bicudo e colaboradores em setembro de 2020 (BICUDO et al., 2020).

O expressivo número de casos de coinfeção SARS-CoV-2/DENV reportados no Brasil pode ser explicado pelo tamanho populacional, bem como pela alta incidência de dengue e COVID-19. Entre janeiro de 2020 e agosto de 2024, foram registrados no Brasil aproximadamente 37,5 milhões de casos de COVID-19 (OMS, 2024a) e 10,8 milhões casos prováveis de dengue (MS, 2020a, 2021a, 2022, 2024). O Distrito Federal, onde foram relatados ao menos 57 casos da coinfeção, incluindo os 13 casos aqui descritos (BICUDO et al., 2020; LEÓN-FIGUEROA et al., 2022; SCHULTE et al., 2021; TEOTÔNIO et al., 2021), frequentemente figura entre as regiões com maior incidência de ambas as doenças (MS, 2020a, 2020b, 2021b, 2022, 2024).

Embora a análise isolada desta série de 13 casos não tenha permitido chegar a conclusões definitivas sobre o impacto da coinfeção SARS-CoV-2/DENV nos desfechos clínicos dos pacientes, a inclusão desses dados em duas revisões sistemáticas permitiu expandir o entendimento desta questão. Dos 13 casos, 4 necessitaram hospitalização (30,8 %), todos com recuperação plena (SCHULTE et al., 2021). A revisão de Dalugama e Seneviratne (2023) incluiu, além destes 13 casos, um estudo realizado no Peru (n=50) e diversos pequenos estudos que relatam entre 1 a 4 casos de coinfeção, totalizando mais 37 casos. Entre esses 37 casos, 27% evoluíram com complicações ou óbito, enquanto o estudo peruano registrou uma taxa de mortalidade de 28% entre os 50 casos de coinfeção. Esses dados sugerem que as respostas imunológicas desencadeadas por cada uma das doenças podem se intensificar durante a coinfeção, resultando em taxas mais elevadas de complicações (DALUGAMA; SENEVIRATNE, 2023).

A revisão publicada por León-Figueroa e colaboradores (2022) também indicou associação entre a coinfeção e piores desfechos clínicos, já que internação foi necessária para a maior parte dos casos relatados nas 19 publicações incluídas (LEÓN-FIGUEROA et al., 2022). Desta forma, ainda que alguns relatos não apontem para maior gravidade em coinfeções, como um estudo retrospectivo na Argentina com 13 pacientes coinfectados, dos quais 92% apresentaram COVID-19 não grave (CAROSELLA et al., 2021), ambas as revisões

sugerem que a proporção de indivíduos que evoluem para formas graves em coinfeções parece ser maior do que os índices de casos graves para dengue e COVID-19 isoladamente.

De maneira geral, a maioria dos pacientes com COVID-19 sintomática desenvolve doença leve (40%) ou moderada (40%), enquanto cerca de 15% evoluem para formas graves que requerem suporte de oxigênio, e 5% apresentam doença crítica, com complicações como insuficiência respiratória, SDRA, choque séptico, tromboembolismo e falência de múltiplos órgãos (OMS, 2023b). A taxa de letalidade varia para cada país. No Brasil, a taxa de letalidade da COVID-19 foi de 2,5% e 2,9%, em 2020 e 2021, respectivamente, período em que a maior parte de casos de coinfeção foram diagnosticados, diminuindo para 0,5% e 0,8% em 2022 e 2023 (MS, 2024b). A gravidade e a mortalidade da dengue são geralmente menores do que as da COVID-19, com casos graves variando entre 0,1% e 5%, e mortalidade inferior a 0,5% (CDC, 2024b; OPAS, 2024).

Contudo, ambas as revisões destacam também a alta prevalência de fatores de risco nos casos de coinfeção, como idade superior a 60 anos e doenças crônicas não transmissíveis, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e doença pulmonar crônica. Esses fatores contribuem para evolução para doença grave e aumento da mortalidade em ambas as infecções (DALUGAMA; SENEVIRATNE, 2023; LEÓN-FIGUEROA et al., 2022). Por volta de 30-50% dos casos analisados por Dalugama e Seneviratne (2023) apresentavam alguma comorbidade, predominantemente diabetes e hipertensão. O estudo realizado no Peru, que relatou uma mortalidade de 28% entre os casos de coinfeção, incluiu 78% de pacientes do sexo masculino, com idade mediana de 55,5 anos e uma prevalência de comorbidades de 72% (MEJÍA-PARRA et al., 2021).

O impacto da coinfeção nos desfechos clínicos também foi analisado em estudos posteriores às revisões mencionadas. Um estudo com 90 pacientes (72 apenas com COVID-19 e 18 com coinfeção) mostrou que os coinfectados tiveram desfechos mais graves, como dispneia, dessaturação de oxigênio e maior necessidade de cuidados intensivos e ventilação mecânica. A taxa de mortalidade na UTI foi significativamente maior entre os coinfectados (66,6% vs. 29,4%). Neste estudo, a prevalência de comorbidades não teve diferença significativa entre os grupos. Contudo, os autores destacam que deve ser considerado um viés de seleção, já que o acesso a estes pacientes ocorreu em um centro de alta complexidade, o que significa que os pacientes incluídos apresentavam mais comorbidades, condições avançadas e complicações (AGUDELO-ROJAS et al., 2023). Essa limitação também pode ser aplicada para outros estudos sobre coinfeção SARS-CoV-2/DENV.

Outro estudo examinou 120 crianças filipinas com coinfeção de SARS-CoV-2/DENV, comparadas a monoinfecções. As coinfeções foram principalmente casos leves ou moderados de COVID-19, enquanto as monoinfecções apresentaram mais casos assintomáticos. Dentre os pacientes sintomáticos, ambos os grupos tiveram taxas semelhantes de COVID-19 grave, sem diferenças significativas nos desfechos (PANTIG et al., 2023).

Portanto, apesar dos indícios de maior severidade em indivíduos coinfectados do que para dengue e COVID-19 isoladamente, é importante considerar a influência de diferentes fatores, como viés de seleção, idade e a alta prevalência de comorbidades nos casos de coinfeção (AGUDELO-ROJAS et al., 2023; DALUGAMA; SENEVIRATNE, 2023; LEÓN-FIGUEROA et al., 2022; PANTIG et al., 2023). Mais estudos são necessários para melhor compreender os impactos fisiopatológicos da coinfeção SARS-CoV-2/DENV.

Tanto a revisão de León-Figueroa e colaboradores (2022) quanto a de Dalugama e Seneviratne (2023) reforçaram os desafios de diagnóstico e de manejo clínico previamente discutidos, e os desafios para o controle e prevenção das infecções e coinfeções, especialmente considerando o contexto socioeconômico dos países endêmicos de dengue. Esses estudos evidenciaram que dificuldades semelhantes foram enfrentadas em outras regiões endêmicas de dengue (DALUGAMA; SENEVIRATNE, 2023; LEÓN-FIGUEROA et al., 2022).

Desta forma, os casos de coinfeção relatados, em conjunto, permitiram formular conclusões mais robustas sobre as questões inicialmente levantadas, além de destacarem a necessidade contínua de monitoramento e aprofundamento das investigações sobre a coinfeção SARS-CoV-2/DENV para melhor compreender como as interações entre esses vírus e seus hospedeiros podem influenciar as manifestações e os desfechos clínicos.

3.5. CONCLUSÃO

Este estudo apresenta de forma detalhada uma série de casos de coinfeção por SARS-CoV-2/DENV diagnosticados no Hospital Universitário de Brasília, Distrito Federal. Apesar de limitada por um desenho de estudo retrospectivo, número reduzido de casos, capacidade restrita de testagem e alguns dados indisponíveis, esta série de casos é uma fonte de valiosas informações escassas na literatura, tendo contribuído juntamente com outros estudos para construir evidências sobre esta coinfeção.

As informações discutidas neste capítulo ressaltam que não considerar a possibilidade de coinfeção por SARS-CoV-2/DENV pode ser prejudicial em nível individual e coletivo, especialmente em áreas endêmicas. Ambas as doenças têm maior potencial de letalidade entre populações mais vulneráveis e com menos acesso a um sistema de saúde de qualidade, apesar da incidência universal em todos os níveis sociais. Portanto, a constante coleta de informações e discussão sobre coinfeções é fundamental para melhorar o diagnóstico, o manejo clínico e as medidas de prevenção.

Assim como a coinfeção por SARS-CoV-2/DENV, coinfeções de COVID-19 com outras doenças altamente prevalentes em áreas tropicais, como chikungunya, Zika e malária, transmitidas por vetores, tem potencial de impactar a saúde pública e, portanto, requerem mais estudos.

4. CAPÍTULO II

4.1. OBJETIVO GERAL

Utilizar análise metabolômica não direcionada para comparar o perfil geral de metabólitos presentes em amostras de soro de pacientes com controles saudáveis, dengue, coinfeção SARS-CoV-2/DENV, COVID-19 não grave e COVID-19 grave, a fim de avaliar as diferenças na assinatura molecular da coinfeção SARS-CoV-2/DENV em relação aos demais grupos.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. População de estudo

Amostras de soro foram coletadas de indivíduos sadios (controles saudáveis - CS) e pacientes com dengue, coinfeção SARS-CoV-2/DENV, COVID-19 não grave e COVID-19 grave, que compuseram os grupos chamados de CS, DENGUE, COINFEÇÃO, COVID-19 e COVID-19 grave, respectivamente. Para classificar os casos de COVID-19 em grave ou não grave, foram utilizadas as definições da OMS, em que COVID-19 grave é definida por qualquer um dos seguintes critérios: saturação de oxigênio < 90% em ar ambiente; pneumonia grave; ou sinais de grande desconforto respiratório. A COVID-19 não grave é definida como a ausência de quaisquer critérios para COVID-19 grave (OMS, 2023b).

Todos os diagnósticos foram realizados por equipes médicas competentes dos participantes no estudo: o Hospital Universitário de Brasília (HUB), e em dois hospitais da Secretaria de Saúde do Distrito Federal (SES-DF), o Hospital Regional da Asa Norte (HRAN) e o Hospital Regional de Taguatinga (HRT). As coletas das amostras foram realizadas de julho a setembro de 2020, durante a circulação das linhagens B.1.1.28 e B.1.1.33 (RESENDE et al., 2021), e fevereiro a junho de 2021, com circulação majoritária da variante P.1 (MS, 2022b).

Todos os pacientes com diagnóstico de COVID-19 apresentaram RT-PCR para SARS-CoV-2 positiva, incluindo os participantes do grupo de coinfeção. O diagnóstico de dengue foi realizado mediante NS1 ou IgM ELISA reagentes em combinação com sintomas fortemente sugestivos de dengue. A metodologia utilizada para realização dos testes diagnósticos citados está descrita no item 3.2.1. O grupo de coinfeção foi formado por indivíduos que receberam diagnóstico de dengue e COVID-19 em intervalo máximo de 15 dias. Excetuando-se as

amostras coletadas de indivíduos saudáveis, todas as amostras biológicas foram coletadas na fase aguda das doenças - até 14 dias a partir do início dos sintomas.

Todos os participantes da presente investigação eram maiores de 18 anos no momento da coleta, declararam residência no Distrito Federal e foram capazes de entender as informações contidas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O TCLE foi formulado de acordo com a Declaração de Helsinque e com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Todos os pacientes receberam esclarecimentos sobre a proposta geral do estudo tanto oralmente quanto por escrito, com base no texto impresso do TCLE, que foi assinado por todos os pacientes incluídos neste estudo. O TCLE também assegurou aos pacientes a confidencialidade de seus nomes e dados pessoais, bem como o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento, sem nenhuma penalização. O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (CEP/FS) da Universidade de Brasília, sob os Certificados de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) 34164820.6.0000.0030 e 30846920.7.0000.0008 (Anexos I e II, respectivamente).

4.2.2. Amostras biológicas

As amostras de soro utilizadas para realização deste estudo foram obtidas por duas diferentes abordagens: 1) o sangue foi diretamente coletado e transportado pela equipe de pesquisa da UnB, onde foi submetido a centrifugação, aliquotagem e congelamento; 2) material sobressalente de amostras de sangue, coletadas pelos profissionais do HUB, HRAN ou HRT para exames de rotina hospitalar, foi cedido para uso no projeto de pesquisa.

Para todas as amostras, o sangue total (10 mL) foi coletado por punção venosa em tubos com ativador de coágulo e gel separador. O soro foi obtido por centrifugação (2000 x g, 7 min, 4 °C) a partir das amostras de sangue total em até 8 horas após coleta do material. O sangue total foi mantido refrigerado até o momento de centrifugação.

Para as amostras coletadas e levadas diretamente para a UnB, alíquotas de 250 mL do soro resultante foram transferidas para microtubos de 1,5 mL. Entre 5 e 10 alíquotas de 250 mL de soro de participante foram então armazenados a -25 °C até o momento de extração dos metabólitos para análise do perfil metabólico. As amostras cedidas pela equipe dos hospitais foram congeladas após uso para realização dos exames hospitalares de rotina e transportadas para a UnB, onde permaneceram congeladas até o dia de análise.

4.2.3. Dados clínicos, sociais e epidemiológicos

Além das amostras biológicas, foram coletados dados clínicos, sociais e epidemiológicos através de consulta aos prontuários eletrônicos e de entrevistas realizadas pessoalmente com os participantes do estudo. Foram coletados dados como sexo, idade, endereço, comorbidades, sintomas apresentados até o dia da coleta da amostra, necessidade de hospitalização e intervenções terapêuticas, incluindo automedicação.

4.2.4. Análise do perfil metabólico

4.2.4.1. Preparação de amostras para análise em CLAE-EM/EM

O preparo das amostras foi baseado no trabalho publicado por Gauglitz e colaboradores (2020) (GAUGLITZ et al., 2020). As amostras, que se encontram armazenadas em *freezer* a -25 °C, foram descongeladas em geladeira *overnight*. Após ambientação das amostras à temperatura ambiente por 30 min, alíquotas de 20 µL de soro foram transferidos para tubos tipo *ependorf* e, em seguida, 120 µL de solução de extração fria, MeOH:MeCN (1:1, v/v), foram adicionados a cada tubo tipo *ependorf*. Depois de 1 min em agitação orbital (Esco Scientific, ProvoCell), as amostras foram deixadas por 30 min a -20 °C e então centrifugadas por 10 min, a 4 °C, a 20000 x g (Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 8R Centrifuge). Uma alíquota da fase orgânica (120 µL) foi transferida para outro tubo tipo *ependorf* e evaporada até a seca (60 min, a 30 °C) em concentradora rotativa a vácuo (Analítica, RVC 2-25 CDplus). Os resíduos secos foram então transportados refrigerados até a Central de Espectrometria de Massas de Micromoléculas Orgânicas (CEMMO), na Universidade de São Paulo-Ribeirão Preto (USP-RP) para análise em CLAE-EM/EM. Um diagrama esquemático desse processo de preparação de amostras está ilustrado na Figura 4.

No dia da realização da análise em CLAE-EM/EM, os resíduos foram ressuspensos em 80 µL de solução MeOH:H₂O (1:1) enriquecida com parecoxibe e minoxidil a 6,25 µg/mL, que foram usados como padrões internos. A solução foi então filtrada para vials de vidro com *insert* fixo usando seringa descartável de 1 mL e filtro de seringa com membrana PTFE (politetrafluoretileno) hidrofóbica 4 mm de diâmetro, poro 0,20 µm (*Millex*, *Millipore*). Desta solução filtrada, uma alíquota de 20 µL foi injetada no sistema CLAE-EM/EM.

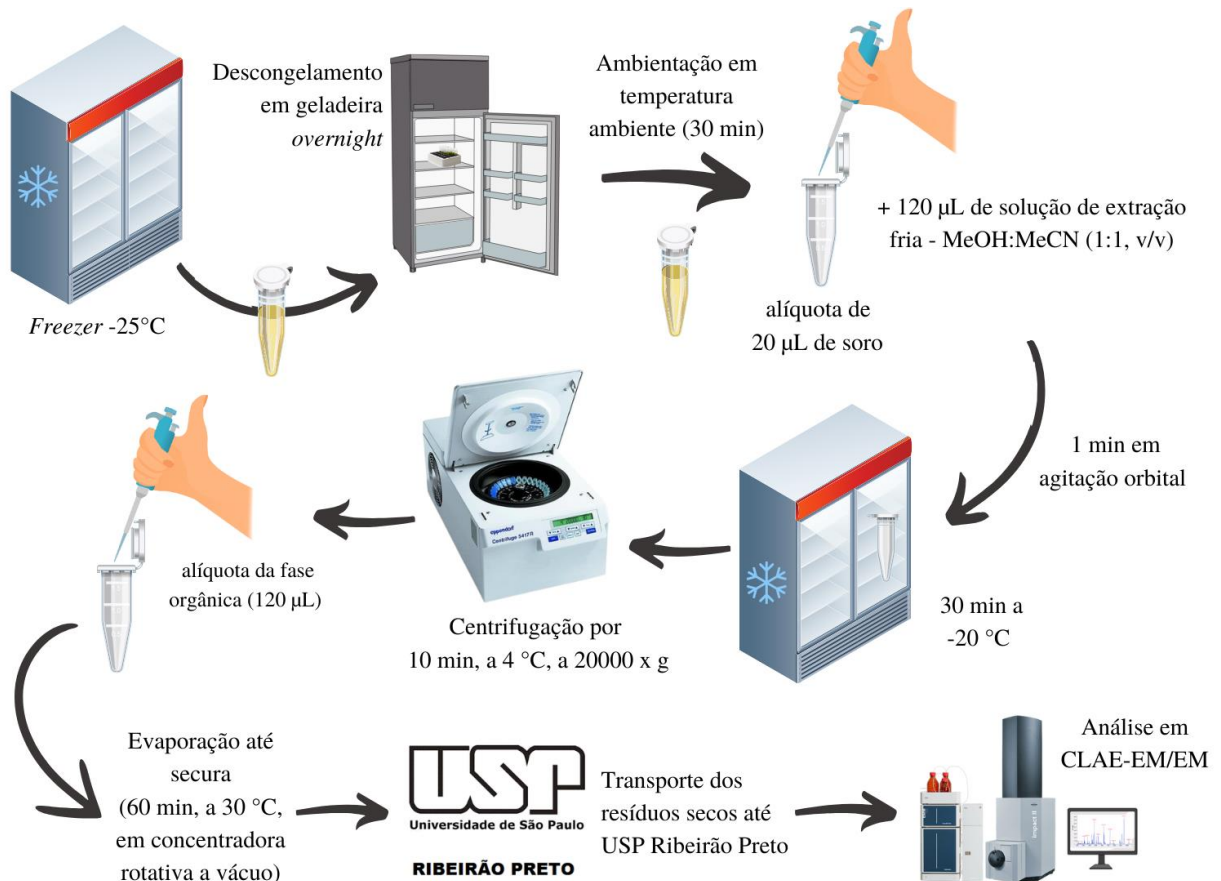


Figura 4. Diagrama do processo de preparo das amostras de soro desde o descongelamento até a análise final por CLAE-EM/EM, incluindo processo de extração dos metabólitos e evaporação das amostras até secura antes do transporte para a USP-RP.

4.2.4.2. Aquisição de dados em CLAE-EM/EM

A análise dos componentes presentes nas 176 amostras de soro foi efetuada em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da marca *Shimadzu*[®] (Kyoto, Japão) composto de: bombas de alta pressão (modelo LC-20AD), degaseificador (DGU-20A₃), injetor com amostrador de 100 µL (SIL-20A HT), detector espectrofotométrico de arranjo de diodo (DAD, SPD-M20A, 200 a 600 nm), módulo de comunicação (CBM-20A) e forno para coluna (CTO-20A) aquecido a 40 °C. As injeções foram realizadas automaticamente (20 µL). Empregou-se coluna *Kinetex*[™] XB-C18 *Phenomenex*[®] (150 mm x 2,1 mm), tamanho de partícula 2,6 µm e coluna de guarda *Phenomenex*[®] (2,1 mm). Como fase móvel, foram utilizados H₂O (A) e MeCN (B) ambos com 0,1% de ácido fórmico (v/v) em eluição por gradiente com fluxo de 0,4 mL/min: 0-4 min 15% (B), 4-30 min 25% (B), 30-50 min 100% (B), 50-55 min 100% (B), 55-60 min 5% (B), 60-65 min 5% (B), com tempo total de análise de 65 minutos.

O equipamento CLAE foi acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução *microOTOF II-ESI-ToF Bruker Daltonics*[®] (Billerica, Massachusetts, EUA). Os espectros foram adquiridos em modo positivo, empregando ionização por *electrospray* (IES) nas condições: 4500 V; *end plate*: 500 V; temperatura do gás de secagem 200 °C a uma vazão de 9 L/min. Foi utilizado nitrogênio (N₂) tanto para nebulização quanto para secagem. A energia de colisão utilizada foi de 20 eV. Para calibração interna utilizou-se solução de ácido trifluoroacético (TFA, 500 mg/L).

O modo de aquisição AutoEM/EM utilizou ciclos de 3,0 s e adquiriu EM/EM para os 5 íons mais intensos, excluindo os íons interferentes determinados previamente no branco do método: *m/z* 207,09-207,29; 223,08-223,28; 225,10-225,30; 226,10-226,30; 383,20-383,40; 397,22-397,42; 398,22-398,42; 424,26-424,46; 425,27-425,47; 426,27-426,47; 436,32-436,52; 437,28-437,48; 438,28-438,48; 439,27-439,47; 439,27-439,47; 440,27-440,47; 477,31-477,51; 478,31-478,51; 479,33-479,53; 480,33-480,53; 481,33-481,53; 482,31-482,51; 512,31-512,51; 526,32-526,52; 570,35-570,55; 614,37-614,57; 703,46-704,66; 704,46-705,66; 705,46-706,66; 725,45-725,65; 726,45-726,65; 741,42-742,62; 802,48-802,68; 803,48-803,68; 826,47-826,67; 833,66-833,86; 873,73-873,93.

Um branco foi injetado (20 µL) a cada 5-6 amostras; e 20 µL de um mix de padrões internos (parecoxibe e minoxidil a 6,25 µg/mL) foram injetados no início e ao final das análises. A cada 12-15 injeções de amostras, foram injetadas amostras de controle de qualidade constituídas de 50 µL de cada uma das 12-15 amostras analisadas. O programa empregado na aquisição dos dados foi o software Bruker Compass DataAnalysis 4.1 (Bremen, Alemanha).

4.2.4.3. Pré-processamento dos dados

Arquivos Bruker .d, resultantes das análises em CLAE-EM/EM, foram convertidos para formato .mzML usando o software Bruker Compass DataAnalysis 4.4 (Bremen, Alemanha) e pré-processados usando MZmine 3 (versão 3.4.27) (SCHMID et al., 2023), a ferramenta de pré-processamento de dados espectrais mais divulgada e utilizada pela comunidade de espectrometria de massas. Após aplicação de uma série de etapas de pré-processamento, o MZmine gera uma lista de *features* (PILON et al., 2021). Cada *feature* é constituída de uma combinação única de relação massa/carga (*m/z*) e tempo de retenção (tR).

As listas de massas geradas pelo MZmine foram compostas por sinais EM¹ com intensidade acima de 1,0E2 e sinais EM² acima de 0. Apenas sinais entre 3,2 e 55,0 min foram considerados. Para construção dos cromatogramas de íons extraídos, foi utilizado *ADAP*

chromatogram builder (MYERS et al., 2017; PLUSKAL et al., 2010) com os seguintes parâmetros: *min group size in # of scans* = 3; *group intensity threshold* = 1,0E2; *min highest intensity* = 3,0E2; *scan to scan accuracy (m/z)* = 0,005 m/z. Após aplicar suavização de Savitzky-Golay (*Retention time smoothing* = 7), os cromatogramas foram deconvoluídos usando o algoritmo *Local minimum feature resolver* com os parâmetros: *chromatographic threshold* = 85%; *minimum search range RT* = 0,05 min; *minimum relative height* = 0%; *minimum absolute height* = 3,0E2; *min ratio of peak top/edge* = 2,5; *peak duration range* = 0,01–2,00 min; *minimum scans* = 4. Os íons de mesmo perfil isotópico foram então agrupados em um único *feature* usando a função *13C isotope filter*, com os parâmetros configurados para: *m/z tolerance* = 0,005 m/z; *retention time tolerance* = 0,1; *monotonic shape* selecionado; *maximum charge* = 2; *representative isotope* = *most intense*. Em seguida, foi feito o alinhamento dos *features* usando a função *Join aligner* (*m/z tolerance* = 0,005 m/z; *retention time tolerance* = 0,5 min; *weight for m/z* = 3; *weight for RT* = 1). A lista de dados foi então filtrada de forma a manter apenas os *features* associados a *scans* de MS2 (*Feature list rows filter*). Com o propósito de reestabelecer *features* de interesse que foram excluídos ou não selecionados devido aos valores dos parâmetros utilizados, foi realizada uma reanálise dos dados usando *Peak finder*, com os parâmetros configurados para: *intensity tolerance* = 20%; *m/z tolerance* = 0,005 m/z; *retention time tolerance* = 0,06 min; *minimum scans* = 3.

Essas etapas e parâmetros foram selecionados a partir da literatura (OTTOSSON et al., 2023; PILON et al., 2021), com adaptações realizadas conforme as particularidades dos dados. Ao final do pré-processamento no MZmine, os dados foram exportados em dois arquivos, uma tabela de *features* em formato .csv contendo as intensidades dos espectros EM¹, e um arquivo .mgf contendo todas as informações dos espectros de EM².

O arquivo .csv foi submetido à curadoria de dados no software TidyMS (BUESCHL et al., 2023). O TidyMS é uma plataforma projetada para melhorar a qualidade dos dados e mitigar a variabilidade técnica por meio de um *pipeline* estruturado em várias etapas. O *pipeline* utilizado neste estudo teve como primeira etapa a subtração de sinais dos brancos utilizando a função *BlankCorrector*, que é essencial para reduzir o ruído de fundo introduzido por solventes e artefatos de manipulação de amostras. Em seguida, foram aplicados filtros de prevalência (*PrevalenceFilter*) para reter apenas os *features* consistentemente detectados nas amostras de controle de qualidade (QC) e em todos os grupos de estudo (CS, DENGUE, COINFECÇÃO, COVID-19 e COVID-19 grave). Subsequentemente, foi feita uma curadoria manual das *features* na tabela exportada pelo TidyMS, eliminando aquelas detectadas apenas nas amostras em branco ou com indícios de *carry-over*.

4.2.4.4. Anotação dos dados

Para a anotação de metabólitos putativos, os dados pré-processados foram analisados utilizando uma variedade de ferramentas metabolômicas para identificação estrutural e busca em bancos de dados moleculares, incluindo GNPS (WANG et al., 2016), SIRIUS (DJOUMBOU FEUNANG et al., 2016; DÜHRKOP et al., 2019, 2021; KIM et al., 2021), MetaboAnalyst (PANG et al., 2024). Estas análises foram seguidas de inspeção manual das anotações sugeridas, bem como busca manual em bases de dados, como HMDB (<https://hmdb.ca/>), Metabolomics Workbench (<https://www.metabolomicsworkbench.org/>) e MassBank (<https://massbank.eu/MassBank/>).

Os dados de espectrometria de massa processados com MZmine 3 foram exportados para o GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) para análise FBMN (Feature-Based Molecular Networking) (NOTHIAS et al., 2020). Os dados foram filtrados removendo todos os íons fragmentos de EM/EM dentro de +/- 17 Da do m/z do precursor. Os espectros de EM/EM foram filtrados para selecionar apenas os 6 principais íons fragmentos na janela de +/- 50 Da ao longo do espectro. A tolerância de massa do íon precursor bem como a tolerância do íon fragmento de EM/EM foram definidas para 0,05 Da. Em seguida, foi criada uma rede molecular, onde as arestas foram filtradas para ter um escore de cosseno acima de 0,70 e mais de 4 picos correspondentes. Além disso, as arestas entre dois nós foram mantidas na rede apenas se cada um dos nós aparecesse entre os 10 nós mais semelhantes um com outro. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100, e as arestas com pontuações mais baixas foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite. Os espectros na rede foram então pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS (HORAI et al., 2010; WANG et al., 2016). Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre os espectros da rede e os espectros da biblioteca precisavam ter um escore acima de 0,7 e pelo menos 4 picos correspondentes. O DEREPLICATOR foi utilizado para anotar os espectros de EM/EM (MOHIMANI et al., 2018).

O arquivo .mgf também foi importado para o SIRIUS 5.6.3 para anotação *in silico*, visualização do padrão de fragmentação e intensidade relativa de cada m/z , previsão da fórmula molecular e classificação de metabólitos. Os elementos C, H, O, N, P e S foram permitidos na identificação da fórmula molecular, assim como uma precisão de massa de EM² de 10 ppm. O campo do instrumento foi definido como “Q-TOF”. A função Predict FPs foi utilizada para

prever o *fingerprint* molecular dos compostos, e a função Search DBs foi utilizada para realizar buscas em bancos de dados estruturais com o CSI:FingerID. A ferramenta CANOPUS foi usada para prever as classes dos compostos (sem necessidade de banco de dados). Na ferramenta MetaboAnalyst, foi utilizado o módulo Peak Annotation e função Single Tandem Spectrum, com tolerância de massa definida para 10 ppm, busca em todas as bases de dados, modo positivo, e método de similaridade “Dot-product”.

Para os metabólitos da classe de glicerofosfolipídios, foram mantidas as siglas derivadas da língua inglesa, como PC (*Phosphatidylcholine*), LPC (*Lysophosphatidylcholine*), LPE (*Lysophosphatidylethanolamine*), PS (*Phosphatidylserine*) e PA (*Phosphatidic Acid*), seguindo as convenções internacionais de nomenclatura de lipídios. Neste sentido, foi empregada a nomenclatura padronizada fornecida pela plataforma RefMet (FAHY; SUBRAMANIAM, 2020) para garantir a consistência na identificação dos metabólitos.

4.2.4.5. Visualização dos dados e análise estatística

Após curadoria dos dados, os dados foram importados para o software PLS_Toolbox (versão 9.2.1) para aplicação de análises multivariadas não supervisionadas, PCA (*Principal Component Analysis*), e supervisionadas, PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*). A importância dos metabólitos para diferenciação dos grupos foi avaliada aplicando a análise de classificação supervisionada XGBoost-DA (*Extreme Gradient Boosting - Discriminant Analysis*). Antes de realizar estas análises, os dados transformados, normalizados, centralizados e/ou autoescalados, usando combinações das funções log10, SNV (*Standard Normal Variate*), *mean center* e *autoscaling*.

O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado usando o GraphPad Prism (versão 8.0.2) para determinar se os metabólitos putativos eram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) entre os grupos em nível de análise univariada. Adicionalmente, o desvio padrão relativo (DPR) foi calculado para a área, altura do sinal, e tempo de retenção (tR) de cada padrão interno (minoxidil e parecoxibe), a fim de avaliar as variações instrumentais. Os padrões internos minoxidil e parecoxibe foram detectados em 10 e 44 min, respectivamente. O DPR para área, altura do sinal e tR variou em 12%, 0,24% e 1,83%, respectivamente, para o minoxidil, e 7%, 0,06% e 0,34% para o parecoxibe.

Os mapas de calor e o gráfico de radar foram produzidos no Microsoft Excel utilizando os dados transformados em log10, normalizados por SNV e autoescalados. Os mapas de calor foram construídos utilizando a formatação condicional, aplicando uma escala de cores

personalizada para destacar as variações nos níveis dos metabólitos. A chave de cores foi configurada da seguinte forma: os valores mínimos foram representados pela cor azul, com o critério definido em 10% dos dados; os valores intermediários foram indicados pela cor amarela, correspondendo ao percentil 50 (mediana dos dados); e os valores máximos foram destacados em vermelho, definidos como aqueles que atingiam 90% da distribuição dos dados.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Caracterização das amostras biológicas

Entre julho de 2020 e junho de 2021, aproximadamente 1550 amostras de sangue foram obtidas pela equipe de professores e estudantes do PPGCM/UnB. Estas amostras contemplaram uma série de estudos que abordaram os impactos da COVID-19 sob diferentes perspectivas, incluindo investigação de: COVID-19 e coinfeções (MORAIS et al., 2021; SCHULTE et al., 2021); perfil de mediadores inflamatórios em pacientes com COVID-19 grave (JARDIM-SANTOS et al., 2022); perfil de mediadores inflamatórios em pacientes gestantes e recém-nascidos (FERNANDES et al., 2021); perfil de coagulação de pacientes com COVID-19 (AIRES et al., 2022); expressão gênica; entre outros trabalhos detalhados no Capítulo III.

Amostras de plasma, soro e sangue total foram coletadas no HUB, HRAN e HRT. Adicionalmente, foram realizadas coletas domiciliares agendadas a partir de atendimentos realizados nos hospitais citados. Estas amostras foram processadas e identificadas com código padronizado que permite rastreamento dos dados clínicos referentes a cada amostra.

O código padronizado baseia-se numa combinação alfanumérica que une informações sobre local e data de coleta, bem como características da amostra biológica e do paciente que forneceu a amostra. O código se inicia com as letras “BR”, que representam o país de coleta (Brasil), seguidas das letras “DF”, separadas pelo símbolo “.”, indicando coleta no Distrito Federal. A sequência seguinte consiste em uma combinação de um número de dois dígitos e uma letra. O número identifica o local de coleta das amostras: os números 01, 02 e 03 são referentes aos hospitais HUB, HRAN e HRT, respectivamente, e o número 04 é referente às coletas domiciliares. A letra indica o caderno físico em que foi feito o registro do doador das amostras: “A” corresponde ao 1º caderno, B ao 2º caderno, e assim sucessivamente. Por exemplo, a combinação “01A” se refere ao primeiro caderno de registros do HUB.

O número de três dígitos que vem na sequência corresponde à página do caderno onde foi feito o registro das amostras de um paciente específico. Cada página contém registros de um único paciente, incluindo amostras coletadas em diferentes datas. Essas amostras são

classificadas por letras correspondentes a diferentes datas (A = primeira coleta, B = segunda coleta etc.), e por números referentes ao tipo de amostra derivada do sangue periférico (1 = plasma, 2 = soro, 3 = sangue total). Desta forma, se for considerado o código até o número da página, essa porção do código caracteriza um paciente específico. Um exemplo da aplicação deste sistema de codificação é mostrado na Figura 5.

A Figura 6 ilustra o método de armazenamento e identificação das amostras utilizando o código padronizado. A Figura 6A mostra que, em cada caixa de criotubos, foram armazenadas amostras coletadas de dois pacientes. Para facilitar a identificação visual, as alíquotas de plasma foram marcadas com adesivos vermelhos, enquanto as de soro receberam adesivos amarelos. O código padronizado foi impresso em etiquetas resistentes a congelamento e solventes, que foram fixadas em cada alíquota ou tubo de coleta, conforme demonstrado na Figura 6B. A Figura 7 mostram como foram feitos os registros nos cadernos, e a Figura 8 mostra uma captura de tela do registro eletrônico em planilha Excel compartilhada entre os pesquisadores do PPGCM/UnB.

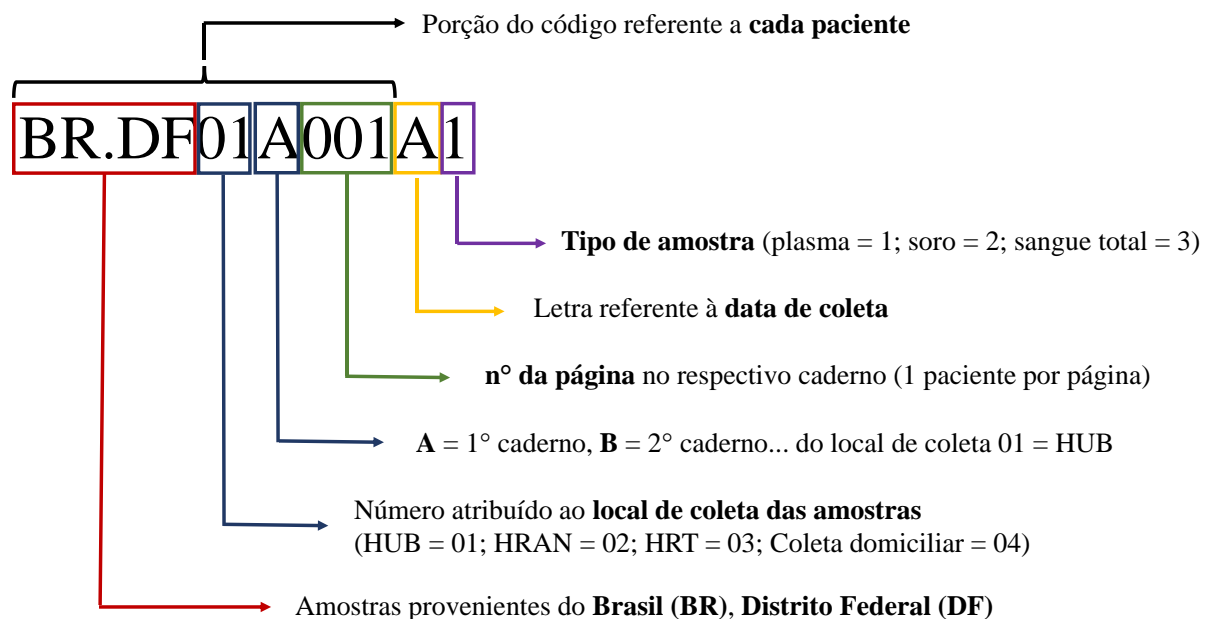


Figura 5. Sistema de codificação padronizado para identificação de amostras biológicas coletadas pelo PPGCM-UnB. O exemplo se refere a uma amostra coletada no Brasil (BR), Distrito Federal (DF), mais especificamente no Hospital Universitário de Brasília (HUB), que é representado pelo número 01. Esta foi a primeira amostra de plasma (A1) coletada no HUB, já que foi registrada na primeira página do primeiro caderno de registros deste hospital.

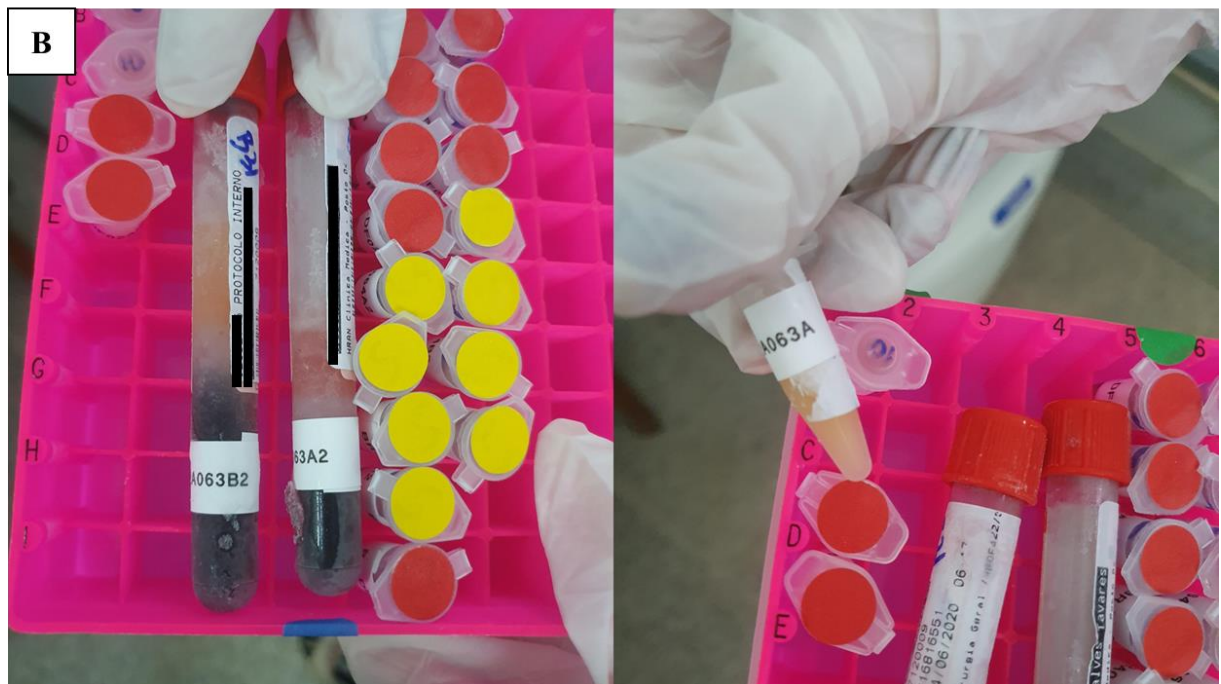
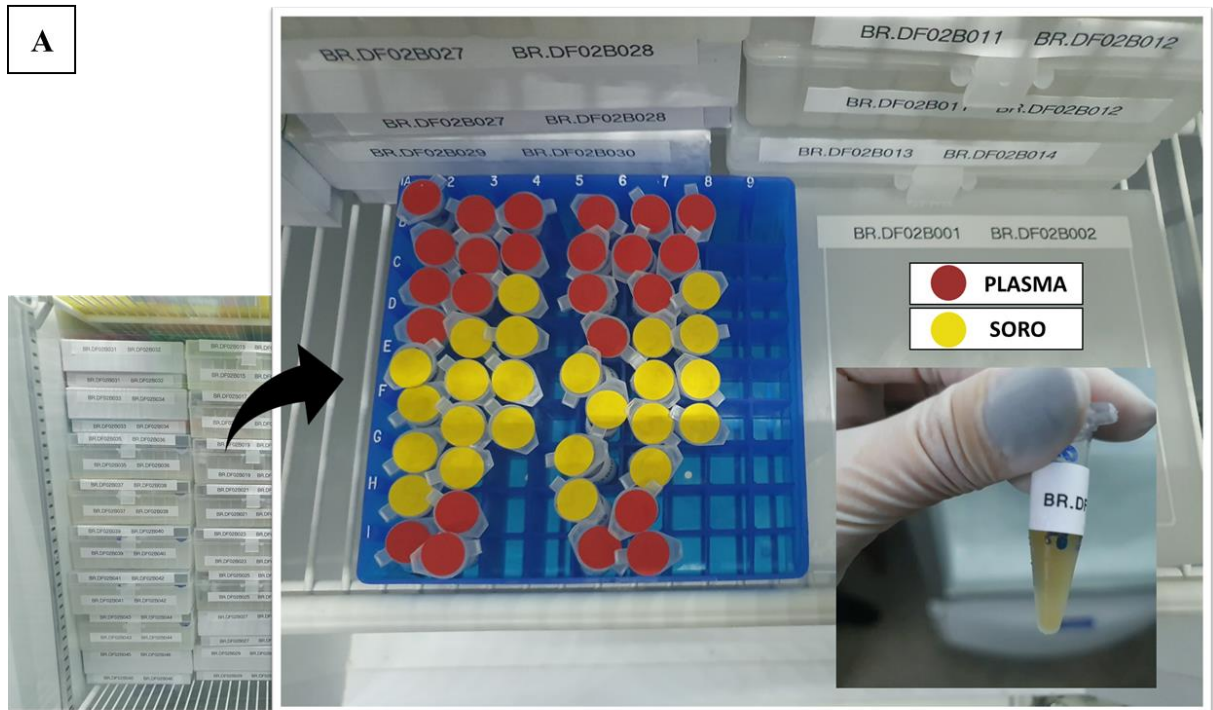


Figura 6. Armazenamento e identificação das amostras de sangue periférico utilizando o código padronizado. (A) Organização das amostras em caixas para criotubos, onde cada caixa acomoda amostras de dois pacientes, cujos códigos estão fixados no exterior da caixa. As alíquotas de plasma foram marcadas com adesivos vermelhos, e as de soro, com adesivos amarelos, facilitando a identificação visual. (B) Exemplos da aplicação das etiquetas com código padronizado impresso em alíquotas mantidas em tubos *ependorff* e tubos de coleta.

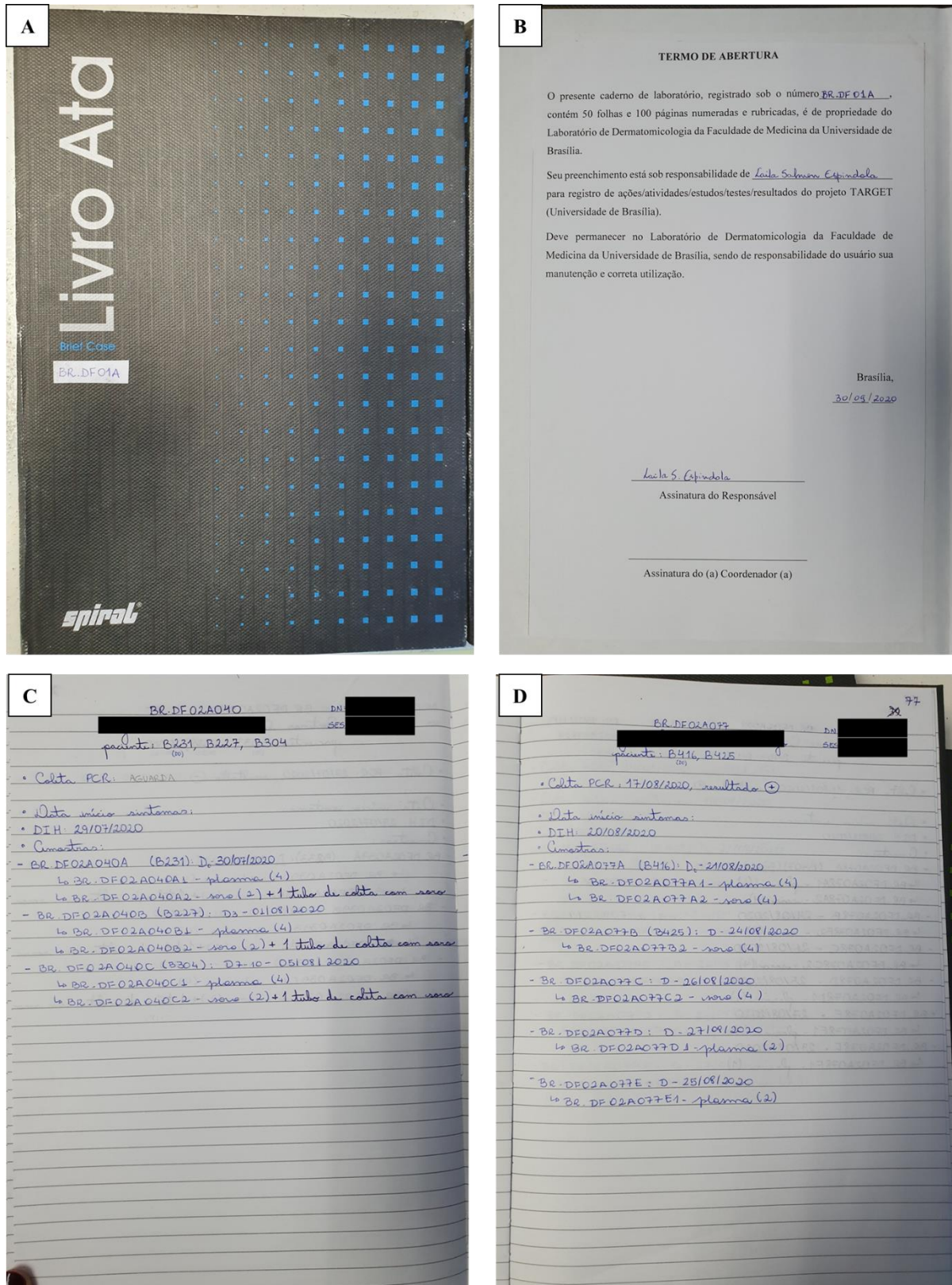


Figura 7. Registro de pacientes e amostras em cadernos. (A) Capa do caderno de registros (livro ata) com identificação BR.DF01A, referente ao primeiro caderno de registro do HUB. (B) Termo de abertura do caderno BR.DF01A. (C) e (D) Exemplos do registro dos pacientes BR.DF02A040 e BR.DF02A077, nas páginas 40 e 77, respectivamente. Em cada página, são detalhados os diferentes tipos de amostras coletadas, incluindo soro e plasma, com as respectivas datas de coleta.

	A	B	M	N	O	P	Q	R	S	
1	HOSPITAL	CÓDIGO ATA PACIENTE	ILETA PCR							
2			RESULTADO	DO/ INTERAÇÃO DIA #1 (Data e código)	PLASMA	Quantidade inicial	Retirados para análise	SORO	Quantidade inicial	Ret
54	HRAN	BR.DF02A036	POSITIVO	BR.DF02A036A 28/07 b208	BR.DF02A036A1	4	-	BR.DF02A036A2	2	-
55										
56	HRAN	BR.DF02A037	AGUARDA	BR.DF02A037A 28/07 b209	BR.DF02A037A1	4	-	BR.DF02A037A2	3	-
57	HRAN	BR.DF02A038	AGUARDA	BR.DF02A038A 28/07 b210 - NE						
58	HRAN	BR.DF02A039	NEGATIVO	BR.DF02A039A 30/07 b233	BR.DF02A039A1	4	-	BR.DF02A039A2	2	-
59	HRAN	BR.DF02A040	AGUARDA	BR.DF02A040A 30/07 b231	BR.DF02A040A1	4	-	BR.DF02A040A2	3	-
60	HRAN	BR.DF02A041	POSITIVO	HRAN 30/07 - NE						
61	HRAN	BR.DF02A042	POSITIVO	BR.DF02A042A 30/07 b230	BR.DF02A042A1	4	-	BR.DF02A042A2	2	-
62	HRAN	BR.DF02A043	POSITIVO	BR.DF02A043A 30/07 b232	BR.DF02A043A1	4	-	BR.DF02A043A2	2	-
63	HRAN	BR.DF02A044	NEGATIVO	BR.DF02A044A 30/07 b229	BR.DF02A044A1	4	-	BR.DF02A044A2	3	-
64	HRAN	BR.DF02A045	POSITIVO	BR.DF02A045A 01/08 b225	BR.DF02A045A1	4	-	BR.DF02A045A2	2	-
65										
66	HRAN	BR.DF02A046	POSITIVO	BR.DF02A046A 01/08 b223	BR.DF02A046A1	2	-	BR.DF02A046A2	2	-
67										
68	HRAN	BR.DF02A047	POSITIVO	BR.DF02A047A 01/08 b220	BR.DF02A047A1	4	-	BR.DF02A047A2	2	-
69	HRAN	BR.DF02A048	POSITIVO	BR.DF02A048A 01/08 b224	BR.DF02A048A1	4	-	BR.DF02A048A2	2	-
70	HRAN	BR.DF02A049	POSITIVO	BR.DF02A049A 01/08 b217	BR.DF02A049A1	4	-	BR.DF02A049A2	2	-

Figura 8. Captura de tela do registro eletrônico das informações sobre as amostras coletadas e seus respectivos metadados, organizados em uma planilha Excel compartilhada entre os pesquisadores do PPGCM/UnB, com destaque para as amostras registradas do paciente BR.DF02A040.

Para o estudo do perfil metabólico de pacientes com COVID-19 e/ou dengue, foram inicialmente selecionadas amostras de soro de 49 pacientes diagnosticados com dengue, 11 pacientes infectados concomitantemente por SARS-CoV-2 e DENV (coinfecção SARS-CoV-2/DENV), 38 pacientes com COVID-19 não grave, e 40 pacientes com COVID-19 grave. Todas as coletas foram realizadas durante a fase aguda das doenças. Adicionalmente, foram selecionadas amostras de soro de 37 indivíduos saudáveis, totalizando 175 amostras de soro.

A seleção das amostras priorizou pacientes com o menor número possível de comorbidades, especialmente doenças metabólicas, buscando manter a mesma mediana de idade e uma distribuição equilibrada entre os sexos. Nos cinco grupos, a mediana de idade variou entre 35 e 45 anos, com proporções semelhantes entre indivíduos do sexo masculino e feminino.

As amostras de soro mencionadas foram obtidas utilizando duas abordagens distintas (item 4.2.2). Do total de 175 amostras, 64 (36,6%) foram coletadas diretamente pela equipe de pesquisa do PPGCM/UnB, enquanto 111 (63,4%) foram cedidas pelas equipes dos hospitais participantes depois de realizados os exames de rotina aos quais estas amostras se destinavam.

A proporção de amostras obtidas diretamente pelo grupo de pesquisa variou entre os grupos de estudo, conforme ilustrado na Figura 9. O maior percentual foi registrado no grupo COVID-19, com 71% das amostras coletadas pela equipe de pesquisa da UnB. No grupo de

COINFECCÃO, que apresentou um número reduzido de amostras (n=11) devido à menor prevalência dessa condição na população, 64% das amostras foram coletadas pela equipe UnB.

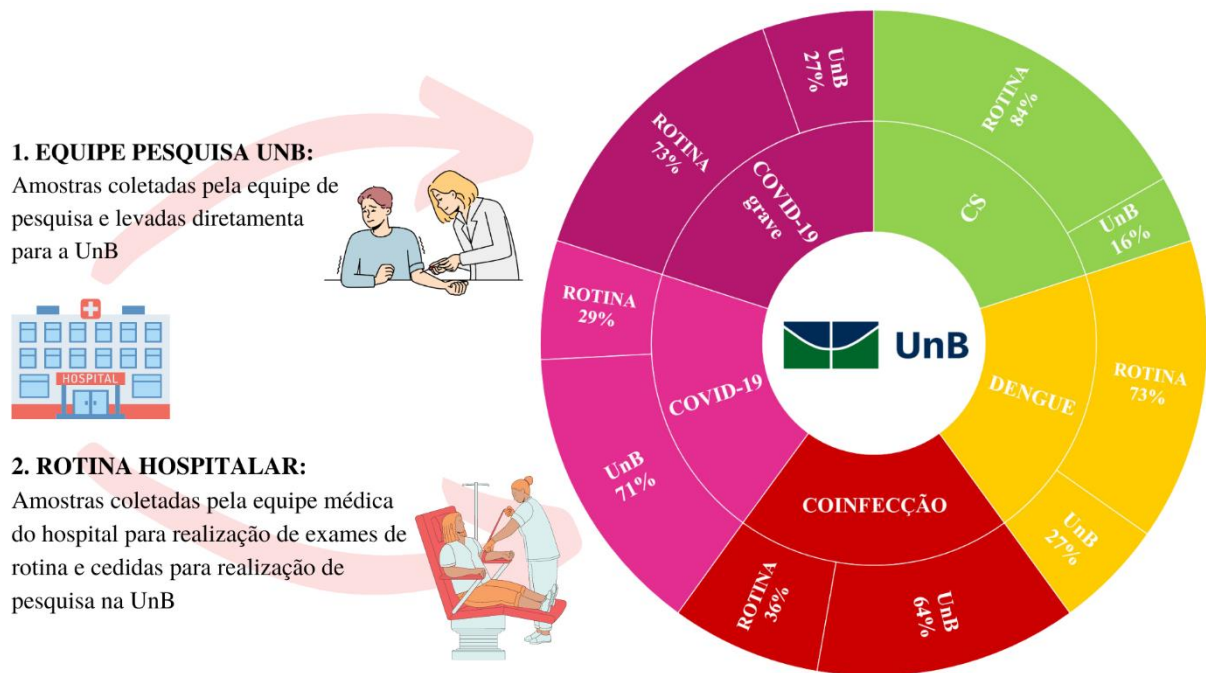


Figura 9. Representação esquemática das duas abordagens para obtenção de amostras de sangue utilizadas neste estudo e as proporções de amostras obtidas por cada abordagem dentro de cada grupo: CS (controles saudáveis), DENGUE, COINFECCÃO, COVID-19 e COVID-19 grave.

Para compor os grupos CS, DENGUE e COVID-19 grave, foi necessário recorrer a porcentagens maiores de amostras cedidas pelos hospitais (84%, 73% e 73%, respectivamente). Durante a pandemia, indivíduos sadios e pacientes com dengue estavam majoritariamente seguindo medidas de distanciamento social, o que aumentou o receio de exposição ao contato com pesquisadores trabalhando com pacientes infectados por SARS-CoV-2. Apesar do grande número de amostras doadas por pacientes com COVID-19 grave, a proporção de amostras obtidas diretamente pela equipe de pesquisa da UnB foi pequena devido à complexidade de acesso às unidades de terapia intensiva.

As amostras de indivíduos sadios provenientes da rotina foram obtidas a partir do aproveitamento de amostras de soro colhidas para realização de uma triagem destinada a detectar possíveis infecções assintomáticas por SARS-CoV-2 entre profissionais do HUB. A triagem em questão, que foi facultativa e aberta a todas as áreas do hospital, teve intuito de garantir a proteção dos colaboradores e pacientes do referido hospital. A testagem, realizada entre junho e julho de 2020, aplicou teste-rápido para COVID-19 em todos os profissionais assintomáticos. O percentual de resultados reagentes na testagem de colaboradores

assintomáticos até 03/07/2020 foi de 5,5% para IgM e 25,9% para IgG, conforme relatório de gestão da EBSEH. Após testagem, as amostras de soro foram mantidas congeladas no Laboratório de Análises Clínicas/HUB e, posteriormente, transportadas para UnB para alíquotagem e extração dos metabólitos.

Após preparo das amostras e aquisição dos dados por CLAE-EM/EM, conforme descrito nos itens 4.2.4.1 e 4.2.4.2, observou-se que as análises das amostras coletadas pela equipe de pesquisa da UnB e aquelas obtidas pela rotina hospitalar geraram perfis cromatográficos sistematicamente distintos. Os cromatogramas do pico base (*base peak chromatogram* - BPC) das amostras coletadas pela equipe da UnB se mostraram consistentemente mais ricos em sinais (Figura 10A), enquanto as amostras obtidas pela rotina hospitalar exibiram um perfil mais variável e com menor densidade de sinais (Figura 10B).

Esta diferença no padrão dos perfis cromatográficos pode ser visualizada pela plotagem em uma PCA de três amostras obtidas pela UnB e três amostras obtidas pela Rotina para cada um dos grupos: CS, DENGUE, COINFECÇÃO, COVID-19 e COVID-19 grave (Figura 10C). A Figura 10C mostra que as amostras obtidas pela UnB e pela Rotina se agruparam em extremos opostos da componente principal 1 (PC1). O perfil mais variável dentre as amostras da Rotina pode ser percebido pela distribuição destas ao longo das PC2 e PC3.

As maiores diferenças entre os perfis cromatográficos das amostras da UnB e da rotina hospitalar foram observadas entre 12 e 40 minutos. No entanto, também houve perda de sinais nas amostras da rotina entre 43 e 53 minutos, intervalo associado à detecção de glicerofosfolipídios, conforme detalhado no item 4.3.3.1, que trata da anotação dos dados. Essa perda pode ter afetado a separação dos grupos, refletida na distribuição das amostras da rotina ao longo das PCs.

Múltiplos fatores podem ter levado à detecção de menos sinais e à maior variabilidade nos perfis cromatográficos das amostras originadas da rotina hospitalar. Estas amostras foram obtidas por diferentes métodos e materiais de coleta, além de terem sido submetidas a diferentes condições de armazenamento, processamento e transporte até chegarem na UnB para armazenamento antes da extração de metabólitos. Estes fatores pré-analíticos, especialmente o tempo e temperatura aos quais as amostras foram expostas antes de serem processadas, podem afetar significativamente os níveis de diferentes metabólitos (STEVENS et al., 2019; THACHIL et al., 2024).

No contexto de análises clínicas, fatores pré-analíticos são responsáveis por 60-80% dos erros laboratoriais (CARRARO; ZAGO; PLEBANI, 2012; LIPPI et al., 2006; STEVENS et al., 2019; SZECSI; ØDUM, 2009), resultando em alterações em biomarcadores frequentemente

avaliados (CLARK et al., 2003; ODDOZE; LOMBARD; PORTUGAL, 2012). Estudos metabolômicos, que envolvem a análise simultânea de um grande número de características metabólicas, enfrentam desafios específicos, já que diferentes metabólitos possuem distintos graus de suscetibilidade à degradação (FERREIRA et al., 2019; OTTOSSON et al., 2023).

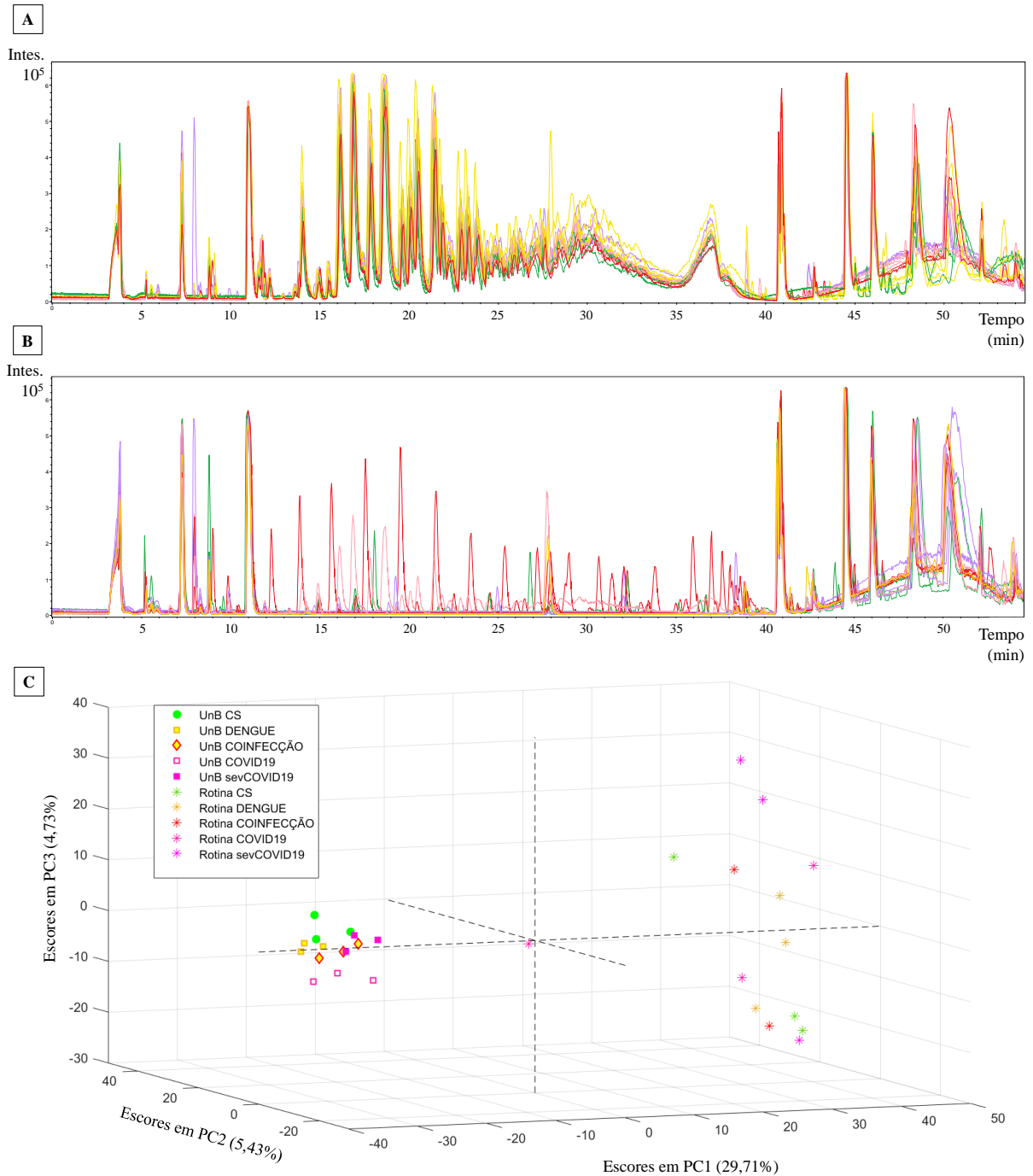


Figura 10. Comparação entre os perfis cromatográficos obtidos para amostras coletadas diretamente pela equipe UnB e amostras obtidas pela rotina. (A) BPCs das amostras coletadas pela equipe da UnB; (B) BPCs das amostras obtidas na rotina hospitalar; (C) PCA mostrando a distribuição de três amostras obtidas pela UnB e três amostras obtidas pela rotina hospitalar

para cada um dos grupos: CS, DENGUE, COINFECÇÃO, COVID-19 e COVID-19 grave.
*BPC: *base peak chromatogram*; PCA: análise de componentes principais.

Acesso a amostras biológicas com perfil metabólico íntegro é um dos principais entraves dos estudos metabolômicos clínicos (THACHIL et al., 2024). Isso dificulta a obtenção de um conjunto amostral significativo, especialmente de condições mais raras, como é o caso de coinfeções. Uma possível solução é o armazenamento de amostras de sangue periférico como amostras de sangue seco. Amostras de sangue seco são obtidas a partir de pequenas quantidades de sangue coletadas em papel-filtro e deixadas para secar naturalmente. Esse método é amplamente utilizado em testes laboratoriais e estudos de triagem, como na triagem neonatal (WILHELM; DEN BURGER; SWART, 2014), popularmente conhecida como teste do pezinho (SILVA et al., 2020).

Amostras secas são mais estáveis em temperatura ambiente o que facilita o armazenamento e o transporte, especialmente em locais com acesso limitado a infraestrutura de refrigeração. Além disso, comparadas à coleta tradicional de sangue total, a obtenção de amostras de sangue seco é menos invasiva e requer um menor volume de amostra (OTTOSSON et al., 2023; WAGNER et al., 2016).

O grupo liderado pela pesquisadora Madeleine Ernst estuda amostras de sangue seco neonatais armazenadas no Biobanco Nacional da Dinamarca (*Danish National Biobank*). Usando um protocolo de metabolômica baseado em espectrometria de massas em tandem não direcionada, o grupo demonstrou que a maioria (71%) do metaboloma permaneceu estável durante 10 anos de armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, embora tenham sido observadas tendências de diminuição em metabólitos relacionados a lipídios, como glicerofosfolinas e acilcarnitinas (OTTOSSON et al., 2023).

Os sinais referentes a lipídios, como os glicerofosfolipídios, estão dentre as alterações metabólicas mais relevantes reportadas para doenças infecciosas como dengue e COVID-19 (CUI et al., 2013, 2018; DELAFIORI et al., 2021; SINDELAR et al., 2021). Desta forma, considerando a menor densidade de sinais, a alta variabilidade entre as amostras e os indícios de perda de informação importante nas amostras da Rotina (Figura 10B), as análises metabolômicas tiveram enfoque nas 64 amostras provenientes da coleta pela equipe de pesquisa UnB (Figura 10A).

4.3.2. População de estudo

Neste estudo, foram analisadas 64 amostras de soro: 6 de controles saudáveis (CS), 13 de DENGUE, 7 de COINFECÇÃO, 27 de COVID-19, e 11 de COVID-19 grave. Os dados clínicos referentes aos 64 participantes do estudo estão dispostos na Tabela 3. A comorbidade mais frequente foi a hipertensão arterial sistêmica (HAS), com maior incidência no grupo COVID-19 grave (18%). O grupo dengue incluiu um paciente obeso. Outras comorbidades registradas incluíram hipopituitarismo no grupo dengue e doenças reumáticas (artrite reumatoide e espondilite anquilosante) no grupo COVID-19 grave.

Febre, mialgia, cefaleia e dor retro-orbital foram sintomas comuns a todos os grupos, sendo febre, mialgia e cefaleia os sintomas mais frequentemente relatados. Artralgia e exantema foram relatados apenas em pacientes infectados por DENV (grupos coinfeção SARS-CoV-2/DENV e dengue), enquanto tosse e dispneia foram relatadas somente em pacientes infectados por SARS-CoV-2 (coinfeção SARS-CoV-2/DENV, grupos COVID-19, e COVID-19 grave). A Figura 11 destaca os principais sintomas relatados nos grupos DENGUE, COINFECÇÃO, COVID-19 e COVID-19 grave.

No grupo COVID-19 grave, as intervenções farmacológicas mais comuns foram uso de antibióticos, para 100% dos integrantes, e corticoides, para 82% destes pacientes. Outros estudos também relataram altas taxas de uso de antimicrobianos em pacientes internados com infecção por SARS-CoV-2 para tratar coinfeções bacterianas documentadas ou presumidas (ALHUMAID et al., 2021; LANSBURY et al., 2020; MUSUUZA et al., 2021).

Dentro do grupo COVID-19, os medicamentos mais utilizados foram analgésicos, corticoides e antibióticos (30%, 30% e 19%, respectivamente). Dentre os pacientes coinfectados, os tratamentos mais comuns foram uso de antibióticos e corticoides (57% e 43%, respectivamente). No grupo dengue, não foram utilizados corticoides, antibióticos ou anticoagulantes, mas sim analgésicos (100%) e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES, 15%) (Tabela 3), embora AINES sejam contraindicados para o tratamento de dengue (CDC, 2024a).

Dentro do grupo COVID-19 grave, 27% dos indivíduos se automedicaram com medicamentos não prescritos e sem comprovação de eficácia para o tratamento da COVID-19, dentre eles ivermectina, cloroquina e hidroxicloroquina. No grupo COVID-19 não grave, 11% dos indivíduos usaram medicamentos não prescritos e, no grupo COINFECÇÃO, 29%. Tais medicamentos não foram utilizados no grupo dengue (Tabela 3).

Tabela 3. Dados clínicos dos pacientes dos quais foram coletadas amostras de soro para avaliação do perfil metabólico separados por grupos (controles saudáveis, dengue, coinfeção SARS-CoV-2/ DENV, COVID-19 e COVID-19 grave).

	Controles saudáveis (n=6)	Dengue (n=13)	Coinfeção (n=7)	COVID-19 (n=27)	COVID-19 grave (n=11)
Idade (anos; mediana, min-máx)	28 (26-37)	36 (22-43)	41 (27-75)	35 (19-67)	38 (18-60)
Sexo, F/M	4/2	8/5	3/4	18/9	3/8
Comorbidades					
Hipertensão, n/total (%)	0/6 (0)	0/13 (0)	1/7 (14)	4/27 (15)	2/11 (18)
Diabetes, n/total (%)	0/6 (0)	0/13 (0)	0/7 (0)	0/27 (0)	0/11 (0)
Obesidade, n/total (%)	0/6 (0)	1/13 (8)	0/7 (0)	0/27 (0)	0/11 (0)
Outras	N.D.	1/13 (8)	0/7 (0)	2/27 (7)	0/11 (0)
Sintomas na admissão hospitalar					
Febre, n/total (%)	N.D.	8/13 (62)	6/7 (86)	16/27 (59)	9/11 (82)
Tosse, n/total (%)	N.D.	0/13 (0)	3/7 (43)	17/27 (63)	7/11 (64)
Dispneia, n/total (%)	N.D.	0/13 (0)	1/7 (14)	6/27 (22)	11/11 (100)
Mialgia, n/total (%)	N.D.	9/13 (69)	2/7 (29)	12/27 (44)	5/11 (45)
Cefaleia, n/total (%)	N.D.	10/13 (77)	1/7 (14)	14/27 (52)	6/11 (54)
Dor retro-orbital, n/total (%)	N.D.	10/13 (77)	1/7 (14)	3/27 (11)	2/11 (18)
Artralgia, n/total (%)	N.D.	6/13 (46)	1/7 (14)	0/27 (0)	0/11 (0)
Exantema, n/total (%)	N.D.	7/13 (54)	1/7 (14)	0/27 (0)	0/11 (0)
Intervenção terapêutica					
Analgésicos	N.D.	13/13 (100)	0/7 (0)	8/27 (30)	5/11 (45)
AINES	N.D.	2/13 (15)	0/7 (0)	2/27 (7)	1/11 (9)
Corticoides	N.D.	0/13 (0)	3/7 (43)	8/27 (30)	9/11 (82)
Antibióticos	N.D.	0/13 (0)	4/7 (57)	5/27 (19)	11/11 (100)
Anticoagulantes	N.D.	0/13 (0)	0/7 (0)	2/27 (7)	0/11 (0)
Medicamentos não prescritos*	N.D.	0/13 (0)	2/7 (29)	3/27 (11)	3/11 (27)

*Medicamentos não prescritos: ivermectina, cloroquina, hidroxicloroquina, colchicina. N.D. = não descrito; AINES = anti-inflamatórios não-esteroidais



Figura 11. Sintomas predominantes relatados nos grupos DENGUE, COINFECÇÃO, COVID-19 e COVID-19 grave. O diâmetro das circunferências é proporcional à porcentagem de pacientes de cada grupo que relataram o sintoma, conforme relatado na Tabela 3.

Dentre os pacientes com COVID-19 grave, 92,5% precisaram de oferta de oxigênio suplementar, por cateter nasal ou máscara não reinalante (MNR), para aumento da saturação periférica de oxigênio (SpO₂). Um destes pacientes evoluiu para necessidade de ventilação mecânica. Um participante do grupo coinfecção SARS-CoV-2/DENV também precisou de ventilação não invasiva usando cateter nasal. Não foram registrados óbitos em nenhum dos grupos.

4.3.3. Análises metabômicas

Para realização das análises metabômicas, os dados brutos foram pré-processados utilizando o *software* MZmine 3.4.27. A partir das 64 amostras UnB, foram extraídas 3092 *features*. As amostras da rotina hospitalar também foram submetidas ao mesmo pré-processamento, com o objetivo de comparar o padrão de separação com as amostras da UnB em análises de PCA e PLS-DA, tendo sido extraídas 2853 *features*.

Dentre as *features* extraídas, mais de 150 geraram correspondências em bancos de dados espectrais nas plataformas GNPS, SIRIUS e MetaboAnalyst. Estas correspondências incluíram metabólitos endógenos, como ácidos biliares, aminoácidos, peptídeos e lipídios; e exógenos,

como fármacos, metabólitos provenientes de alimentos (como flavonoides, aditivos, flavorizantes, entre outros), pesticidas, e plastificantes.

As correspondências geradas foram individualmente analisadas, combinando as informações fornecidas pelas plataformas mencionadas com a inspeção manual das anotações sugeridas, além de consultas manuais em bases de dados como HMDB, Metabolomics Workbench e MassBank, complementadas por uma busca na literatura pertinente. A partir desta análise individualizada, foram priorizadas as anotações de metabólitos mais relevantes para as discussões sobre o impacto das infecções, abrangendo predominantemente as classes de ácidos biliare, aminoácidos e lipídios, totalizando 31 metabólitos putativos.

Os dados exportados do MZmine referentes às 64 amostras da UnB passaram por uma curadoria subsequente utilizando o *software* TidyMS, seguida por uma curadoria manual, o que resultou na redução do conjunto de *features* para 878. O TidyMS aplica filtros que removem picos de baixa intensidade ou sinais espúrios que não são consistentes ao longo de múltiplas amostras, garantindo a eliminação de ruídos que possam comprometer a qualidade dos dados (BUESCHL et al., 2023). Considerando a variabilidade na detecção dos sinais entre as amostras da Rotina, os dados da rotina hospitalar não passaram pela curadoria no TidyMS.

Os dados pré-processados foram organizados e analisados utilizando diferentes ferramentas, como PLS_Toolbox, MetaboAnalyst 6.0, GraphPad Prism e Microsoft Excel. Inicialmente, foi considerado todo o conjunto de *features*, e, em seguida, houve um foco específico nos metabólitos anotados. A Figura 12 apresenta um fluxograma que resume as etapas do processamento e análise dos dados metabolômicos.

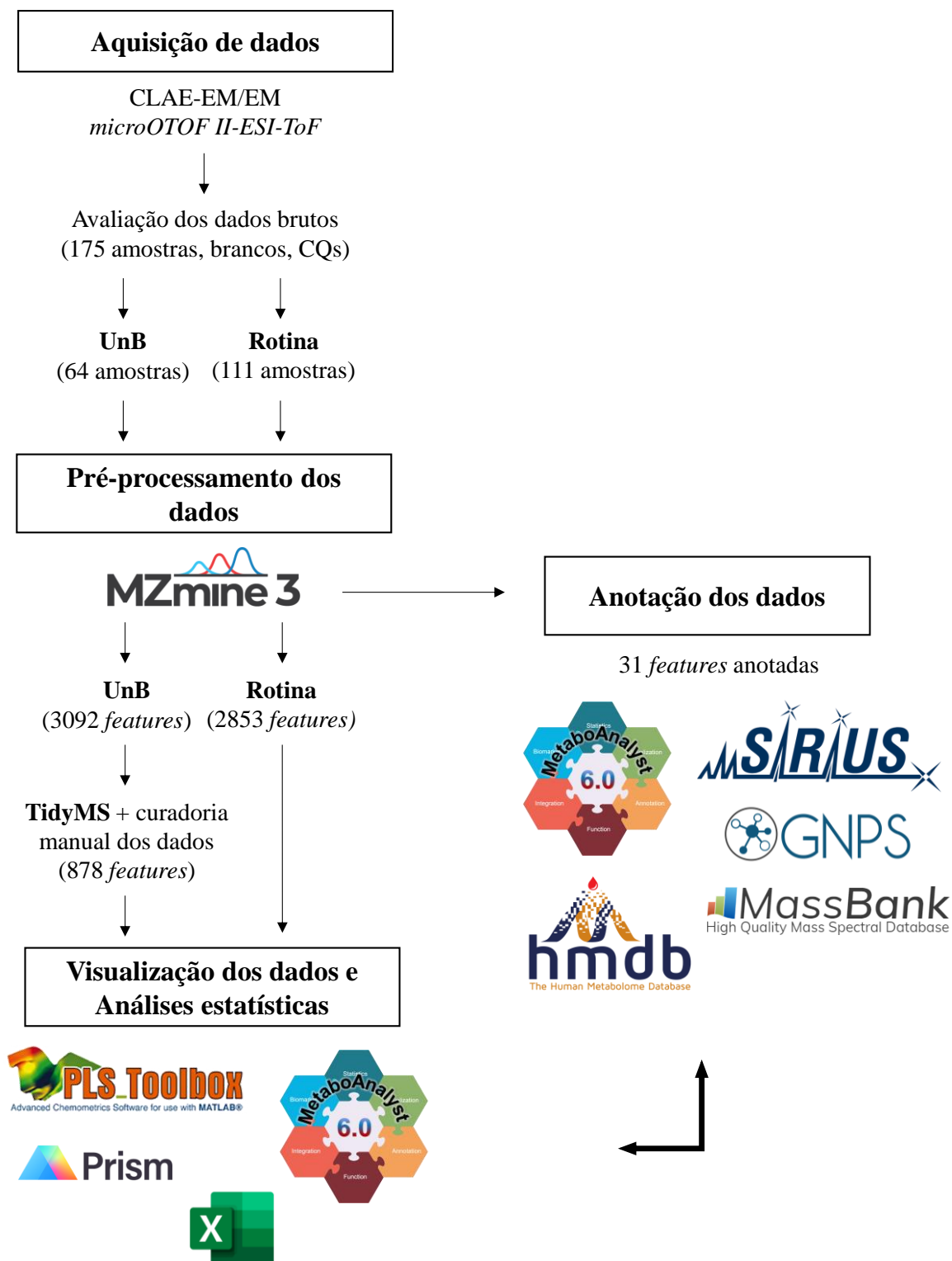


Figura 12. Fluxograma das etapas do processamento e análise dos dados metabolômicos. A aquisição dos dados foi realizada por CLAE-EM/EM, seguida do pré-processamento utilizando o *software* MZmine 3. Posteriormente, os dados foram anotados com auxílio de ferramentas como SIRIUS, GNPS, HMDB e MassBank. As etapas de visualização e análise estatística dos dados foram realizadas com os *softwares* PLS_Toolbox, MetaboAnalyst 6.0, GraphPad Prism e Excel.

4.3.3.1. Anotação dos dados

A Tabela 4 lista os 31 metabólitos putativos pertencentes às classes ácidos biliares, aminoácidos e lipídios, junto aos respectivos dados de identificação, dispostos conforme as diretrizes do guia publicado por Alseekh e colaboradores (2021) (ALSEEKH et al., 2021). O nível de identificação para os metabólitos anotados variou de 2 a 3 (BLAŽENOVIC et al., 2018), e os escores de correspondência estão detalhados na Tabela 4 de acordo com o *software* de anotação.

Os ácidos biliares são moléculas anfipáticas derivadas do colesterol, que desempenham um papel fundamental na digestão e absorção de lipídios, bem como nas vias moleculares que regulam o gasto energético, a homeostase da glicose e a oxidação de ácidos graxos. Estruturalmente, os ácidos biliares possuem um núcleo esteroidal de quatro anéis com diversos grupos hidroxila e uma cadeia lateral que termina em um grupo carboxila, que pode estar conjugado com glicina ou taurina, formando ácidos biliares conjugados, como ácido glicocólico e ácido taurocólico (ZHAO et al., 2022).

Neste estudo, foram anotados quatro ácidos biliares: ácido cólico, ácido glicocólico, ácido glicodesoxicólico e ácido taurocólico, conforme detalhado na Tabela 4. Para todos os ácidos biliares, foram identificados fragmentos referentes à perda de 1 a 3 moléculas de H₂O, que são típicos de dihidroxi e trihidroxi ácidos biliares (RZAGALINSKI et al., 2018). No caso do ácido cólico, foi detectado o íon aduto de amônia do ácido cólico dimérico [m/z 834,5; (2M+NH₄)⁺] (SUAREZ; BRÜCKNER; ROHN, 2018). Para o ácido taurocólico, foi identificado fragmento característico de conjugados de taurina [m/z 126,02; (C₂H₇NO₃S+H)⁺] (RZAGALINSKI et al., 2018). Os padrões de fragmentação dos ácidos biliares foram consistentes com a literatura, bem como com espectros experimentais e preditos disponíveis nas bases de dados MassBank, GNPS e HMDB (BGC, 2017; HMDB, 2024a, 2024b, 2024c, 2024d; SILVA et al., 2022; SUAREZ; BRÜCKNER; ROHN, 2018).

A bilirrubina foi detectada neste estudo com um fragmento principal em m/z 299, em concordância com a literatura. A bilirrubina, um produto da degradação da hemoglobina, desempenha um papel importante no metabolismo e em processos patológicos relacionados à função hepática, o que torna sua detecção relevante para a compreensão de processos infecciosos e inflamatórios (GONG et al., 2018; HMDB, 2024e; NOGAWA; OKANO, 2018).

A Tabela 4 também lista os aminoácidos detectados neste estudo que incluíram fenilalanina e tirosina, bem como derivados do metabolismo de aminoácidos, como ácido fenilacético, fenilacetilglutamina, fenilalaniltreonina, N-(1-Desoxi-1-

frutosil)leucina/isoleucina, e N2-(2-Carboximetil-2-hidroxissuccinol)arginina. Os aminoácidos são caracterizados por conterem um grupo amina (-NH₂), um grupo carboxila (-COOH), um átomo de hidrogênio e uma cadeia lateral (R) específica, todos ligados a um carbono alfa central. Durante o estresse imunológico, os aminoácidos são redistribuídos para os tecidos envolvidos na inflamação e na resposta imune. Eles são utilizados para a síntese de proteínas sinalizadoras e moduladores do sistema imunológico, além de sustentar a proliferação das células imunes (KELLY; PEARCE, 2020; LE FLOC'H; MELCHIOR; OBLED, 2004; WU, 2009). Além disso, o metabolismo de aminoácidos celulares pode ser sequestrado para sustentar a proliferação viral (PANG et al., 2021; THAKER; CH'NG; CHRISTOFK, 2019).

A diversidade de cadeias laterais confere aos aminoácidos propriedades químicas variadas, influenciando sua ionização e fragmentação em estudos de espectrometria de massas. Os aminoácidos podem ser facilmente ionizados utilizando técnicas como a ionização por *electrospray* (ESI), produzindo íons precursores como [M+H]⁺ e [M-H]⁻ (VIOLI et al., 2020). Os padrões de fragmentação observados para os aminoácidos e seus derivados detectados neste estudo foram consistentes com a literatura, bem como com espectros experimentais e preditos disponíveis nas bases de dados MassBank, GNPS e HMDB, conforme detalhado na Tabela 4 (DA SILVA et al., 2021; HMDB, 2024f, 2024g, 2024h; BGC-MUNICH, 2024). Os erros de massa em ppm foram mais elevados do que nas demais anotações, possivelmente devido ao fato de os aminoácidos apresentarem sinais com *m/z* menores, que se situam mais próximos do início da janela espectral (VIOLI et al., 2020).

Dentre os lipídios, foram anotados eicosanoides, esfingolipídios e diferentes subclasses de glicerofosfolipídios: glicerofosfocolinas (*glycerophosphocholines* – GPCs), glicerofosfoetanolaminas (*glycerophosphoethanolamines* – GPEs), glicerofosfoserinas (*glycerophosphoserines* – GPSs), e ácidos glicerofosfatídicos (*glycerophosphatidic acids* – GPAs).

A estrutura geral dos glicerofosfolipídios consiste em uma molécula de glicerol com um grupo acil ou alquil graxo na posição sn-1, grupos acil-graxos na posição sn-2 e um grupo éster fosfato característico na posição sn-3. Entre as subclasses de glicerofosfolipídios, existe diversidade em relação aos substituintes conjugados ao grupo fosfato e às espécies de ácidos graxos ligadas em sn-1 e sn-2, que variam em relação ao comprimento da cadeia, ao grau de insaturação e à localização dos substituintes no esqueleto de glicerol (PULFER; MURPHY, 2003; TANG et al., 2011).

Glicerofosfocolinas (GPCs), comumente conhecidas como fosfatidilcolinas (PC), possuem um grupo fosfocolina na posição sn-3 e ácidos graxos substituintes nas posições sn-1

e/ou sn-2 do esqueleto de glicerol. O grupo fosfocolina consiste em um grupo fosfato ligado a uma molécula de colina. No contexto dos fosfolipídios, a fosfocolina atua como a cabeça polar hidrofílica, enquanto as caudas de ácidos graxos são hidrofóbicas, contribuindo para a natureza anfipática dos fosfolipídios como as fosfatidilcolinas. Quando há um substituinte hidroxila na posição sn-1 ou sn-2 em vez de um ácido graxo, as GPCs são chamadas de liso-GPCs (LPCs) (TANG et al., 2011). Neste estudo, foram anotadas uma fosfatidilcolina (PC) e seis lisofosfatidilcolinas (LPCs): PC 16:1/2:0, LPC 0:0/16:0, LPC 0:0/20:4, LPC 14:0/0:0, LPC 16:1/0:0, LPC 18:2/0:0 e LPC 20:5/0:0 (Tabela 4).

Todas as GPCs anotadas neste estudo apresentaram, em seus espectros de fragmentação, os sinais m/z 258, m/z 184, m/z 125, e m/z 104. A geração do sinal de m/z 184 corresponde ao íon fosfocolina ($C_5H_{14}NO_4P+H$)⁺, enquanto o íon de m/z 104 refere-se à colina ($C_5H_{13}NO+H$)⁺. O sinal de m/z 125 ($C_2H_5O_4P+H$)⁺ resulta da perda de trimetilamina – $N(CH_3)_3$, que possui massa de 59 u, a partir do grupo fosfocolina. O íon de m/z 258 corresponde ao esqueleto de glicerol ligado à fosfocolina na ausência dos ácidos graxos substituintes. Esses sinais são característicos e frequentemente reportados para glicerofosfocolinas (GPCs) (IVANOVA et al., 2007; PULFER; MURPHY, 2003; TANG et al., 2011).

Para todas as GPCs, foram também anotados os sinais referentes à perda de água ($M+H-H_2O$)⁺, bem como os íons resultantes da perda do grupo fosfocolina ($M+H-183$)⁺ (IVANOVA et al., 2007; PULFER; MURPHY, 2003; TANG et al., 2011). Para a PC 16:1/2:0, foi detectado ainda o íon de m/z 392,22 ($C_{18}H_{34}NO_6P+H$)⁺, referente à quebra da insaturação em sn-1 e à quebra da ligação éster em sn-2 (TANG et al., 2011; ZAMITH-MIRANDA et al., 2021). As árvores de fragmentação geradas pela plataforma SIRIUS (DÜHRKOP et al., 2019, 2021) auxiliaram na anotação da PC 16:1/2:0 na falta de espectros de fragmentação específicos no modo positivo publicados na literatura, onde foram encontrados apenas relatos de MS1 no modo positivo (ZAMITH-MIRANDA et al., 2021).

Enquanto as GPCs possuem um grupo fosfocolina na posição sn-3, glicerofosfoetanolaminas (GPEs) possuem um grupo fosfoetanolamina (PULFER; MURPHY, 2003). A Tabela 4 mostra as duas GPEs anotadas neste estudo: LPE 16:0/0:0 e LPE 20:4/0:0. Ambas apresentaram, dentre os seus fragmentos, íons referentes à perda de água e à perda do grupamento fosfoetanolamina ($M+H-141$)⁺, que são característicos da fragmentação de PE e LPEs no modo positivo (BLEIJERVELD et al., 2006; IVANOVA et al., 2007; PULFER; MURPHY, 2003). Uma vez que foram atribuídas as subclasses GPC e GPE com base na detecção de sinais característicos, o número de carbonos e o grau de insaturação presentes no

substituinte ácido graxo nas LPCs e LPEs puderam ser inferidos do peso molecular (TANG et al., 2011).

Ainda dentre os glicerofosfolipídios, foram anotadas duas glicerofosfoferinas (GPSs): PS 20:3/20:0 e PS 23:4; e três ácidos glicerofosfatídicos (GPAs): PA 32:2, PA 38:5, e PA 40:3. As GPSs possuem um grupo cabeça de fosfoferina ligado na posição sn-3, enquanto os GPAs são a classe de fosfolipídios que possui o grupamento polar mais simples, formado apenas por um grupo fosfato (FUCHS, 2014; PULFER; MURPHY, 2003).

Tanto para GPSs quanto para GPAs, é possível observar íons $(M+H)^+$ e $(M-H)^-$ na ionização por *electrospray* (IES); entretanto, a formação de íons negativos tende a predominar nestas classes de fosfolipídios. Conseqüentemente, informações sobre o espectro de fragmentação no modo positivo são mais escassas (PULFER; MURPHY, 2003).

Em geral, as espécies $(M+H)^+$ derivadas da IES de GPSs produzem íons abundantes que correspondem à perda do grupamento polar $(M+H-184)^+$ (PULFER; MURPHY, 2003). Estes íons foram identificados nos espectros de fragmentação das GPSs anotadas neste estudo, conforme destacado na Tabela 4. Apesar da escassez de espectros experimentais, a plataforma HMDB disponibiliza espectros preditos que auxiliam na anotação de metabólitos (WANG et al., 2021) e que permitiram a seleção da PS 20:3/20:0 dentre os demais candidatos sugeridos pelas plataformas MetaboAnalyst e SIRIUS (HMDB, 2024i). A mesma metodologia foi utilizada para anotação da PS 23:4, mas não foi possível restringir a busca para o tamanho específico de cada cadeia.

A indicação de GPAs como candidatos para anotação das *features* de m/z 787,54, m/z 645,45, e m/z 723,50 foi inicialmente realizada pela plataforma MetaboAnalyst. A *feature* de m/z 787,54 foi compatível com GPAs formados por cadeias que totalizam 40 carbonos e 3 insaturações (PA 40:3). Em uma busca na HMDB, considerando candidatos com massas monoisotópicas entre 786,52 e 786,56, os candidatos identificados foram PA 40:3 e esfingolipídios oxidados nos quais seria esperado o característico fragmento m/z 184 referente ao grupo fosfocolina. Os fragmentos m/z 770,55 e m/z 690,48, presentes do espectro de fragmentação de PA 40:3, ficaram próximos dos previstos na HMDB para duas diferentes PAs cujos substituintes são um ácido graxo de cadeia 18:1 e outro de cadeia 22:2, PA 18:1/22:2 e PA 22:2/18:1 (HMDB, 2024j, 2024k).

Para as *features* de m/z 645,45 e m/z 723,50, a correspondência foi realizada apenas com valor de MS1. Seguindo metodologia similar àquela descrita no parágrafo anterior, o íon de m/z 645,4478 foi congruente com diferentes PAs cujas cadeias totalizam 32 carbonos e 2 insaturações (PA 32:2), incluindo PA 18:2/14:0, PA 14:0/18:2, e PA 18:1/14:1 (DA COSTA et

al., 2018; HMDB, 2024l, 2024m); enquanto m/z 723,50 é compatível com PA 38:5, como PA 16:0/22:5, PA 22:5/16:0, PA 18:0/20:5, e PA 18:1/20:4 (HMDB, 2024n, 2024o, 2024p, 2024q). Os padrões de fragmentação para os esfingolipídios fitoesfingosina e esfinganina também foram condizentes com espectros depositados na HMDB.

Dentre os eicosanoides, foram anotados um ácido hidroxeicosapentaenoico (*hydroxyeicosapentaenoic acid* – HEPE), um ácido hidroxeicosatetraenoico (*hydroxyicosatetraenoic acid* – HETE) e um leucotrieno (LT). A anotação do HEPE foi inicialmente guiada pela identificação de sinais esperados para esta subclasse: m/z 301,21 ($M+H-H_2O$)⁺ e m/z 283,23 ($M+H-2H_2O$)⁺ (DASILVA et al., 2019; HMDB, 2024r, 2024s). Entre os isômeros de HEPE, as clivagens carbono-carbono (C-C) podem originar produtos comuns. As transições específicas que auxiliam na diferenciação dos isômeros originam-se da clivagem de uma ligação C-C adjacente ao grupo hidroxila (clivagem α -hidroxi). O m/z dos aldeídos e/ou cetonas resultantes dependem da posição do grupo hidroxila, permitindo assim a determinação dos regioisômeros. O sinal em m/z 117 sugere que possa ter sido detectado 5-HETE. Entretanto, o produto da clivagem também pode produzir um fragmento específico com a perda concomitante de 28 unidades de m/z (perda de CO). Desta forma, a m/z 129 poderia corresponder a este fragmento, mas proveniente do isômero 8-HEPE (DASILVA et al., 2019).

O ácido 20-hidroxeicosatetraenoico (20-HETE) foi detectado na forma de um produto da condensação de seu grupo carboxila com metanol, resultando em um éster metílico de 20-HETE (C₂₁H₃₄O₃) (CHEBI, 2024). Para o éster metílico de 20-HETE, foi detectado seu íon molecular protonado com a perda de água ($M+H-H_2O$)⁺. Dentro do referente espectro de fragmentação, foi detectado também o íon protonado de 20-HETE, sem a condensação com metanol (C₂₀H₃₂O₃), após a perda de duas moléculas de água – m/z 285,22 (C₂₀H₃₂O₃+H-2H₂O)⁺. Em conjunto com os demais sinais, estes íons compõem um padrão de fragmentação consistente com a literatura (DASILVA et al., 2019; HMDB, 2024q; MARTIN-VENEGAS; JÁUREGUI; MORENO, 2014).

Para leucotrieno B4 (LTB4), foi detectado o íon molecular sodiado ($M+Na$)⁺ associado a fragmentos decorrentes da perda de água – m/z 319,08 ($M+H-H_2O$)⁺ e m/z 301,22 ($M+H-2H_2O$)⁺, seguido pela consecutiva perda de CO₂ – m/z 279,20 ($M-CH_4O_4+Na$)⁺. Além disso, foi observado o fragmento resultante da perda direta de CO₂ – 292,13 ($M+H-CO_2$)⁺, entre outros íons listados na Tabela 4, que estão de acordo com a literatura (DASILVA et al., 2019).

Tabela 4. Tabela de metabólitos putativos, contendo informações sobre suas classes, fórmulas moleculares, tempos de retenção (tR), valores de m/z teórica e detectada, erro de m/z (em ppm), fragmentos obtidos na análise EM/EM, *softwares* de anotação utilizados com seus respectivos escores, referências bibliográficas e números de identificação internacional (HMDB, PubChem, CHEBI e/ou LipidMaps). As classes dos metabólitos e os valores de m/z teórica estão de acordo com os dados do repositório da plataforma RefMet.

Metabólito putativo	Classe do metabólito	Fórmula molecular	tR (min)	m/z teórica	m/z detectada	m/z erro (ppm)	Fragmentos EM/EM	Software de anotação (escore de corresp.)	Referência	Número de identificação internacional
Ácido cólico	Ácidos biliares	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	43,68	834,6090 (2M+NH ₄) ⁺	834,5959 (2M+NH ₄) ⁺	15	818,59 (2M+H) ⁺ 817,59 (2M) ⁺ 426,32 (M+NH ₄) ⁺ 409,22 (M+H) ⁺ 392,28 391,26 (M+H-H ₂ O) ⁺ 375,28 374,28 373,27 (M-2H ₂ O) ⁺ 357,27 356,27 355,26 (M-3H ₂ O) ⁺ 345,20 337,25	GNPS (cosine = 0,74)	HMDB, 2024a SUAREZ; BRÜCKNER e ROHN, 2018	221493 HMDB0000619
Ácido glicocólico	Ácidos biliares	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	41,46	466,3163 (M+H) ⁺	466,3131 (M+H) ⁺	7	466,31 (M+H) ⁺ 448,30 (M+H-H ₂ O) ⁺ 430,29 (M+H-2H ₂ O) ⁺ 412,28 (M+H-3H ₂ O) ⁺ 394,27 370,23 355,26 338,25 337,25 320,24 295,23 293,23 277,19 145,10 119,09	SIRIUS (score = -4,208)	HMDB, 2024b	10140 HMDB0000138

Ácido glicodeoxicólico	Ácidos biliares	$C_{26}H_{43}NO_5$	41,64	450,3214 (M+H) ⁺	450,3185 (M+H) ⁺	6	450,32 (M+H) ⁺ 432,30 (M+H-H ₂ O) ⁺ 414,30 (M+H-2H ₂ O) ⁺ 340,27 339,27 332,21 321,25 304,19 292,19 278,17 266,17	GNPS (cosine = 0,93)	BGC-MUNICH, 2017	3035026 HMDB0000631
Ácido taurocólico	Ácidos biliares	$C_{26}H_{45}NO_7S$	42,72	533,3255 (M+NH ₄) ⁺	533,3227 (M+NH ₄) ⁺	6	516,29 (M+H) ⁺ 498,28 (M+H-H ₂ O) ⁺ 480,27 (M+H-2H ₂ O) ⁺ 462,26 (M+H-3H ₂ O) ⁺ 352,17 337,25 319,24 208,06 126,02 (C ₂ H ₇ NO ₃ S+H) ⁺	GNPS (cosine = 0,79)	HMDB, 2024c, 2024d SILVA et al., 2022	6675 HMDB0000036
Bilirrubina	Bilirrubinas	$C_{33}H_{36}N_4O_6$	39,52	585,2708 (M+H) ⁺	585,2666 (M+H) ⁺	7	585,27 569,24 568,24 491,21 490,21 299,24 285,12 269,13 267,11	GNPS Dereplicator (score = 16)	HMDB, 2024e NOGAWA ; OKANO, 2018	5280352 HMDB0000054
Tirosina	Aminoácido	$C_9H_{11}NO_3$	5,34	182,0812 (M+H) ⁺	182,0917 (M+H) ⁺	56	165,48 147,05 (C ₉ H ₇ O ₂) ⁺ 137,07 136,07 (C ₈ H ₁₀ NO) ⁺ 123,04 119,05 118,06 107,05 95,05 91,05	GNPS (cosine = 0,93)	DA SILVA et al., 2021	6057 HMDB0000158

Fenilalanina	Aminoácido	C ₉ H ₁₁ NO ₂	7,34	166,0863 (M+H) ⁺	166,0907 (M+H) ⁺	28	131,05 121,08 120,08 107,05 104,06 103,05 95,05 93,05 91,05	GNPS (cosine = 0,97)	HMDB, 2024h; BGC-MUNICH, 2024	6140 HMDB0000159
Ácido fenilacético	Aminoácidos (derivado)	C ₈ H ₈ O ₂	5,34	136,0519 (M) ⁺	136,0758 (M) ⁺	135	119,04 (C ₈ H ₇ O ⁺) 110,04 91,05 (C ₇ H ₇ ⁺)	Busca manual em bases de dados	HMDB, 2024u	999 HMDB0000209
Fenilacetilglutamina	Aminoácidos (derivado)	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₄	12,74	265,1183 (M+H) ⁺	265,1189 (M+H) ⁺	3	246,51 136,07 130,05 95,52 92,05 91,05 58,14	GNPS (cosine = 0,77) SIRIUS (score = -57,165)	HMDB, 2024v	92258 HMDB0006344
Fenilalaniltreonina	Aminoácidos (dipeptídeo)	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₄	8,42	267,1339 (M+H) ⁺	267,1326 (M+H) ⁺	1	120,08 (C ₈ H ₉ N+H) ⁺ 103,05 (C ₈ H ₆ +H) ⁺	SIRIUS (score = -6,804)	HMDB, 2024w	HMDB0029005
N-(1-Desoxi-1-frutossil)leucina/ isoleucina	Aminoácidos (derivado)	C ₁₂ H ₂₃ NO ₇	5,90	294,1534 (M+H) ⁺	294,1553 (M+H) ⁺	4	294,15 (M+H) ⁺ 276,14 (M+H-H ₂ O) ⁺ 258,13 (M+H-2H ₂ O) ⁺	SIRIUS (score = -101,345)	HMDB, 2024x, 2024y	HMDB0037840 HMDB0039780
N2-(2-Carboximetil-2-hidroxissuccinol) arginina	Aminoácidos (derivado)	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₈	8,74	367,1471 (M+H+H ₂ O) ⁺	349,1359 (M+H) ⁺	4	349,13 (M+H) ⁺ 332,11 313,11 303,12 229,09	SIRIUS	HMDB, 2024z	HMDB0032766
5-HEPE/8-HEPE	Eicosanoides	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	45,28	301,2162 (M+H-H ₂ O) ⁺	301,2139 (M+H-H ₂ O) ⁺	8	301,21 (M+H-H ₂ O) ⁺ 284,23 283,23 (M+H-2H ₂ O) ⁺ 274,19 266,21 134,72 129,08 115,05 117,07 53,39	MetaboAnalyst (Matching score = 66,86)	HMDB, 2024s, 2024r	HMDB0005081

20-HETE (éster metílico)	Eicosanoides	C ₂₁ H ₃₄ O ₃	52,71	317,2487 (M+H-H ₂ O) ⁺	317,2494 (M+H-H ₂ O) ⁺	2	317,25 (M+H-H ₂ O) ⁺ 301,23 285,22 (C ₂₀ H ₃₂ O ₃ +H-2H ₂ O) ⁺ 289,21 275,23 267,21 258,19 149,13 138,87 131,08 117,07 105,07 95,05 93,06 91,05 57,69	SIRIUS (score = -114,527)	HMDB, 2024t DASILVA et al., 2019	HMDB0005998 CHEBI:145032
Leucotrieno B4	Eicosanoides	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	45,60	359,2193 (M+Na) ⁺	359,2187 (M+Na) ⁺	2	359,22 (M+Na) ⁺ 357,35 341,20 338,16 319,08 (M+H-H ₂ O) ⁺ 301,22 (M+H-2H ₂ O) ⁺ 292,13 (M+H-CO ₂) ⁺ 279,20 (M-2H ₂ O-CO ₂ +Na) ⁺ 275,00 (M+H-H ₂ O-CO ₂) ⁺ 179,73	SIRIUS (score = -76,471)	HMDB, 2024aa DASILVA et al., 2019	HMDB0001085
Fitoesfingosina	Esfingolípido	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	40,90	318,3003 (M+H) ⁺	318,2995 (M+H) ⁺	3	318,30 (M+H) ⁺ 300,29 (M+H-H ₂ O) ⁺ 256,26 102,09 60,10	SIRIUS (score = -81,957) MetaboAnalyst (<i>Matching score</i> = 74,96)	HMDB, 2024ab	HMDB0004610
Esfinganina	Esfingolípido	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	42,74	302,3054 (M+H) ⁺	302,3044 (M+H) ⁺	3	302,30 (M+H) ⁺ 284,29 (M+H-H ₂ O) ⁺ 258,28 102,09	MetaboAnalyst (<i>Matching score</i> = 31,27)	HMDB, 2024ac	HMDB0000269
PC 16:1/2:0	Glicerofosfolípido	C ₂₆ H ₅₀ NO ₈ P	43,21	536,3347 (M+H) ⁺	536,3303 (M+H) ⁺	8	536,33 (M+H) ⁺ 518,32 (M+H-H ₂ O) ⁺ 500,32	SIRIUS (score = -113,311)	TANG et al., 2011	24778770 LM ID LMGP01010693

							392,22 (C ₁₈ H ₃₄ NO ₆ P+H) ⁺ 353,28 (M+H-183) ⁺ 258,13 (C ₈ H ₂₀ NO ₆ P+H) ⁺ 184,08 (C ₅ H ₁₄ NO ₄ P+H) ⁺ 125,00 (C ₂ H ₅ O ₄ P+H) ⁺ 104,11 (C ₅ H ₁₃ NO+H) ⁺		ZAMITH-MIRANDA et al., 2021	
LPC 0:0/16:0	Glicerofosfolípido	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	50,23	496,3397 (M+H) ⁺	496,3359 (M+H) ⁺	8	496,34 (M+H) ⁺ 478,33 (M+H-H ₂ O) ⁺ 419,25 313,27 (M+H-183) ⁺ 258,11 (C ₈ H ₂₀ NO ₆ P+H) ⁺ 184,08 (C ₅ H ₁₄ NO ₄ P+H) ⁺ 163,02 125,00 (C ₂ H ₅ O ₄ P+H) ⁺ 104,10 (C ₅ H ₁₃ NO+H) ⁺	GNPS (cosine = 0,86) SIRIUS (score = -3,529)	HMDB, 2024ad TANG et al., 2011	HMDB0240262
LPC 0:0/20:4	Glicerofosfolípido	C ₂₈ H ₅₀ NO ₇ P	48,23	544,3398 (M+H) ⁺	544,3369 (M+H) ⁺	5	544,34 (M+H) ⁺ 526,32 (M+H-H ₂ O) ⁺ 483,24 361,27 (M+H-183) ⁺ 258,12 (C ₈ H ₂₀ NO ₆ P+H) ⁺ 184,08 (C ₅ H ₁₄ NO ₄ P+H) ⁺ 163,02 125,00 (C ₂ H ₅ O ₄ P+H) ⁺ 104,11 (C ₅ H ₁₃ NO+H) ⁺	GNPS (cosine = 0,76) SIRIUS (score = -108,310)	HMDB, 2024ae	HMDB0061699
LPC 14:0/0:0	Glicerofosfolípido	C ₂₂ H ₄₆ NO ₇ P	46,29	468,3085 (M+H) ⁺	468,3048 (M+H) ⁺	8	468,31 (M+H) ⁺ 450,29 (M+H-H ₂ O) ⁺ 391,22 285,24 (M+H-183) ⁺ 258,11 (C ₈ H ₂₀ NO ₆ P+H) ⁺ 184,08 (C ₅ H ₁₄ NO ₄ P+H) ⁺ 125,00 (C ₂ H ₅ O ₄ P+H) ⁺ 104,11 (C ₅ H ₁₃ NO+H) ⁺ 98,98	SIRIUS (score = -6,037) GNPS (cosine = 0,82)	HMDB, 2024af	HMDB0010379
LPC 16:1/0:0	Glicerofosfolípido	C ₂₄ H ₄₈ NO ₇ P	47,24	494,3241 (M+H) ⁺	494,3204 (M+H) ⁺	8	494,32 (M+H) ⁺ 476,31 (M+H-H ₂ O) ⁺ 311,26 (M+H-183) ⁺ 258,16 (C ₈ H ₂₀ NO ₆ P+H) ⁺ 184,08 (C ₅ H ₁₄ NO ₄ P+H) ⁺ 125,00 (C ₂ H ₅ O ₄ P+H) ⁺	SIRIUS (score = -7,997) MetaboAnalyst Matching score = 69,27)	HMDB, 2024ag TANG et al., 2011	HMDB0010383

							104,11 (C ₅ H ₁₃ NO+H) ⁺	GNPS (cosine = 0,73)		
LPC 18:2/0:0	Glicerofosfolipídio	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	48,37	520,3398 (M+H) ⁺	520,3360 (M+H) ⁺	8	520,34 (M+H) ⁺ 502,33 (M+H-H ₂ O) ⁺ 443,25 337,27 (M+H-183) ⁺ 258,11 (C ₈ H ₂₀ NO ₆ P+H) ⁺ 184,09 (C ₅ H ₁₄ NO ₄ P+H) ⁺ 125,00 (C ₂ H ₅ O ₄ P+H) ⁺ 104,11 (C ₅ H ₁₃ NO+H) ⁺	GNPS (cosine = 0,80) SIRIUS (score = -50,040)	HMDB, 2024ah	HMDB0010386
LPC 20:5/0:0	Glicerofosfolipídio	C ₂₈ H ₄₈ NO ₇ P	46,56	542,3241 (M+H) ⁺	542,3202 (M+H) ⁺	7	542,32 (M+H) ⁺ 524,31 (M+H-H ₂ O) ⁺ 481,23 258,11 (C ₈ H ₂₀ NO ₆ P+H) ⁺ 184,09 (C ₅ H ₁₄ NO ₄ P+H) ⁺ 125,00 (C ₂ H ₅ O ₄ P+H) ⁺ 104,11 (C ₅ H ₁₃ NO+H) ⁺ 86,10 (C ₅ H ₁₁ N+H) ⁺	SIRIUS (score = -61,655)	HMDB, 2024ai	HMDB0010397
LPE 16:0/0:0	Glicerofosfolipídio	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	48,56	454,2928 (M+H) ⁺	454,2888 (M+H) ⁺	9	454,29 (M+H) ⁺ 436,28 (M+H-H ₂ O) ⁺ 393,24 (C ₁₉ H ₃₇ O ₆ P+H) ⁺ 313,27 (M+H-141) ⁺ 314,28 282,28 240,62	GNPS (cosine = 0,88) SIRIUS (score - 2,026)	HMDB, 2024aj	HMDB0011503
LPE 20:4/0:0	Glicerofosfolipídio	C ₂₅ H ₄₄ NO ₇ P	47,44	502,2928 (M+H) ⁺	502,2896 (M+H) ⁺	6	502,29 (M+H) ⁺ 485,34 484,24 (M+H-H ₂ O) ⁺ 361,27 (M+H-141) ⁺ 330,28 287,24 269,23 98,98	GNPS (cosine = 0,81) SIRIUS	HMDB, 2024ak	HMDB0011517
PS 20:3/20:0	Glicerofosfolipídio	C ₄₆ H ₈₄ NO ₁₀ P	53,32	842,5906 (M+H) ⁺	842,5895 (M+H) ⁺	2	842,59 (M+H) ⁺ 835,07 661,46 658,97 (M+H-184) ⁺ 657,44 554,24	SIRIUS (score = -354,459) MetaboAnalyst (Matching score = 56,17)	HMDB, 2024i	HMDB0112625

							391,26 307,20 293,19 147,09 101,06			
PS 23:4	Glicerofosfolipídio	C ₂₉ H ₄₈ NO ₁₀ P	8,55	602,3089 (M+H) ⁺	602,3107 (M+H) ⁺	3	602,31 (M+H) ⁺ 584,29 (M+H-H ₂ O) ⁺ 485,22 418,18 (M+H-184) ⁺ 314,17	SIRIUS (score = -240,027) MetaboAnalyst (<i>Matching score</i> = 53,97)	PULFER; MURPHY, 2003	-
PA 32:2	Glicerofosfolipídio	C ₃₅ H ₆₅ O ₈ P	53,37	645,4490 (M+H) ⁺	645,4478 (M+H) ⁺	2	645,45 630,6 263,68 133,09	MetaboAnalyst (<i>Matching score</i> = 57,49)	HMDB, 2024l, 2024m DA COSTA et al., 2018	HMDB0114779 HMDB0114897 HMDB0114946
PA 38:5	Glicerofosfolipídio	C ₄₁ H ₇₁ O ₈ P	53,33	723,4959 (M+H) ⁺	723,4971 (M+H) ⁺	2	723,50 717,00 718,50 369,35 301,71 147,10 133,09 129,09	MetaboAnalyst (<i>Matching score</i> = 55,89)	HMDB, 2024al, 2024am	HMDB0114909 HMDB0115352 HMDB0114847 HMDB0114886
PA 40:3	Glicerofosfolipídio	C ₄₃ H ₇₉ O ₁₀ P	53,39	787,5484 (M+H) ⁺	787,5416 (M+H) ⁺	9	787,55 770,55 690,48 476,80 133,08	MetaboAnalyst (<i>Matching score</i> = 47,03)	HMDB, 2024j, 2024k	HMDB0265813 HMDB0265812

4.3.3.2. Visualização dos dados e análises estatísticas

A fim de explorar as variações metabólicas entre os grupos, as 878 *features* selecionadas após curadoria dos dados foram submetidas a análises de componentes principais (PCA) e análises discriminantes por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) utilizando o *software* PLS_Toolbox. Diferentes métodos de processamento, incluindo transformação, normalização, escalonamento e centralização, foram testados para ajustar a importância dos *features*.

Inicialmente, foram testados dois métodos frequentemente utilizados para ajuste de conjuntos de dados: centralização na média (*mean centering*) e autoescalonamento (*autoscaling*). Ambos ajustam os dados para que a média de cada variável seja zero, destacando as variações em torno da média. O autoescalonamento ajusta ainda a escala de forma que todas as variáveis tenham desvio padrão de 1, dando pesos iguais a todos sinais da amostra (PILON et al., 2020; VAN DEN BERG et al., 2006).

Tanto a centralização na média quanto o autoescalonamento permitiram visualizar a distribuição das amostras em grupos distintos, tanto na PCA quanto na PLS-DA (Figuras 13A e 14A, respectivamente). No entanto, métricas do desempenho destas análises¹, como RMSEC, RMSECV, R^2 Cal, e R^2 CV (Tabela 5), indicaram que o ajuste poderia ser aprimorado.

Após centralização na média, foram observados valores muito elevados de RMSEC e RMSECV para a PCA (5745,04 e 9392,51, respectivamente), indicando baixa performance do agrupamento. Com o autoescalonamento, os valores de RMSEC e RMSECV para a PCA tornaram-se notavelmente mais apropriados (0,8119 e 6,81, respectivamente). Contudo, os valores de R^2 para as PLS-DAs obtidos nas PLS-DAs, independentemente do método aplicado, indicaram que a qualidade da classificação poderia ser otimizada (Tabela 5).

¹ Na construção de um modelo de classificação PLS-DA, o modelo é aplicado aos mesmos dados que foram usados para derivá-lo durante o processo de calibração, gerando o R^2 de calibração (R^2 Cal) ou, alternativamente, o erro quadrático médio da calibração (*Root Mean Square Error of Calibration* – RMSEC). Estas métricas indicam quanto da variação dos dados pode ser explicado pelo modelo. Subsequentemente, é realizada a validação cruzada (*cross validation* - CV), onde a maior parte do conjunto de dados de calibração é usada para desenvolver o modelo e, em seguida, o modelo é testado na parte deixada de fora. Esse procedimento é repetido até que todas as amostras tenham sido excluídas uma vez. Os erros de previsão para cada parte dos dados que foi deixada de fora durante o treinamento do modelo são então reunidos para produzir o R^2 de validação cruzada (R^2 CV), também chamado de Q^2 , ou o equivalente de validação cruzada do RMSEC, que é o RMSECV. Desta forma, R^2 CV e RMSECV são métricas que avaliam como o modelo se comporta quando aplicado a novos dados. Para os valores de R^2 , quanto mais próximos de 1,0, melhor é o ajuste do modelo. Não há valores fixos que definem um bom RMSEC ou RMSECV, pois esses dependem da escala dos dados. Contudo, a comparação entre esses valores é importante. O RMSEC deve ser baixo, indicando que o modelo se ajusta bem aos dados de calibração. O RMSECV também deve ser baixo, mas idealmente não muito maior que o RMSEC. Se o RMSECV for muito maior que o RMSEC, isso pode indicar que o modelo está sobreajustado aos dados de calibração e não generaliza bem. RMSEC e RMSECV também podem ser calculados durante a calibração e validação de um modelo de PCA para avaliar seu desempenho (EIGENVECTOR RESEARCH, 2022).

Em busca do aperfeiçoamento das análises, foram adicionados ao processamento métodos de transformação e normalização. Entre os métodos testados, a incorporação de diferentes combinações usando transformação logarítmica (\log_{10}) e normalização por Variável Normal Padrão (SNV) produziu as melhores métricas. Os gráficos de PCA e PLS-DA resultantes das melhores combinações estão ilustrados nas Figuras 13B, 13C, 14B e 14C, com suas respectivas métricas detalhadas na Tabela 5. Dentre as combinações apresentadas, a aplicação de \log_{10} seguida de normalização por SNV antes dos métodos da centralização na média (Figura 13C) ou autoescalonamento (Figura 14C) produziu as métricas mais favoráveis, com menores valores de RMSEC e RMSECV, e maiores valores de R^2 Cal e R^2 CV.

A normalização por SNV é eficaz quando grande parte dos sinais são iguais em todas as amostras (EIGENVECTOR RESEARCH, 2021), como é o caso para amostras de soro, que são constituídas majoritariamente dos mesmos metabólitos (PSYCHOGIOS et al., 2011). Esse método ajusta cada valor subtraindo a média da amostra e dividindo pelo desvio padrão, amenizando assim efeitos de variação de escala causados por fatores como alterações na fonte, no detector e outras sensibilidades instrumentais (EIGENVECTOR RESEARCH, 2021).

A transformação em \log_{10} reduz a variância e o impacto de grandes flutuações da intensidade dos sinais, corrigindo variações relacionadas à linha de base e tornando os dados mais normalmente distribuídos (PILON et al., 2020). Considerando que a normalização deve ser realizada antes de qualquer centralização ou escalonamento e após ajuste da linha de base (EIGENVECTOR RESEARCH, 2021), a SNV foi aplicada após a transformação em \log_{10} e antes da centralização na média ou autoescalonamento.

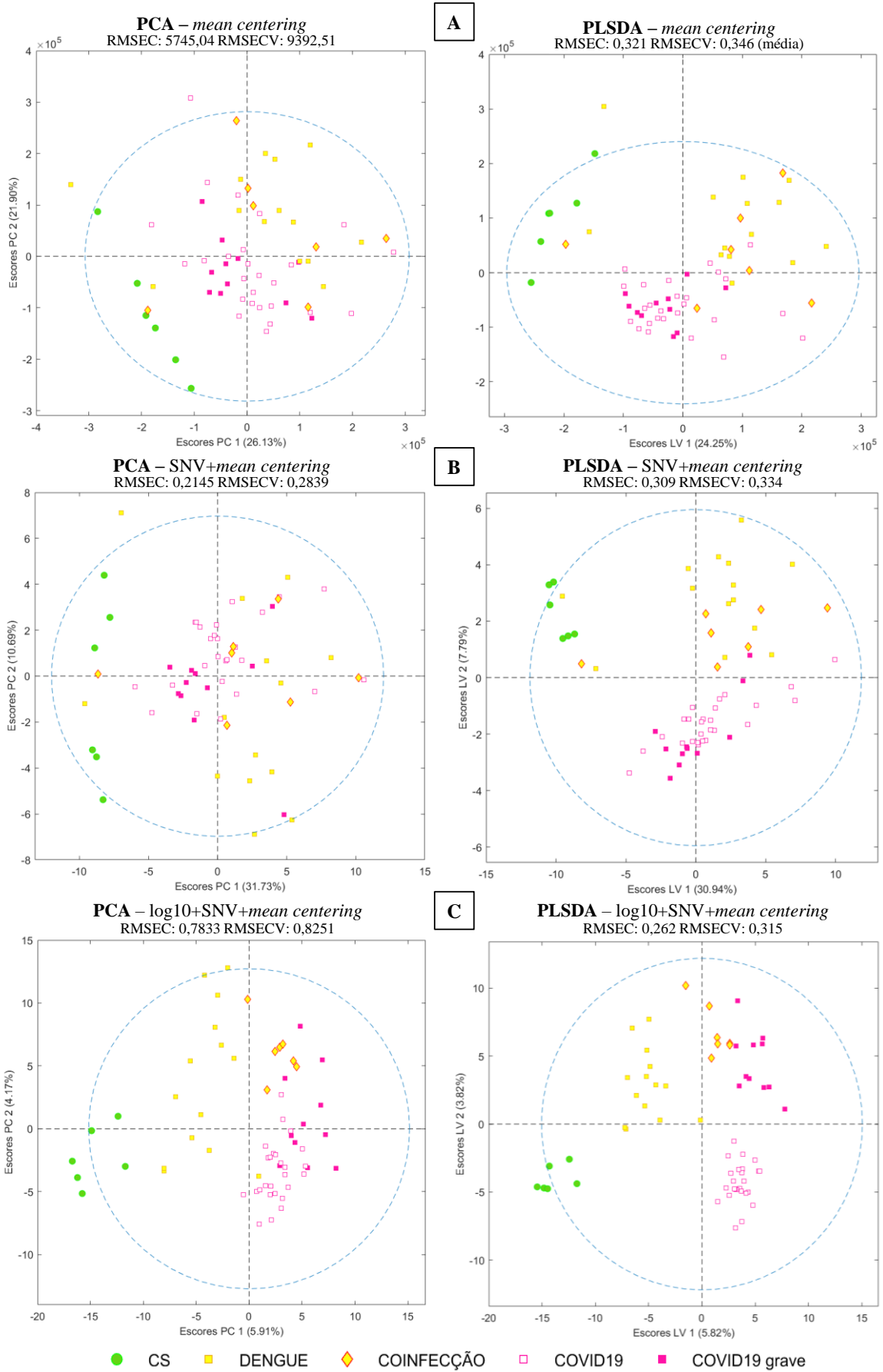


Figura 13. Gráficos de PCA e PLS-DA resultantes da aplicação de diferentes métodos de processamento: (A) centralização na média (*mean centering*); (B) normalização por variável normal padrão (SNV) seguida de centralização na média; e (C) combinação de transformação log10, normalização por SNV e centralização na média. As análises foram realizadas com as 64 amostras de soro selecionadas para realizar as análises metabolômicas: 6 controles saudáveis (CS), 13 de DENGUE, 7 de COINFECÇÃO, 27 de COVID-19, e 11 de COVID-19 grave. Esta análise considerou os 878 *features* selecionadas após curadoria dos dados. Os valores de RMSEC e RMSECV apresentados em cada gráfico indicam a qualidade dos ajustes de cada modelo.

A aplicação combinada de log10, SNV e centralização na média (*mean centering*), nesta ordem, apresentou os menores valores de RMSEC e RMSECV, e os maiores valores de R^2 . Entretanto, as múltiplas ocorrências de sensibilidade e especificidade iguais a 1,0 sugerem subajuste dos dados. Em contrapartida, a combinação de log10, SNV e autoescalonamento (*autoscaling*) resultou em métricas mais equilibradas, indicando um ajuste mais adequado (Tabela 5).

Mais além, a inclusão da terceira variável latente (LV3) na PLS-DA com log10+SNV+*autoscaling* produziu menores valores de RMSEC e RMSECV e maiores valores de R^2 Cal e R^2 CV (Tabela 6). Desta forma, as análises quimiométricas subsequentes foram realizadas aplicando log10, SNV e autoescalonamento (*autoscaling*) como métodos de processamento, e abrangendo três dimensões (PCs ou LVs).

A PCA considerando dados processados por log10+SNV+*autoscaling* e 3 componentes principais (PCs) está representada na Figura 15A. Nesta PCA, pode ser observada uma marcada separação entre o grupo CS e os grupos de pacientes infectados (DENGUE, COINFECÇÃO, COVID-19 e COVID-19 grave), especialmente ao longo do primeiro componente principal (PC1), que explicou 11,3% da variação no conjunto de dados. É possível perceber também um discreto agrupamento entre as amostras dos diferentes grupos de pacientes infectados, com o grupo COINFECÇÃO disperso entre os grupos DENGUE e COVID-19, enquanto o grupo COVID-19 grave se afasta destes especialmente ao longo da PC1. No total, as três PCs explicaram 23,15% da variação.

Pode-se notar também que, embora tenham sido selecionadas as análises aplicando log10+SNV+*autoscaling* para melhor representação dos dados, a aplicação dos outros métodos de processamento demonstrou um padrão similar, onde a COINFECÇÃO se distribui em meio aos grupos DENGUE e COVID-19, enquanto COVID-19 grave fica mais afastado dos demais grupos de pacientes infectados (Figuras 13 e 14).

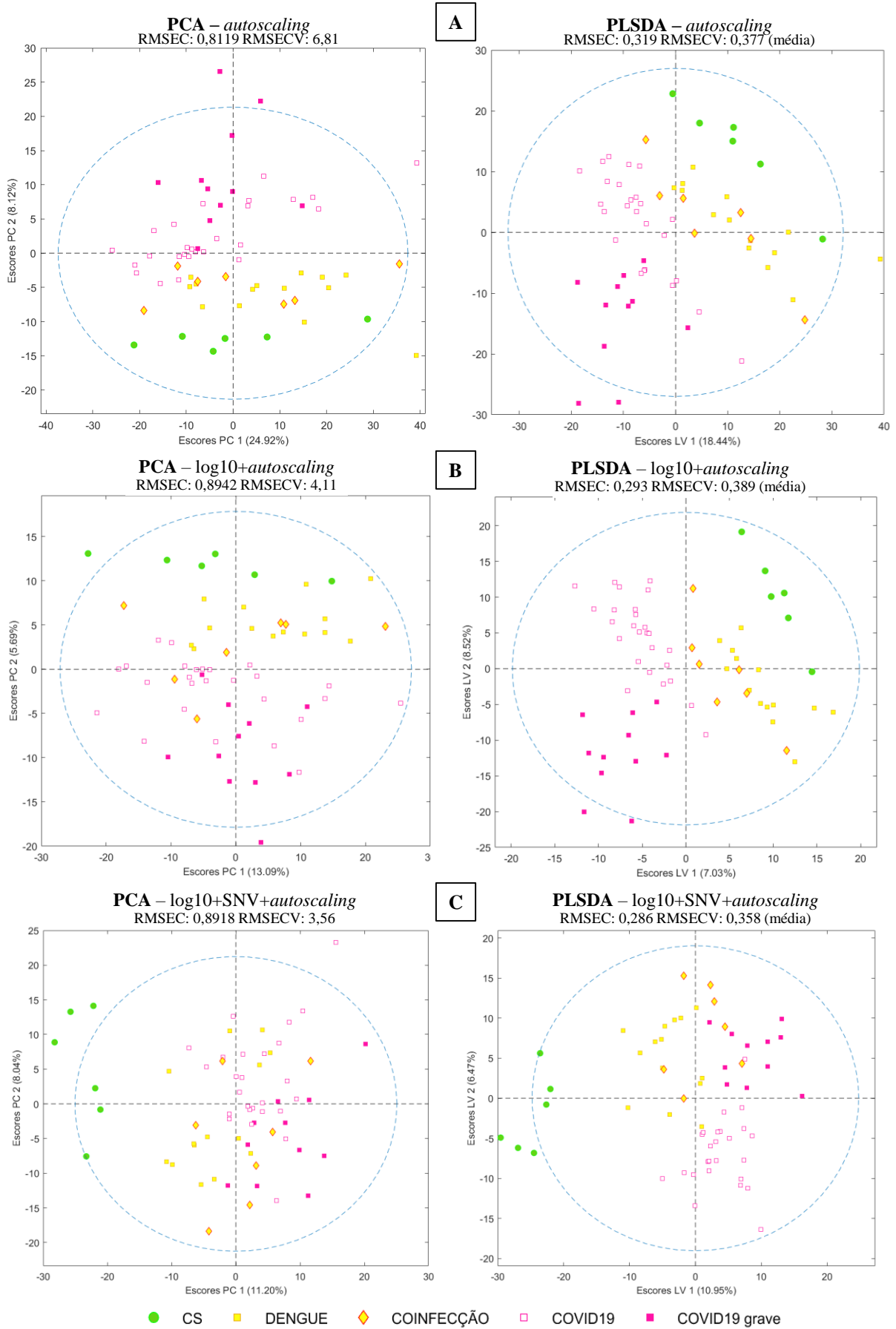


Figura 14. Gráficos de PCA e PLS-DA resultantes da aplicação de diferentes métodos de processamento: (A) autoescalonamento (*autoscaling*), (B) transformação log10 seguida de

autoescalonamento, e (C) combinação de transformação log10, normalização por variável normal padrão (SNV) e autoescalonamento. As análises foram realizadas com as 64 amostras de soro selecionadas para realizar as análises metabolômicas: 6 controles saudáveis (CS), 13 de DENGUE, 7 de COINFEÇÃO, 27 de COVID-19, e 11 de COVID-19 grave. Esta análise considerou os 878 *features* selecionadas após curadoria dos dados. Os valores de RMSEC e RMSECV apresentados em cada gráfico indicam a qualidade dos ajustes de cada modelo.

Tabela 5. Tabela comparativa das métricas de desempenho obtidas para PCA e PLS-DA utilizando diferentes métodos de processamento: *mean centering*, SNV + *mean centering*, log10 + SNV + *mean centering*, *autoscaling*, log10 + *autoscaling*, e log10 + SNV + *autoscaling*. As métricas avaliadas abrangem sensibilidade (Cal e CV), especificidade (Cal e CV), erro de Classificação (Cal e CV), RMSEC, RMSECV, R² Cal, e R² CV, para os grupos Controles Saudáveis (CS), DENGUE (DENG), COINFEÇÃO (COINF), COVID-19, e COVID-19 grave. Também são apresentados os valores médios de RMSEC, RMSECV, R² Cal e R² CV.

	Análise	Métrica	CS	DENG	COINF	COVID-19	COVID-19 grave	Média
<i>mean centering</i>	PCA	RMSEC	5745,04					
		RMSECV	9392,51					
	PLS-DA	Sens. (Cal)	1,000	0,857	0,714	0,885	0,818	
		Esp. (Cal)	0,966	0,860	0,702	0,605	0,528	
		Sens. (CV)	0,833	0,714	0,714	0,808	0,909	
		Esp. (CV)	0,966	0,800	0,719	0,553	0,528	
		Class. Err (Cal)	0,017	0,141	0,292	0,255	0,327	
		Class. Err (CV)	0,101	0,243	0,283	0,320	0,281	
		RMSEC	0,214	0,312	0,302	0,421	0,357	0,321
		RMSECV	0,251	0,357	0,314	0,445	0,365	0,346
	R ² Cal	0,460	0,429	0,066	0,266	0,106	0,265	
	R ² CV	0,280	0,260	0,009	0,181	0,067	0,159	
SNV + <i>mean centering</i>	PCA	RMSEC	0,2145					
		RMSECV	0,2839					
	PLS-DA	Sens. (Cal)	1,000	0,857	0,857	1,000	0,818	
		Esp. (Cal)	0,966	0,800	0,702	0,763	0,547	
		Sens. (CV)	1,000	0,714	0,714	0,885	0,818	
		Esp. (CV)	0,966	0,800	0,649	0,763	0,585	
		Class. Err (Cal)	0,017	0,171	0,221	0,118	0,317	
		Class. Err (CV)	0,017	0,243	0,318	0,176	0,298	
		RMSEC	0,196	0,310	0,301	0,392	0,345	0,309
		RMSECV	0,220	0,367	0,311	0,414	0,356	0,334
	R ² Cal	0,550	0,438	0,072	0,362	0,164	0,317	
	R ² CV	0,430	0,225	0,017	0,289	0,109	0,214	
log10 + SNV + <i>mean centering</i>	PCA	RMSEC	0,7833					
		RMSECV	0,8251					
	PLS-DA	Sens. (Cal)	1,000	0,929	1,000	1,000	1,000	
		Esp. (Cal)	1,000	0,760	0,842	0,974	0,868	
		Sens. (CV)	0,667	0,786	0,286	0,731	0,455	
		Esp. (CV)	1,000	0,820	0,912	0,947	0,962	

		Class. Err (Cal)	0,000	0,156	0,079	0,013	0,066		
		Class. Err (CV)	0,167	0,197	0,401	0,161	0,292		
		RMSEC	0,174	0,343	0,270	0,215	0,309	0,262	
		RMSECV	0,204	0,389	0,286	0,351	0,343	0,315	
		R ² Cal	0,644	0,311	0,254	0,808	0,327	0,469	
		R ² CV	0,543	0,118	0,180	0,528	0,172	0,308	
<i>autoscaling</i>	PCA	RMSEC	0,8119						
		RMSECV	6,81						
	PLS-DA	Sens. (Cal)	1,000	0,786	1,000	0,846	1,000		
		Esp. (Cal)	0,983	0,820	0,614	0,500	0,868		
		Sens. (CV)	0,833	0,714	0,286	0,846	0,909		
		Esp. (CV)	0,948	0,800	0,561	0,474	0,849		
		Class. Err (Cal)	0,009	0,197	0,193	0,327	0,066		
		Class. Err (CV)	0,109	0,243	0,576	0,340	0,121		
		RMSEC	0,249	0,346	0,306	0,432	0,263	0,319	
		RMSECV	0,296	0,379	0,339	0,470	0,400	0,377	
		R ² Cal	0,267	0,299	0,041	0,227	0,515	0,270	
		R ² CV	0,088	0,205	0,025	0,125	0,159	0,120	
		<i>log10 + autoscaling</i>	PCA	RMSEC	0,8942				
RMSECV	4,11								
PLS-DA	Sens. (Cal)		1,000	0,929	0,857	0,846	0,909		
	Esp. (Cal)		1,000	0,800	0,614	0,842	0,962		
	Sens. (CV)		0,667	0,429	0,571	0,846	0,818		
	Esp. (CV)		0,948	0,840	0,702	0,447	0,925		
	Class. Err (Cal)		0,000	0,136	0,264	0,156	0,064		
	Class. Err (CV)		0,193	0,366	0,363	0,353	0,129		
	RMSEC		0,239	0,325	0,306	0,357	0,238	0,293	
	RMSECV		0,274	0,472	0,321	0,566	0,312	0,389	
	R ² Cal		0,327	0,384	0,041	0,473	0,602	0,365	
	R ² CV		0,153	0,057	0,005	0,079	0,321	0,123	
	<i>log10 + SNV + autoscaling</i>		PCA	RMSEC	0,8918				
RMSECV		3,56							
PLS-DA		Sens. (Cal)	1,000	0,857	0,714	0,962	0,909		
		Esp. (Cal)	1,000	0,640	0,667	0,947	0,830		
		Sens. (CV)	0,833	0,786	0,714	0,692	1,000		
		Esp. (CV)	0,983	0,580	0,544	0,921	0,717		
		Class. Err (Cal)	0,000	0,251	0,310	0,046	0,130		
		Class. Err (CV)	0,092	0,317	0,371	0,193	0,142		
		RMSEC	0,164	0,376	0,287	0,282	0,320	0,286	
		RMSECV	0,261	0,426	0,310	0,440	0,352	0,358	
		R ² Cal	0,683	0,174	0,155	0,671	0,279	0,392	
		R ² CV	0,333	0,033	0,056	0,322	0,192	0,187	

Sens. = sensibilidade; Esp. = especificidade; Cal = calibração; CV = validação cruzada; Class. Err = erro de classificação; RMSEC = erro médio quadrático de calibração; RMSECV = erro médio quadrático de validação cruzada; R² Cal = coeficiente de determinação para calibração; R² CV = coeficiente de determinação para validação cruzada.

Tabela 6. Métricas de desempenho da PLS-DA após aplicação combinada de log10, normalização por SNV e autoescalamento aos 878 *features*, considerando três dimensões latentes (LV1, LV2 e LV3). As métricas avaliadas abrangem sensibilidade (Cal e CV), especificidade (Cal e CV), erro de classificação (Cal e CV), RMSEC, RMSECV, R² Cal, e R² CV, para os grupos Controles Saudáveis (CS), DENGUE, COINFEÇÃO (COINF), COVID-19, e COVID-19 grave. Também são fornecidos os valores médios para cada métrica.

Métrica	CS	DENGUE	COINF	COVID-19	COVID-19 grave	Média
Sens. (Cal)	1,000	0,929	1,000	0,962	1,000	0,978
Esp. (Cal)	1,000	0,780	0,860	0,895	1,000	0,907
Sens. (CV)	0,833	0,714	0,571	0,692	0,727	0,707
Esp. (CV)	0,983	0,720	0,860	0,921	0,887	0,874
Class. Err (Cal)	0,000	0,146	0,070	0,072	0,000	0,058
Class. Err (CV)	0,092	0,283	0,284	0,193	0,193	0,209
RMSEC	0,141	0,350	0,240	0,270	0,136	0,227
RMSECV	0,249	0,432	0,313	0,432	0,316	0,348
R ² Cal	0,765	0,281	0,410	0,698	0,869	0,605
R ² CV	0,375	0,051	0,099	0,347	0,399	0,254

Sens. = sensibilidade; Esp. = especificidade; Cal = calibração; CV = validação cruzada; Class. Err = erro de classificação; RMSEC = erro médio quadrático de calibração; RMSECV = erro médio quadrático de validação cruzada; R² Cal = coeficiente de determinação para calibração; R² CV = coeficiente de determinação para validação cruzada.

A PLS-DA realizada com dados processados por log10, SNV e autoescalamento e considerando três variáveis latentes (LVs) (Figura 15B) ressaltou as diferenças entre os grupos de pacientes infectados. O modelo apresentou elevada sensibilidade de calibração (Cal) para todos os grupos, com valores variando de 0,929 (DENGUE) a 1,000 (COVID-19 grave e CS). Contudo, a sensibilidade observada durante a validação cruzada (CV) foi inferior, particularmente para o grupo COINFEÇÃO (0,571), resultando em uma média geral de 0,707. No que se refere à especificidade, os valores obtidos na calibração foram considerados satisfatórios, com uma média de 0,907. No entanto, na validação cruzada, houve uma redução desses valores, destacando-se o grupo DENGUE, que apresentou a especificidade mais baixa (0,720) (Tabela 6).

Dentre os grupos infectados, o grupo COVID-19 grave apresentou a separação mais acentuada (Figura 15B), sugerindo variações metabólicas específicas associadas à gravidade da infecção. Isso é corroborado pelos valores de RMSEC (0,136) e R² Cal (0,869) para o grupo COVID-19 grave, que foram, respectivamente, o menor e o maior dentre os grupos, indicando um melhor ajuste do modelo para esse grupo (Tabela 6).

As amostras do grupo COVID-19 se concentraram mais ao centro do gráfico (Figura 15B), mais próximo aos grupos COINFEÇÃO e DENGUE, com RMSEC de 0,270 e R² Cal

de 0,698, sugerindo que o modelo conseguiu capturar com razoável qualidade as variações metabólicas associadas à infecção por COVID-19, embora com menor precisão em comparação ao grupo COVID-19 grave.

O grupo DENGUE se apresentou mais disperso (Figura 15B), sobrepondo-se parcialmente ao grupo COINFECÇÃO, sugerindo mistura de características metabólicas de ambas as infecções. Desta forma, os grupos DENGUE e COINFECÇÃO apresentaram os maiores desafios para o modelo, com R^2 Cal mais baixos (0,281 e 0,410, respectivamente) e erros de classificação mais elevados, especialmente na validação cruzada (0,283 e 0,284, respectivamente) (Tabela 6).

A título de comparação, foi analisado um subconjunto das amostras obtidas pela rotina hospitalar: 12 controles saudáveis (CS), 8 de DENGUE, 2 de COINFECÇÃO, 10 de COVID-19, e 10 de COVID-19 grave. Ao aplicar às 2853 *features* extraídas a partir das amostras de rotina as mesmas combinações de log10, SNV e autoescalamento utilizadas para as amostras UnB, também foi possível observar separação entre os grupos, apesar da ausência de parte dos sinais, conforme mostrado na Figura 16.

Todas as PLS-DAs das amostras da rotina hospitalar (Figura 16) indicaram uma sobreposição entre as amostras de COINFECÇÃO e o grupo DENGUE, assim como observado na PLS-DA das amostras da UnB (Figura 15B). No entanto, apesar desta semelhança, a comparação entre essas PLS-DAs também revela possíveis impactos das perdas no perfil metabólico da rotina na discriminação entre os grupos. A separação entre COVID-19 e COVID-19 grave foi menos acentuada nas amostras da rotina, sugerindo que a ausência de determinados sinais, especialmente aqueles relacionados a glicerofosfolipídios, pode comprometer a distinção precisa entre esses grupos.

Além disso, apesar da discriminação do grupo CS nas PLS-DAs e nas PCAs da Figura 16, é possível observar que o perfil de metabólitos detectados na rotina hospitalar impactou negativamente na separação do grupo CS dos grupos infectados. A acentuada separação do grupo CS da rotina na PLS-DA pode ter sido influenciado pelos métodos de coleta, já que as amostras CS foram todas coletadas e armazenadas de maneira similar durante a triagem de possíveis infecções assintomáticas por SARS-CoV-2 entre profissionais do HUB.

Sendo assim, a análise comparativa entre as amostras da UnB e da rotina hospitalar destaca a relevância da padronização nos métodos de coleta e armazenamento das amostras biológicas para preservar o perfil metabólico de maneira consistente. A coleta e armazenamento uniformes permitem que todas as amostras passem por processos homogêneos antes da

aquisição dos dados, minimizando variações técnicas que possam interferir nos resultados das análises estatísticas e metabolômicas.

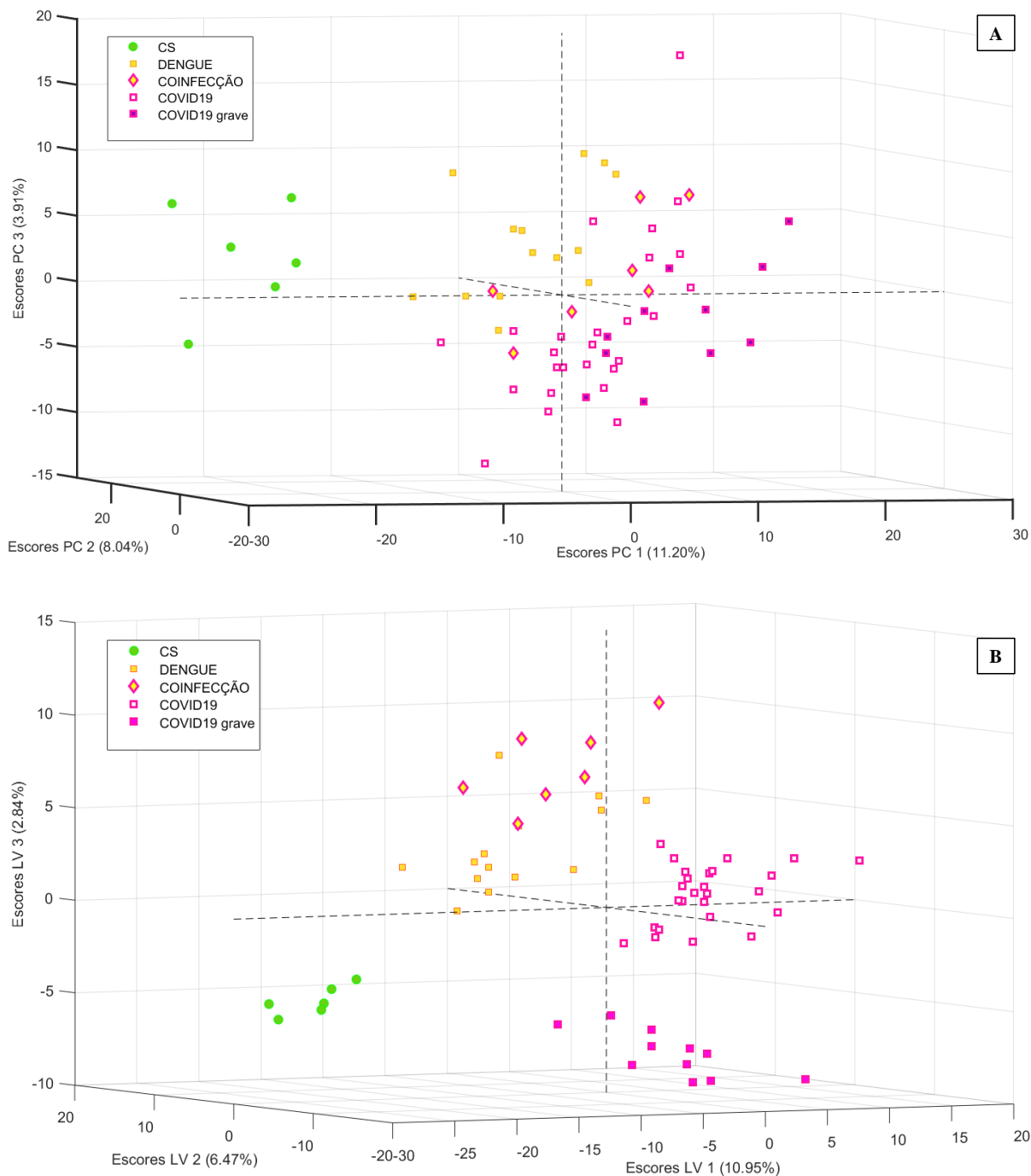
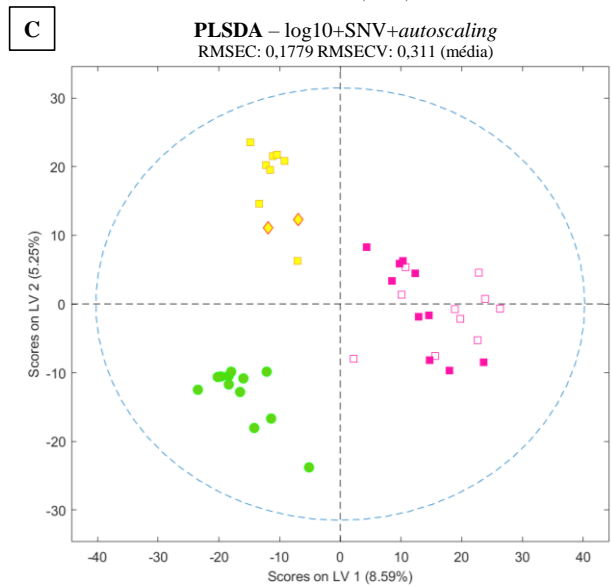
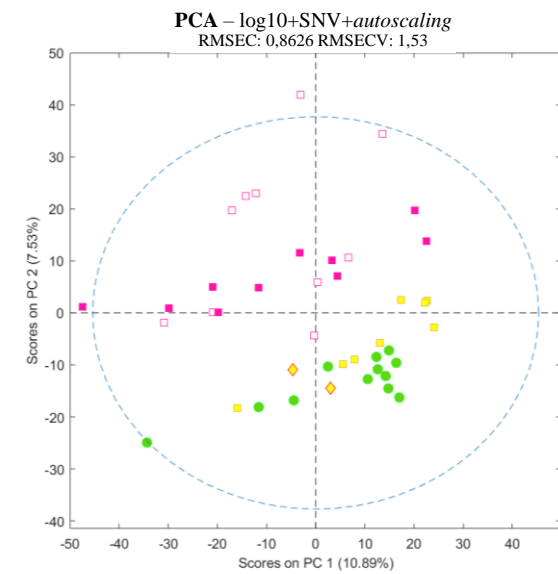
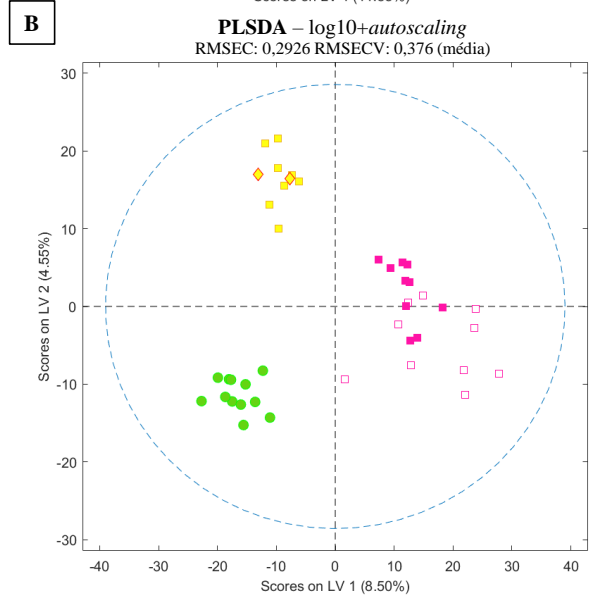
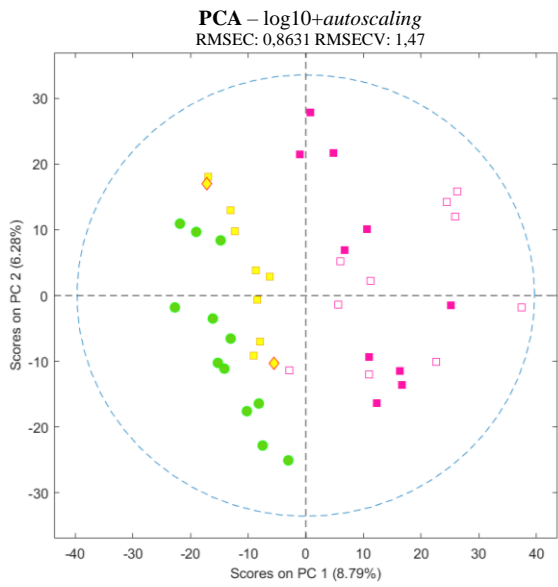
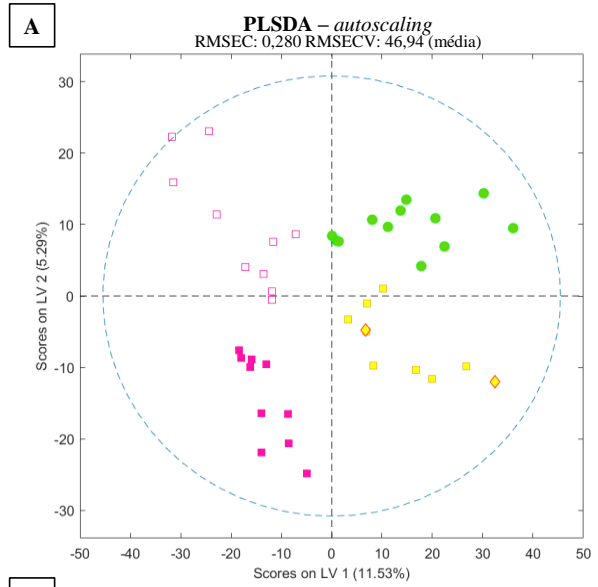
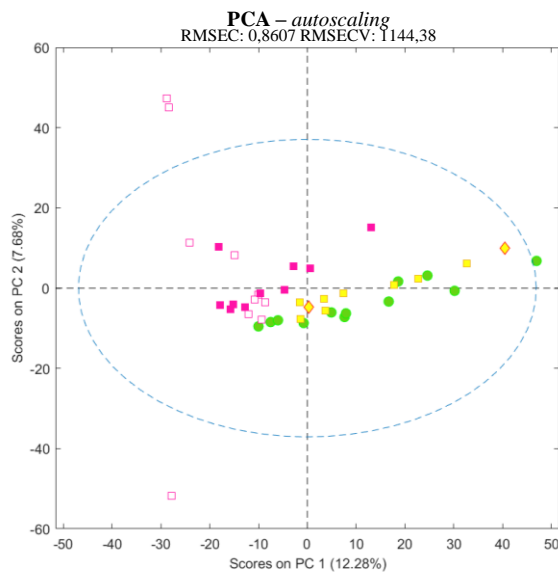


Figura 15. Gráficos tridimensionais de PCA (A) e PLS-DA (B) mostrando a distribuição das 64 amostras de soro UnB analisadas: 6 controles saudáveis (CS), 13 de DENGUE, 7 de COINFECÇÃO, 27 de COVID-19, e 11 de COVID-19 grave. As análises foram realizadas após o processamento dos dados com a combinação de \log_{10} +SNV+*autoscaling*.



● CS ■ DENGUE ◆ COINFEÇÃO □ COVID19 ■ COVID19 grave

Figura 16. Gráficos de PCA e PLS-DA resultantes da aplicação de diferentes métodos de processamento: (A) autoescalonamento (*autoscaling*), (B) transformação log10 seguida de autoescalonamento, e (C) combinação de transformação log10, normalização por SNV e autoescalonamento. As análises foram realizadas com amostras de soro provenientes da rotina hospitalar: 12 controles saudáveis (CS), 8 de DENGUE, 2 de COINFECCÃO, 10 de COVID-19, e 10 de COVID-19 grave. Os valores de RMSEC e RMSECV apresentados em cada gráfico indicam a qualidade dos ajustes de cada modelo.

Considerando então o perfil metabólico identificado nas 64 amostras UnB, foram investigadas as alterações metabólicas envolvendo os aminoácidos, ácidos biliares e lipídios anotados. Para avaliar a capacidade dos metabólitos anotados em gerar um modelo para classificação dos grupos, foi realizada uma PLS-DA considerando apenas os 31 metabólitos putativos (Figura 17).

Mesmo com a redução de 878 para 31 variáveis (*features*), ainda foi possível observar separação entre os grupos. Além disso, não houve grande prejuízo às métricas de desempenho, conforme detalhado na Tabela 7. A PLS-DA com 31 *features* apresentou boa sensibilidade de calibração, variando de 0,846 (DENGUE) a 1,000 (CS, COVID-19 e COVID-19 grave), enquanto a PLS-DA com 878 *features* teve variação entre 0,929 (DENGUE) a 1,000 (CS, COINFECCÃO e COVID-19 grave). Em relação à sensibilidade na validação cruzada, os valores aumentaram para CS, COVID-19 e COVID-19 grave, mas diminuíram para COINFECCÃO e DENGUE, ao comparar os dois modelos. Os valores médios de especificidade de calibração e validação cruzada foram maiores para o modelo com 31 *features*.

Na Figura 17, pode-se observar que o grupo CS aparece mais disperso, mais ainda separado dos grupos infectados. O grupo COINFECCÃO aparece entre o grupo DENGUE e os grupos COVID-19. O grupo COVID-19 grave não aparece tão separado quanto na PLS-DA que considerou todos os 878 *features*. Nessa PLS-DA, os valores de RMSEC e RMSECV foram, em geral, mais altos, refletindo um ajuste menos preciso do modelo. O RMSEC variou de 0,182 (CS) a 0,498 (COVID-19), enquanto o RMSECV variou de 0,257 (CS) a 0,553 (COVID-19). Isso indica que a utilização de menos variáveis para montar o modelo refletiu em maior dificuldade em captar a variabilidade dos dados com a mesma precisão do modelo com 878 *features*.

Na PLS-DA com 878 variáveis, os valores de R^2 Cal variaram de 0,281 (DENGUE) a 0,869 (COVID-19 grave), indicando um bom ajuste para a maioria dos grupos. Entretanto, os valores de R^2 CV são consideravelmente mais baixos, especialmente para COINFECCÃO (0,099) e DENGUE (0,051), o que sugere dificuldades do modelo em generalizar para novos dados nesses grupos. De forma semelhante, na PLS-DA com 31 variáveis, os valores de R^2 Cal

são satisfatórios, variando de 0,455 (COINFECÇÃO) a 0,713 (COVID-19), mas os valores de R^2 CV são significativamente mais baixos, oscilando entre 0,027 (COINFECÇÃO) e 0,499 (COVID-19), revelando que, assim como no modelo com 878 variáveis, há limitações na capacidade de predição, particularmente em COINFECÇÃO.

O valor médio de R^2 Cal foi igual para o modelo com 878 e para o modelo com 31 *features* (0,605). Contudo, o valor médio de R^2 CV foi maior para o modelo com 31 *features* (0,311 vs 0,254). O valor médio de R^2 CV reflete a capacidade de generalização do modelo de forma mais ampla, indicando que, mesmo que o primeiro modelo tenha tido um ajuste melhor em alguns grupos (como COVID-19 grave), o segundo modelo apresentou uma performance mais consistente ao longo de todos os grupos.

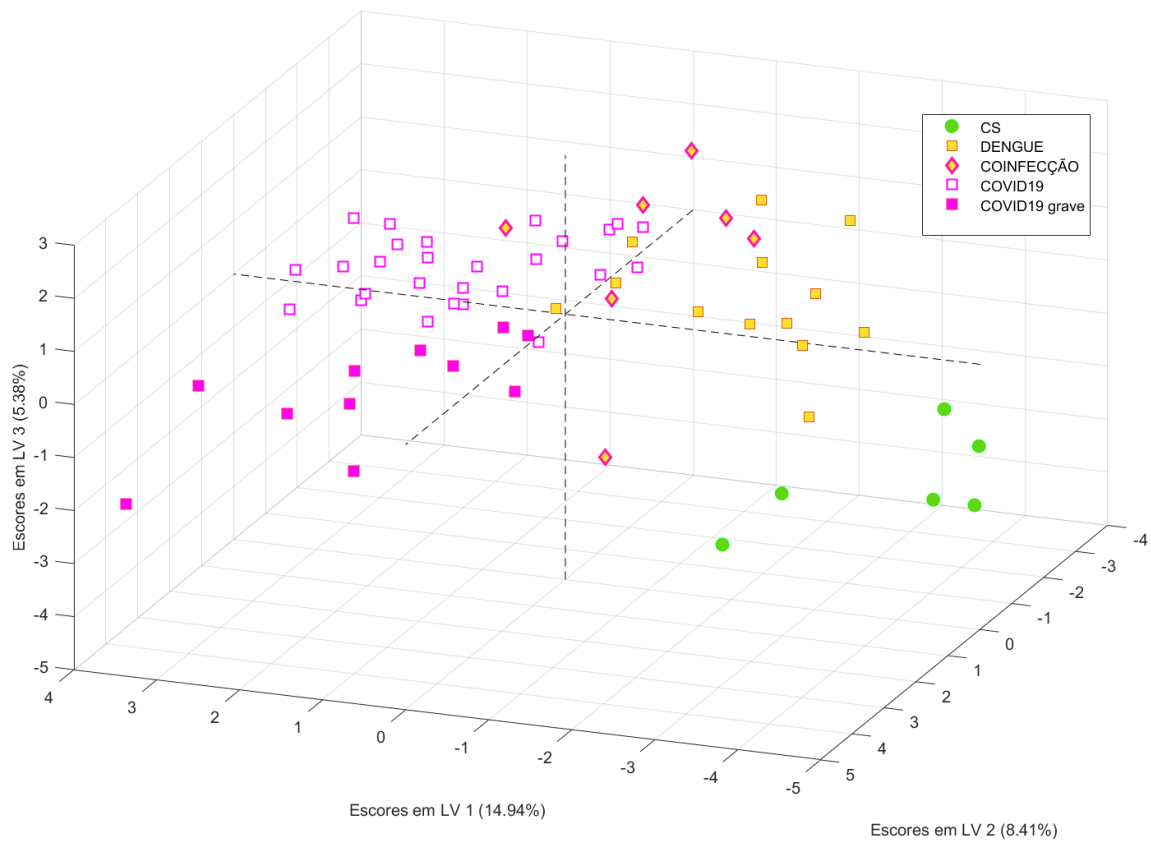


Figura 17. Distribuição tridimensional das 64 amostras de soro analisadas por PLS-DA, considerando 31 metabólitos putativos. Os dados foram processados utilizando log10, SNV e *autoscaling*.

Tabela 7. Métricas de desempenho da PLS-DA após aplicação combinada de log10, normalização por SNV e autoescalonamento aos 31 *features* de metabólitos anotados, considerando três dimensões latentes (LV1, LV2 e LV3). As métricas avaliadas abrangem sensibilidade (Cal e CV), especificidade (Cal e CV), erro de classificação (Cal e CV), RMSEC, RMSECV, R² Cal, e R² CV, para os grupos Controles Saudáveis (CS), DENGUE, COINFEÇÃO (COINF), COVID-19, e COVID-19 grave. Também são fornecidos os valores médios para cada métrica.

Métrica	CS	DENGUE	COINF	COVID-19	COVID-19 grave	Média
Sens. (Cal)	1,000	0,846	0,857	1,000	1,000	0,941
Esp. (Cal)	0,983	0,882	0,947	0,973	0,943	0,946
Sens. (CV)	1,000	0,692	0,429	0,889	0,909	0,784
Esp. (CV)	0,966	0,824	0,895	0,865	0,887	0,887
Class. Err (Cal)	0,009	0,136	0,098	0,014	0,028	0,057
Class. Err (CV)	0,017	0,242	0,338	0,123	0,102	0,165
RMSEC	0,182	0,341	0,255	0,498	0,292	0,314
RMSECV	0,257	0,434	0,384	0,553	0,344	0,394
R ² Cal	0,712	0,536	0,456	0,714	0,608	0,605
R ² CV	0,417	0,21	0,027	0,499	0,403	0,311

Sens. = sensibilidade; Esp. = especificidade; Cal = calibração; CV = validação cruzada; Class. Err = erro de classificação; RMSEC = erro médio quadrático de calibração; RMSECV = erro médio quadrático de validação cruzada; R² Cal = coeficiente de determinação para calibração; R² CV = coeficiente de determinação para validação cruzada.

Estes resultados indicam que, embora o modelo com 31 variáveis apresente métricas de erro mais altas, como RMSEC e RMSECV, sinalizando uma menor precisão no ajuste dos dados de calibração e validação, este modelo parece oferecer uma melhor capacidade de generalização. Isso é evidenciado pelos maiores valores médios de especificidade e R² CV, que refletem uma maior consistência na predição de novos dados. Assim, mesmo com uma perda de precisão, o modelo com 31 variáveis demonstra um desempenho eficiente para a classificação dos grupos de pacientes. Isto indica que os metabólitos anotados são representativos das principais alterações metabólicas associadas a esses grupos de pacientes, sugerindo que eles capturam as assinaturas moleculares mais relevantes.

Para explorar a associação entre os metabólicos individuais e a separação dos grupos, foi realizada a análise de classificação XGBoostDA. O XGBoostDA é uma técnica de aprendizado de máquina (em inglês, *machine learning*) baseada no algoritmo XGBoost, uma variante do *boosting* que otimiza a criação de árvores de decisão para classificar os dados. Os resultados do XGBoostDA fornecem uma avaliação das variáveis mais importantes para a discriminação entre os grupos (EIGENVECTOR RESEARCH, 2024). A Figura 18 destaca as variáveis com maiores escores de importância gerado pelo método de classificação XGBoostDA. Dentre as

variáveis mais importantes para discriminação entre os grupos estão PA 40:3, LPC 0:0/16:0, N-(1-Desoxi-1-frutossil)leucina/isoleucina, 20-HETE e fenilalanina.

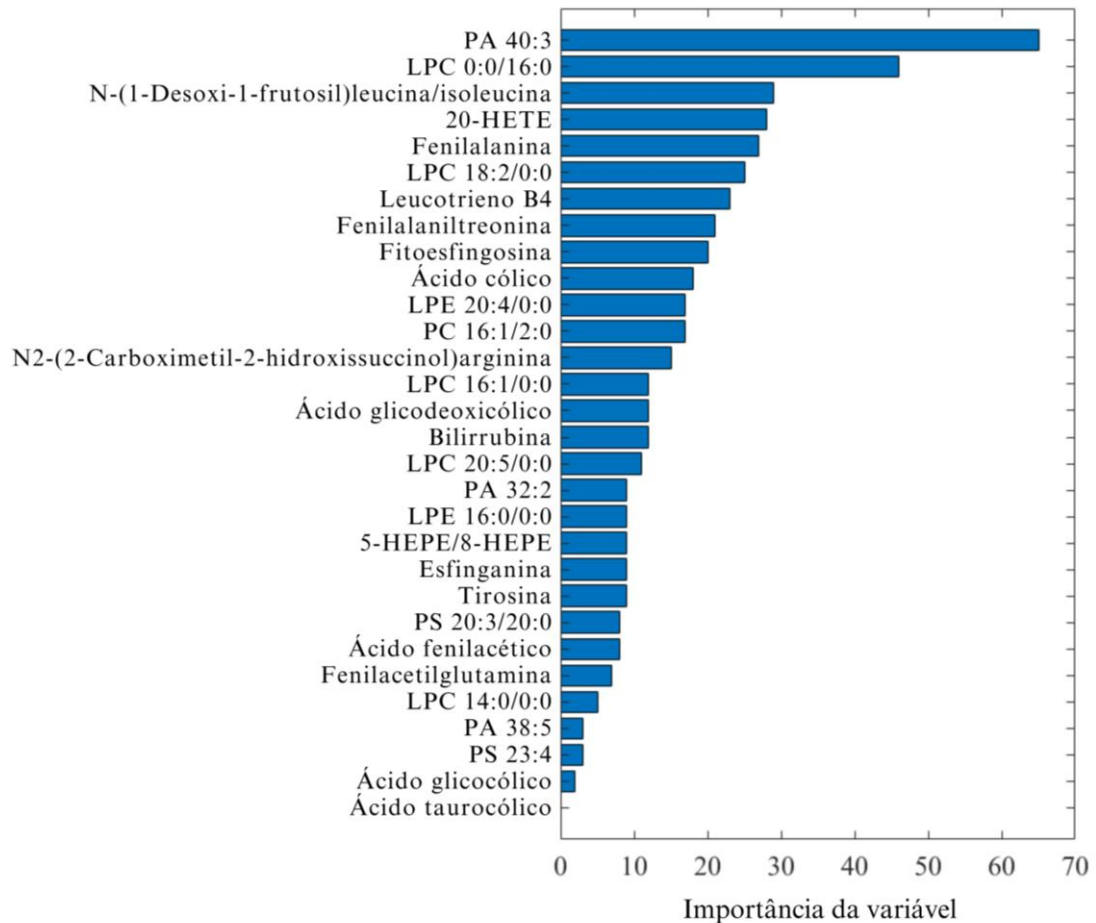


Figura 18. Análise de importância das variáveis para a discriminação entre grupos usando XGBoostDA.

Para fornecer uma visão geral da distribuição das intensidades de cada metabólito entre os grupos, foram produzidos mapas de calor e diagramas de caixa. Para cada classe de metabólitos anotados, foi produzido um mapa de calor, que detalha as variações individuais em cada paciente, e, para cada metabólito da classe, foi elaborado um diagrama de caixas, ressaltando as alterações com diferenças estatísticas.

Dentre os aminoácidos, foram observadas alterações no metabolismo de fenilalanina e tirosina (Figura 19). Os níveis de fenilalanina apresentaram-se significativamente elevados ($p < 0,05$) em todos os grupos de pacientes infectados, exceto no grupo COINFECÇÃO, tendo sido elencada entre os cinco metabólitos mais importantes para discriminação entre os grupos pela análise por XGBoostDA (Figura 18). A elevação dos níveis de fenilalanina é uma alteração metabólica comum em diferentes infecções, incluindo a dengue (CUI et al., 2018; ROMAGNOLO; CARVALHO, 2021) e a COVID-19. Esta elevação é ainda mais acentuada

no grupo COVID-19 grave, com a literatura indicando uma correlação entre o aumento dos níveis de fenilalanina e a severidade da COVID-19 (ATILA et al., 2021; HUANG et al., 2019; PÁEZ-FRANCO et al., 2021; SHI et al., 2021). O grupo COINFECÇÃO também mostra um aparente aumento, sendo a falta de significância provavelmente relacionada ao reduzido tamanho amostral e maior heterogeneidade entre os componentes deste grupo.

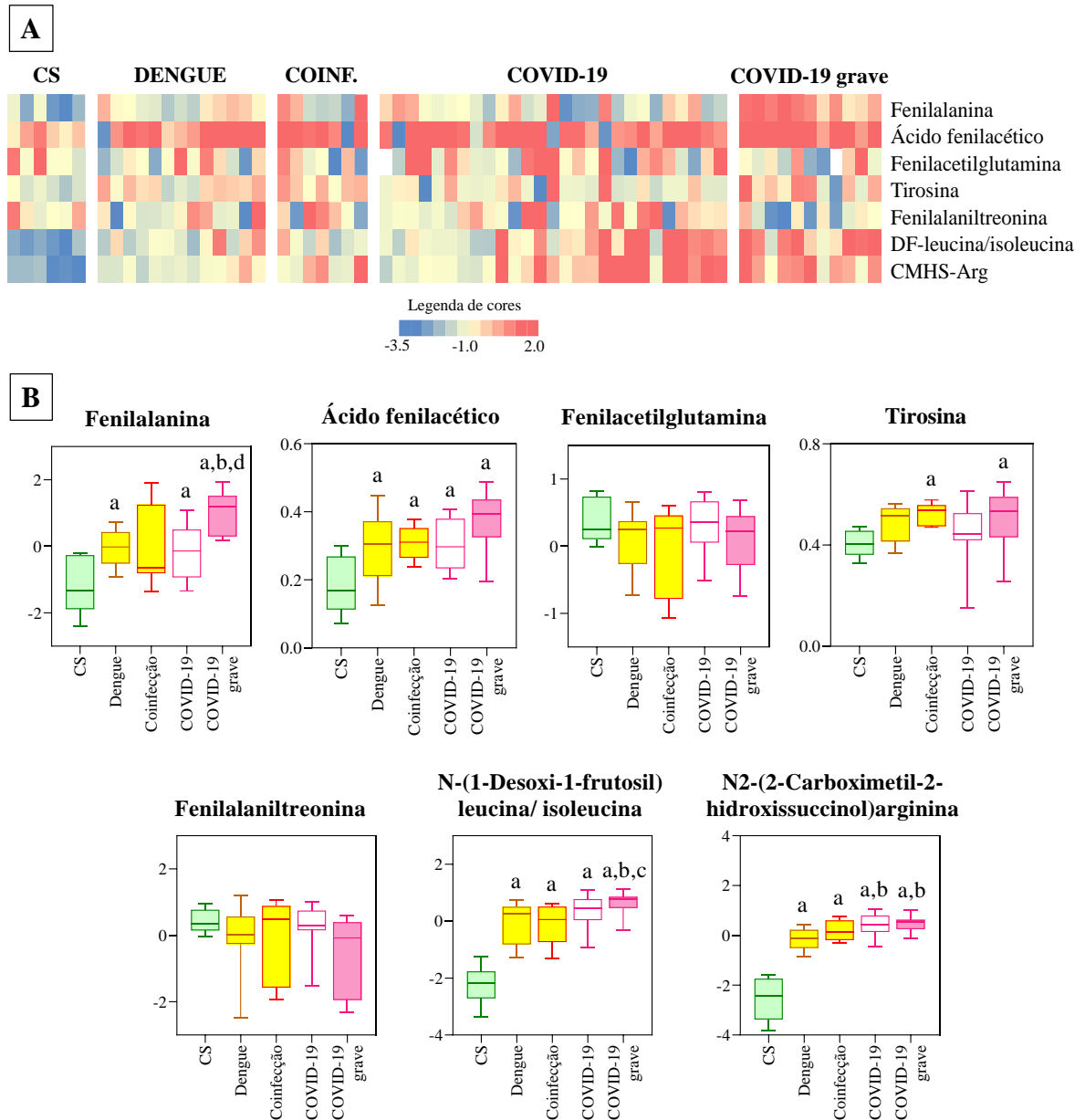


Figura 19. Variação nos níveis de aminoácidos e derivados entre grupos de amostras de soro analisadas. (A) Mapa de calor representando as alterações em cada indivíduo, onde as cores variam de azul (baixa intensidade) a vermelho (alta intensidade). (B) Diagramas de caixa ilustrando a distribuição dos níveis destes metabólitos entre os diferentes grupos, destacando as diferenças estatisticamente significativas. *DF-leucina/isoleucina: N-(1-Desoxi-1-frutossil)leucina/isoleucina; CMHS-Arg: N2-(2-Carboximetil-2-hidroxisuccinil)arginina.

Durante uma inflamação induzida por infecção ou sepse, pode ocorrer acúmulo de fenilalanina devido à redução da disponibilidade de tetra-hidrobiopterina (BH4), essencial para a atividade da fenilalanina 4-hidroxilase (PAH), a enzima que catalisa a conversão de fenilalanina em tirosina. Citocinas ativadas em resposta a infecções geram espécies reativas de oxigênio (ROS), oxidando BH4 para 7,8-dihidrobiopterina (BH2). A escassez de BH4 reduz a atividade da PAH, afetando a conversão de fenilalanina em tirosina, e, conseqüentemente, a síntese de dopamina, norepinefrina e epinefrina (SHI et al., 2004). Esse mecanismo de estresse oxidativo decorrente da inflamação tem sido proposto como uma possível explicação para o acúmulo de fenilalanina observado tanto na dengue quanto na COVID-19 (CUI et al., 2018; MUSSAP; FANOS, 2021).

Os níveis de ácido fenilacético estavam significativamente elevados em todos os grupos de pacientes infectados, enquanto os níveis de fenilacetilglutamina (PAGln) apresentaram uma aparente redução, porém sem significância estatística. O excesso de fenilalanina no organismo pode ser eliminado por meio de uma transaminação que leva à produção de fenilpiruvato. O fenilpiruvato pode ser posteriormente metabolizado em vários produtos, incluindo fenilacetato (ácido fenilacético). O fenilacetato pode ser posteriormente conjugado com glutamina para formar fenilacetilglutamina (HMDB, 2023).

Neste sentido, seria esperado um aumento nos níveis de ácido fenilacético (PAA) e fenilacetilglutamina (PAGln) acompanhando os aumentos de fenilalanina (SEE, 2023). Entretanto, os resultados mostram aumento significativo de fenilalanina e PAA, enquanto os níveis de PAGln estão aparentemente diminuídos. A glutamina desempenha um papel no fornecimento de energia para as células do sistema imunológico e é indispensável para a síntese de nucleotídeos essenciais para a reprodução dos linfócitos. Desta forma, em pacientes com doenças inflamatórias, como a COVID-19, os níveis de glutamina no sangue estão frequentemente reduzidos (ATILA et al., 2021; MASOODI et al., 2022). Essa redução pode explicar por que os níveis de PAGln não estão elevados, já que a baixa disponibilidade de glutamina limita a produção de seus derivados no organismo.

Embora a elevação nos níveis de fenilalanina seja consistentemente reportada para dengue e COVID-19, existe maior discordância em relação aos níveis de tirosina. No presente estudo, os níveis de tirosina estavam significativamente elevados nos grupos COINFECCÃO e COVID-19 grave. Outros autores também registraram níveis elevados tanto de fenilalanina quanto de tirosina em pacientes com maior gravidade da COVID-19 (ATILA et al., 2021; LUPORINI et al., 2021; MARTÍNEZ-GÓMEZ et al., 2022; RUSSKIKH et al., 2024), mas também existem registros de aumento da fenilalanina em conjunto com a diminuição da tirosina

(MUSSAP; FANOS, 2021), e de tirosina reduzida sem reportar fenilalanina (MASOODI et al., 2022). Em estudos avaliando pacientes com dengue, são reportadas alterações envolvendo o metabolismo da tirosina, mas sem muitos detalhes sobre os níveis de tirosina especificamente (CUI et al., 2018).

Assim como para a fenilalanina, a tirosina pode ser catabolizada pela ação de hidroxilases e transaminases. Tanto as fenilalanina hidroxilases quanto as tirosina hidroxilases utilizam BH₄ como cofator. Assim, a falta desse fator pode causar uma deficiência na atividade catalítica, explicando o acúmulo observado de ambos os aminoácidos. Além disso, pode haver comprometimento das transaminases, contribuindo para o acúmulo destes aminoácidos (MARTÍNEZ-GÓMEZ et al., 2022; VAN SPRONSEN et al., 2021).

Estas reações de hidroxilação e transaminação ocorrem majoritariamente no fígado (SHI et al., 2004). Tanto a COVID-19 quanto a dengue podem causar prejuízo à função hepática por uma combinação de fatores, como resposta imune exacerbada, lesão direta causada pelo vírus, e alterações vasculares (LEOWATTANA; LEOWATTANA, 2021; WANG et al., 2020; WIERSINGA et al., 2020), fazendo com que o fígado falhe em catabolizar aminoácidos aromáticos, o que se reflete no acúmulo dos mesmos. Neste sentido, aumentos na fenilalanina e tirosina circulantes foram relatados em pacientes com dano hepático (GRAY et al., 2017; KIMHOFER et al., 2020).

N-(1-Desoxi-1-frutosil)leucina/isoleucina e N₂-(2-Carboximetil-2-hidroxisuccinol)arginina pertencem a classes de compostos orgânicos derivados de aminoácidos. A N-(1-Desoxi-1-frutosil)leucina/isoleucina faz parte da classe de leucina ou isoleucina e derivados, que inclui compostos formados por reações envolvendo o grupo amino ou carboxila da leucina ou isoleucina. De forma semelhante, a N₂-(2-Carboximetil-2-hidroxisuccinol)arginina pertence à classe de arginina e derivados, envolvendo reações nos grupos amino ou carboxila da arginina (HMDB, 2024an, 2024ao).

A Figura 19B mostra que os níveis de ambos os derivados de aminoácidos se mostraram elevados em todos os grupos infectados quando comparados aos CS. Os níveis de N-(1-Desoxi-1-frutosil)leucina/isoleucina no grupo COVID-19 grave estavam mais elevados também em relação aos grupos DENGUE e COINFECÇÃO, enquanto N₂-(2-Carboximetil-2-hidroxisuccinol)arginina estava elevada na COVID-19 e COVID-19 grave em relação à DENGUE.

Poucos trabalhos foram publicados sobre N-(1-Desoxi-1-frutosil)leucina/isoleucina e N₂-(2-Carboximetil-2-hidroxisuccinol)arginina (HMDB, 2024an, 2024ao). Todavia, um estudo metabolômico não dirigido com plasma apontou N-(1-Desoxi-1-frutosil)aminoácidos

como potenciais biomarcadores de infecção por SARS-CoV-2. Derivados como N-(1-Desoxi-1-frutossil)leucina/isoleucina foram detectados em níveis elevados em pacientes com COVID-19, especialmente nos casos graves, sugerindo que esses compostos podem estar associados à progressão da doença (OCCELLI et al., 2022). Em consonância com esses achados da literatura, o presente estudo também encontrou níveis mais elevados de N-(1-Desoxi-1-frutossil)leucina/isoleucina no grupo COVID-19 grave, com a análise de XGBoostDA indicando este metabólito com um dos mais importantes para a discriminação entre os grupos.

A presença de N-(1-desoxi-1-frutossil)aminoácidos poderia estar relacionada a compostos exógenos (ingeridos) e, nesse caso, eles deveriam ser removidos dos conjuntos de dados em estudos metabolômicos. Contudo, a identificação destes compostos em todas as classes de indivíduos permitiu supor que, se fossem exógenos, teriam sido ingeridos aleatoriamente por todos os participantes e, sendo assim, os N-(1-desoxi-1-frutossil)aminoácidos poderiam ser mantidos nas análises (OCCELLI et al., 2022). Por serem tão pouco descritos na literatura, mais estudos são necessários para entender os níveis séricos alterados desses aminoácidos em indivíduos infectados por SARS-CoV-2 e por DENV.

Adicionalmente, foi anotado o dipeptídeo fenilalaniltreonina, composto por fenilalanina e treonina. Esse também é, potencialmente, um composto de origem exógena, produto da digestão parcial de proteínas ou do catabolismo proteico. Alguns dipeptídeos são conhecidos por ter efeitos fisiológicos ou de sinalização celular, embora a maioria seja simplesmente intermediários de curta duração, seguindo para vias específicas de degradação de aminoácidos após proteólise adicional (HMDB, 2024ap). Apesar deste potencial, os níveis de fenilalaniotreonina não apresentaram diferença entre os grupos.

Dentre os ácidos biliares (Figura 20), os níveis de ácido cólico se mostraram elevados para todos os grupos de pacientes infectados. Para os grupos COVID-19 e COVID-19 grave, os níveis de ácido cólico estavam ainda mais elevados do que para DENGUE e COINFECÇÃO, mas não tiveram diferença entre si. Os níveis dos ácidos glicocólico, glicodeoxicólico e taurocólico estavam aumentados apenas nos grupos COVID-19 e COVID-19 grave em relação a CS. O grupo COVID-19 grave teve os níveis mais elevados dentre os grupos, estando significativamente mais elevados que DENGUE para ácidos glicocólico, glicodeoxicólico e taurocólico e que COVID-19 no caso do ácido glicocólico e taurocólico. Desta forma, os grupos COVID-19 e, especialmente, COVID-19 grave se destacam com níveis marcadamente mais elevados de ácidos biliares que os demais grupos. O ácido biliar com maior escore de relevância na análise de XGBoostDA foi o ácido cólico.

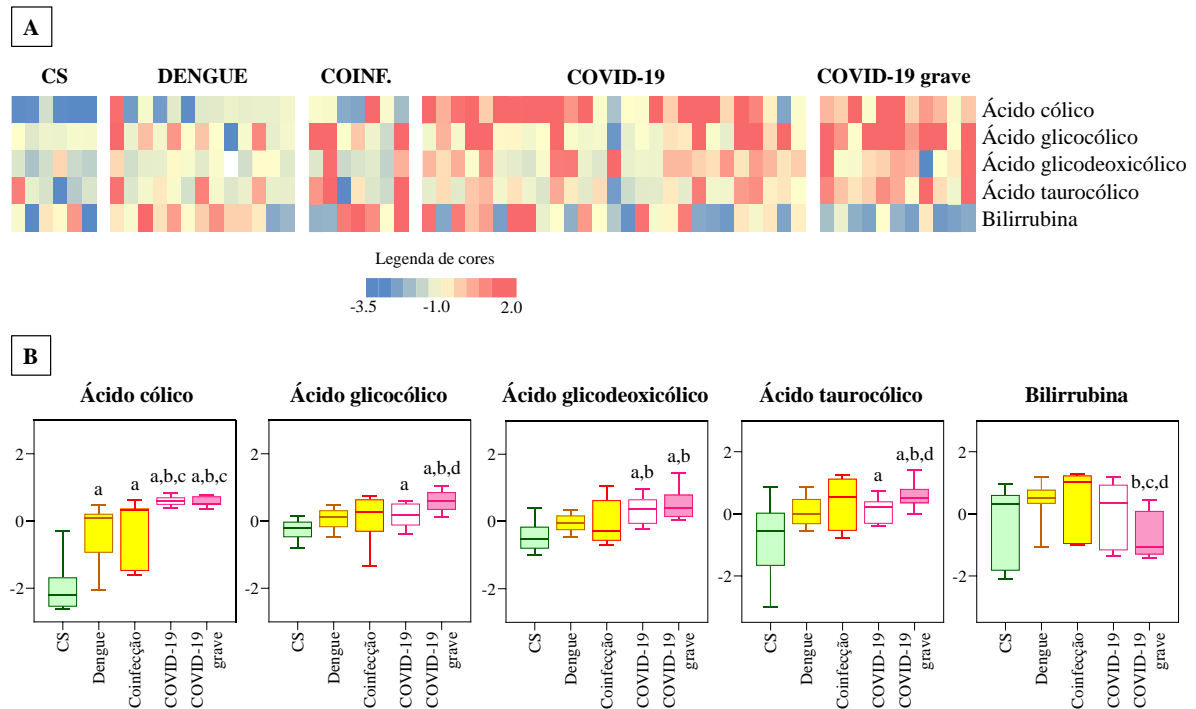


Figura 20. Variação nos níveis de ácidos biliares entre grupos de amostras de soro analisadas. (A) Mapa de calor representando as alterações em cada indivíduo, onde as cores variam de azul (baixa intensidade) a vermelho (alta intensidade). (B) Diagramas de caixa ilustrando a distribuição dos níveis destes metabólitos entre os diferentes grupos, destacando as diferenças estatisticamente significativas.

Assim como o acúmulo de aminoácidos, variações na biossíntese de ácidos biliares podem ser uma manifestação clínica de disfunção hepática causada por infecções como dengue e COVID-19 (CUI et al., 2018; PANG et al., 2021). A dengue pode trazer manifestações hepáticas variadas, desde elevações assintomáticas de transaminases até insuficiência hepática fulminante (LEOWATTANA; LEOWATTANA, 2021; SAMANTA; SHARMA, 2015).

Em estudos metabolômicos, ácidos biliares, incluindo ácido glicocólico, foram observados em níveis mais elevados em pacientes com dengue em relação a controles (CUI et al., 2013), e em até 5 vezes mais elevados entre pacientes com dengue grave em comparação com pacientes com dengue clássica. Em casos de dengue grave, os ácidos biliares elevados foram correlacionados com os níveis mais altos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), sugerindo maior lesão hepática em caso graves (CUI et al., 2018).

Na Figura 20B, observa-se que, embora a significância estatística tenha sido alcançada apenas para o ácido cólico nos casos de DENGUE e COINFECÇÃO, outros ácidos biliares também mostram uma tendência de elevação. Essa observação é coerente com os dados clínicos, uma vez que os pacientes desses grupos não desenvolveram sintomas de dengue grave.

Estudos metabolômicos avaliando soro de pacientes com COVID-19 exibiram resultados discrepantes em relação aos níveis de ácidos biliares. Alguns autores encontraram ácidos biliares, como ácido glicodeoxicólico e ácido glicolítico 3-sulfato, reduzidos em pacientes com COVID-19 (CASTAÑÉ et al., 2022; SPICK et al., 2022). Enquanto outros descreveram níveis elevados de ácidos biliares em COVID-19 grave (SHEN et al., 2020).

A caracterização metabolômica do aumento sérico de ácidos biliares é condizente com achados clínicos na COVID-19 grave (NARDO et al., 2021; PIÑOL-JIMÉNEZ et al., 2022). Características colestáticas, como proliferação de ductos biliares, infiltrados inflamatórios portais e, em alguns casos, tampões biliares canaliculares/ductulares, foram reportadas em avaliações post-mortem de pacientes com COVID-19. A tempestade de citocinas, característica da doença, pode ser um fator contribuinte importante, já que citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6 podem induzir colestase hepatocelular ao regular negativamente os sistemas de captação e excreção hepatobiliares, semelhante aos mecanismos patológicos observados na colestase induzida por sepse (NARDO et al., 2021).

Quando ocorre colestase, que consiste na redução ou no bloqueio do fluxo da bile, os ácidos biliares não conseguem ser adequadamente excretados do fígado para o intestino. Como resultado, eles se acumulam no fígado e acabam sendo liberados na corrente sanguínea. Desta forma, assim como na sepse, os ácidos biliares séricos, considerados os indicadores mais precisos de colestase, podem ser relevantes como parâmetros prognósticos na COVID-19 (NARDO et al., 2021).

A associação entre níveis elevados de diversos mediadores pró-inflamatórios, incluindo quimiocinas (e.g., CXCL10, CCL2, CCL5 e CCL3) e citocinas (e.g., IL-6, TNF- α , IL-1, INFs e IL-1 β), e a severidade da COVID-19 foi demonstrada por uma série de estudos (CHEN et al., 2021; MERAD et al., 2022; SCHULTZE; ASCHENBRENNER, 2021).

O perfil de mediadores inflamatórios de pacientes com COVID-19 grave internados nos hospitais HUB, HRT e HRAN foi avaliado dentro do contexto do projeto TARGET (KURIZKY et al., 2021). Além da já conhecida tempestade pró-inflamatória, o estudo destaca perturbações e aumentos nas ordens de magnitude de mediadores solúveis em soro ao longo da progressão temporal da doença, que foram associados a desfechos distintos (especialmente CXCL10, IL-6, CCL3 e G-CSF). Além disso, um conjunto selecionado de mediadores solúveis no soro (IL-6, IFN- γ , IL-1Ra, IL-13, PDGF e IL-7) foi apontado como biomarcadores promissores para o manejo clínico de pacientes com COVID-19 grave (JARDIM-SANTOS et al., 2022)².

² Gabriela Jardim-Santos e Heidi Schulte contribuíram igualmente para este trabalho como primeiras autoras.

Para dengue, também existem estudos sobre o perfil de mediadores solúveis no soro (quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, e fatores de crescimento). Os principais achados incluem um aumento significativo em mediadores imunológicos, como CXCL10, IL-6 e IFN- γ , em todos os sorotipos de DENV, sugerindo respostas imunológicas universais à infecção. Por outro lado, alguns sorotipos apresentaram respostas mais tardias, enquanto outros mostraram picos mais precoces, destacando padrões distintos de ativação e progressão imunológica entre os diferentes sorotipos (COUTINHO-DA-SILVA et al., 2022).

Desta forma, tanto a dengue quanto a COVID-19 promovem significativas alterações imunológicas que podem afetar o metabolismo hepático, refletidas no aumento dos níveis de ácidos biliares e mediadores inflamatórios no soro dos pacientes. O acúmulo de ácidos biliares, especialmente em casos graves de COVID-19, está associado a disfunções hepáticas, como colestase, e pode servir como importante indicador prognóstico. Considerando os diferentes ácidos biliares, a coinfeção SARS-CoV-2/DENV apresentou um perfil mais parecido com a dengue, havendo elevação significativa apenas do ácido cólico.

Prejuízo da função hepática também pode se refletir em alterações nos níveis de bilirrubina. A Figura 20 mostra bilirrubina diminuída na COVID-19 grave, resultado que também foi observado por Shen e colaboradores (2020) (SHEN et al., 2020). Não foram observadas diferenças nos níveis de bilirrubina para os demais grupos.

Estudos metabolômicos também mostraram mudanças no perfil lipídico, incluindo glicerofosfolipídios, esfingolipídios e eicosanoides, em decorrência de infecções por SARS-CoV-2 ou por DENV (CUI et al., 2013, 2018; PANG et al., 2021; SHEN et al., 2020). O processo inflamatório e a disfunção ou lesão de órgãos causados pela dengue e pela COVID-19 podem comprometer o metabolismo lipídico e afetar os níveis de lipídios na corrente sanguínea (CUI et al., 2013, 2018; ONOJA et al., 2023; PANG et al., 2021).

Na Figura 21, é possível observar níveis elevados de 5-HEPE/8-HEPE na COVID-19 grave, em relação aos controles saudáveis (CS) e aos demais grupos infectados. Para 20-HETE, os níveis em DENGUE e COINFEÇÃO se mostraram elevados em relação a CS, enquanto nos pacientes com COVID-19 os níveis eram mais altos que em CS e DENGUE, e nos pacientes com COVID-19 grave, maior que CS, DENGUE e COINFEÇÃO. Estes resultados sugerem diferenças na modulação da resposta inflamatória entre os grupos infectados.

Os HEPEs e HETEs pertencem à família de eicosanoides, moléculas bioativas derivadas de ácidos graxos poli-insaturados, que desempenham papéis na modulação da resposta inflamatória, embora com efeitos opostos. HETEs, como o 20-HETE, são derivados do ácido araquidônico (AA, um ácido graxo ômega-6) e possuem efeitos pró-inflamatórios, contribuindo

para a progressão de doenças inflamatórias, como a inflamação vascular (CHRISTI; HARWOOD, 2020). Já os HEPEs, como o 5-HEPE e o 8-HEPE, são derivados do ácido eicosapentaenoico (EPA, um ácido graxo ômega-3) e estão majoritariamente associados a propriedades anti-inflamatórias, modulando a resposta imunológica e atenuando a inflamação (CALDER, 2006; SERHAN; DE LA ROSA; JOUVENE, 2019).

Os níveis elevados de 20-HETE nos pacientes com dengue, coinfeção e COVID-19 indicam que esses grupos enfrentam um grau significativo de inflamação e possível disfunção vascular, consistente com as manifestações clínicas das infecções. Na COVID-19 grave, os níveis mais elevados de 20-HETE são consistentes com a ativação intensa de vias inflamatórias e vasculares, característica dos casos mais severos. O aumento de 5-HEPE/8-HEPE na COVID-19 grave pode retratar uma tentativa do organismo de contrabalançar a inflamação exacerbada, promovendo uma resposta anti-inflamatória compensatória para limitar os danos causados pela resposta inflamatória.

Além disso, o leucotrieno B4 (LTB4), outro mediador derivado do ácido araquidônico pela via da 5-lipoxigenase (5-LOX), também desempenha um papel crítico na inflamação, ao ativar e recrutar leucócitos, e aumentar a produção de citocinas. O aumento dos níveis de LTB4 seria esperado na COVID-19, dadas as características inflamatórias da doença (AL-KURASHY et al., 2021; CALDER, 2006; PÉREZ et al., 2022), entretanto a Figura 21B mostra os níveis de LTB4 diminuídos em todos os grupos infectados por SARS-CoV-2.

Os níveis reduzidos de LTB4 observados em alguns pacientes com COVID-19 podem estar relacionados a fatores como a exaustão imunológica, a modulação da resposta inflamatória no curso da doença ou o uso de medicamentos anti-inflamatórios, como corticosteroides (GOODWIN et al., 1985). O uso da azitromicina e de medicamentos não prescritos, como a ivermectina, também pode ter efeito modulatório na produção de fatores pró-inflamatórios (PEERZADA; VERMA, 2023; VENDITTO et al., 2021).

A coinfeção apresentou níveis de 20-HETE mais semelhantes aos observados na dengue e níveis de LTB4 mais próximos aos da COVID-19. Esses achados sugerem que a coinfeção pode gerar uma resposta inflamatória com elementos compartilhados entre as duas infecções, sendo necessário considerar os possíveis impactos das intervenções terapêuticas nos níveis de LTB4.

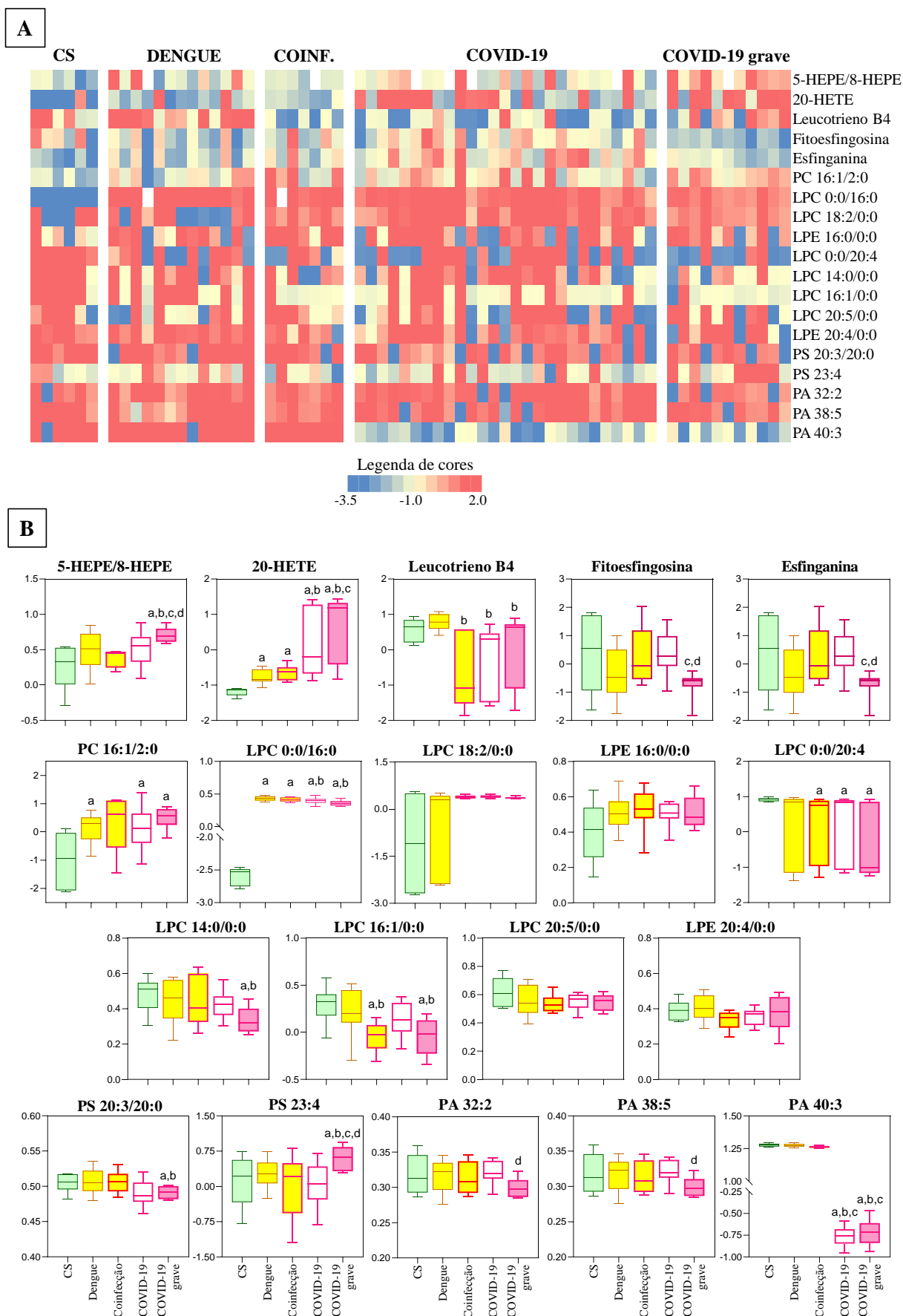


Figura 21. Variação nos níveis de lipídios entre grupos de amostras de soro analisadas. (A) Mapa de calor representando as alterações em cada indivíduo, onde as cores variam de azul

(baixa intensidade) a vermelho (alta intensidade). (B) Diagramas de caixa ilustrando a distribuição dos níveis destes metabólitos entre os diferentes grupos, destacando as diferenças estatisticamente significativas.

A Figura 21 também ilustra as alterações nos níveis de esfingolipídios e glicerofosfolipídios que foram detectadas neste estudo. Observou-se aumento nos níveis de PC 16:1/2:0 em todos os grupos infectados, embora sem significância para o grupo COINFECÇÃO. Em termos de lisofosfolipídios, os níveis de LPC 0:0/16:0 foram significativamente elevados em todos os grupos infectados, com destaque para DENGUE e COINFECÇÃO, que apresentaram aumentos mais pronunciados em comparação aos grupos de COVID-19. Os grupos COINFECÇÃO, COVID-19 e COVID-19 grave também apresentaram níveis elevados de LPC 18:2/0:0 em comparação com o grupo CS, mas sem significância estatística devido à alta variação entre os indivíduos do grupo controle.

Em contrapartida, os níveis de LPC 14:0/0:0, LPC 16:1/0:0, LPC 20:5/0:0 e LPE 20:4/0:0 apresentaram reduções em pacientes infectados. No grupo COVID-19 grave, os níveis de LPC 14:0/0:0 foram significativamente reduzidos em relação a CS e DENGUE. Da mesma forma, os níveis de LPC 16:1/0:0 estavam diminuídos nos grupos COINFECÇÃO e COVID-19 grave em relação a CS e DENGUE. Embora os níveis de LPC 20:5/0:0 e LPE 20:4/0:0 demonstrem aparente redução em pacientes infectados, esses achados não foram estatisticamente significativos.

A análise de fosfatidilserinas (PS) também indicou alterações, com a PS 20:3/20:0 reduzida na COVID-19 grave em relação a CS e DENGUE, enquanto PS 23:4 estava mais elevada neste grupo do que nos demais. Dentre os ácidos fosfatídicos (PAs), PA 32:2 e PA 38:5 estavam diminuídos em COVID-19 grave em relação a COVID-19, e PA 40:3 estava diminuído em COVID-19 e COVID-19 grave em relação a CS, DENGUE e COINFECÇÃO. Os esfingolipídios fitoesfingosina e esfinganina também se mostraram reduzidos em pacientes com COVID-19 grave. Desta forma, considerando as diferentes classes de lipídios anotados, o grupo COVID-19 grave foi o grupo com mais alterações significativas. Isto reforça a relevância destes metabólitos na discriminação dos perfis metabólicos associados à gravidade da infecção por COVID-19.

As duas variáveis com maior importância para classificação dos grupos foram dois glicerofosfolipídios PA 40:3 e LPC 0:0/16:0, conforme mostrado na Figura 18. O PA 40:3 foi importante para discriminar os grupos COVID-19 e COVID-19 grave, já que estava marcadamente diminuído nestes grupos. LPC 0:0/16:0, por outro lado, estava

significativamente elevado para todos os grupos infectados, mas especialmente DENGUE e COINFEÇÃO, tendo contribuído para discriminar estes grupos dos demais.

Esses resultados destacam a relevância destes metabólitos para a investigação de alterações em pacientes com infecções, especialmente para detectar perfis metabólicos associados à gravidade das doenças, reforçando a importância de utilizar amostras com perfil metabólico preservado, como as amostras da UnB. Neste sentido, o perfil encontrado para as amostras da rotina hospitalar ressalta um dos grandes desafios de realizar estudos de metabolômica clínica no Brasil: a ampla variação nos procedimentos de coleta, processamento, transporte e armazenamento de amostras. Essas inconsistências podem resultar na perda de importantes metabólitos, como os glicerofosfolipídios, que não foram detectados de maneira consistente nas amostras da rotina.

O remodelamento do metabolismo de glicerofosfolipídios é um dos principais achados reportados na literatura tanto para dengue quanto COVID-19, especialmente em casos graves (CUI et al., 2013, 2018; DELAFIORI et al., 2021; SINDELAR et al., 2021). Glicerofosfolipídios, especialmente LPCs, emergiram como uma classe de lipídios inflamatórios, integrando-se a tromboxanos, leucotrienos e prostaglandinas, com os quais compartilham vias metabólicas e mecanismos regulatórios (SEVASTOU et al., 2013).

As LPCs se originam da clivagem da fosfatidilcolina pela fosfolipase A2 (PLA2) (FUNK, 2021). As LPCs podem induzir a migração de linfócitos e macrófagos, aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, induzir o estresse oxidativo e promover apoptose, o que pode agravar a inflamação e promover o desenvolvimento de doenças, como infecções. De maneira geral, devido ao efeito pró-inflamatório da maioria das LPCs, seria esperado que seus níveis aumentassem durante as fases agudas das infecções (SEVASTOU et al., 2013). No entanto, níveis reduzidos de algumas LPCs foram relatados tanto para dengue quanto para COVID-19, especialmente em casos graves (CUI et al., 2013, 2018; DELAFIORI et al., 2021; SINDELAR et al., 2021).

Tanto na sepse quanto nas infecções virais, níveis reduzidos de LPC podem resultar de vários mecanismos importantes (SEVASTOU et al., 2013). Primeiro, o LPC é consumido durante a ativação imunológica, onde desempenha um papel no recrutamento de células imunológicas e na modulação da inflamação. A atividade aumentada da fosfolipase A2 (PLA2) também contribui para a quebra do LPC em outros lipídios bioativos. Além disso, a disfunção hepática, comumente observada em infecções graves, prejudica a produção de LPC devido à perturbação no metabolismo lipídico. O dano endotelial e a disfunção vascular, presentes tanto na sepse quanto nas infecções virais graves como a COVID-19, podem levar a um maior

consumo de LPC, à medida que este participa da reparação de tecidos danificados. Finalmente, a inflamação sistêmica generalizada e a desregulação metabólica durante infecções contribuem para a depleção de LPC, enquanto o organismo tenta controlar a inflamação excessiva e responder à infecção (CUI et al., 2013, 2018; DELAFIORI et al., 2021; LIU et al., 2020; SINDELAR et al., 2021).

Especificamente, LPC 0:0/16:0, LPC 18:2/0:0, LPC 14:0/0:0 e LPC 16:1/0:0 foram reportados com níveis reduzidos tanto para dengue quanto para COVID-19, com reduções mais significativas para COVID-19 grave (CUI et al., 2013; SINDELAR et al., 2021). Em contraste, outros autores encontraram LPC 16:0 e LPE 18:0 elevados em soro de pacientes com COVID-19 (KAUR; JI; RAHMAN, 2021). Diminuição de certas LPCs e PSs, bem como o aumento de PCs e PEs também foram reportados por Delafiori et al., 2021 para pacientes com COVID-19 (DELAFIORI et al., 2021). Xue e colaboradores (2022) encontraram níveis mais elevados de glicosfingolipídios e fosfoerinas em pacientes com COVID-19, enquanto os níveis de LPAs e esfingosina foram mais baixos em pacientes com COVID-19 (XUE et al., 2022).

Portanto, as alterações nos níveis de glicerofosfolipídios e outros lipídios bioativos observadas neste estudo e em investigações anteriores destacam o papel crucial do metabolismo lipídico na resposta inflamatória durante infecções virais, como a dengue e a COVID-19. A heterogeneidade dos perfis lipídicos reportados reflete a complexidade dessas doenças e suas manifestações clínicas, especialmente em casos graves, sendo importante considerar também a influência de variações relacionadas às diferenças metodológicas nos estudos metabolômicos nos resultados obtidos (DELAFIORI et al., 2021).

Considerando um panorama geral dos metabólitos que apresentaram diferenças significativas nos grupos infectados, o grupo COINFECÇÃO mostrou, para 11 metabólitos, níveis semelhantes aos observados na DENGUE e na COVID-19 não grave. Para outros 7 metabólitos, os níveis na COINFECÇÃO se assemelharam mais aos do grupo DENGUE, enquanto para 2 metabólitos os níveis se aproximaram dos observados na COVID-19, e para outros 2, na COVID-19 grave. Estes metabólitos estão discriminados na Tabela 8.

Desta forma, como pode ser observado na Figura 22, o perfil da COINFECÇÃO (linha vermelha) tende a seguir um perfil mais parecido com as formas não graves das infecções (DENGUE, linha laranja; COVID-19, linha roxa), e predominantemente mais parecido com a dengue. O grupo COVID-19 grave (linha roxo escuro) apresentou as alterações metabólicas mais acentuadas, devido à intensa resposta inflamatória e ao consequente dano tecidual, especialmente no fígado.

Sendo assim, estes resultados sugerem que, apesar das suspeitas levantadas por algumas séries de casos e revisões sistemáticas sobre casos de coinfeção SARS-CoV-2/DENV de que as coinfeções poderiam desencadear piora dos desfechos clínicos, o perfil metabólico dos pacientes coinfectados analisados neste estudo é mais similar às formas não graves da dengue e da COVID-19.

Tabela 8. Metabólitos observados em níveis semelhantes nos casos de COINFEÇÃO e infecções isoladas.

COINFEÇÃO DENGUE COVID-19	Fenilalanina
	N-(1-Desoxi-1-frutósil)leucina/isoleucina
	5-HEPE/8-HEPE
	Fitoesfingosina
	Esfinganina
	LPC 14:0/0:0
	PS 20:3/20:0
	PS 23:4
	PA 32:2
	PA 38:5
	Bilirrubina
COINFEÇÃO DENGUE	N2-(2-Carboximetil-2-hidroxissuccinol)arginina
	Ácido cólico
	Ácido taurocólico
	Ácido glicocólico
	Ácido glicodeoxicólico
	20-HETE
	LPC 0:0/16:0
COINFEÇÃO COVID-19	Leucotrieno B4
	LPC 0:0/20:4
COINFEÇÃO COVID-19 grave	Tirosina
	LPC 16:1/0:0

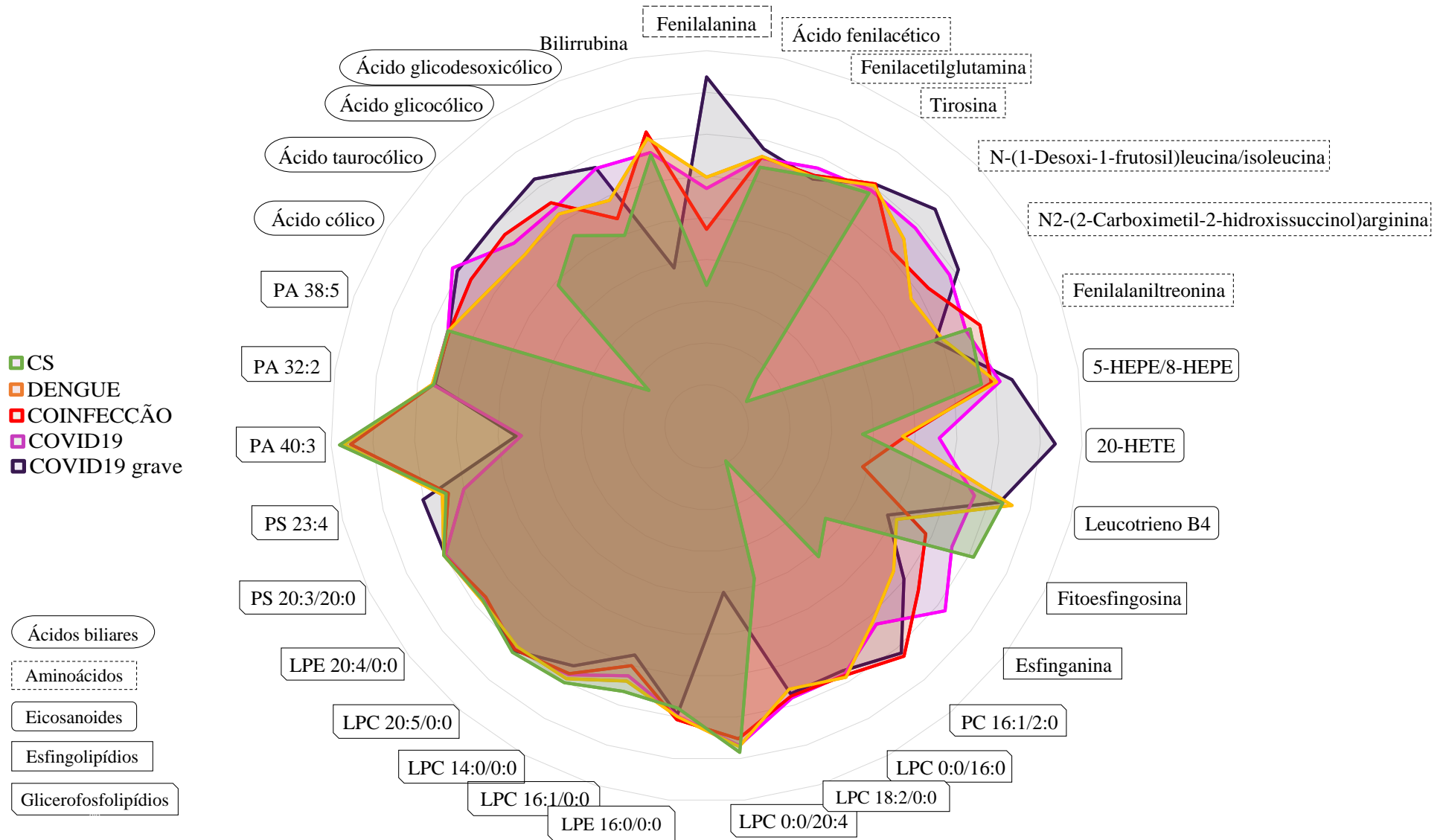


Figura 22. Gráfico de radar ilustrando um panorama geral das alterações metabólicas encontradas para cada grupo.

As principais limitações deste estudo incluem o tamanho reduzido do conjunto amostral, bem como a avaliação de um subconjunto restrito de metabólitos putativos, o que pode limitar a generalização dos resultados. Embora o Distrito Federal tenha registrado mais de 71,4 mil casos de dengue e mais de 519 mil casos de COVID-19 entre 2020 e 2021 (SVS/SES-DF, 2020, 2021, 2021a), período de coleta das amostras, o acesso a material biológico adequado para as análises metabolômicas foi limitado por diversos fatores. Apesar da ampla possibilidade de obtenção de amostras e da dedicação de profissionais de saúde, professores, estudantes e servidores altamente capacitados, além do interesse de centenas de pacientes em contribuir para os estudos do PPGCM/UnB e HUB/UnB, mesmo em situação de grande fragilidade, limitações de infraestrutura e gestão comprometeram o acesso a amostras biológicas adequadas para estudos metabolômicos.

Foram enfrentadas limitações de infraestrutura para armazenamento, processamento, e análises das amostras de soro, bem como para análise dos dados adquiridos. A instabilidade elétrica na UnB afetou o funcionamento de congeladores, sistemas de climatização, o espectrômetro de massas do Laboratório de Farmacognosia/UnB, entre outros. A manutenção desses equipamentos enfrentou dificuldades devido à pandemia, incluindo restrições de deslocamento das equipes técnicas e atrasos na importação de peças para reparo. Como consequência, foi necessário recorrer à USP-RP para a aquisição de dados, onde o tempo limitado de uso de equipamentos permitiu a análise apenas no modo positivo. Além disso, a capacidade computacional dos sistemas disponíveis representou um obstáculo significativo para o processamento dos dados adquiridos.

Adicionalmente, a comunicação e coordenação entre os centros de saúde, a Universidade e os diferentes Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs), agravadas pela sobrecarga dos sistemas de saúde durante a pandemia, dificultaram o acesso oportuno aos pacientes. A necessidade de distanciamento social e o clima de insegurança também impactaram a coleta de amostras a nível domiciliar, a principal forma de coleta de amostras com perfis metabólicos íntegros.

A coleta de amostras de coinfeção SARS-CoV-2/DENV apresentou entraves adicionais por ser um diagnóstico de baixa incidência, dificultado por similaridade dos sintomas e possibilidade de reações sorológicas cruzadas. Além disso, a maioria dos casos de coinfeção relatados na literatura se basearam nas evidências clínicas e nos testes confirmatórios NS1 ou IgM ELISA, que são mais frequentemente usados na clínica, mas um desenho experimental incorporando o teste RT-PCR para DENV deve ser considerado para estudos futuros, por ser um questionamento frequente em publicações científicas.

O reduzido tamanho amostral pode ter aumentado o impacto da variabilidade interindividual entre os pacientes, influenciada por fatores como idade, sexo, comorbidades, gravidade da doença e histórico de tratamentos, o que pode mascarar sinais metabólicos relevantes e dificultar a identificação de biomarcadores consistentes. Com a limitação no uso das amostras de rotina hospitalar, as proporções de sexo, idade e outras características demográficas ficaram mais desequilibradas na composição amostral, o que contribui para o aumento da heterogeneidade dos dados e, possivelmente, falta de significância estatística na análise dos níveis de alguns metabólitos.

Além disso, estudos metabolômicos que avaliam infecções frequentemente apresentam perfis heterogêneos devido à ampla variação nas metodologias analíticas utilizados, o que torna a comparação entre resultados desafiadora. Apesar disso, os achados do presente estudo para DENGUE, COVID-19 e COVID-19 grave estão alinhados com a maior parte das evidências reportadas na literatura, que indicam alterações predominantes no metabolismo de lipídios e aminoácidos.

Apesar destas limitações, este é o primeiro estudo que traz dados experimentais coinfectados com SARS-CoV-2 e DENV, contribuindo com indícios sobre as alterações metabólicas e impactos fisiopatológicos desta coinfeção. Este estudo pode embasar estudos subsequentes, avaliando esta ou outras coinfeções, com expansão do número de metabólitos analisados ou quantificação de metabólitos específicos.

Contudo, o acesso a novas amostras de coinfeção SARS-CoV-2 e DENV encontrará uma série de limitações. A conjuntura única entre 2020 e 2021, marcada pela alta incidência tanto de COVID-19 quanto de dengue, permitiu o acesso a amostras de pacientes coinfectados, apesar de todos os obstáculos. Espera-se que um cenário similar a este não se repita. Desta forma, este estudo pode fundamentar e direcionar futuras investigações considerando outras coinfeções, especialmente de doenças endêmicas no Brasil.

4.4. CONCLUSÃO

Neste capítulo, foram analisadas 64 amostras de soro, identificadas como “amostras UnB”, classificadas nos seguintes grupos: controles saudáveis (CS) (n = 6), DENGUE (n = 13), coinfeção SARS-CoV-2/DENV (n = 7), COVID-19 não grave (n = 27) e COVID-19 grave (n = 11). Foi aplicada metabolômica não direcionada para comparar as variações no perfil metabólico entre pacientes coinfectados e aqueles com infecções isoladas. As análises por PCA (análise de componentes principais) e PLS-DA (análise discriminante por mínimos quadrados parciais) permitiram visualizar o agrupamento e classificação das amostras demonstrando separação entre os cinco grupos estudados, sugerindo alterações metabólicas distintas. Um total de 31 metabólitos putativos foram anotados, com destaque para os aminoácidos e derivados, ácidos biliares e lipídios, como PA 40:3 (*phosphatidic acid*) e LPC 0:0/16:0 (*lysophosphatidylcholine*), glicerofosfolipídios envolvidos na resposta inflamatória. Os resultados não sugerem uma resposta inflamatória mais exacerbada como consequência de coinfeções SARS-CoV-2/DENV. Observou-se que a coinfeção apresentou um perfil metabólico que compartilhava mais características de dengue e COVID-19 não grave, com maior similaridade com a dengue, sugerindo que a infecção concomitante por SARS-CoV-2 e DENV não acarreta desfechos clínicos mais severos.

Apesar do metaboloma de pacientes com infecções virais serem reportados com maior frequência por estudos metabolômicos não dirigidos, estes resultados podem embasar estudos subsequentes de metabolômica direcionada a fim de quantificar metabólitos específicos. Além disso, podem direcionar novas investigações em cenários específicos de coinfeção, como por exemplo, o de coinfeções de doenças endêmicas, que podem gerar dados particularmente brasileiros. A literatura traz raros registros de estudos experimentais de coinfeções. Esta tese de doutorado apresenta o primeiro estudo experimental de coinfeção SARS-CoV-2/DENV.

5. CAPÍTULO III

5.1. OBJETIVO GERAL

Descrever os trabalhos desenvolvidos ao longo do doutorado, que abordaram diferentes aspectos do impacto da COVID-19 no Distrito Federal. Estes estudos foram feitos no contexto do grupo de pesquisa formado no início da pandemia, pelo Hospital Universitário de Brasília, envolvendo o Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. Alguns estudos foram realizados com as amostras da rotina hospitalar, e outros com amostras de sangue coletadas pelos autores das próprias teses de doutorado. A pesquisa inclui o estudo do perfil de mediadores inflamatórios em pacientes com COVID-19 grave, perfil de mediadores inflamatórios em pacientes gestantes, perfil de coagulação de pacientes com COVID-19, saúde mental de profissionais de saúde do HUB, e coinfeção COVID-19/hanseníase. A participação em todos estes estudos compôs o conhecimento técnico-científico formado neste período de doutoramento, ampliando o entendimento das diferentes doenças, incluindo coinfeções. Este conhecimento contribuiu em revelar as alterações metabólicas observadas entre a coinfeção SARS-CoV-2/DENV e as infecções isoladas.

5.2. ARTIGOS PUBLICADOS, SUBMETIDOS E EM ELABORAÇÃO ENVOLVENDO O ESTUDO DA COVID-19

5.2.1. COVID-19 e coinfeções

SARS-CoV-2/DENV coinfection: a series of cases from Midwestern Brazil

BMC Infectious Diseases (2021)

doi: 10.1186/s12879-021-06456-2

Resumo: Background: Since the novel coronavirus disease outbreak, over 179.7 million people have been infected by SARS-CoV-2 worldwide, including the population living in dengue-endemic regions, particularly Latin America and Southeast Asia, raising concern about the impact of possible co-infections. Methods: Thirteen SARS-CoV-2/DENV co-infection cases reported in Midwestern Brazil between April and September of 2020 are described. Information was gathered from hospital medical records regarding the most relevant clinical and laboratory findings, diagnostic process, therapeutic interventions, together with clinician-assessed outcomes and follow-up. Results: Of the 13 cases, seven patients presented Acute Undifferentiated Febrile Syndrome and six had pre-existing co-morbidities, such as diabetes,

hypertension and hypopituitarism. Two patients were pregnant. The most common symptoms and clinical signs reported at first evaluation were myalgia, fever and dyspnea. In six cases, the initial diagnosis was dengue fever, which delayed the diagnosis of concomitant infections. The most frequently applied therapeutic interventions were antibiotics and analgesics. In total, four patients were hospitalized. None of them were transferred to the intensive care unit or died. Clinical improvement was verified in all patients after a maximum of 21 days. Conclusions: The cases reported here highlight the challenges in differential diagnosis and the importance of considering concomitant infections, especially to improve clinical management and possible prevention measures. Failure to consider a SARS-CoV-2/DENV co-infection may impact both individual and community levels, especially in endemic areas.

Enhanced IL-6 and IL-12B Gene Expression After SARS-CoV-2 Infection in Leprosy Patients May Increase the Risk of Neural Damage

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene (2021)

doi: 10.4269/ajtmh.21-0034

Resumo: Experts have called attention to the possible negative impact of the coronavirus disease 2019 (COVID-19)-related cytokine storm syndrome on the progression of leprosy-related disabilities. We assessed the frequency of reactional states in patients co-infected with *Mycobacterium leprae* and severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus (CoV) 2 (SARS-CoV-2). We consecutively included patients during the first peak of the COVID-19 epidemic in Brazil and analyzed the expressions of genes encoding interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12A, IL-12B, and tumor necrosis factor- α in peripheral blood mononuclear cells. We included 64 leprosy patients and 50 controls. Twelve of the leprosy patients and 14 of the controls had been diagnosed with COVID-19. Co-infection was associated with increased IL-6 ($P = 0.043$) and IL-12B ($P = 0.017$) expression. The median disability grades were higher for leprosy/COVID-19 patients; however, the difference was not significant ($P = 0.194$). Patients co-infected with *M. leprae* and SARS-CoV-2 may experience a higher-grade proinflammatory state.

5.2.2. COVID-19 e mediadores imunológicos solúveis

Unbalanced networks and disturbed kinetics of serum soluble mediators associated with distinct disease outcomes in severe COVID-19 patients

Frontiers in Immunology (2022)

doi: 10.3389/fimmu.2022.1004023

Resumo: The present study applied distinct models of descriptive analysis to explore the integrative networks and the kinetic timeline of serum soluble mediators to select a set of systemic biomarkers applicable for the clinical management of COVID-19 patients. For this purpose, a total of 246 participants (82 COVID-19 and 164 healthy controls - HC) were enrolled in a prospective observational study. Serum soluble mediators were quantified by high-throughput microbeads array on hospital admission (D0) and at consecutive timepoints (D1-6 and D7-20). The results reinforce that the COVID-19 group exhibited a massive storm of serum soluble mediators. While increased levels of CCL3 and G-CSF were associated with the favorable prognosis of non-mechanical ventilation (nMV) or discharge, high levels of CXCL10 and IL-6 were observed in patients progressing to mechanical ventilation (MV) or death. At the time of admission, COVID-19 patients presented a complex and robust serum soluble mediator network, with a higher number of strong correlations involving IFN- γ , IL-1Ra and IL-9 observed in patients progressing to MV or death. Multivariate regression analysis demonstrates the ability of serum soluble mediators to cluster COVID-19 from HC. Ascendant fold change signatures and the kinetic timeline analysis further confirmed that the pairs "CCL3 and G-CSF" and "CXCL10 and IL-6" were associated with favorable or poor prognosis, respectively. A selected set of systemic mediators (IL-6, IFN- γ , IL-1Ra, IL-13, PDGF and IL-7) were identified as putative laboratory markers, applicable as complementary records for the clinical management of patients with severe COVID-19.

5.2.3. COVID-19 e os efeitos na gestação

Panoramic overview of serum soluble mediators in convalescent COVID-19 at distinct pregnancy trimesters

Frontiers in Immunology (2023)

doi: 10.3389/fimmu.2023.1176898

Resumo: Introduction: SARS-CoV-2 infection during pregnancy can induce changes in the maternal immune response, with effects on pregnancy outcome and offspring. This is a cross-

sectional observational study designed to characterize the immunological status of pregnant women with convalescent COVID-19 at distinct pregnancy trimesters. The study focused on providing a clear snapshot of the interplay among serum soluble mediators. Methods: A sample of 141 pregnant women from all prenatal periods (1st, 2nd and 3rd trimesters) comprised patients with convalescent SARS-CoV-2 infection at 3-20 weeks after symptoms onset (COVID, n=89) and a control group of pre-pandemic non-infected pregnant women (HC, n=52). Chemokine, pro-inflammatory/regulatory cytokine and growth factor levels were quantified by a high-throughput microbeads array. Results: In the HC group, most serum soluble mediators progressively decreased towards the 2nd and 3rd trimesters of pregnancy, while higher chemokine, cytokine and growth factor levels were observed in the COVID patient group. Serum soluble mediator signatures and heatmap analysis pointed out that the major increase observed in the COVID group related to pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ and IL-17). A larger set of biomarkers displayed an increased COVID/HC ratio towards the 2nd (3x increase) and the 3rd (3x to 15x increase) trimesters. Integrative network analysis demonstrated that HC pregnancy evolves with decreasing connectivity between pairs of serum soluble mediators towards the 3rd trimester. Although the COVID group exhibited a similar profile, the number of connections was remarkably lower throughout the pregnancy. Meanwhile, IL-1Ra, IL-10 and GM-CSF presented a preserved number of correlations (≥ 5 strong correlations in HC and COVID), IL-17, FGF-basic and VEGF lost connectivity throughout the pregnancy. IL-6 and CXCL8 were included in a set of acquired attributes, named COVID-selective (≥ 5 strong correlations in COVID and < 5 in HC) observed at the 3rd pregnancy trimester. Discussion and conclusion: From an overall perspective, a pronounced increase in serum levels of soluble mediators with decreased network interplay between them demonstrated an imbalanced immune response in convalescent COVID-19 infection during pregnancy that may contribute to the management of, or indeed recovery from, late complications in the post-symptomatic phase of the SARS-CoV-2 infection in pregnant women.

Systemic and cerebrospinal fluid immune mediators coordinate a dichotomic microenvironment in parturients with acute or convalescent phases of COVID-19

Submetido à revista *Inflammation Research*.

5.2.4. COVID-19 e coagulação

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

PLoS One (2022)

doi: 10.1371/journal.pone.0262600

Resumo: In patients with severe forms of COVID-19, thromboelastometry has been reported to display a hypercoagulant pattern. However, an algorithm to differentiate severe COVID-19 patients from nonsevere patients and healthy controls based on thromboelastometry parameters has not been developed. Forty-one patients over 18 years of age with positive qRT-PCR for SARS-CoV-2 were classified according to the severity of the disease: nonsevere (NS, n = 20) or severe (S, n = 21). A healthy control (HC, n = 9) group was also examined. Blood samples from all participants were tested by extrinsic (EXTEM), intrinsic (INTEM), non-activated (NATEM) and functional assessment of fibrinogen (FIBTEM) assays of thromboelastometry. The thrombodynamic potential index (TPI) was also calculated. Severe COVID-19 patients exhibited a thromboelastometry profile with clear hypercoagulability, which was significantly different from the NS and HC groups. Nonsevere COVID-19 cases showed a trend to thrombotic pole. The NATEM test suggested that nonsevere and severe COVID-19 patients presented endogenous coagulation activation (reduced clotting time and clot formation time). TPI data were significantly different between the NS and S groups. The maximum clot firmness profile obtained by FIBTEM showed moderate/elevated accuracy to differentiate severe patients from NS and HC. A decision tree algorithm based on the FIBTEM-MCF profile was proposed to differentiate S from HC and NS. Thromboelastometric parameters are a useful tool to differentiate the coagulation profile of nonsevere and severe COVID-19 patients for therapeutic intervention purposes.

5.2.5. COVID-19 e saúde mental

Impact of COVID-19 on the mental health of public university hospital workers in Brazil: A cohort-based analysis of 32,691 workers

PLoS One (2022)

doi: 10.1371/journal.pone.0269318

Resumo: Background: In early 2020, the COVID-19 pandemic paralyzed the world and exposed the fragility of health systems in the face of mass illness. Health professionals became

protagonists, fulfilling their mission at the risk of physical and mental illness. The study aimed to evaluate absenteeism indirectly related to SARS-CoV-2 infection in a large population of health care professionals. Methods: An observational longitudinal repeated measures study was performed, including workers linked to 40 public university hospitals in Brazil. All causes of absenteeism were analyzed, focusing on those not directly attributed to COVID-19. Results for the same population were compared over two equivalent time intervals: prepandemic and during the pandemic. Findings: A total of 32,691 workers were included in the study, with health professionals comprising 82.5% of the sample. Comparison of the periods before and during the pandemic showed a 26.6% reduction in work absence for all causes, except for COVID-19 and mental health-related absence. Concerning work absence related to mental health, the odds ratio was 39.0% higher during the pandemic. At the onset of the pandemic, there was an increase in absenteeism (all causes), followed by a progressive reduction until the end of the observation period. Interpretation: Work absence related to mental illness among health care professionals increased during the COVID-19 pandemic, highlighting the need for health care managers to prioritize and implement support strategies to minimize absenteeism.

5.2.6. COVID-19 e expressão gênica

Differential Circulating Levels of miR-92a In Patients with SARS-CoV-2 Infection

Submetido à revista Clinics

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A circulação concomitante do SARS-CoV-2 e do DENV levantou preocupações sobre seus impactos na saúde pública, incluindo a possibilidade de coinfeções. Questionamentos foram levantados em relação à semelhança entre os sintomas das duas doenças, o risco de reatividade cruzada em testes diagnósticos, e o impacto destes fatores no diagnóstico diferencial e consequente manejo clínico das coinfeções SARS-CoV-2/DENV. Além disso, foram colocadas preocupações em relação ao impacto de uma infecção concomitante com ambos os vírus nas manifestações e desfechos clínicos. Esses fatores levantaram a necessidade de estudos que elucidem as características clínicas, epidemiológicas e fisiopatológicas das coinfeções.

O Capítulo I desta tese apresentou uma série de 13 casos de coinfeção SARS-CoV-2/DENV diagnosticados no Hospital Universitário de Brasília, detalhando os desafios do diagnóstico diferencial e manejo clínico, além de aspectos epidemiológicos e sociais. A análise desses casos destacou a dificuldade de diagnóstico devido à sobreposição de sintomas e a necessidade de maior vigilância para melhorar a identificação precoce de coinfeções. Além disso, foram destacadas possíveis consequências do erro de diagnóstico, que pode acarretar intervenções medicamentosas inadequadas com prescrição de anticoagulantes, frequentemente usados na COVID-19, para pacientes com dengue, aumentando risco de trombocitopenia e eventos hemorrágicos.

Adicionalmente, foram discutidos possíveis impactos da coinfeção SARS-CoV-2/DENV no desfecho clínico dos pacientes. A literatura relata a inclusão desta série de casos em duas revisões sistemáticas sobre os impactos da coinfeção, que sugeriram piora dos desfechos clínicos em relação às infecções isoladas. Entretanto, estas revisões ressaltam também o viés da prevalência de comorbidades nos casos de coinfeção. Os 13 casos descritos no Capítulo I não indicam piora do desfecho clínico.

No Capítulo II, a aplicação da metabolômica não direcionada permitiu caracterizar as diferenças metabólicas entre pacientes com dengue, coinfeção SARS-CoV-2/DENV, COVID-19 e COVID-19 grave. As análises por PCA e PLS-DA mostraram uma separação clara entre os grupos, sugerindo alterações metabólicas distintas, com destaque para 31 metabólitos putativos incluindo aminoácidos, ácidos biliares e lipídios, como PA 40:3 e LPC 0:0/16:0, glicerofosfolipídios envolvidos na resposta inflamatória. Notavelmente, os pacientes coinfectados apresentaram um perfil metabólico mais próximo ao de pacientes com dengue e COVID-19 não grave, sugerindo que a coinfeção não leva a uma resposta inflamatória mais

exacerbada ou a desfechos clínicos mais graves. Esses achados fornecem uma base valiosa para futuras pesquisas direcionadas à quantificação de metabólitos específicos e à investigação de coinfeções em cenários de doenças endêmicas, especialmente no Brasil, onde tais coinfeções podem ser mais frequentes.

Por fim, o Capítulo III reuniu artigos desenvolvidos ao longo do período de doutoramento, que exploraram diversos aspectos do impacto da COVID-19 no Distrito Federal. Esses estudos, conduzidos em conjunto com o grupo de pesquisa do Hospital Universitário de Brasília em colaboração com o Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UnB, investigaram temas como mediadores inflamatórios em pacientes com COVID-19 grave e gestantes, perfil de coagulação, saúde mental de profissionais de saúde, e coinfeções como COVID-19/hanseníase. A participação em todos estes estudos compôs o conhecimento técnico-científico formado neste período de doutoramento, ampliando o entendimento das diferentes doenças, incluindo coinfeções. Este conhecimento adquirido contribuiu para elucidar as alterações metabólicas observadas entre a coinfeção SARS-CoV-2/DENV e as infecções isoladas.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, K. et al. Morbidity and Mortality Weekly Report Prevalence of SARS-CoV-2 and Influenza Coinfection and Clinical Characteristics Among Children and Adolescents Aged <18 Years Who Were Hospitalized or Died with Influenza-United States, 2021-22 Influenza Season. **US Department of Health and Human Services/Centers for Disease Control and Prevention**, 2022.

AGUDELO-ROJAS, O. L. et al. Co-Infection between Dengue Virus and SARS-CoV-2 in Cali, Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 3, p. 536–541, 2023.

AIRES, R. B. et al. Thromboelastometry demonstrates endogenous coagulation activation in nonsevere and severe COVID-19 patients and has applicability as a decision algorithm for intervention. **PLOS ONE**, v. 17, n. 1, p. e0262600, 14 jan. 2022.

ALCALÁ, A. C.; LUDERT, J. E. The dengue virus NS1 protein; new roles in pathogenesis due to similarities with and affinity for the high-density lipoprotein (HDL)? **PLoS Pathogens**, v. 19, n. 8 August, 1 ago. 2023.

ALHUMAID, S. et al. Coinfections with bacteria, fungi, and respiratory viruses in patients with sars-cov-2: A systematic review and meta-analysis. **Pathogens**, v. 10, n. 7, 1 jul. 2021.

AL-KURAIISHY, H. M. et al. Role of leukotriene pathway and montelukast in pulmonary and extrapulmonary manifestations of Covid-19: The enigmatic entity. **European Journal of Pharmacology**, v. 904, 5 ago. 2021.

ALSEEKH, S. et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. **Nature Methods**, v. 18, n. 7, p. 747–756, 1 jul. 2021.

ARCHAMBAULT, A.-S. et al. Lipid storm within the lungs of severe COVID-19 patients: Extensive levels of cyclooxygenase 2 and lipoxygenase-derived inflammatory metabolites. **medRxiv**, 2020.

ARIF, S. et al. A Case of Triple-Infection with SARS-CoV-2, Chikungunya, and Dengue Fever in a Returning Traveler. **Private Practice Infectious Disease**, v. 3, n. 1, 31 mar. 2023.

ASHRAFIAN, H. et al. Metabolomics: The Stethoscope for the Twenty-First Century. **Medical Principles and Practice**, v. 30, n. 4, p. 301–310, 1 ago. 2021.

ATILA, A. et al. The serum amino acid profile in COVID-19. **Amino Acids**, v. 53, n. 10, p. 1569–1588, 1 out. 2021.

BADOLATO-CORRÊA, J. et al. Human T cell responses to Dengue and Zika virus infection compared to Dengue/Zika coinfection. **Immunity Inflammation and Disease**, v. 6, n. 2, p. 194–206, 1 jun. 2018.

BALMASEDA, A. et al. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 3, p. 449–456, 1 mar. 2006.

BARROS-AREAL, A. F. et al. Impact of COVID-19 on the mental health of public university hospital workers in Brazil: A cohort-based analysis of 32,691 workers. **PLoS ONE**, v. 17, n. 6, 1 jun. 2022.

BHARDWAJ, A. et al. COVID-19: Immunology, Immunopathogenesis and Potential Therapies. **International Reviews of Immunology**, v. 41, n. 2, p. 171–206, 2021.

BHATIA, V.; KAUL, U. Dengue fever, thrombocytopenia and management issues in post-coronary stenting patients. **AsiaIntervention**, p. 99–102, 2017.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 25 abr. 2013.

BICUDO, N. et al. Co-infection of SARS-CoV-2 and dengue virus: a clinical challenge. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 2020.

BLAŽENović, I. et al. Software tools and approaches for compound identification of LC-MS/MS data in metabolomics. **Metabolites**, v. 8, n. 2, 1 jun. 2018.

BLEIJERVELD, O. B. et al. Metabolipidomics: Profiling metabolism of glycerophospholipid species by stable isotopic precursors and tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 352, n. 1, p. 1–14, 1 maio 2006.

BLIDDAL, S. et al. Acute and persistent symptoms in non-hospitalized PCR-confirmed COVID-19 patients. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

BUESCHL, C. et al. Tidy-Direct-to-MS: An Open-Source Data-Processing Pipeline for Direct Mass Spectrometry-Based Metabolomics Experiments. **Journal of Proteome Research**, 2023.

BUTT, M. H. et al. Dengue fever and COVID-19 coinfection; a threat to public health for coepidemic in Pakistan. **Journal of Medical Virology**, 5 out. 2020.

BYERS, N. M. et al. Metabolomic Insights into Human Arboviral Infections: Dengue, Chikungunya, and Zika Viruses. **Viruses 2019, Vol. 11, Page 225**, v. 11, n. 3, p. 225, 6 mar. 2019.

CALDER, P. C. n3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases 1-3. **Am J Clin Nutr**, 2006.

CARDONA-OSPINA, J. A. et al. Dengue and COVID-19, overlapping epidemics? An analysis from Colombia. **Journal of Medical Virology**, p. jmv.26194, 11 jul. 2020.

CAROSELLA, L. et al. Characteristics of Patients Co-infected with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 and Dengue Virus, Buenos Aires, Argentina, March–June 2020. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 2, 1 set. 2021.

CARRARO, P.; ZAGO, T.; PLEBANI, M. Exploring the initial steps of the testing process: Frequency and nature of pre-analytic errors. **Clinical Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 638–642, mar. 2012.

CASTAÑÉ, H. et al. Machine learning and semi-targeted lipidomics identify distinct serum lipid signatures in hospitalized COVID-19-positive and COVID-19-negative patients. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 131, 1 jun. 2022.

CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (CDC). **Clinical Care of Dengue**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dengue/hcp/clinical-care/index.html>>. Acesso em: 21 ago. 2024a.

CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (CDC). **Clinical Features of Dengue**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dengue/hcp/clinical-signs/index.html>>. Acesso em: 9 set. 2024b.

CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (CDC). **Symptoms of COVID-19 | CDC**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/covid/signs-symptoms/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>. Acesso em: 20 ago. 2024.

CHAN, H. B. Y.; HOW, C. H.; NG, C. W. M. Definitive tests for dengue fever: When and which should I use? **Singapore Medical Journal**, v. 58, n. 11, p. 632–635, 1 nov. 2017.

CHAO, C. H. et al. Dengue virus nonstructural protein 1 activates platelets via Toll-like receptor 4, leading to thrombocytopenia and hemorrhage. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 4, 2019.

CHEBI. **CHEBI:145032 - 20-HETE methyl ester**. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:145032>>. Acesso em: 23 set. 2024.

CHEKURI, S. et al. SARS-CoV-2 coinfection with additional respiratory virus does not predict severe disease: A retrospective cohort study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, p. III12–III19, 1 set. 2021.

CHEN, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, fev. 2020.

CHEN, R. et al. Cytokine Storm: The Primary Determinant for the Pathophysiological Evolution of COVID-19 Deterioration. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 28 abr. 2021.

CHEN, Y. et al. Measuring the effects of COVID-19-related disruption on dengue transmission in southeast Asia and Latin America: a statistical modelling study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 657–667, 1 maio 2022.

CHRISTI, W. W.; HARWOO, J. L. Oxidation of polyunsaturated fatty acids to produce lipid mediators. **Essays in Biochemistry**, v. 64, n. 3, p. 401–421, 2020.

CHUNG, M. et al. CT imaging features of 2019 novel coronavirus (2019-NCoV). **Radiology**, v. 295, n. 1, p. 202–207, 2020.

CLARK, S. et al. Stability of plasma analytes after delayed separation of whole blood: Implications for epidemiological studies. **International Journal of Epidemiology**, v. 32, n. 1, p. 125–130, fev. 2003.

COUTINHO-DA-SILVA, M. S. et al. Serum Soluble Mediator Profiles and Networks During Acute Infection With Distinct DENV Serotypes. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 31 maio 2022.

CUI, L. et al. Serum Metabolome and Lipidome Changes in Adult Patients with Primary Dengue Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, 2013.

CUI, L. et al. Serum metabolome changes in adult patients with severe dengue in the critical and recovery phases of dengue infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2018.

DA COSTA, E. et al. High-Resolution Lipidomics of the Early Life Stages of the Red Seaweed *Porphyra dioica*. **Molecules**, v. 23, n. 1, 2018.

DA SILVA, K. et al. **TYROSINE Mass Spectrum**. Disponível em: <https://massbank.eu/MassBank/RecordDisplay?id=MSBNK-Antwerp_Univ-METOX_P103603_EF88>. Acesso em: 27 ago. 2024.

DALUGAMA, C.; SENEVIRATNE, S. L. Dengue and COVID-19 co-infections: an important consideration in the tropics. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 117, n. 4, p. 241–254, 1 abr. 2023.

DANWANG, C. et al. Outcomes of patients with HIV and COVID-19 co-infection: a systematic review and meta-analysis. **AIDS Research and Therapy**, v. 19, n. 1, 1 dez. 2022.

DARIF, D. et al. The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong? **Microbial Pathogenesis**, v. 153, p. 104799, 1 abr. 2021.

DASILVA, G. et al. Non-targeted LC-MS/MS assay for screening over 100 lipid mediators from ARA, EPA, and DHA in biological samples based on mass spectral fragmentations. **Molecules**, v. 24, n. 12, 2019.

DE OLIVEIRA, É. C. L. et al. Hematological abnormalities in patients with dengue. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2009.

DELAFIORI, J. et al. Covid-19 Automated Diagnosis and Risk Assessment through Metabolomics and Machine Learning. **Analytical Chemistry**, v. 93, n. 4, p. 2471–2479, 2 fev. 2021.

DELOREY, T. M. et al. COVID-19 tissue atlases reveal SARS-CoV-2 pathology and cellular targets. **Nature**, v. 595, n. 7865, p. 107–113, 1 jul. 2021.

DESAI, A. D. et al. Long-term complications of COVID-19. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 322, n. 1, p. C1–C11, 1 jan. 2022.

DJOUMBOU FEUNANG, Y. et al. ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. **Journal of Cheminformatics**, v. 8, n. 1, p. 1–20, 4 nov. 2016.

DÜHRKOP, K. et al. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. **Nature Methods**, v. 16, n. 4, p. 299–302, 1 abr. 2019.

DÜHRKOP, K. et al. Systematic classification of unknown metabolites using high-resolution fragmentation mass spectra. **Nature Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 462–471, 1 abr. 2021.

EIGENVECTOR RESEARCH. **Advanced Preprocessing: Sample Normalization**. Disponível em: <https://wiki.eigenvector.com/index.php?title=Advanced_Preprocessing:_Sample_Normalization>. Acesso em: 15 set. 2024.

EIGENVECTOR RESEARCH. **Evaluating Models: Hating on R-squared**. Disponível em: <<https://eigenvector.com/%EF%BF%BCevaluating-models-hating-on-r-squared/>>. Acesso em: 15 set. 2024.

EIGENVECTOR RESEARCH. **Xgbda**. Disponível em: <<https://wiki.eigenvector.com/index.php?title=Xgbda>>. Acesso em: 19 set. 2024.

FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S. RefMet: a reference nomenclature for metabolomics. **Nature Methods**, v. 17, n. 12, p. 1173–1174, 1 dez. 2020.

FELDMAN, C.; ANDERSON, R. The role of co-infections and secondary infections in patients with COVID-19. **Pneumonia**, v. 13, n. 1, dez. 2021.

FERNANDES, G. M. et al. Pregnancy outcomes and child development effects of SARS-CoV-2 infection (PROUDEST Trial): Protocol for a multicenter, prospective cohort study. **JMIR Research Protocols**, v. 10, n. 4, 1 abr. 2021.

FERREIRA, D. L. S. et al. The effect of pre-analytical conditions on blood metabolomics in epidemiological studies. **Metabolites**, v. 9, n. 4, 1 abr. 2019.

FUCHS, B. **Mass spectrometry and inflammation - MS methods to study oxidation and enzyme-induced changes of phospholipids**. Analytical and Bioanalytical Chemistry. **Anais...** fev. 2014.

FUNK, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. **Science**, v. 294, p. 1871–1875, 2021.

GAUGLITZ, J. M. et al. Reference data based insights expand understanding of human metabolomes. **bioRxiv**, 2020.

GEBREMARIAM, T. T. et al. Increasing prevalence of malaria and acute dengue virus coinfection in Africa: a meta-analysis and meta-regression of cross-sectional studies. **Malaria Journal**, v. 22, n. 1, 1 dez. 2023.

GONG, Z. et al. Quantification of bilirubin from dry blood spots using tandem mass spectrometry. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 19701–19706, 2018.

GOODWIN, J. S. et al. Mechanism of Action of Glucocorticosteroids Inhibition of T Cell Proliferation and Interleukin 2 Production by Hydrocortisone Is Reversed by Leukotriene B4. **Journal of Clinical Investigation**, v. 77, p. 1244–1250, 1985.

GRASSELLI, G. et al. Risk Factors Associated with Mortality among Patients with COVID-19 in Intensive Care Units in Lombardy, Italy. **JAMA Internal Medicine**, 2020.

GRAY, N. et al. High-Speed Quantitative UPLC-MS Analysis of Multiple Amines in Human Plasma and Serum via Precolumn Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate: Application to Acetaminophen-Induced Liver Failure. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 2478–2487, 21 fev. 2017.

GUAN, Z. et al. Impact of Coinfection With SARS-CoV-2 and Influenza on Disease Severity: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Public Health**, v. 9, 10 dez. 2021.

HALSTEAD, S. B.; COHEN, S. N. Dengue Hemorrhagic Fever at 60 Years: Early Evolution of Concepts of Causation and Treatment. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 281–291, set. 2015.

HARIADI, P. et al. Coinfection with SARS-CoV-2 and dengue virus: a case report. **Front. Trop. Dis.**, 2022.

HORAI, H. et al. MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 45, n. 7, p. 703–714, 2010.

HOTTZ, E. D. et al. Platelet function in HIV plus dengue coinfection associates with reduced inflammation and milder dengue illness. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

HUANG, S. S. et al. Phenylalanine- and leucine-defined metabolic types identify high mortality risk in patients with severe infection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 85, p. 143–149, 1 ago. 2019.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Phenylacetic acid**. Disponível em: <<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000209>>. Acesso em: 2 set. 2024.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0000619)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/29421>. Acesso em: 16 jul. 2024a.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **LC-MS/MS Spectrum - 35V, Positive (HMDB0000138)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2240972>. Acesso em: 16 jul. 2024b.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0000036)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2248796>. Acesso em: 16 jul. 2024c.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0000036)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2247603>. Acesso em: 16 jul. 2024d.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 40V, Positive (HMDB0000054)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2351766>. Acesso em: 16 jul. 2024e.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **LC-MS/MS Spectrum - 30V, Positive (HMDB0006344)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2236048>. Acesso em: 15 set. 2024f.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0000209)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/178594>. Acesso em: 15 set. 2024g.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **LC-MS/MS Spectrum - LC-ESI-QQ (API3000, Applied Biosystems) 30V, Positive (HMDB0000159)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/3210>. Acesso em: 15 set. 2024h.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0112625)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2972356>. Acesso em: 17 jul. 2024i.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0265812)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/3202058>. Acesso em: 17 jul. 2024j.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 40V, Positive (HMDB0265813)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/3163740>. Acesso em: 17 jul. 2024k.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0114779)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/1319723>. Acesso em: 17 jul. 2024l.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0114946)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/1275704>. Acesso em: 17 jul. 2024m.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Showing metabocard for PA(18:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)) (HMDB0114886)**. Disponível em: <<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0114886>>. Acesso em: 18 jul. 2024n.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Showing metabocard for PA(16:0/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)) (HMDB0114847)**.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Showing metabocard for PA(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)/16:0) (HMDB0115352)**. Disponível em: <<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0115352>>. Acesso em: 18 jul. 2024p.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Showing metabocard for PA(18:1(11Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)) (HMDB0114909)**. Disponível em: <<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0114909>>. Acesso em: 18 jul. 2024q.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0060053)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/1300160>. Acesso em: 16 jul. 2024r.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0005081)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/316553>. Acesso em: 16 jul. 2024s.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0005998)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2951794>. Acesso em: 16 jul. 2024t.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0000209)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/178594>. Acesso em: 21 set. 2024u.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **LC-MS/MS Spectrum - 30V, Positive (HMDB0006344)**.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0029005)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2818174>. Acesso em: 15 set. 2024w.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0039780)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/98314>. Acesso em: 21 set. 2024x.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0037840)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/56416>. Acesso em: 21 set. 2024y.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0032766)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/76255>. Acesso em: 21 set. 2024z.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0001085)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2896561>. Acesso em: 16 jul. 2024aa.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **LC-MS/MS Spectrum - LC-ESI-QTOF 35V, positive (HMDB0004610)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/1470870>. Acesso em: 15 set. 2024ab.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0000269)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2246182>. Acesso em: 15 set. 2024ac.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0240262)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2895748>. Acesso em: 15 set. 2024ad.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0061699)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2868760>. Acesso em: 21 set. 2024ae.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 40V, Positive (HMDB0010379)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2464202>. Acesso em: 21 set. 2024af.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 40V, Positive (HMDB0010383)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2308982>. Acesso em: 21 set. 2024ag.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 40V, Positive (HMDB0010386)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2458839>. Acesso em: 21 set. 2024ah.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 40V, Positive (HMDB0010397)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2382934>. Acesso em: 22 set. 2024ai.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0011503)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2253481>. Acesso em: 22 set. 2024aj.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0011517)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/2513921>. Acesso em: 22 set. 2024ak.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0115352)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/1320185>. Acesso em: 22 set. 2024al.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Predicted LC-MS/MS Spectrum - 20V, Positive (HMDB0114909)**. Disponível em: <https://hmdb.ca/spectra/ms_ms/1305767>. Acesso em: 22 set. 2024am.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **N2-(2-Carboxymethyl-2-hydroxysuccinoyl)arginine (HMDB0032766)**. Disponível em: <<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0032766>>. Acesso em: 6 set. 2024an.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **N-(1-Deoxy-1-fructosyl)leucine (HMDB0037840)**. Disponível em: <<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0037840>>. Acesso em: 11 set. 2024ao.

HUMAN METABOLOME DATABASE (HMDB). **Phenylalanylthreonine (HMDB0029005)**. Disponível em: <<https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0029005>>. Acesso em: 11 set. 2024ap.

IREKEOLA, A. A. et al. Global prevalence of dengue and chikungunya coinfection: A systematic review and meta-analysis of 43,341 participants. **Acta Tropica**, v. 231, 1 jul. 2022.

IVANOVA, P. T. et al. Glycerophospholipid Identification and Quantitation by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Methods in Enzymology**, v. 432, p. 21–57, 2007.

JARDIM-SANTOS, G. P. et al. Unbalanced networks and disturbed kinetics of serum soluble mediators associated with distinct disease outcomes in severe COVID-19 patients. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 14 nov. 2022.

JOLLIFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: A review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2065, 13 abr. 2016.

KADIANE-OUSSOU, N. J. et al. COVID-19: comparative clinical features and outcome in 114 patients with or without pneumonia (Nord Franche-Comte Hospital, France). **Microbes and Infection**, v. 22, n. 10, p. 622–625, 1 nov. 2020.

KALAYANAROOJ, S.; ROTHMAN, A. L.; SRIKIATKHACHORN, A. Case management of dengue: Lessons learned. **Journal of Infectious Diseases**, 2017.

KAUR, G.; JI, X.; RAHMAN, I. Sars-cov2 infection alters tryptophan catabolism and phospholipid metabolism. **Metabolites**, v. 11, n. 10, 1 out. 2021.

KELLY, B.; PEARCE, E. L. Amino Assets: How Amino Acids Support Immunity. **Cell Metabolism**, v. 32, n. 2, p. 154–175, 4 ago. 2020.

KIM, D. et al. Rates of Co-infection between SARS-CoV-2 and Other Respiratory Pathogens. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 20, p. 2085–2086, 26 maio 2020.

KIM, H. W. et al. NPClassifier: A Deep Neural Network-Based Structural Classification Tool for Natural Products. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 11, p. 2795–2807, 26 nov. 2021.

KIMHOFER, T. et al. Integrative Modeling of Quantitative Plasma Lipoprotein, Metabolic, and Amino Acid Data Reveals a Multiorgan Pathological Signature of SARS-CoV-2 Infection. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 11, p. 4442–4454, 6 nov. 2020.

KLASSEN, A. et al. Metabolomics: Definitions and significance in systems biology. Em: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2017. v. 965p. 3–17.

KOTEPUI, M.; KOTEPUI, K. U. Prevalence and laboratory analysis of malaria and dengue co-infection: A systematic review and meta-Analysis. **BMC Public Health**, v. 19, n. 1, 16 set. 2019.

KURIZKY, P. et al. Molecular and cellular biomarkers of COVID-19 prognosis: Protocol for the prospective cohort TARGET study. **JMIR Research Protocols**, v. 10, n. 3, 1 mar. 2021.

LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA DO DISTRITO FEDERAL. **Dengue PCR – Laboratório Central de Saúde Pública**. Disponível em: <<http://lacendf.saude.df.gov.br/arbovirus-pesq-pcr/>>. Acesso em: 24 jun. 2021.

LANSBURY, L. et al. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection**, v. 81, n. 2, p. 266–275, 1 ago. 2020.

LE FLOC'H, N.; MELCHIOR, D.; OBLED, C. **Modifications of protein and amino acid metabolism during inflammation and immune system activation**. Livestock Production Science. **Anais...**abr. 2004.

LEÓN-FIGUEROA, D. A. et al. COVID-19 and dengue coinfection in Latin America: A systematic review. **New Microbes and New Infections**, v. 49–50, 1 nov. 2022.

LEOWATTANA, W.; LEOWATTANA, T. Dengue hemorrhagic fever and the liver. **World Journal of Hepatology**, v. 13, n. 12, p. 1968–1976, 2021.

LIAO, M. et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 6, p. 842–844, 1 jun. 2020.

LIN, C.-F. et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. **Journal of Medical Virology**, v. 69, n. 1, p. 82–90, 15 nov. 2002.

LIN, C.-F. et al. Expression of Cytokine, Chemokine, and Adhesion Molecules during Endothelial Cell Activation Induced by Antibodies against Dengue Virus Nonstructural Protein 1. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 1, p. 395–403, 2005.

LIPPI, G. et al. Preanalytical variability: The dark side of the moon in laboratory testing. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 44, n. 4, p. 358–365, 1 abr. 2006.

LIU, P. et al. The mechanisms of lysophosphatidylcholine in the development of diseases. **Life Sciences**, v. 247, 15 abr. 2020.

LU, X. et al. Dengue outbreaks in the covid-19 era: Alarm raised for Asia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 10, 1 out. 2021.

LUCAS, C. et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 463–469, 20 ago. 2020.

LUPORINI, R. L. et al. Phenylalanine and COVID-19: Tracking disease severity markers. **International Immunopharmacology**, v. 101, 1 dez. 2021.

MALTEZOU, H. C. et al. COVID-19 and Respiratory Virus Co-Infections: A Systematic Review of the Literature. **Viruses**, v. 15, n. 4, 1 abr. 2023.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, L. E. et al. Metabolic Reprogramming in SARS-CoV-2 Infection Impacts the Outcome of COVID-19 Patients. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 11 jul. 2022.

MARTIN-VENEGAS, R.; JÁUREGUI, O.; MORENO, J. J. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of eicosanoids and related compounds in cell models. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 964, p. 41–49, 1 ago. 2014.

MASOODI, M. et al. Disturbed lipid and amino acid metabolisms in COVID-19 patients. **Journal of Molecular Medicine**, v. 100, n. 4, p. 555–568, 1 abr. 2022.

MATHEW, D. et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. **Science (New York, N.Y.)**, v. 369, n. 6508, 4 set. 2020.

MAYER, K. A. et al. Hijacking the supplies: Metabolism as a novel facet of virus-host interaction. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JULY, 2019.

MEJÍA-PARRA, J. L. et al. Characteristics of patients coinfecting with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 and dengue virus, Lambayeque, Peru, May–August 2020: A retrospective analysis. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 43, 1 set. 2021.

MENDONÇA, V. R. R. et al. Unravelling the patterns of host immune responses in Plasmodium vivax malaria and dengue co-infection. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, 14 ago. 2015.

MERAD, M. et al. The immunology and immunopathology of COVID-19. **Science**, v. 375, n. 6585, p. 1122–1127, 11 mar. 2022.

MIAH, MD. A.; HUSNA, A. Coinfection, coepidemics of COVID-19, and dengue in dengue-endemic countries: A serious health concern. **Journal of Medical Virology**, 14 jul. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **DENGUE: diagnóstico e manejo clínico adulto e criança**. 4a Edição ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **DENGUE diagnóstico e manejo clínico adulto e criança**. 5th Editio ed. Brasília - DF: 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Boletim Epidemiológico nº36 - Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 34, 2020**. Brasília: 2020a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes aegypti (dengue, chikungunya e Zika), semanas epidemiológicas 1 a 50, 2020**. 2020b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO ESPECIAL - Doença pelo Coronavírus COVID-19 - Semana Epidemiológica 52 (20 a 26/12/2020)**. 2020c. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/coronavirus>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Coronavirus Panel**. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 6 dez. 2020d.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 51, 2021**. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO ESPECIAL - Doença pelo Novo Coronavírus – COVID-19 Semana Epidemiológica 48 • 28/11 a 4/12/2021**. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 51 de 2022**. 2022a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO ESPECIAL - Doença pelo Novo Coronavírus – COVID-19**. 2022b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Transmissão**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/covid-19/transmissao>>. Acesso em: 20 ago. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Monitoramento das arboviroses e balanço de encerramento do Comitê de Operações de Emergência (COE) Dengue e outras Arboviroses 2024**. 2024a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Boletim Epidemiológico Especial nº 162 - Doença pelo Novo Coronavírus – COVID-19**. 2024b.

MIRZAEI, R. et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. **IUBMB Life**, v. 72, n. 10, p. 2097–2111, 1 out. 2020.

MODHIRAN, N. et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. **Viral Toxin**, v. 7, n. 304, 2015.

MOHIMANI, H. et al. Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.

MORAIS, G. S. et al. Enhanced IL-6 and IL-12B gene expression after SARS-CoV-2 infection in leprosy patients may increase the risk of neural damage. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 6, p. 2190–2194, 1 jun. 2021.

MORENS, D. M. Antibody-Dependent Enhancement of Infection and the Pathogenesis of Viral Disease. **Infection Enhancement in Disease Pathogenesis**, 1994.

MUSSAP, M.; FANOS, V. Could metabolomics drive the fate of COVID-19 pandemic? A narrative review on lights and shadows. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 59, n. 12, p. 1891–1905, 1 nov. 2021.

MUSUUZA, J. S. et al. Prevalence and outcomes of co-infection and superinfection with SARS-CoV-2 and other pathogens: A systematic review and metaanalysis. **PLoS ONE**, v. 16, n. 5 May, 1 maio 2021.

MYERS, O. D. et al. One Step Forward for Reducing False Positive and False Negative Compound Identifications from Mass Spectrometry Metabolomics Data: New Algorithms for Constructing Extracted Ion Chromatograms and Detecting Chromatographic Peaks. **Analytical chemistry**, v. 89, n. 17, p. 8696–8703, 5 set. 2017.

NACHER, M. et al. Simultaneous dengue and COVID-19 epidemics: Difficult days ahead? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008426, 14 ago. 2020.

NARDO, A. D. et al. Pathophysiological mechanisms of liver injury in COVID-19. **Liver International**, v. 41, n. 1, p. 20–32, 1 jan. 2021.

NOGAWA, T.; OKANO, A. **Bilirubin Ixalpha; LC-ESI-QQQ; MS2; Frag=135.0V CID@10.0; [M+H]⁺**. Disponível em: <https://massbank.eu/MassBank/RecordDisplay?id=MSBNK-RIKEN_NPDepo-NGA00460>. Acesso em: 6 ago. 2024.

NOTHIAS, L. F. et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. **Nature Methods**, v. 17, n. 9, p. 905–908, 1 set. 2020.

NUNEZ-AVELLANEDA, D. et al. Evidence of Coinfections between SARS-CoV-2 and Select Arboviruses in Guerrero, Mexico, 2020–2021. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 3, p. 896–899, 1 mar. 2022.

OCCELLI, C. et al. Untargeted plasma metabolomic fingerprinting highlights several biomarkers for the diagnosis and prognosis of coronavirus disease 19. **Frontiers in Medicine**, v. 9, 29 set. 2022.

ODDOZE, C.; LOMBARD, E.; PORTUGAL, H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 6, p. 464–469, abr. 2012.

OLIVE, M.-M. et al. The COVID-19 pandemic should not jeopardize dengue control. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 9, p. e0008716, 23 set. 2020.

OMAME, A.; ABBAS, M.; ONYENEGECHA, C. P. Backward bifurcation and optimal control in a co-infection model for SARS-CoV-2 and ZIKV. **Results in Physics**, v. 37, 1 jun. 2022.

ONOJA, A. et al. Meta-Analysis of COVID-19 Metabolomics Identifies Variations in Robustness of Biomarkers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, 1 set. 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **DENGUE GUIDELINES FOR DIAGNOSIS, TREATMENT, PREVENTION AND CONTROL TREATMENT, PREVENTION AND CONTROL**. 2009. Disponível em: <www.who.int/tdr>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Coronavirus disease (COVID-19) pandemic - Overview**. Disponível em: <<https://www.who.int/europe/emergencies/situations/covid-19>>. Acesso em: 28 ago. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Coronavirus disease (COVID-19): How is it transmitted?** Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-covid-19-how-is-it-transmitted>>. Acesso em: 20 ago. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Dengue - Global situation**. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON498>>. Acesso em: 22 ago. 2024a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Guideline Clinical management of COVID-19: living guideline**. Disponível em: <<http://apps.who.int/bookorders>>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Number of COVID-19 cases reported to WHO (cumulative total)**. Disponível em: <<https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>>. Acesso em: 27 ago. 2024a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Dengue and severe dengue**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 20 ago. 2024b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Global dengue surveillance**. Disponível em: <https://worldhealthorg.shinyapps.io/dengue_global/>. Acesso em: 21 ago. 2024c.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Epidemiological Update Increase in dengue cases in the Region of the Americas**. Disponível em: <<https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en.html>>. Acesso em: 21 ago. 2024.

OTTOSSON, F. et al. Effects of Long-Term Storage on the Biobanked Neonatal Dried Blood Spot Metabolome. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 34, n. 4, p. 685–694, 5 abr. 2023.

PÁEZ-FRANCO, J. C. et al. Metabolomics analysis reveals a modified amino acid metabolism that correlates with altered oxygen homeostasis in COVID-19 patients. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

PANG, Z. et al. Comprehensive meta-analysis of covid-19 global metabolomics datasets. **Metabolites**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 1 jan. 2021.

PANG, Z. et al. MetaboAnalyst 6.0: towards a unified platform for metabolomics data processing, analysis and interpretation. **Nucleic Acids Research**, 5 jul. 2024.

PANTIG, F. M. T. et al. SARS-CoV-2 and Dengue Coinfection in Filipino Children: Epidemiology Profile, Clinical Presentation and Outcomes. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 42, n. 9, p. 787–791, 1 set. 2023.

PEERZADA, M. N.; VERMA, S. Ivermectin as an Anti-Inflammatory Agent. **Chemistry and Biological Activities of Ivermectin**, v. Chapter 7, 2023.

PÉREZ, M. M. et al. Acetylcholine, Fatty Acids, and Lipid Mediators Are Linked to COVID-19 Severity. **The Journal of Immunology**, v. 209, n. 2, p. 250–261, 15 jul. 2022.

PERICO, L. et al. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. **Nature Reviews Nephrology**, v. 17, n. 1, p. 46–64, 1 jan. 2021.

PILON, A. C. et al. Plant metabolomics: Methods and challenges. **Quimica Nova**, v. 43, n. 3, p. 329–354, 1 mar. 2020.

PILON, A. C. et al. Molecular networks: An analysis on annotations and discovery of new assets. **Quimica Nova**, v. 44, n. 9, p. 1168–1179, 2021.

PIÑOL-JIMÉNEZ, F. N. et al. High Levels of Serum Bile Acids in COVID-19 Patients on Hospital Admission. **MEDICC Review**, v. 24, p. 3–4, 2022.

PLASENCIA-DUEÑAS, R.; FAILOC-ROJAS, V. E.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence of dengue fever in Peru. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 1, p. 393–398, 1 jan. 2022.

PLUSKAL, T. et al. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, 23 jul. 2010.

PORTAL DA TRANSPARÊNCIA DO REGISTRO CIVIL. CENTRAL NACIONAL DE INFORMAÇÕES DO REGISTRO CIVIL (CRC NACIONAL). **Óbitos por doenças respiratórias - Painel Registral**. Disponível em: <<https://transparencia.registrocivil.org.br/registral-COVID>>. Acesso em: 30 jun. 2024.

POSTLER, T. S. et al. Renaming of the genus Flavivirus to Orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family Flaviviridae. **Archives of Virology**, v. 168, n. 9, 1 set. 2023.

PSYCHOGIOS, N. et al. The Human Serum Metabolome. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 1 mar. 2011.

PULFER, M.; MURPHY, R. C. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 22, n. 5, p. 332–364, set. 2003.

RAAFAT, N.; BLACKSELL, S. D.; MAUDE, R. J. A review of dengue diagnostics and implications for surveillance and control. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 11, p. 653–660, 1 nov. 2019.

RAHMAN, S.; RAHMAN, T. Risks of Simultaneous Co-Infection of Dengue and COVID-19 in Bangladesh: Challenges and Recommendations. **Preprints**, 29 set. 2020.

RESEARCH UNIT ANALYTICAL BIOGEOCHEMISTRY HELMHOLTZ ZENTRUM MUENCHEN (BGC-MUNICH). **Glycodeoxycholic acid; LC-ESI-QTOF; MS2; CE: 20; R=; [M+H]⁺**. Disponível em: <https://massbank.eu/MassBank/RecordDisplay?id=MSBNK-BGC_Munich-RP005402>. Acesso em: 16 jul. 2024.

RESEARCH UNIT ANALYTICAL BIOGEOCHEMISTRY HELMHOLTZ ZENTRUM MUENCHEN (BGC-MUNICH). **L-Phenylalanine Mass Spectrum**. Disponível em: <https://massbank.eu/MassBank/RecordDisplay?id=MSBNK-BGC_Munich-RP000402>. Acesso em: 15 set. 2024.

RESENDE, P. C. et al. Evolutionary Dynamics and Dissemination Pattern of the SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.33 During the Early Pandemic Phase in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 3565, 17 fev. 2021.

RIDWAN, R. COVID-19 and dengue: a deadly duo. **Tropical doctor**, p. 49475520936874, 26 jun. 2020.

ROMAGNOLO, A. G.; CARVALHO, K. I. Dengue and metabolomics in humans. **Metabolomics**, v. 17, n. 3, 1 mar. 2021.

RUIY, W. et al. COVID-19 mimicking dengue fever with the initial manifestation of retro-orbital pain – A Rare Case. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 119, n. 11, p. 1715, 1 nov. 2020.

RUSSKIKH, Y. et al. Amino acid profiling of COVID-19 patients blood serum. **medRxiv**, 2024.

RZAGALINSKI, I. et al. MALDI Mass Spectral Imaging of Bile Acids Observed as Deprotonated Molecules and Proton-Bound Dimers from Mouse Liver Sections. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 29, n. 4, p. 711–722, 1 abr. 2018.

SADDIQUE, A. et al. Emergence of co-infection of COVID-19 and dengue: A serious public health threat. **Journal of Infection**, 2020.

SALAM, N. et al. Global prevalence and distribution of coinfection of malaria, dengue and chikungunya: A systematic review. **BMC Public Health**, v. 18, n. 1, 8 jun. 2018.

SAMANTA, J.; SHARMA, V. Dengue and its effects on liver. **World Journal of Clinical Cases**, v. 3, n. 2, p. 125, 2015.

SCHMID, R. et al. Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. **Nature Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 447–449, 1 abr. 2023.

SCHULTE, H. L. et al. SARS-CoV-2/DENV co-infection: a series of cases from the Federal District, Midwestern Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 727, 31 dez. 2021.

SCHULTE-SCHREPPING, J. et al. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. **Cell**, v. 182, n. 6, p. 1419- 1440.e23, 17 set. 2020.

SCHULTZE, J. L.; ASCHENBRENNER, A. C. COVID-19 and the human innate immune system. **Cell**, v. 184, n. 7, p. 1671–1692, 1 abr. 2021.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE (SVSA/MS). **Vigilância das Síndromes Gripais**. 2023.

SEE, K. C. Personalizing Care for Critically Ill Adults Using Omics: A Concise Review of Potential Clinical Applications. **Cells**, v. 12, n. 4, 1 fev. 2023.

SERHAN, C. N.; DE LA ROSA, X.; JOUVENE, C. Novel mediators and mechanisms in the resolution of infectious inflammation: evidence for vagus regulation. **Journal of Internal Medicine**, v. 286, n. 3, p. 240–258, 2019.

SEVASTOU, I. et al. Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: The PLA 2/LPC and ATX/LPA axes. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 1, p. 42–60, 2013.

SHAH, I.; DEY, A. Hepatitis A and dengue coinfection. **J Vector Borne Dis**, v. 52, p. 265–266, 2015.

SHEN, B. et al. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. **Cell**, v. 182, p. 1–14, 2020.

SHI, D. et al. The serum metabolome of COVID-19 patients is distinctive and predictive. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 118, 1 maio 2021.

SHI, W. et al. Regulation of Tetrahydrobiopterin Synthesis and Bioavailability in Endothelial Cells. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 41, p. 415–433, 2004.

SHRINET, J. et al. Serum metabolomics analysis of patients with chikungunya and dengue mono/co-infections reveals distinct metabolite signatures in the three disease conditions. **Scientific Reports**, v. 6, 15 nov. 2016.

SILVA, A. F. et al. A importância da triagem neonatal: cartilha educativa teste do pezinho. **Lynx**, v. 1, n. 1, 2020.

SILVA, K. et al. **Taurocholic acid; LC-ESI-QTOF; MS2; CE: 20eV; R=7000; [M-H₂O+H]⁺**. Disponível em: <https://massbank.eu/MassBank/RecordDisplay?id=MSBNK-Antwerp_Univ-METOX_N109414_1273>. Acesso em: 16 jul. 2024.

SINDELAR, M. et al. Longitudinal metabolomics of human plasma reveals prognostic markers of COVID-19 disease severity. **Cell Reports Medicine**, v. 2, n. 8, 17 ago. 2021.

SIQUEIRA, C. et al. Six cases of Zika/dengue coinfection in a Brazilian cohort, 2015-2019. **Viruses**, 2020.

SPICK, M. et al. An integrated analysis and comparison of serum, saliva and sebum for COVID-19 metabolomics. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.

STEVENS, V. L. et al. Pre-analytical factors that affect metabolite stability in human urine, plasma, and serum: A review. **Metabolites**, v. 9, n. 8, 2019.

SUAREZ, L. N.; BRÜCKNER, L.; ROHN, S. Electrochemical oxidation of primary bile acids: A tool for simulating their oxidative metabolism? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, 1 set. 2018.

SUBSECRETARIA DE VIGILÂNCIA À SAÚDE (SVS)/SECRETARIA DE SAÚDE DO DISTRITO FEDERAL (SES-DF). Monitoramento dos casos de dengue, Semanas Epidemiológicas 1 a 52 de 2020. 2020.

SUBSECRETARIA DE VIGILÂNCIA À SAÚDE (SVS)/SECRETARIA DE SAÚDE DO DISTRITO FEDERAL (SES-DF). Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya, doença aguda pelo vírus zika e febre amarela até a Semana Epidemiológica 50 de 2021. 2021a.

SUBSECRETARIA DE VIGILÂNCIA À SAÚDE (SVS)/SECRETARIA DE SAÚDE DO DISTRITO FEDERAL (SES-DF). BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO No 649. 2021b.

SWETS, M. C. et al. SARS-CoV-2 co-infection with influenza viruses, respiratory syncytial virus, or adenoviruses. **The Lancet**, v. 399, n. 10334, p. 1463–1464, 16 abr. 2022.

SZECSI, P. B.; ØDUM, L. Error tracking in a clinical biochemistry laboratory. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 47, n. 10, p. 1253–1257, 1 out. 2009.

TAKAHASHI, T. et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. **Nature**, v. 588, n. 7837, p. 315–320, 10 dez. 2020.

TAN, W. et al. A Novel Coronavirus Genome Identified in a Cluster of Pneumonia Cases — Wuhan, China 2019–2020. **China CDC Weekly**, 2020, Vol. 2, Issue 4, Pages: 61-62, v. 2, n. 4, p. 61–62, 1 jan. 2020.

TANG, C. H. et al. Glycerophosphocholine molecular species profiling in the biological tissue using UPLC/MS/MS. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 22, p. 2095–2106, 15 jul. 2011.

TANGSATHAPORNONG, A.; THISYAKORN, U. Dengue amid COVID-19 pandemic. **PLOS Global Public Health**, v. 3, n. 2, 1 fev. 2023.

TAYLOR, A. et al. Fc receptors in antibody-dependent enhancement of viral infections. **Immunological Reviews**, v. 268, n. 1, p. 340–364, 1 nov. 2015.

TEKLU, S. W. Analysis of HBV and COVID-19 Coinfection Model with Intervention Strategies. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 2023, p. 1–17, 29 set. 2023.

TEOTÔNIO, I. M. S. N. et al. Clinical and biochemical parameters of COVID-19 patients with prior or active dengue fever. **Acta Tropica**, v. 214, 1 fev. 2021.

THACHIL, A. et al. An Overview of Pre-Analytical Factors Impacting Metabolomics Analyses of Blood Samples. **Metabolites**, v. 14, n. 9, p. 474, 28 ago. 2024.

THAKER, S. K.; CH'NG, J.; CHRISTOFK, H. R. Viral hijacking of cellular metabolism. **BMC biology**, v. 17, n. 1, p. 59, 18 jul. 2019.

THE RECOVERY COLLABORATIVE GROUP. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. **N Engl J Med**, v. 8, p. 693–704, 2021.

- TOUNTA, V. et al. Metabolomics in infectious diseases and drug discovery. **Molecular Omics**, v. 17, n. 3, p. 376–393, 1 jun. 2021.
- TOWNSEND, J. P. et al. Seasonality of endemic COVID-19. **mBio**, v. 14, n. 6, 1 dez. 2023.
- UDDIN, M. N. et al. Clinical and Serological Study of Recent Dengue Outbreak in Chittagong, Bangladesh. **IOSR Journal of Dental and Medical Sciences**, v. 20, p. 27–31, 2021.
- VAN DEN BERG, R. A. et al. Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, v. 7, 8 jun. 2006.
- VAN SPRONSEN, F. J. et al. Phenylketonuria. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2021.
- VAUGHN, D. W. et al. Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. **The Journal of Infectious Diseases**, 2000.
- VENDITTO, V. J. et al. Immunomodulatory Effects of Azithromycin Revisited: Potential Applications to COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 12 fev. 2021.
- VIOLI, J. P. et al. Considerations for amino acid analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A tutorial review. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 131, 1 out. 2020.
- WAGNER, M. et al. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 35, n. 3, p. 361–368, 1 maio 2016.
- WANG, F. et al. CFM-ID 4.0: More Accurate ESI-MS/MS Spectral Prediction and Compound Identification. **Analytical Chemistry**, v. 93, n. 34, p. 11692–11700, 31 ago. 2021.
- WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 8 set. 2016.
- WANG, W. H. et al. Dengue hemorrhagic fever – A systemic literature review of current perspectives on pathogenesis, prevention and control. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2020.
- WIERSINGA, W. J. et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA**, v. 324, n. 8, p. 782–793, 25 ago. 2020.
- WILHELM, A. J.; DEN BURGER, J. C. G.; SWART, E. L. Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot: Progress to Date and Future Directions. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 53, n. 11, p. 961–973, 1 nov. 2014.
- WILK, A. J. et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 7, p. 1070–1076, 1 jul. 2020.

WILK, A. J. et al. Multi-omic profiling reveals widespread dysregulation of innate immunity and hematopoiesis in COVID-19. **Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 8, 15 jun. 2021.

WILLIAMSON, E. J. et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 430–436, 20 ago. 2020.

WITKOWSKI, M. et al. Untimely TGF β responses in COVID-19 limit antiviral functions of NK cells. **Nature**, v. 600, n. 7888, p. 295–301, 9 dez. 2021.

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Current Metabolomics**, n. 1, p. 92–107, 2013.

WU, G. **Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition**. **Amino Acids**, 2009.

XUE, M. et al. Effect of a Functional Phospholipid Metabolome-Protein Association Pathway on the Mechanism of COVID-19 Disease Progression. **International Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 12, p. 4618–4628, 2022.

YAN, G. et al. **Covert COVID-19 and false-positive dengue serology in Singapore**. **The Lancet Infectious Diseases**, 2020.

ZAMITH-MIRANDA, D. et al. A Histoplasma capsulatum lipid metabolic map identifies antifungal targets. **bioRxiv**, 2021.

ZHANG, Q. et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. **Science (New York, N.Y.)**, v. 370, n. 6515, 23 out. 2020.

ZHAO, X. et al. Bile Acid Detection Techniques and Bile Acid-Related Diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 13, 16 mar. 2022.

ZHOU, R. et al. Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses. **Immunity**, v. 53, n. 4, p. 864–877.e5, 13 out. 2020.

UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização do perfil clínico, epidemiológico e de biomarcadores na coinfeção COVID-19 e doenças endêmicas no Brasil: estudo observacional, prospectivo.

Pesquisador: PATRICIA SHU KURIZKY

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34164820.6.0000.0030

Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVICOS HOSPITALARES - EBSERH

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.206.657

Apresentação do Projeto:

Conforme documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1565918.pdf" postado em 17/07/2020:

"Resumo:

A Organização Mundial de Saúde declarou a pandemia de COVID-19 em 12 de março de 2020. No Brasil, atualmente existem 392.360 casos confirmados de COVID-19, com registro de cerca de 24000 mortes. Um aspecto que tem chamado atenção é o crescente registro de coinfeções por SARS-CoV-2 e patógenos causadores de doenças endêmicas em nosso país, como dengue e chikungunya. O estudo das coinfeções de doenças endêmicas e covid-19 é importante, porque muitas vezes as infecções podem apresentar quadros clínicos semelhantes, gerando um atraso no diagnóstico de COVID-19 e permitindo uma maior disseminação do vírus. Além disso, a sobreposição das infecções em alguns pacientes tende a acarretar quadros mais graves, evoluindo inclusive com óbito, como se observou em um relato de caso da Tailândia que mostrava coinfeção entre dengue e COVID-19. Métodos: estudo analítico prospectivo, com levantamento dos casos de coinfeção COVID-19 e doenças endêmicas, através de linkage de bases de dados do Ministério da Saúde, e avaliação de coorte de pacientes e contactantes de doenças endêmicas em acompanhamento nos hospitais participantes, com registro dos casos de COVID-19 nessas populações. Resultados esperados: estimamos que a coinfeção acarrete em piores prognósticos e

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 4.206.657

a presença de infecções endêmicas torne esses pacientes mais susceptíveis a infecção pelo SARS- CoV-2."

"Hipótese:

Qual a prevalência de coinfeção de COVID-19 e doenças endêmicas no Brasil? Existe piora do prognóstico na vigência de coinfeção de COVID-19 e doenças endêmicas no Brasil? O tratamento ou quimioprofilaxia das doenças endêmicas impactam no curso da COVID-19? Existe mudança no perfil metabólico e/ ou proteico destes pacientes após ocorrência de coinfeção?"

"Metodologia Proposta:

O grupo de estudo será composto por pacientes com diagnóstico de doenças endêmicas no Brasil, em especial dengue e outras arboviroses, hanseníase e contactantes, doença de Chagas, tuberculose, malária, leishmaniose e febre amarela. Inicialmente será feita uma busca, através de linkage, dos últimos seis meses, utilizando bases de dados do Ministério da Saúde, como SIVEP-GRIPE, SIM- SISTEMA DE INFORMACOES DE MORTALIDADE, E-SUS VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA, E-SUS ATENCAO BASICA, GAL-GERENCIADOR DE AMBIENTE LABORATORIAL, SINAN – SISTEMA DE INFORMACOES DE AGRAVOS DE NOTIFICACAO. Os pacientes identificados como portadores de coinfeções por COVID- 19 e outras infecções endêmicas serão contactados, via telefone, e responderão a questionário, a fim de se registrar dados epidemiológicos, clínicos e sociais que possam impactar as duas ou mais doenças. Além disso, serão captados pacientes que apresentem coinfeções nos ambulatórios, emergências, enfermarias e CTI / Unidades Coronarianas dos Hospitais envolvidos no projeto, além de ser feito acompanhamento dos pacientes já registrados nos ambulatórios de doenças endêmicas específicos destes hospitais. Estes pacientes serão submetidos também a questionário, a fim de se registrar dados epidemiológicos, clínicos e sociais, além de coleta sanguínea na admissão, no 7º dia e no 15º dia de internação. Nos casos de doenças cujos contactantes recebam quimioprofilaxia, como na hanseníase, estes também serão avaliados e submetidos a coleta sanguínea, seguindo o mesmo padrão dos pacientes, caso se constate diagnóstico de COVID-19 ou a uma única coleta na data da entrevista, caso não haja suspeita ou diagnóstico de COVID-19 não se confirme. Será feito seguimento prospectivo por 5 anos, de junho de 2020 a junho de 2025, dos pacientes e contactantes registrados nos ambulatórios de doenças endêmicas ou de doenças infecto-parasitárias que contemplem essas doenças, a fim de se observar episódios de coinfeção ou susceptibilidade ao SARS-Cov-2. Para os estudos imunológicos e metabólico serão coletadas amostras de sangue periférico por punção

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 4.206.657

venosa, sendo utilizadas amostras de plasma em heparina sodica coletados em dois tempos consecutivos [T(0) – admissao e T(7dias) – 7-10 dias apos a admissao]."

"Critério de Inclusao:

Capacidade de compreensao e preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, >18 anos

Critério de Exclusao:

Doenca mental organica, funcional ou oligofrenia, que comprometam a qualidade da informacao fornecida pelo paciente"

"Metodologia de Analise de Dados:

Serao comparados dados demograficos dos pacientes, dados clinicos, bem como caracteristicas de drogas utilizadas como dose e tempo de tratamento. Os resultados serao comparados por meio da media aritmetica proveniente de cada uma das triplicatas selecionadas. Serao calculadas diversas medidas de dispersao a depender da normalidade do conjunto de variaveis aferidas. Estas medias tambem serao confrontadas com dados clinicos e terapeutico em um componente analitico da pesquisa. Para se comparar as medias referidas entre os grupos, empregaremos o teste t- student para aquelas variaveis que apresentarem distribuicao gaussiana em ambos os grupos. Nos casos em que nao se observar a normalidade nos dois grupos sera empregado o teste nao parametrico de Mann-Whitney. Em relacao ao teste t-student, um intervalo de 95% de confianca para a diferenca entre as medias sera calculado. Para efeito de analise empregaremos nivel de significancia de 5%. Sera utilizado o programa SAS 9.3® (SAS Institute Inc, Cary, EUA)."

"Desfecho Primario:

deteccao de coinfeccao entre doenca endenica e COVID-19 Tamanho da Amostra no Brasil: 1.000"

Objetivo da Pesquisa:

Conforme documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1565918.pdf" postado em 17/07/2020:

"Objetivo Primario:

Analisar a prevalencia, o prognostico e a resposta imune de coinfeccoes de doencas endemicas no Brasil e o SARS-CoV-2."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1565918.pdf" postado em

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 4.206.657

17/07/2020:

"Riscos:

Por se tratar de trabalho envolvendo coleta de sangue, os pacientes estão expostos ao risco de flebite, equimoses e hematomas nos locais da punção. A escolha de profissionais bem treinados pode diminuir a ocorrência de efeitos. O uso de luvas e materiais estéreis descartáveis evita a ocorrência de possíveis infecções associadas ao procedimento.

Benefícios:

Esse estudo visa esclarecer o comportamento da COVID-19 na vigência de outras infecções endêmicas no Brasil, focando na prevalência das associações das doenças e prognóstico. Além disso, será realizado também o estudo de biomarcadores a fim de se avaliar como as coinfeções, seus tratamentos e profilaxias impactam o sistema imune."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de extensão do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília que será executado pela Pesquisadora Principal Patrícia Shu Kurizky sob a supervisão do Prof. Dr. Ciro Martins Gomes.

O projeto envolve realização de exames laboratoriais em pacientes ou servidores e terá duração de 5 anos, com previsão de início para agosto/2020.

O cronograma indica o início das atividades de recrutamento e coleta para 17/08/2020.

O orçamento apresenta gastos no total de R\$ 102.000,00 com custeio de bolsas, análise de biomarcadores e equipamento necessário à pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos acrescentados ao processo e analisados para emissão deste parecer:

1. Informações Básicas do Projeto: "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1565918.pdf" postado em 17/07/2020.
2. Carta de respostas às pendências apresentadas no Parecer Consubstanciado No. 4.155.134: "CARTARESPOSTAcoinfeccao.docx" postada em 17/07/2020.
3. Planilha orçamentária detalhada ATUALIZADA: "orcamentocoinfecoes.docx" postada em 17/07/2020.
4. Cronograma ATUALIZADO: "cronogramacoinfecoes.docx" postado em 17/07/2020.
5. Projeto Detalhado ATUALIZADO: "projetocovidcoinfeccaoFS.docx" postado em 17/07/2020.
6. Modelo de TCLE: "TCLEcovidxcoinfeccao.doc" postado em 17/07/2020.

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

**UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 4.206.657

Recomendações:

Não se aplicam.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise das respostas às pendências apontadas no Parecer Consubstanciado No. 4.155.134:

1. Solicita-se apresentar modelo de TCLE adequado a Resolucao CNS 466/2012, item IV.3, todas as letras em especial as letras "g" e "h" que tratam da explicitacao da garantia de ressarcimento e explicitacao da garantia de indenizacao diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa. Recomenda-se a utilizacao do modelo disponivel em <http://fs.unb.br/images/Docs/CEP-FS/TCLE.doc>, adequando apenas os trechos destacados em vermelho.

RESPOSTA: refeito o TCLE, conforme modelo disponível <http://fs.unb.br/images/Docs/CEP-FS/TCLE.doc>.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

2. Solicita-se atualizar o cronograma prevendo o inicio da pesquisa para periodo posterior a aprovacao pelo CEP. Ressalta-se que cabe ao pesquisador responsavel aguardar a decisao de aprovacao etica, antes de iniciar a pesquisa (Res. CNS 466/2012, item XI.2.a). Tal alteracao devera ser realizada no cronograma do projeto da Plataforma Brasil e no documento "cronogramacoinfeccoes.docx".

RESPOSTA: alterado cronograma na Plataforma Brasil e no documento anexado.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

3. A Secretaria de Estado da Saude indicada como coparticipante (CNPJ: 46.374.500/0044-24) e de Barretos/SP. Solicitam-se esclarecimentos e adequacao.

RESPOSTA: Diante da necessidade do início rápido do projeto e pelo fato de não ter havido ainda a anuência formal das outras instituições, foi readequado o projeto como unicêntrico, a ser realizado no Hospital Universitário de Brasília. Haverá possibilidade de entrada de outras instituições posteriormente, caso elas concretizem o interesse em participar, neste caso sendo submetida uma emenda a esse projeto para nova avaliação do CEP quanto a inclusão de novos centros.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

4. Nao foi informado como se dara a participacao do centro coparticipante HOSPITAL UNIVERSITARIO CASSIANO ANTONIO MORAES- HUCAM, tao pouco foi termo de concordancia dessa

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

**UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 4.206.657

instituição quanto a participação neste projeto de pesquisa. Solicitam-se esclarecimentos e adequação.

RESPOSTA: Diante da necessidade do início rápido do projeto e pelo fato de não ter havido ainda a anuência formal das outras instituições, foi readequado o projeto como unicêntrico, a ser realizado no Hospital Universitário de Brasília. Haverá possibilidade de entrada de outras instituições posteriormente, caso elas concretizem o interesse em participar, neste caso sendo submetida uma emenda a esse projeto para nova avaliação do CEP quanto a inclusão de novos centros.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

5. O projeto detalhado informa que serão recrutados 1.000 participantes, mas na Plataforma Brasil só foram indicados em quais grupos 300 desses participantes serão alocados. Solicita-se adequação. Tal alteração deverá ser realizada no projeto da Plataforma Brasil.

RESPOSTA: feita alteração na Plataforma Brasil, informando os grupos de alocação dos 1000 participantes.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

6. Os orçamentos apresentados apresentam dados divergentes. Solicita-se uniformização.

RESPOSTA: feita uniformização dos dados dos cronogramas na plataforma e documento anexado.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

Todas as pendências foram atendidas.

Não há óbices éticos para a realização do presente protocolo de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme Resolução CNS 466/2012, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1565918.pdf	17/07/2020 00:23:32		Aceito
Outros	CARTARESPPOSTAcoinfeccao.docx	17/07/2020 00:22:22	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

**UNB - FACULDADE DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 4.206.657

Orçamento	orcamentocoinfeccoes.docx	17/07/2020 00:18:18	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Cronograma	cronogramacoinfeccoes.docx	17/07/2020 00:17:54	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetocovidcoinfeccaoFS.docx	17/07/2020 00:17:25	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLCovidxcoinfeccao.doc	17/07/2020 00:16:54	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	concordancia.doc	23/06/2020 12:39:11	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	CartadeEncaminhamentocovidxcoinfec oesFS.doc	23/06/2020 12:35:41	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	TermodeRespPesqcovidxcoinfeccao.doc	23/06/2020 12:35:15	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	encaminhamento.pdf	23/06/2020 12:32:08	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Declaração de Pesquisadores	responsabilidade.pdf	23/06/2020 12:31:40	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Declaração de concordância	concordancia.pdf	23/06/2020 12:31:26	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	23/06/2020 12:31:11	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	lattesciro.pdf	02/06/2020 11:05:56	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	lattespat.pdf	02/06/2020 11:05:13	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 11 de Agosto de 2020

**Assinado por:
Marie Togashi
(Coordenador(a))**

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Biomarcadores imunológicos como preditores de prognóstico em pacientes com formas leves e graves de COVID-19

Pesquisador: PATRICIA SHU KURIZKY

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 30846920.7.0000.0008

Instituição Proponente: EMPRESA BRASILEIRA DE SERVICOS HOSPITALARES - EBSERH

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.251.669

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1813879_E4.pdf de 16/02/2022.

INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde declarou a pandemia de COVID-19 em 12 de março de 2020.¹ A doença se caracteriza por febre, tosse, dispneia, podendo evoluir para edema e falência pulmonar, além de ter danos hepático, cardíaco e renais.² O manejo clínico é principalmente sintomático, entretanto casos graves podem necessitar de assistência respiratória.¹ O SARS-CoV-2, patógeno responsável pelo quadro, liga-se às células epiteliais alveolares, entrando via enzima conversora da angiotensina-2, e assim, ativa o receptor toll-like-7 (TLR-7).^{3,4} A ativação do TLR-7 leva a produção de alfa-interferon, TNF- α , e à secreção de IL-12 e IL-6. Isso resulta na formação de células T citotóxicas CD8-específicas e células T-helper CD4, levando à formação de células B antígeno-específicas e produção de anticorpos.⁴ Essa resposta imune adaptativa controla a infecção viral e determina o restabelecimento clínico.⁴ Ao mesmo tempo, parece que quando o organismo não é capaz de produzir uma resposta adaptativa adequada ao vírus, a inflamação persistente induzida pela imunidade inata leva a uma liberação excessiva de citocinas (cytokine storm).²⁻⁴ Hung et al sugeriram que essa "tempestade" de citocinas se manifestaria por altos

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.251.669

níveis de IL-1b, IL-2, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , TNF α , IP10, MCP1, MIP1A e MIP1B. Comparado com os pacientes não internados em unidades intensivas, os pacientes críticos tendem a apresentar níveis mais altos de IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, IP10, MCP1, MIP1A e TNF α .⁵ Outro estudo avaliando pacientes com COVID-19 mostrou uma diminuição das células CD4 e CD8, mas um aumento na proporção de células Th17.⁶ A diferenciação de células Th17 se dá pelo estímulo de IL-6 e IL-23. Estudo de Jing Liu et al, ainda a ser publicado, sugeriu que casos graves mostrariam uma diminuição sustentada na proporção de linfócitos quando comparado com os casos moderados, além de mostrarem também diminuição de células T CD8 e aumento de citocinas inflamatórias no sangue periférico (IL-6, IL-10, IL-2 e IFN- γ).³ A IL-6 apresenta um papel central na inflamação aguda.³ Ela pode ser produzida por quase todas as células estromais e do sistema imune, como linfócitos B, T, macrófagos, monócitos, células dendríticas, mastócitos e outras células não linfocitárias, como fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, células mesangiais glomerulares e células tumorais.³ Os principais ativadores da expressão da IL-6 são a IL-1B e o fator de necrose tumoral (TNF- α), mas também pode ocorrer pelos receptores Toll-like, prostaglandinas, adipocinas, resposta ao estresse e outras citocinas.³ Nas fases iniciais da inflamação infecciosa, a IL-6 é produzida por monócitos e macrófagos, estimulados pelos receptores Toll-like. Essa expressão aguda de IL-6 tem um papel central na defesa do organismo ao estimular várias populações celulares.³ Além disso, a resposta do tipo TH17 parece ter um papel importante nos casos graves de COVID-19.² A IL-1b e TNF α estimulam a resposta de Th17, promovendo permeabilidade vascular e extravasamento. As células Th17 produzem IL-17, GM-CSF, IL-21 e IL-22. Dentre estas, a IL-17 tem amplo efeito proinflamatório na indução de citocinas G-CSF (responsáveis pela granulopoiese e recrutamento de neutrófilos), IL-1b, IL-6, TNF α (esses 3 últimos envolvidos em sintomas inflamatórios, como a febre), quimiocina KC, MIP2A, IL-8, IP10, MIP3A (atraem e recrutam mais infiltrado imune); e metaloproteínas da matriz (participando do dano tecidual e remodelamento).² Já a IL-22 estimula a produção de mucina, fibrinogênio, proteínas antiapoptóticas, amiloide A sérico e proteína ligadora LPS, podendo assim contribuir para a formação do edema encontrado nos pacientes com SARS-CoV-2 e SARS-CoV.² Finalmente, Xu et al mostraram que o sangue periférico de pacientes com COVID-19 grave apresentava um alto número de células Th17 CCR6 β , reforçando a importância destas células na fisiopatogenia da doença.⁷ A Prolactina regula a maturação das células CD4⁺ CD8⁻ nos timócitos para células T CD4⁺CD8⁺ via expressão receptor IL-2 e leva ao aprimoramento da célula pró-B, além do desenvolvimento células apresentadoras de antígeno que expressam MHC classe II e moléculas coestimulatórias CD 40, CD 80/CD86, aumentando interação entre CD 80/CD86

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.251.669

expresso nas APC (células apresentadoras de antígeno) com CD28 expresso linfócitos T, o que leva a produção de IL-2 e expressão do seu receptor alta afinidade CD 25 que favorece a expansão de linfócitos específicos. Estudos sugerem influência da prolactina na maturação das células dentriticas, inclinando a função de apresentação de antígeno para fenótipo pró-inflamatório com aumento da produção de interferon . (Shelly et al., 2012). Estudos mostram ainda que PRL induz receptores IL-2 na superfície dos linfócitos e estimula produção de IFN- (interferon-gama) através fator 1 regulatório interferon (IRF-1), um gene do fator de transcrição. IRF-1 é um importante regulador na diferenciação e maturação das células B e T. A prolactina ativa ainda proteína kinase C que é essencial para proliferação célula T sendo co-mitogenica com IL-2. (Vera- Lastra et al., 2002) A proliferação e diferenciação células T induzidas pelos sinais de ativação acima citados, significativamente aumenta a habilidade das células do sistema imune em produzir citocinas como fator necrose tumoral (do inglês tumor necrosis factor-alpha TNF-) , interferon-gama (INF-) e IL-2, desencadeando a proliferação estimulada pela IL-2 e promovendo disfunção de células T regulatórias. (Borba et al., 2018). Nas células B a PRL parece agir nos mecanismos que promovem a auto-tolerância, promovendo assim a sobrevivência de clones auto-reativos. (Saha et al., 2009) Algumas isoformas de prolactina já foram identificadas em vários tipos de células imunes maduras e células hematopoiéticas humanas normais, produzindo ou expressando RNAm PRL com potencial para produzir prolactina. Acreditava-se que as isoformas de PRL produzidas pareciam ser idênticas àquelas produzidas pela hipófise e que mantinham atividade biológica similar (Vera-Lastra et al., 2002)). Publicações posteriores descreveram PRL extra-hipofisária possuindo, além da diferença no peso molecular, atividade biológica diferente da PRL intra-hipofisária. (Shelly et al., 2012) Os glicocorticoides, cuja secreção e efeito são manifestados sob circunstâncias críticas de estresse físico e infeccioso, teria efeito contra-regulatório a ações previamente descritas da PRL no balanço da resposta imune (Fojtíková et al., 2010). Em pacientes com diagnóstico recente doenças autoimunes, ainda sem tratamento um estudo mostrou uma secreção de esteroides adrenais relativamente baixa em relação a inflamação, representada pelas concentrações de IL-6 e TNF. (Straub et al.,2006) Outro aspecto observado nos casos de insuficiência respiratória foi a associação com quadro hematológico caracterizado por tendência aumentada da ocorrência de fenômenos tromboembólicos. Nesse contexto, a tromboelastometria auxiliaria a evidenciar todo o processo de formação do coágulo, desde a ativação plaquetária até a dissolução do mesmo. Poderia demonstrar com maior precisão qual componente se encontra alterado e, possivelmente, correlacionar com a ocorrência de fenômenos tromboembólicos na COVID-19. Considerando que até o momento não há uma droga específica para o tratamento de COVID-19, uma gama de

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.251.669

terapias direcionadas ao hospedeiro tem sido potencialmente redirecionada para suprir essa ausência. Considerando que até o momento não há uma droga específica para o tratamento de COVID-19, uma gama de terapias direcionadas ao hospedeiro tem sido potencialmente redirecionada para suprir essa ausência.1 O tocilizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado que atua bloqueando os receptores de interleucina-6 (IL-6), usado no tratamento da artrite reumatoide e arterite de células gigantes, e recentemente empregado (por compaixão) no tratamento de pacientes com quadros graves de COVID-19 na China e na Itália.1,3 O estudo chinês avaliou 21 pacientes, não havendo complicações com o uso da medicação nem história de piora da doença ou morte, sendo que todos os pacientes apresentaram melhora clínica. Os autores defenderam que o fato do tocilizumabe ter um baixo risco de infecções favorece seu uso e a limitação principal do estudo foi que a IL-6 foi quantificada no sangue periférico apenas antes do tratamento.3 Outra droga sugerida foi o Fedratinibe (SAR302503, TG101348), um inibidor da JAK2, aprovada pelo FDA para neoplasias mieloproliferativas, que age na produção das citocinas das células Th17, entretanto ainda não existem estudos mostrando sua ação no COVID-19.2 Outro inibidor da JAK, aprovado no Brasil, e que tem sido estudado é o Baricitinibe. Além de diminuir a cascata inflamatória potencializada pelas citocinas, essa droga também seria capaz de diminuir a entrada e aglomeração intracelular do vírus nas células do hospedeiro, em especial nas células pulmonares, pelo bloqueio da proteína quinase 1 associada a AP2 (AAK1).8 Esses dados apoiam a hipótese que uma “tempestade” de citocinas apresente um papel importante nos casos graves, de forma que a neutralização de fatores inflamatórios chaves na síndrome de liberação de citocinas teria grande valor na redução da mortalidade de casos graves.3 Além disso, alguns estudos têm levantado teorias interessantes sobre a pouca piora do prognóstico em pacientes com doenças autoimunes, em especial reumáticas, e sobre o uso da vacina BCG na prevenção do COVID-19. O Brasil é o país com maior disponibilidade de medicações imunobiológicas na saúde pública, o que faz com que tenhamos uma facilidade a mais para avaliar a relação entre estas medicações na população com doenças autoimunes e uma possível proteção contra o SARSCoV-2. A BCG, além de instituída no calendário vacinal, também é principal medida de profilaxia contra a hanseníase, doença que apresenta alta prevalência em nosso país. Dessa forma, uma subanálise específica dos biomarcadores nestas populações poderia agregar informações relevantes sobre a história natural da COVID-19.

HIPÓTESE

- Qual o perfil de citocinas e quimiocinas séricas encontrado nos pacientes portadores de COVID-

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.251.669

19 brasileiros?

- Existe relação entre o perfil de citocinas e quimiocinas apresentado e a gravidade do quadro de COVID-19?
- Existe influência hormonal na imunoregulação?
- A doença leva a formação de anticorpos neutralizantes capazes de conferir imunidade?
- A tromboelastometria evidenciará estado pró-coagulante que irá se correlacionar com complicações pró-trombóticas em indivíduos graves com COVID-19?
- O uso de medicações imunobiológicas e da BCG, ao alterarem o perfil de biomarcadores, está relacionado a está relacionada a proteção do COVID-19?

METODOLOGIA

Estudo analítico prospectivo com pacientes e profissionais de saúde, que tenham diagnóstico de COVID-19. Esses pacientes serão submetidos a coleta de sangue no dia 1, 3, 10 e 15. O sangue será processado para obtenção plasma e de células mononucleares do sangue periférico, que serão avaliados quanto à presença de quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento, à expressão de biomarcadores fenotípicos de memória, produção de citocinas intracitoplasmáticas bem como, quantificação do nível de expressão de genes para citocina. Além de dosagem de prolactina e cortisol, e tromboelastometria nas amostras coletadas.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Capacidade de compreensão e preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-Diagnóstico de COVID-19

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Doença mental orgânica, funcional ou oligofrenia, que comprometam a qualidade da informação fornecida pelo paciente

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO

Analisar a resposta imune celular por meio da assinatura de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e reguladoras em pacientes brasileiros com COVID-19.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Relacionar os dados obtidos com a gravidade do quadro apresentado pelo paciente.

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.251.669

Avaliar o perfil fenotípico / funcional de subpopulações de células mononucleares circulantes Analisar a expressão de genes envolvidos na resposta inata e adaptativa ao COVID-19

Analisar o repertório da região hipervariável de imunoglobulinas

Avaliar a presença de anticorpos neutralizantes desencadeados pela doença e possível imunidade contra reinfecção

Avaliar a influência de hormônios de resposta ao estresse, Cortisol e Prolactina, na resposta imunológica e clínica

Comparar a evolução tromboelastométrica através do ROTEM na internação, com 72h, 7 dias e 15 dias de evolução, relacionando o padrão tromboelastométrico com eventuais ocorrências tromboembólicas.

Avaliar o perfil de biomarcadores em subpopulação de pacientes com doenças autoimunes em uso ou não de medicações imunossupressoras que apresentaram COVID-19

Avaliar o perfil de biomarcadores em subpopulação de pacientes com hanseníase vacinados ou não com BCG que apresentaram COVID-19

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Por se tratar de trabalho envolvendo coleta de sangue, os pacientes estão expostos ao risco de flebite, equimoses e hematomas nos locais da punção. A escolha de profissionais bem treinados pode diminuir a ocorrência de efeitos. O uso de luvas e materiais estéreis descartáveis evita a ocorrência de possíveis infecções associadas ao procedimento.

BENEFÍCIOS

Alguns estudos têm focado a relação entre os níveis séricos das quimiocinas e das citocinas inflamatórias e o quadro crítico de falência respiratória nos pacientes com COVID-19, avaliando seus papéis como biomarcadores. Um biomarcador, conforme definição do US National Institutes of Health, é um fator que pode ser medido objetivamente e que serve como marcador de processos biológicos fisiológicos ou patológicos ou de respostas farmacológicas de intervenções terapêuticas. Os biomarcadores apresentam aplicações clínicas importantes no diagnóstico, estadiamento ou classificação da doença, bem como no monitoramento da resposta ao tratamento. Este estudo visa esclarecer a assinatura de quimiocinas e citocinas envolvidas na patogênese do COVID-19 em pacientes brasileiros e analisar sua relação com a gravidade do quadro, auxiliando na avaliação de fatores prognósticos e na escolha de tratamentos personalizado. O trabalho também vai auxiliar no esclarecimento da possível obtenção de

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.251.669

imunidade pós-infecção.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

EMENDA 04

Trata-se de Emenda em que o objetivo é apresentar ao Sistema CEP/CONEP a nova versão do Projeto Detalhado e cronograma do estudo.

Quanto ao documento Projeto Detalhado intitulado "EMENDAVERSAO6.docx" (datado de 16/02/2022) foi atualizado a fim de gerar as informações conforme abaixo:

1. Detalhamento da inclusão de amostras de funcionários do HUB: explicitação da necessidade e metodologia de inclusão destes participantes (item Pacientes e Métodos).
2. Alteração do cronograma: devido à dificuldade de contactar os participantes (cadastros desatualizados, pandemia em curso, necessidade de coleta via presencial para aumentar a taxa de adesão dos participantes).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos nos documentos desta emenda.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Situação: Emenda aprovada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.251.669

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1813879_E4.pdf	16/02/2022 22:23:51		Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	CARTAVERSAO6.pdf	16/02/2022 22:20:12	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Brochura Pesquisa	EMENDAVERSAO6.docx	16/02/2022 22:16:35	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	EMENDAVERSAO5.docx	08/07/2021 22:57:56	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLNOVAVERSAO.docx	08/07/2021 22:55:42	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	TermoAnuenciaUSPRP.pdf	26/08/2020 11:18:17	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	anuenciahrg.pdf	26/05/2020 14:14:15	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	anuenciahran.pdf	19/05/2020 15:44:55	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	anuenciahrt.pdf	19/05/2020 15:43:02	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	anuenciahucam.pdf	19/05/2020 15:42:40	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	anuenciabiorrepositorioIRR.pdf	27/04/2020 21:27:06	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Outros	CARTARESPOSTABiomarcadores.docx	27/04/2020 13:31:49	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	biomarcadoresfreconcordancia.pdf	14/04/2020 08:57:21	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Folha de Rosto	Biomarcadores.pdf	14/04/2020 08:51:59	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Declaração de concordância	AnuenciaFIOCRUZcovid.pdf	11/04/2020 10:17:21	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Orçamento	orcamentocitocinacovid.docx	08/04/2020 16:13:05	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito
Cronograma	cronogramabiomarcadores.docx	08/04/2020 16:12:28	PATRICIA SHU KURIZKY	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 5.251.669

BRASILIA, 25 de Fevereiro de 2022

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador(a))

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Termo de consentimento livre e esclarecido - projeto COVID-19 e coinfeções

Projeto: Caracterização do perfil clínico, epidemiológico e de biomarcadores na coinfeção COVID-19 e doenças endêmicas no Brasil: estudo observacional, prospectivo.

*Obrigatório

1. Nome *

2. Sexo *

Marcar apenas uma oval.

Feminino

Masculino

3. Documento de identidade *

4. Endereço *

5. Bairro *

6. Cidade *

7. CEP

8. Telefone celular (com DDD) *

9. Telefone fixo

10. Telefone para contato

11. E-mail

Termo de
consentimento
livre e
esclarecido -
projeto
COVID-19 e
coinfeções

Por meio deste formulário, convido você a participar do estudo COVID-19 e coinfeções.

O objetivo desse estudo é avaliar o que acontece quando o paciente tem, ao mesmo tempo, COVID-19 e alguma outra infecção comum no Brasil, como dengue, Zika, chikungunya, Chagas, entre outras, que é o que chamamos de coinfeções. Por meio deste estudo, queremos entender como contrair COVID-19 junto com uma outra infecção vai afetar a saúde dos pacientes. Para isso, precisamos de pacientes com COVID-19, pacientes com dengue e pacientes que tiveram dengue e COVID-19 em um intervalo máximo de 15 dias. Dentro do grupo de pacientes com dengue, avaliaremos também as diferenças entre pacientes com a forma grave e a forma leve da doença.

O estudo trata apenas de coleta de informações e coleta de amostras de sangue. Para coleta de informações, os pesquisadores vão acessar seu prontuário eletrônico e, se o Sr (a) concordar, vão entrar em contato para obtenção dos dados adicionais necessários. Mas fique tranquilo, as suas informações continuam confidenciais! Nem o seu nome nem nenhuma informação que te identifique será publicada ou divulgada! Caso tenha coleta de sangue, o seu sangue será analisado para avaliar as alterações do seu sistema imune e no seu metabolismo, para ver como as infecções afetaram seu organismo. Para isto, é necessária a coleta de 12 mL de sangue, o equivalente a 1 colher de sopa, em até 4 momentos: no primeiro dia, no sétimo dia e no 15º dia do quadro de infecção pelo COVID-19, caso você esteja apenas em isolamento em casa, ou no primeiro dia, no terceiro dia, no sétimo dia e no décimo quinto dia, caso você precise ficar internado. As análises que serão realizadas não fazem parte do tratamento da sua doença, sendo usadas apenas para os fins desta pesquisa.

Não existem muitas informações a respeito do que acontece com pacientes que evoluem tendo só COVID-19 e pacientes que tem, junto com o COVID-19, outra infecção, como dengue, por exemplo, que também é muito comum no Brasil. Assim este estudo é importante para que se possa conhecer um pouco mais sobre esses efeitos. Isso pode ser útil para que os médicos possam ter mais informações no futuro na escolha do melhor tratamento de cada paciente.

Entretanto, o seu tratamento para a doença não será modificado pela pesquisa e não serão testados novos remédios para a doença por essa pesquisa. Seu atendimento não será prejudicado, independentemente de sua decisão de participar ou não da pesquisa. A pesquisa se restringirá ao preenchimento de uma ficha clínica e a coleta de exames de sangue nas datas citadas acima, mas você seguirá no fluxo assistencial (atendimento de rotina do serviço), com acompanhamento médico e realização de exames necessários para sua recuperação, independente de optar por participar ou não desta pesquisa. Por se tratar de trabalho envolvendo coleta de sangue, os pacientes estão expostos ao risco de hematomas e infecção nos locais da punção. A escolha de profissionais bem treinados pode diminuir a ocorrência de efeitos. O uso de luvas e materiais estéreis descartáveis evita a ocorrência de possíveis infecções associadas ao procedimento. O paciente pode se sentir desconfortável quanto à possibilidade de exposição de seus dados, porém a informação obtida será de uso científico e não será divulgada para outros fins. Como mencionado anteriormente, todos os dados referentes aos pacientes são confidenciais, e isso será garantido através do anonimato (não identificação) do participante quando do repasse dos dados, os quais serão utilizados exclusivamente para os fins deste estudo. Em nenhum momento haverá liberação de identidade ou quaisquer dados que possam levar à sua identificação.

A sua participação neste estudo é totalmente voluntária, garantindo-se ao profissional plena liberdade de se recusar a participar. Uma vez que você aceite participar do estudo, permanecerá com o direito de retirar seu consentimento a qualquer momento, sem nenhuma penalização.

Todas as despesas da pesquisa serão de responsabilidade do pesquisador, de forma que você não arcará com qualquer custo referente aos procedimentos e exames do estudo. Fica garantido o acesso aos resultados dos exames ao seu médico ou ao próprio participante sempre que solicitado e/ou indicado.

Para qualquer dúvida ou esclarecimento adicional, você pode entrar em contato com o Dra. Patricia Shu Kurizky, pelo telefone 20285324, ou

diretamente no endereço SGAN 604/605, Avenida L2 Norte, Hospital Universitário de Brasília, Ambulatório de Dermatologia, CEP:70919970. A dra. poderá ser encontrada no corredor vermelho, sala B, às sextas feiras, das 8h às 12 horas. Poderá ser feito contato também com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, que tem como objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa e contribuir para o desenvolvimento da pesquisa dentro dos padrões éticos. Esse contato pode ser feito através do telefone 31071918 ou pelo e-mail cepfm@unb.br, ou pessoalmente no endereço: Faculdade de Medicina da UnB - Campus Universitário Darcy Ribeiro – Asa Norte – DF CEP 70910-900, de 8:30-12:30 e de 14:30-16h de segunda a sexta-feira.

12. Afirmo que recebi uma via deste termo de consentimento por meio eletrônico (e-mail,whatsapp) para ler antes de assiná-lo, que os detalhes do projeto foram explicados e que mantereí uma cópia deste consentimento em meu poder. *

Marcar apenas uma oval.

Sim

Não

Termo de
consentimento
livre e
esclarecido -
Autorização
para coleta,
depósito,
armazenamento
e utilização de
material
biológico
humano

O (A) Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa de COVID-19 e coinfeções.
Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte de sangue e seus componentes. A utilização do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa, ou se o Sr. (a) concordar, em outras pesquisas futuras.
O (A) Sr. (a) será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar, podendo retirar, a qualquer momento, o seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador.
O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo e privacidade, sendo que os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos e após esse tempo serão destruídos. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.
Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Este termo de consentimento encontra-se disponível por meio eletrônico (e-mail,whatsapp) bem como pode ser solicitado ao pesquisador a via impressa, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Hospital Universitário de Brasília e a outra será fornecida a (o) Sr. (a). Caso haja danos decorrentes dos riscos desta pesquisa, o pesquisador assumirá a responsabilidade pelo ressarcimento e pela indenização.

13. Afirmo que recebi uma via deste termo de consentimento para ler antes de assiná-lo, que os detalhes do projeto foram explicados e que mantereí uma cópia deste consentimento em meu poder *

Marcar apenas uma oval.

Sim

Não

14. Ao concordar em participar da pesquisa, em relação ao armazenamento das amostras coletadas no biorrepositório: * Sobre as amostras contidas no biorrepositório, qualquer processamento não previsto neste projeto só será feito após aprovação por este Comitê de Ética em Pesquisa e após consentimento assinado por você *

Marcar apenas uma oval.

Concordo que minhas amostras sejam armazenadas neste biorrepositório

Não concordo que minhas amostras sejam armazenadas neste biorrepositório com descarte imediato das amostras após processamento.

Este conteúdo não foi criado nem aprovado pelo Google.

Google Formulários