INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

ESTUDO DO PERFIL PLAQUETÁRIO EM DOENTES COM COVID-19

JIAXIN YE

ORIENTADOR: DOUTOR RENATO ABREU – ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA / INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ORIENTADOR: DOUTOR JOSÉ CARLOS GOUVEIA – AFFIDEA/ HORMOFUNCIONAL

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, 2023

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

ESTUDO DO PERFIL PLAQUETÁRIO EM DOENTES COM COVID-19

JIAXIN YE

ORIENTADOR: DOUTOR RENATO ABREU – ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA / INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ORIENTADOR: DOUTOR JOSÉ CARLOS GOUVEIA – AFFIDEA/ HORMOFUNCIONAL

MEMBROS DO JÚRI:

PRESIDENTE: DOUTORA EDNA RIBEIRO – ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA/ INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ARGUENTE: ESPECIALISTA LYLLIANE DE MENEZES LUZ – HOSPITAL SÃO FRANCISCO XAVIER

(Esta versão inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, 2023

Direitos de cópia

Autorizo a Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa e o Instituto Politécnico de Lisboa o direito de arquivar e publicar a presente dissertação e de a divulgar em repositórios científicos para fins educacionais ou de pesquisa não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao autor e ao editor.

Copyright© 2023 – Jiaxin Ye

“Somos o que fazemos, mas principalmente somos o que fazemos para mudar o que somos.”

Eduardo Galeano

Agradecimentos

Este trabalho é o culminar de um longo percurso, onde as dificuldades e as exultações caminharam lado a lado, e cujo resultado se encontra patente nas páginas que se seguem e que vão refletir a contribuição de várias pessoas a quem gostaria de exprimir aqui o mais profundo reconhecimento, pela dedicação, generosidade e tempo despendido.

Ao Professor Doutor Renato Abreu e ao Doutor José Carlos Gouveia, por terem aceitado ser orientadores da minha dissertação com imensa dedicação e por toda a colaboração incansável nos aspetos técnicos e científicos que estruturam esta tese e pelas críticas construtivas que permitiram melhorar a elaboração deste trabalho.

Aos doentes, que consentiram a sua participação neste trabalho, que espero, seja um pequeno contributo para melhor conhecimento deste vírus que nos acompanha desde 2019.

À ESTeSL e ao laboratório Affidea por me proporcionarem as condições para a realização deste projeto.

Aos meus pais e ao meu irmão, por serem os melhores do mundo e por fazerem sempre os possíveis e os impossíveis por mim. São desde sempre o meu exemplo de perseverança, dedicação e integridade.

Ao meu namorado, por partilhar a vida comigo, comungando as alegrias e sendo um esteio nas adversidades.

À “Dream Team”, em especial a Benvinda Nogueira, Catarina Dias e Rita Coutinho, obrigada pela amizade, pela paciência e pela ajuda incondicional na aquisição e análise laboratorial de uma quantidade descomunal de dados.

A todos os meus colegas de turma da ESTeSL, pelo companheirismo, amizade, diversão e solidariedade ao longo de todo o curso, e também pela colaboração entre todos com vista à concretização dos nossos objetivos pessoais.

A todos, um enorme e sincero agradecimento.

Resumo

Desde dezembro de 2019, a doença de coronavírus 2019 (COVID-19), uma doença potencialmente fatal, está a conduzir rapidamente a uma crise de saúde pública em todo o mundo. Como sétimo género conhecido de coronavírus humano, o SARS-CoV-2 é comparável ao SARS-CoV e ao coronavírus da síndrome respiratória do Médio Oriente, pois todos causam pneumonia viral incomum. À medida que obtemos mais informações sobre a condição, a COVID-19 tem sido considerada mais como uma condição sistémica do que uma doença respiratória, especialmente em casos severos. Evidências crescentes têm revelado que as alterações plaquetárias estão associadas à gravidade da doença e ao aumento da mortalidade. Objetivou-se avaliar a variação da contagem de plaquetas e volume plaquetário médio (VPM) nos doentes com COVID-19, comparativamente aos seus valores anteriores à infeção. Amostras de sangue venoso foram obtidas a partir da população que frequenta os serviços de colheita de um laboratório privado em Lisboa, com acesso aos resultados mediante o consentimento informado. Os dados obtidos foram analisados com recurso ao *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS®),* versão 27.0, através da análise estatística descritiva e dos testes paramétricos, nomeadamente o teste de *t-student* para amostras emparelhadas.

Os resultados demonstraram que apesar da média dos valores da contagem de plaquetas terem sofrido uma diminuição e VPM um aumento após infeção por COVID-19, a relação entre as variáveis não foi estatisticamente significativa.

Não obstante, mais estudos com amostras maiores devem ser realizados antes da translação dos resultados para abordagens terapêuticas.

Palavras-chave: COVID-19, SARS-CoV-2, plaquetas, volume plaquetário médio, coagulopatia

Abstract

Since December 2019, coronavirus disease 2019 (COVID-19), a potentially fatal disease, is swiftly leading to public health crisis worldwide. As the seventh known human coronavirus genus, SARS-CoV-2 is comparable to SARS-CoV and Middle East respiratory syndrome coronavirus in that they all cause unusual viral pneumonia. As we gain further insights into the condition, COVID-19 is more a systemic condition than it is a respiratory disease, especially in severe cases. Mounting evidence has revealed that platelet changes are associated with disease severity and increased mortality. The aim was to assess the variation in platelet count and mean platelet volume (MPV) in COVID-19 patients compared to their pre-infection values. Venous blood samples were obtained from the population that attends the services of a private laboratory in Lisbon, with access to the results through informed consent. The data obtained will be analyzed using the *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS®),* version 27.0, through descriptive statistical and parametric tests, namely the *t-student* test for paired samples. The results demonstrated that despite the mean platelet count values having decreased and MPV increased after COVID-19 infection, the relationship between the variables was not statistically significant.

However, further studies with greater sample sizes should take place before the translation of the results into clinically relevant strategies.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, platelets, mean platelet volume, coagulopathy

Índice Geral

Direitos de cópia ..... *iii*

Agradecimentos ..... *v*

Resumo ..... *vii*

Abstract ..... *ix*

Índice Geral ..... *xi*

Índice de tabelas ..... *xiii*

Índice de figuras ..... *xv*

Lista de abreviaturas e acrónimos ..... *xvii*

1. Introdução *1*

2. Estado de arte *3*

2.1. SARS-CoV-2 ..... **3**

2.2. Manifestações clínicas **5**

2.3. Patogénese da infeção por SARS-CoV-2 ..... **6**

2.4. Diagnóstico da infeção por SARS-CoV-2 ..... **7**

2.4.1. Testes serológicos 7

2.4.2. Testes rápidos de antigénio 8

2.4.3. Testes moleculares de amplificação de ácidos nucleicos 8

2.5. Drogas terapêuticas e vacinação **9**

2.6. Plaquetas **12**

3. Metodologia *13*

3.1. Desenho, método e local do estudo **13**

3.2. População/Amostragem e critérios de seleção **13**

3.3. Recolha de amostras sanguíneas **14**

3.4. Etapas do estudo **15**

3.5. Variáveis do estudo **16**

3.6. Análise estatística **16**

3.7. Ética **17**

4. Resultados 19

4.1. Caracterização geral dos participantes do estudo 19

4.1.1. Sexo 19

4.1.2. Idade 19

4.1.3. Período de infeção 21

4.1.4. Sintomas 21

4.1.5. Vacinação 22

4.1.6. Comorbilidades 22

4.1.7. Medicação 23

4.2. Plaquetograma antes e depois da infeção 24

4.2.1. Contagem total de plaquetas 24

4.2.2. Volume plaquetário médio (VPM) 26

4.2.3. Ratio PLT/VPM e VPM/PLT (MPR) 27

5. Discussão de resultados e conclusão 29

5.1. Discussão 29

5.2. Conclusão 33

6. Perspetivas futuras 35

7. Referências bibliográficas 37

8. Anexos 45

8.1. Parecer do Conselho de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa 45

8.2. Documento de aceitação da instituição envolvida 47

9. Apêndices 49

9.1. Cronograma do estudo 49

9.2. Consentimento Informado 50

9.3. Inquérito para participantes 53

9.4. Base de dados – EXCEL 54

Índice de tabelas

Tabela 4.1 - Estatísticas descritivas da variável idade para ambos os sexos. 20
Tabela 4.2 - Teste de normalidade para o parâmetro número de plaquetas antes e depois da infeção por COVID-19. 25
Tabela 4.3 - Teste t-student emparelhado para o parâmetro número de plaquetas antes e depois do COVID-19. 25
Tabela 4.4 - Teste de normalidade para o parâmetro VPM antes e depois da infeção por COVID-19. 26
Tabela 4.5 - Teste t-student emparelhado para o parâmetro VPM antes e depois do COVID-19. 27
Tabela 4.6 - Teste de normalidade para o ratio PLT/VPM antes e depois da infeção por COVID-19. 27
Tabela 4.7 - Teste de normalidade para o ratio VPM/PLT antes e depois da infeção por COVID-19. 28
Tabela 4.8 - Teste t-student emparelhado para o ratio PLT/VPM e VPM/PLT antes e depois do COVID-19. 28
Tabela 9.1 - Cronograma do presente estudo. 49

Índice de figuras

Figura 2.1. Representação esquemática da estrutura (A) e genoma (B) do SARS-CoV-2[22]. 4
Figura 2.2 - Manifestações clínicas respiratórias e extra-respiratórias na infeção por COVID-19[28]. 5
Figura 2.3 - Ciclo replicativo do vírus SARS-CoV-2. As diferentes etapas do ciclo de replicação viral estão numeradas de (1) a (12): (1) ligação do vírus ao recetor ACE2; (2) entrada do vírus na célula; (3) internalização do vacúolo contendo o vírus; (4) fusão da membrana celular com o vírus; (5) libertação do genoma viral no citoplasma da célula hospedeira; (6) tradução do genoma para produção das poliproteínas pp1a e pp1b; (7) clivagem de pp1a e pp1b e formação de 16 NSPs; (8) formação do RTC; (9) replicação do genoma viral e transcrição das proteínas estruturais codificadas pelo mRNA; (10) tradução dos mRNA subgenómicos; (11) formação de um novo virião; (12) libertação do vírus por exocitose. 7
Figura 2.4 - Diagnóstico de COVID-19 através de rRT-PCR. O método rRT-PCR envolve colheita de material biológico e extração da amostra de RNA viral. A amostra de RNA extraída é convertida no seu cDNA pela transcrição reversa. Por fim, a amplificação da amostra de DNA é realizada em PCR quantitativo, e o cDNA viral é detetado por um sinal fluorescente[45]. 9
Figura 3.1 – Etapas do estudo relativamente à recolha das amostras e dos respetivos valores. 16
Figura 4.1 - Distribuição dos utentes consoante o sexo. 19
Figura 4.2 - Distribuição dos utentes de acordo com a faixa etária (a estratificação por faixas etárias foi realizada com base nas diretrizes da National Institutes of Health).. 19
Figura 4.3 - Distribuição dos utentes consoante o sexo e a faixa etária. 20
Figura 4.4 - Distribuição dos utentes mediante o período de infeção. 21
Figura 4.5 - Distribuição da sintomatologia dos utentes. 22
Figura 4.6 - Distribuição dos utentes em relação ao estado de vacinação. 22
Figura 4.7 - Distribuição das comorbilidades pré-existentes dos utentes. 23
Figura 4.8 - Distribuição da medicação dos utentes. 24
Figura 4.9 - Número de plaquetas pré e pós diagnóstico de COVID-19. 24
Figura 4.10 - Volume plaquetário médio pré e pós diagnóstico de COVID-19. 26

Lista de abreviaturas e acrónimos

ACE2 – Enzima conversora da angiotensina 2

ACEIs – Inibidores da enzima conversa da angiotensina

aGPIIbIIIa – Glicoproteína IIb/IIIa ativada

ARBs – Bloqueadores dos recetores de angiotensina II

ARDS – Síndrome de dificuldade respiratória aguda

cDNA – ADN complementar

COVID-19 - Doença por Coronavírus 2019

CoVs – Coronavírus

CTD – Domínio C-terminal

DM – Diabetes *Mellitus*

DMVs – Vesículas de dupla membrana

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dsDNA – DNA de cadeia dupla

EDTA K3 – Ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico

EMA – Agência Europeia de Medicamentos

ERGIC – Retículo endoplasmático intermediário de Golgi

FDA – *Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Medicamentos)

G-CSF – Fator estimulador de colónias de granulócitos

GPIbvWP – Ligação do fator de Von Willebrand à glicoproteína Ib da membrana plaquetária

H_0 – Hipótese nula

H_1 – Hipótese alternativa

HE – Hemaglutinina esterase

HR1 – *Heptad* de repetição 1

HR2 – *Heptad* de repetição 2

HT – Hipertensão arterial

IFP – Fração de plaquetas imaturas

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL-10 – Interleucina 10

IL-1β – Interleucina 1β

IL-6 – Interleucina 6

IL-7 – Interleucina 7

IL-8 – Interleucina 8

IL-9 – Interleucina 9

kb – Kilobases

kg – Kilogramas

M-CSF – Fator estimulador de colónias de macrófagos

mAbs – Anticorpos monoclonais

MERS-CoV - Coronavírus da Síndrome Respiratória do Médio Oriente

mg – Miligramas

mL – Mililitro

MPR – *Ratio* volume plaquetário médio por número total de plaquetas

mRNA – ARN mensageiro

N.S – Nível de significância

NAATs - Testes de amplificação de ácidos nucleicos

NIAID – Instituto Nacional de Alergias e Doenças Infeciosas

NSPs – Proteínas não-estruturais

NTD – Domínio N-terminal

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORFs – *Open reading frames* (grelhas de leitura aberta)

PCR – Proteína C Reativa

RAS – Sistema renina angiotensina

RBD – Domínio de ligação ao recetor

RBM – Motivo específico de ligação ao recetor

RNA – Ácido ribonucleico

rP – Plaquetas reticuladas

RpRd – ARN polimerase ARN-dependente

rRT-PCR – Transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase em tempo real

RTC – Complexo replicação-transcrição

SARS-CoV - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave

SARS-CoV-2 - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences* (pacote estatístico para as Ciências Sociais)

ST – Sangue total

TMPRSS2 – Protease transmembranar celular serina 2

TNF-α – Fator de necrose tumoral-α

TRAg – Testes rápidos de antigénio

UCI – Unidade de cuidados intensivos

VPM – Volume plaquetário médio

vWF – Fator de Von Willebrand

β-CoV – Beta-coronavírus

1. Introdução

Em dezembro de 2019, a Organização Mundial de Saúde (OMS) foi oficialmente informada da ocorrência de um *cluster* de casos de pneumonia na cidade de Wuhan, na China[1]. Inicialmente de etiologia desconhecida, foi, entretanto, confirmado tratar-se de uma infeção provocada por um novo coronavírus, que veio a denominar-se Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), sendo a doença provocada por este designada de *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19)[2]. A sua rápida disseminação, a nível mundial, levou a OMS a declarar o surto da doença causada por SARS-CoV-2 como pandemia no dia 11 de março de 2020, com um número significativo e ainda crescente de morbilidade e mortalidade por todo o mundo[3].

De entre as diversas manifestações clínicas e laboratoriais da doença descritas ao longo da pandemia, as alterações hematológicas são as mais frequentes[4]. Destes, os principais eventos encontrados são: alterações na contagem de leucócitos, eritrócitos, plaquetas e estado de hipercoagulabilidade[4]. Embora a maioria dos pacientes desenvolva doença leve ou não complicada, aqueles com idade mais avançada ou com comorbilidades médicas subjacentes são mais suscetíveis à doença grave e maior probabilidade de adquirir um prognóstico mais reservado, com admissão na unidade de cuidados intensivos (UCI), progressão para síndrome de dificuldade respiratória aguda (ARDS) ou morte[5]. Estudos em larga escala revelaram que 18,8% a 36,2% dos pacientes apresentam trombocitopenia na admissão hospitalar[6]. Além disso, a incidência cumulativa de complicações trombóticas para pacientes com COVID-19 na UCI foi de 31%, enquanto apenas 1,3% dos pacientes de UCI não COVID-19 apresentam complicações trombóticas[6]. Durante a infeção, as plaquetas ativadas aderem ao subendotélio e a sua hiperatividade resulta na formação de trombos, conduzindo a isquemia arterial e, em alguns casos, a situações de embolia pulmonar[6]. Embora a ativação plaquetária seja crucial para os fenómenos de trombose e seja responsável por diversas complicações, o papel das plaquetas na patogénese de infeção por COVID-19 permanece incerto[6].

Deste modo, testes laboratoriais de fácil acesso, baratos e amplamente utilizados que demonstram a gravidade da infeção por COVID-19 são importantes[7]. A contagem de plaquetas e o volume plaquetário médio (VPM) são rotineiramente utilizados na prática clínica em todo o mundo, estando diretamente relacionados com a severidade da doença[7]. Assim, a questão que se pretende abordar com esta investigação é “Que alterações e fatores preditivos apresenta o plaquetograma em

doentes com positividade para a infeção por COVID-19?". O estudo tem como objetivo geral avaliar o plaquetograma em indivíduos que testaram positivo para COVID-19, sendo os objetivos específicos os seguintes:

- Avaliar o número de plaquetas e VPM nas amostras obtidas através de punção venosa;
- Comparar os valores obtidos com os dados antes da infeção;
- Correlacionar com outros parâmetros específicos, como a idade, sexo e estado de vacinação;
- Pesquisar fatores preditivos do plaquetograma no desenvolvimento da doença de COVID-19.

Com base na literatura encontrada, podemos formular a seguinte hipótese investigacional a ser estudada: 1) Existe correlação entre valores diminuídos do número de plaquetas e níveis aumentados do VPM na infeção por COVID-19; 2) Não existe correlação entre infeção por COVID-19 e alterações do perfil plaquetário.

Esta dissertação foca-se num tema que tem sido um dos principais alvos de investigação por parte da comunidade científica nos últimos três anos, desde o início da pandemia, existindo inúmeros estudos que visam a procura de mecanismos de resposta do hospedeiro que possam estar implicados na patogénese da infeção por COVID-19, nomeadamente ao nível das alterações laboratoriais. Sabe-se que além do papel tradicional das plaquetas na trombose e hemostase, as plaquetas medeiam aspetos-chave dos processos inflamatórios e imunológicos[8]. Assim sendo, faz todo o sentido desenvolver um trabalho em que seja possível reunir as principais informações que já existem sobre este vírus, de modo a fornecer orientações aos profissionais de saúde para modular a resposta imune inflamatória no estágio inicial da doença, evitando complicações trombóticas que conduzam até a morte[9].

Em primeiro lugar, uma abordagem geral dos tópicos do estado de arte foi realizada no capítulo 2, dando uma visão clara do conhecimento atual sobre o SARS-CoV-2 e os seus mecanismos de infeção/patogénese, os testes de diagnóstico, as drogas terapêuticas e vacinas autorizadas contra a infeção por COVID-19. No capítulo 3, além do desenho do estudo e métodos de amostragem, é referenciado as variáveis e análise estatística usadas para fazer a presente pesquisa. Os resultados são apresentados e discutidos no capítulo 4 e 5, respetivamente. No capítulo 6, é apresentado as conclusões do estudo. Por fim, as perspetivas futuras são relatadas no último capítulo.

2. Estado de arte

Neste capítulo, forneço uma visão geral do conhecimento atual sobre quatro tópicos principais. Começo por explorar a taxonomia, constituição e patogénese do SARS-CoV-2. De seguida, sintetizo os principais testes de diagnóstico utilizados na identificação do vírus. Por fim, examino as drogas terapêuticas e outros meios complementares de prevenção como a vacinação, mas também o papel das plaquetas no combate à infeção por SARS-CoV-2.

2.1. SARS-CoV-2

A estirpe SARS-CoV-2 pertence ao reino *Orthornavirae*, filo *Pisuviricota*, à ordem *Nidovirales*, à subordem *Cornidovirineae*, à família *Coronaviridae*, à subfamília *Orthocoronavirinae*, ao género beta-coronavírus, ao subgénero *Sarbecovirus* e à espécie *Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus*[2]. É uma das sete estirpes de coronavírus (CoVs) conhecidas com capacidade de infetar humanos, ou seja, é um *human coronavirus* (HCoV) e pertence ao mesmo subgénero que os outros dois CoVs responsáveis por desencadear surtos epidémicos no passado (SARS-CoV e MERS-CoV)[10].

O SARS-CoV-2 foi considerado um membro do género beta-coronavírus (β-CoV), que integra vírus envelopados de ácido ribonucleico (RNA) de cadeia simples com polaridade positiva, com um tamanho de aproximadamente 30 kb[11,12,13]. Este vírus apresenta uma morfologia semelhante aos outros CoVs, isto é, uma morfologia esférica, no entanto, uma vez que se trata de vírus com envelope, apresentam algum pleomorfismo devido às projeções deste[13]. Na extremidade 5', cerca de dois terços do seu genoma é composto por *open reading frames* (ORFs): a ORF1a e a ORF1b que codificam as poliproteínas pp1a e pp1b[14]. Na extremidade 3', o genoma contém várias ORFs responsáveis por codificar as proteínas acessórias e as quatro proteínas estruturais principais: a proteína de superfície *spike* (S), a proteína da membrana (M), a proteína do envelope (E), a proteína da nucleocápside (N) que são codificadas pelas ORFs S, M, E e N, respetivamente e ainda, a proteína hemaglutinina esterase (HE), que apesar de estar presente no SARS-CoV-2, não se encontra em todos os CoVs[14,15].

A glicoproteína M é a proteína transmembranar que se encontra em maior quantidade e é responsável pela montagem e morfogénese viral (incluindo regulação da replicação e empacotamento do RNA genómico em partículas virais), embora nestes processos seja igualmente necessário a interação com outras proteínas estruturais[16,17]. A proteína E é a mais pequena das proteínas estruturais do SARS-CoV-2, e o seu papel

está associado à patogénese, montagem e libertação dos viriões[16]. A proteína N caracteriza-se estruturalmente por possuir três regiões diferentes altamente conservadas: um domínio N-terminal (NTD), uma região central característica e um domínio de dimerização C-terminal (CTD). A região central é responsável pela ligação ao RNA e caracteriza-se por ser rica em resíduos de serina e arginina que mantêm a proteína fosforilada[16]. A principal função da proteína N nos CoVs é o empacotamento do genoma viral em capsídeos, como forma de garantir a sua proteção[18]. O último componente é a proteína S, que é uma glicoproteína trimérica composta por 2 subunidades funcionais: S1 que permite a ligação ao recetor celular e envolve o NTD e o domínio de ligação ao recetor (RBD)[19]. Cada RBD do SARS-CoV-2 contém um motivo específico de ligação ao recetor (RBM) de interação com a enzima conversora da angiotensina 2 (ACE2) expresso em várias células de diferentes órgãos, e S2 que medeia a fusão entre a membrana viral e a membrana celular e que compreende o péptido de fusão, a *heptad repeat 1* e a *heptad repeat 2* (HR1 e HR2, respetivamente)[19]. A proteína HE pode contribuir para a entrada e libertação do vírus nas células do hospedeiro, em conjunto com a proteína *spike*[20].

As proteínas acessórias dos CoVs, apesar de serem aparentemente irrelevantes para o processo de replicação, são importantes nos mecanismos de patogénese, sendo assim fatores de virulência, na medida em que permitem interferir com a resposta imune do hospedeiro[21].

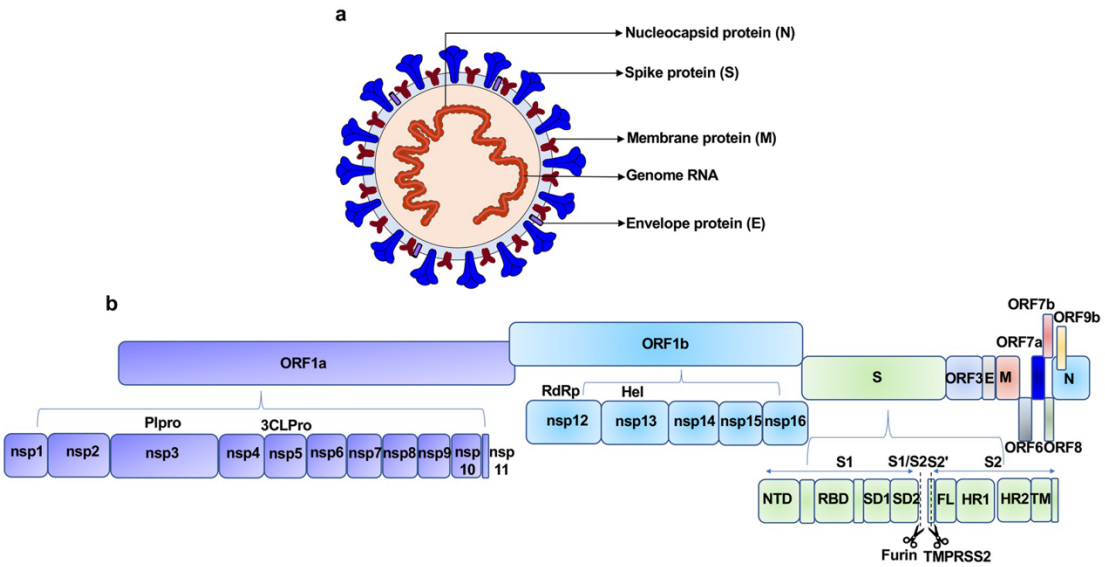

Figura 2.1. Representação esquemática da estrutura (A) e genoma (B) do SARS-CoV-2[22].

2.2. Manifestações clínicas

No que concerne às manifestações clínicas, o SARS-CoV-2 pode causar doença respiratória, intestinal, hepática e neurológica[12]. Entre humanos, a transmissão ocorre maioritariamente por via respiratória, através de gotículas contaminadas, embora as vias fecal-oral, sexual ou vertical possam também constituir possíveis formas de contágio[23]. A doença tem um período médio de incubação de cinco dias, iniciando-se geralmente como uma infeção do aparelho respiratório superior, cujos sintomas mais comuns são febre, tosse seca, astenia, congestão nasal, disgeusia, anosmia e fadiga[24]. No entanto, muitos casos apresentam-se com quadros clínicos diferentes, que podem incluir outros sintomas do foro respiratório (especialmente dispneia), sintomas gastrointestinais (por exemplo, náuseas, vómitos e diarreia), sinais e sintomas neurológicos, manifestações cutâneas, entre outros[24,25].

A evolução clínica da infeção por SARS-CoV-2 revela um espetro muito variado, desde casos assintomáticos até casos de doença muito grave com insuficiência respiratória aguda, ARDS, choque séptico, acidose metabólica e desordens de coagulação, estando vários fatores de risco associados a um aumento da severidade da doença, como por exemplo, obesidade, diabetes e doença renal. Igualmente, doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão, doença cardíaca congénita e doença coronária, têm sido associadas não só a doença grave, como também à exacerbação de condições pré-existentes no período pós-recuperação[25,26,27].

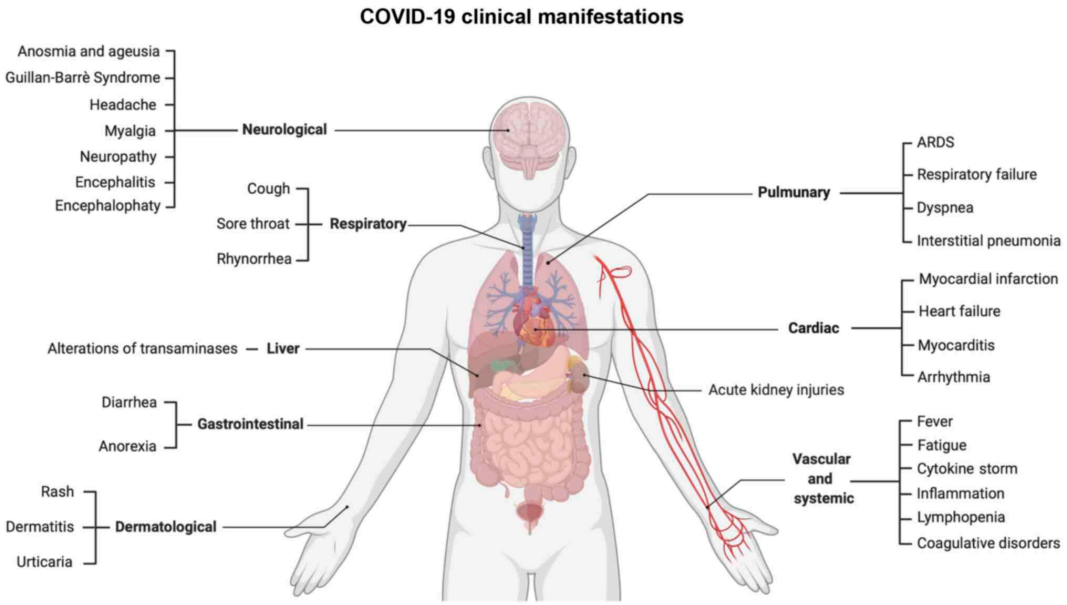

Figura 2.2 - Manifestações clínicas respiratórias e extra-respiratórias na infeção por COVID-19[28].

2.3. Patogénese da infeção por SARS-CoV-2

O processo pelo qual o SARS-CoV-2 entra na célula do hospedeiro e se replica, acontece inicialmente por ligação do RBD da glicoproteína *spike* do vírus, ao recetor da ACE2 localizado na membrana plasmática da célula-alvo do hospedeiro[29]. A capacidade de o vírus infetar determinadas células, isto é, tropismo celular do SARS-CoV-2, é determinado pela presença deste recetor que é expresso maioritariamente em células epiteliais do aparelho respiratório, macrófagos pulmonares, enterócitos e células endoteliais vasculares[30,31]. Após o processo de entrada e ligação, ocorre a etapa de fusão da membrana viral com a célula-alvo do hospedeiro, em que é necessário que a glicoproteína *spike* seja clivada por um de três tipos de proteases celulares: a protease transmembranar celular serina 2 (TMPRSS2), a catepsina B/L ou furina, presentes na membrana celular de algumas células e nos endossomas, respetivamente[30]. Esta clivagem vai ocorrer no limite S1/S2, alterando a estrutura da subunidade S2, individualizando-a, em S2', permitindo a ativação da proteína viral e facilitando a entrada do vírus por endocitose[32,33].

Uma vez no interior da célula, o genoma viral, ou seja, o seu RNA mensageiro (mRNA), é libertado para o citoplasma da célula-alvo, sendo traduzido em proteínas ao nível dos ribossomas da célula hospedeira[33]. A tradução do RNA viral, vai ocorrer na extremidade 5', onde estão codificados as ORF1a e ORF1b que vão produzir as poliproteínas pp1a e pp1b que por sua vez irão ser desassociadas em 16 proteínas não-estruturais (NSPs), formando um complexo replicação-transcrição (RTC) dentro de vesículas de dupla membrana (DMVs), que irão sintetizar RNA genómico e subgenómico para ser usado como modelo para a produção de mRNA subgenómico de sentido positivo[16]. Após a descapsidação, o RNA genómico viral vai ficar livre para ser replicado e transcrito pela RNA polimerase RNA-dependente (RpRd) dando origem a novas cópias do RNA genómico e aos diferentes mRNA subgenómicos que serão traduzidos nas proteínas apropriadas[34]. Após a conclusão desta etapa, vai haver a tradução das proteínas subgenómicas em proteínas estruturais S, M e E que serão isoladas no retículo endoplasmático, sendo depois transportadas para o lúmen do retículo endoplasmático intermediário de Golgi (ERGIC), ao qual se irá juntar a proteína N, do nucleocápside[35]. Desta forma, o virião fica completo e maturo, sendo depois libertado através de pequenas vesículas para fora das células, por exocitose[35].

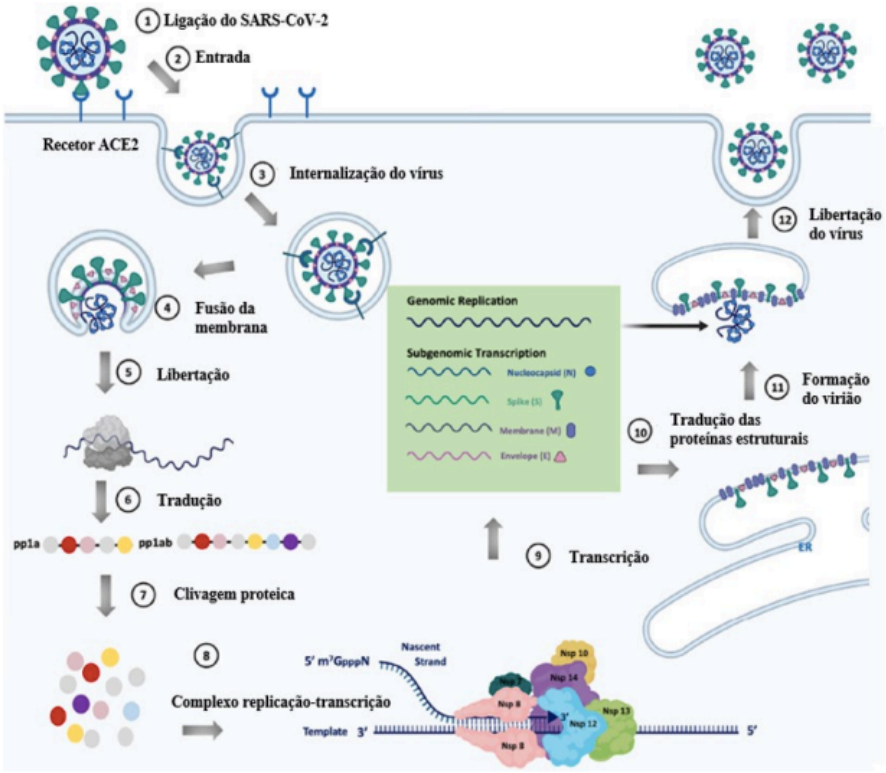

Figura 2.3 - Ciclo replicativo do vírus SARS-CoV-2. As diferentes etapas do ciclo de replicação viral estão numeradas de (1) a (12): (1) ligação do vírus ao recetor ACE2; (2) entrada do vírus na célula; (3) internalização do vacúolo contendo o vírus; (4) fusão da membrana celular com o vírus; (5) libertação do genoma viral no citoplasma da célula hospedeira; (6) tradução do genoma para produção das poliproteínas pp1a e pp1b; (7) clivagem de pp1a e pp1b e formação de 16 NSPs; (8) formação do RTC; (9) replicação do genoma viral e transcrição das proteínas estruturais codificadas pelo mRNA; (10) tradução dos mRNA subgenómicos; (11) formação de um novo virião; (12) libertação do vírus por exocitose. *Fonte: Adaptado de (29).*

2.4. Diagnóstico da infeção por SARS-CoV-2

Dada a importância do diagnóstico laboratorial na resposta atempada à COVID-19, é imperativo sistematizar os testes disponíveis laboratorialmente para deteção de SARS-CoV-2, no sentido de clarificar a sua indicação e utilização clínica. Os resultados destes testes laboratoriais devem ser sempre correlacionados com a história clínica e contexto epidemiológico. Os testes mais utilizados atualmente, têm por base a deteção de componentes virais, que pode consistir em material genético ou antigénico, bem como dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 produzidos na resposta imune[36].

2.4.1. Testes serológicos

Os testes serológicos, também designados de testes de anticorpos ou imunoensaios, são utilizados para detetar infeção prévia, e não, diagnosticar infeção atual de COVID-19, uma vez que avaliam a presença de anticorpos produzidos pelo

sistema imunitário em resposta ao SARS-CoV-2, e estes levam entre 8 e 10 dias a ser detetados após o aparecimento dos sintomas[37].

Este método consiste na colheita de uma amostra de sangue (sangue total, soro ou plasma) que vai ser utilizada para detetar a presença de imunoglobulinas IgM e IgG que são produzidas na resposta imunitária à presença do SARS-CoV-2 nomeadamente contra os antigénios nucleocápside ou *spike*[38]. As imunoglobulinas IgM desenvolvem-se primeiro, o que sugere que a pessoa ainda se encontra numa fase precoce da infeção[39]. Um pouco mais tarde na infeção surgem as IgG que durante um período são detetadas em simultâneo com as IgM. Após isso, os títulos de IgM diminuem em comparação com os títulos de IgG (processo de seroconversão)[38]. Contudo, na COVID-19, o padrão de seroconversão pode ser diferente, desconhecendo-se se esses anticorpos conferem imunidade de longa duração[40]. Um resultado negativo neste tipo de teste, significa que o mesmo não detetou anticorpos contra o SARS-CoV-2, já um resultado positivo poderá significar que o indivíduo foi vacinado contra a COVID-19 ou esteve em contacto com o vírus recentemente ou previamente e tenha desenvolvido uma resposta imune adaptativa ao SARS-CoV-2[37].

2.4.2. Testes rápidos de antigénio

Os testes rápidos de antigénio (TRAg) são testes de diagnóstico que identificam infeção atual por SARS-CoV-2, através da deteção de proteínas virais presentes no organismo do indivíduo infetado[38].

As amostras utilizadas para a realização destes testes são colhidas com a ajuda de uma zaragatoa através de esfregaços realizados na nasofaringe ou orofaringe, ou ainda, através de amostras de saliva expelidas para um tubo de colheita[37,38]. Posteriormente, a amostra é aplicada numa cassete que irá ou não identificar a presença de antigénios por imunocromatografia[41]. As vantagens deste tipo de método em comparação com os testes moleculares, passam pela rapidez na obtenção dos resultados, que ocorre geralmente entre 15 e 30 minutos após a colheita[41]. Contudo, os TRAg apresentam uma baixa sensibilidade, pelo que há uma maior probabilidade de resultados falsos negativos, especialmente quando a pessoa apresenta uma carga viral reduzida[37,38].

2.4.3. Testes moleculares de amplificação de ácidos nucleicos

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs), que detetam e amplificam o RNA do SARS-CoV-2 (mesmo em pequenas quantidades), são considerados os testes de diagnóstico mais específicos[42], nomeadamente a *Real-Time*

Transcription Polymerase Chain Reaction (rRT-PCR) que se trata de uma transcrição reversa, utilizando uma enzima, a transcriptase reversa para transformar RNA do vírus em DNA complementar (cDNA), é atualmente o *gold standard* no diagnóstico de infeção por SARS-CoV-2[43]. Este tipo de teste também utiliza amostras biológicas colhidas por profissionais de saúde com zaragatoa na nasofaringe ou orofaringe e amostras de saliva que são depois armazenadas a 4ºC, preparadas e analisadas em laboratórios com a utilização de sistemas moleculares especializados para detetar o genoma viral[43]. Este é um método com aproximadamente 100% de sensibilidade e especificidade, sendo uma técnica que apesar de complexa é bastante fiável nos resultados[44].

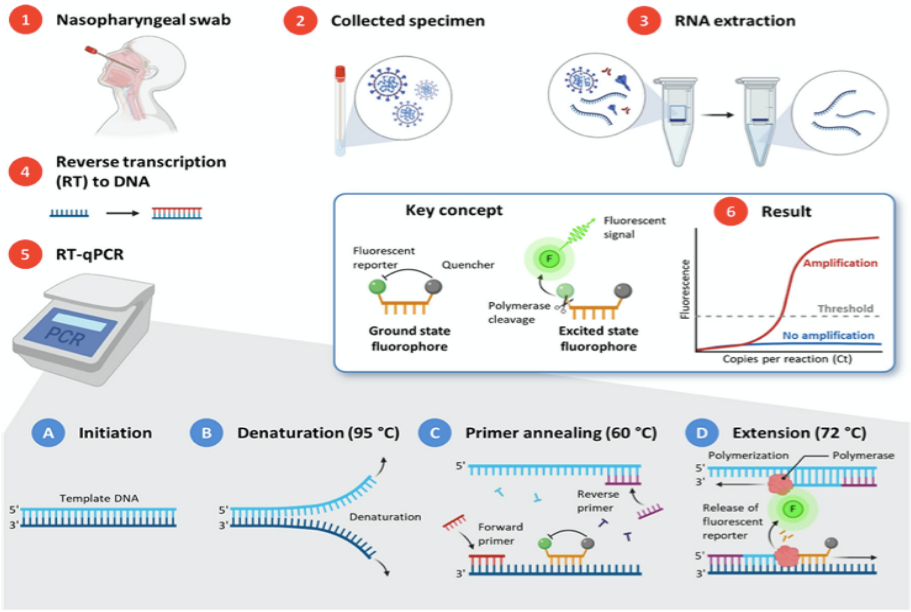

Figura 2.4 - Diagnóstico de COVID-19 através de rRT-PCR. O método rRT-PCR envolve colheita de material biológico e extração da amostra de RNA viral. A amostra de RNA extraída é convertida no seu cDNA pela transcrição reversa. Por fim, a amplificação da amostra de DNA é realizada em PCR quantitativo, e o cDNA viral é detetado por um sinal fluorescente[45].

2.5. Drogas terapêuticas e vacinação

No contexto da pandemia por COVID-19, e de forma complementar ao acesso a vacinas (que continua a ser a forma mais eficaz de prevenir a infeção por SARS-CoV-2), têm vindo a ser desenvolvidos novos fármacos para o tratamento desta infeção[46].

Remdesivir, ronapreve (casirivimab+imdevimab), paxlovid, anacinra, tocilizumab e corticosteroides têm sido algumas das terapêuticas promissoras avaliadas em ensaios clínicos para o tratamento da infeção[47,48].

O remdesivir é um pró-fármaco antiviral análogo dos nucleótidos, administrado por via intravenosa, que desacelera a replicação do RNA viral e que foi desenvolvido primeiramente para atuar no vírus Ébola[46,49,50]. Adicionalmente, recebeu autorização

conferida pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) e pela *Food and Drug Administration* (FDA) para utilização de emergência em adultos e adolescentes (com 12 a 18 anos de idade e com peso mínimo de 40 kg) com pneumonia que requerem administração suplementar de oxigénio e adultos que não requerem administração suplementar de oxigénio e que estão em risco aumentado de progredir para COVID-19 grave, contribuindo assim para uma maior probabilidade de recuperação e aumento da taxa de alta hospitalar[46].

De acordo com as diretrizes da OMS relativas às terapêuticas para a COVID-19, a combinação casirivimab/imdevimab (associação também conhecida por REGN-CoV-2) é recomendada a doentes que tenham um elevado risco de hospitalização, isto é, indivíduos não vacinados, idosos ou pessoas com doenças crónicas e/ou imunodeficientes, uma vez que estes dois anticorpos monoclonais (mAbs) mostraram reduzir o risco de hospitalização e a duração de sintomas em doentes não severos[46,51]. O mecanismo de ação subjacente a estes mAbs é explicado pela ligação simultânea e não competitiva do casirivimab e do imdevimab a diferentes epítopos do RBD da proteína S, neutralizando a capacidade do vírus de se unir ao recetor de superfície da ACE2 e de se fundir com a célula alvo[51].

A paxlovid é o primeiro medicamento antiviral oral para o tratamento da COVID-19. Este fármaco contém duas substâncias ativas, nirmatrelvir e ritonavir, em dois comprimidos diferentes[52]. O nirmatrelvir reduz a capacidade de multiplicação do SARS-CoV-2, enquanto o ritonavir prolonga a ação do nirmatrelvir, permitindo que ele permaneça mais tempo no corpo em níveis que afetam a multiplicação do vírus[52]. Está indicado para o tratamento de adultos que não precisam de oxigénio suplementar e com risco acrescido de desenvolver formas graves da doença[52].

A anacinra é um antagonista do recetor da IL-1 que tem revelado benefícios no tratamento de pacientes com COVID-19 com melhorias na função respiratória e diminuição da taxa de mortalidade[46]. Por outro lado, o tocilizumab, anticorpo monoclonal que bloqueia o recetor da IL-6 (citocina pró-inflamatória exacerbada na fase severa de COVID-19) demonstrou melhorias no controlo da disfunção imunitária e na hiperinflamação associada ao SARS-CoV-2, reduzindo a duração e/ou a gravidade da infeção[53,54]. Atualmente, o tocilizumab está indicado para adultos que se encontrem a receber corticosteroides sistémicos e que necessitem de oxigénio suplementar ou ventilação mecânica[46].

Por último, os corticosteroides como o dexametasona, podem ser potenciais candidatos na supressão da resposta inflamatória, com evolução favorável da infeção em doentes tratados com esta terapêutica[55]. No entanto, não devem ser consideradas na generalidade dos casos de COVID-19, apenas em casos severos e críticos que

requerem suporte respiratório com oxigenação suplementar ou ventilação mecânica sendo a dose recomendada de 6 mg/dia até 10 dias, por via oral ou em perfusão intravenosa[46,55].

As vacinas são compostas por várias substâncias sensibilizadoras do organismo que produzem respostas imunitárias eficientes. Podem ser clássicas com vírus inativados, atenuados ou partículas semelhantes a vírus ou de próxima geração com RNA, DNA ou vetores[56]. Atualmente, existem 4 vacinas que demonstraram ser seguras e eficazes e que estão autorizadas para administração na União Europeia pela EMA para prevenção da doença provocada pelo COVID-19: *Comirnaty, Spikevax, Janssen e Vaxzevria*[57].

Duas delas - *Comirnaty e a Spikevax* - são vacinas baseadas no mRNA do SARS-CoV-2 que vão produzir uma resposta imunológica diretamente contra o vírus e que têm demonstrado um elevado nível de estabilidade e segurança[58]. A vacina *Comirnaty* é uma vacina de mRNA produzida pela *BioNTech* e *Pfizer*, Inc. que atua através do encapsulamento do mRNA do SARS-CoV-2 com nucleósido modificado em nanopartículas lipídicas que entra nas células do hospedeiro induzindo-as a codificar transitoriamente a proteína *spike* do vírus, o que vai estimular uma resposta imunitária humoral e celular, sem o risco de contrair a doença[59]. À semelhança desta, também a *Spikevax* anteriormente designada de Moderna, é uma vacina de mRNA que foi desenvolvida pelo Instituto Nacional de Alergias e Doenças Infeciosas (NIAID) e pela Moderna, Inc[60]. A *Spikevax* atua pelo encapsulamento do mRNA do SARS-CoV-2 que codifica a sequência integral da glicoproteína *spike* modificada, estabilizando-a numa conformação pré-fusão, em nanopartículas lipídicas[61]. As células e gânglios linfáticos drenantes do hospedeiro, vão no local onde é administrada a vacina, absorver esta nanopartícula lipídica e entregar o mRNA não replicante às células hospedeiras onde ocorrerá a tradução da glicoproteína *spike*, que vai ser expressa temporariamente à superfície da célula, desencadeando resposta das células T e B do sistema imunitário, para produção de anticorpos que neutralizem o antigénio desconhecido, conferindo proteção ao indivíduo contra a COVID-19, sem que este desenvolva a doença[38,62].

No que diz respeito à vacina *Janssen* e à *Vaxzevria*, estas utilizam um vetor viral baseado em adenovírus, que são vírus de DNA de cadeia dupla sem invólucro (dsDNA)[63]. A vacina *Janssen* é uma vacina de vetor viral, fabricada pela *Janssen Pharmaceuticals Companies of Johnson & Johnson*, cujo mecanismo de ação se baseia no uso de um vetor de adenovírus humano tipo 26, não replicante que foi modificado para conter o gene que codifica a glicoproteína *spike* do SARS-CoV-2 numa conformação estabilizada, produzindo-a e expressando-a transitoriamente, sendo

depois reconhecida como estranha ao sistema imunitário do indivíduo e posteriormente atacada pelos anticorpos neutralizantes que serão produzidos em defesa do organismo[38]. A vacina *Vaxzevria*, também designada de *AstraZeneca*, é uma vacina de vetor viral, desenvolvida pela Universidade de Oxford em parceria com a *Astrazeneca*, Inc[62]. Esta vacina utiliza um vetor não recombinante, o adenovírus de chimpanzé não replicante que vai conter no seu interior, a sequência genética da proteína *spike* do SARS-CoV-2, que vai depois ser expressa localmente na conformação pré-fusão, ativando as respostas imunitárias, através dos anticorpos neutralizantes que vão atacar o vírus, contribuindo para a proteção contra a COVID-19[62].

2.6. Plaquetas

As plaquetas são pequenos fragmentos de uma célula, que se formam na medula óssea a partir da fragmentação do citoplasma dos seus precursores, os megacariócitos[64]. Promovem a coagulação do sangue e auxiliam na reparação da parede vascular, evitando perdas sanguíneas, num processo denominado de hemostase[65]. Este processo fisiológico é regulado por diferentes mecanismos e inclui, essencialmente três fases: resposta vascular (constrição do vaso lesado), hemostase primária (formação do trombo plaquetário) e hemostase secundária (formação de coágulo de fibrina)[65]. Durante muito tempo, pensou-se que as funções das plaquetas estavam restritas ao seu papel na coagulação do sangue e agregação plaquetária[66]. Este dogma tradicional foi mudando nas últimas décadas e agora sabe-se que as plaquetas estão implicadas em várias condições fisiopatológicas, incluindo inflamação, angiogénese, carcinogénese e resposta imune a vírus[67]. De facto, as plaquetas expressam milhares de recetores nas membranas celulares que são importantes para as funções normais, como por exemplo as integrinas, seletinas, recetores de lípidos e imunoglobulinas[66]. Muitos destes são ativados no início de uma infeção e, portanto, as plaquetas podem ser vistas como uma das defesas de primeira linha contra vários patógenos, incluindo o vírus do SARS-CoV-2[66].

A suscetibilidade das plaquetas ao SARS-CoV-2 ainda é controversa, no entanto sabe-se que as plaquetas expressam a ACE2, pelo que a ligação da proteína *spike* do vírus aumenta diretamente a agregação plaquetária, a secreção de grânulos α e grânulos densos e a formação de trombos[67]. Embora inicialmente a contagem de plaquetas esteja dentro do intervalo de referência na maioria dos pacientes que apresentam COVID-19, a ativação plaquetária desempenha um papel crucial no desenvolvimento da trombose[67]. Tendo em conta que o tamanho das plaquetas é um indicador de “reciclagem” plaquetária, o volume plaquetário médio é conhecido por se

correlacionar com a ativação plaquetária, cujo aumento se verifica em pacientes com trombose[67].

3. Metodologia

3.1. Desenho, método e local do estudo

Foi realizado um estudo quantitativo, correlacional, observacional e transversal numa população de utentes selecionados para colheita de sangue venoso, nomeadamente hemograma para avaliação da contagem de plaquetas e VPM, antes e depois da infeção por COVID-19[68]. Considera-se quantitativo porque caracteriza-se pela medição de variáveis e pela obtenção de resultados numéricos suscetíveis de ser generalizados a outras populações ou contextos[68]. A nível da questão de investigação, o estudo é correlacional porque procura-se avaliar o grau de correlação ou associação entre os valores obtidos em duas ocasiões no mesmo grupo de sujeitos relativamente à variação dos valores do plaquetograma[68]. É ainda classificado como observacional, uma vez que, cinge-se à observação não existindo qualquer intervenção de qualquer aspeto que esteja em estudo e transversal, com uma única observação sem acompanhamento posterior[68].

O estudo foi realizado no laboratório da Affidea - Hormofuncional, no período compreendido entre agosto e outubro de 2022 na dependência das condições logísticas para a sua realização. Durante o processo de seleção dos utentes foi entregue um consentimento informado aos participantes, bem como um inquérito para recolha de dados demográficos e clínicos (Apêndice 2 e 3, respetivamente).

3.2. População/Amostragem e critérios de seleção

A população do estudo foi constituída por todos os utentes que se dirigiram ao serviço de colheitas da Affidea – Hormofuncional, designadamente ao posto de colheitas do Saldanha, no âmbito de análises de rotina, no período compreendido entre agosto e outubro de 2022. O laboratório Hormofuncional – Centro de Hormonologia Funcional iniciou a sua atividade em outubro de 1982, sendo no momento composto por 3 laboratórios e mais de 400 postos de colheitas de Análises Clínicas em Portugal, contando com uma equipa de mais de 1000 profissionais e tratando 1 000 000 pacientes/ano[69].

A amostragem real foi não probabilística por conveniência[68], submetendo-se aos seguintes critérios de elegibilidade:

- Critérios de inclusão: Todos os utentes que tenham tido infeção por COVID-19 e que tenham realizado análises nomeadamente hemograma antes da infeção, até há um ano, na Affidea.
- Critérios de exclusão: Além dos indivíduos que não cumpriram os critérios supracitados, foram excluídas todas as colheitas de sangue com presença de coágulos e/ou microcoágulos no tubo de ácido etilenodiamino tetra-acético tripotássico (EDTA K3).

Na amostra não foi estipulado um valor limite de participantes e, por isso, o número de participantes foi o conseguido em dois meses de recolha de dados. Deste modo, o presente estudo é composto por 50 utentes, os quais reuniram os requisitos supracitados.

3.3. Recolha de amostras sanguíneas

Para este projeto foram recolhidas amostras de sangue total (ST) de indivíduos voluntários de várias faixas etárias, que tiveram infeção por COVID-19, após leitura e assinatura do consentimento informado, salvaguardando todas as questões éticas inerentes. Para tal, foi utilizado um tubo com EDTA K3, no qual foram recolhidos 3 mL de ST, para determinação do hemograma. Todas as amostras para realização do hemograma foram enviadas posteriormente para a secção de hematologia do laboratório da Affidea, as quais foram processadas no analisador hematológico *Horiba Medical Yumizen H2500* com capacidade de 120 amostras em simultâneo e carga contínua, que faz até 58 parâmetros, com homogeneização automática das amostras por rotação a 360º e câmara de contagem termostatizada a 37ºC que permite a estabilidade dos resultados[70]. É um equipamento baseado na tecnologia de impedância elétrica, ou seja, na medição de alterações numa corrente elétrica produzidas durante a passagem de células sanguíneas, através de um pequeno orifício situado entre dois elétrodos[71]. Para tal, na câmara de contagem é aplicada uma corrente elétrica de baixa frequência entre o elétrodo externo (situado ao nível da suspensão celular) e o interno (submerso num tubo de vidro que possui um pequeno orifício)[71]. As células suspensas numa solução condutora (diluente) passam através da pequena abertura do tubo de vidro causando uma diferença de potencial entre os dois elétrodos submersos[71]. Isto

gera um impulso elétrico que é detetado e medido: o número de pulsos é proporcional ao número de células contadas e o tamanho dos pulsos ao volume de cada célula[71].

3.4. Etapas do estudo

O presente estudo foi desenvolvido em quatro etapas, nomeadamente:

• Etapa 1 - Seleção dos participantes e entrega do consentimento informado e inquérito do estudo

Os participantes foram selecionados de acordo com os critérios de elegibilidade acima mencionados. Após o esclarecimento sobre o estudo, foi entregue aos participantes o consentimento informado e o inquérito para recolha de dados demográficos e clínicos.

• Etapa 2 - Colheita de sangue total dos participantes

Foram colhidos 3 mL de sangue periférico de 50 participantes para tubos de EDTA K3, com posterior homogeneização do ST com o anticoagulante. As colheitas de sangue foram realizadas de 16 de agosto a 16 de outubro de 2022, no período da manhã, e mantidas em repouso a 4ºC até ao seu transporte, em mala térmica, para o laboratório.

• Etapa 3 – Processamento do ST

Numa primeira fase, as amostras foram triadas no sistema informático do laboratório *eDeiaLab* e de seguida para a realização do hemograma, o tubo de EDTA K3 foi colocado num suporte do equipamento *Yumizen H2500*. O suporte foi inserido no equipamento, que automaticamente homogeneiza o tubo e faz a determinação dos parâmetros. No final, o suporte com os tubos são retirados do equipamento e as amostras são arquivadas.

• Etapa 4 - Registo dos resultados do perfil plaquetário

No que concerne aos fatores relativos aos participantes, recorreu-se ao consentimento informado, bem como ao *eDeiaLab.* Todos os resultados dos parâmetros do perfil plaquetário foram consultados na base de dados do equipamento *Yumizen H2500* e registadas em folhas de cálculo do *Microsoft Office Excel*.

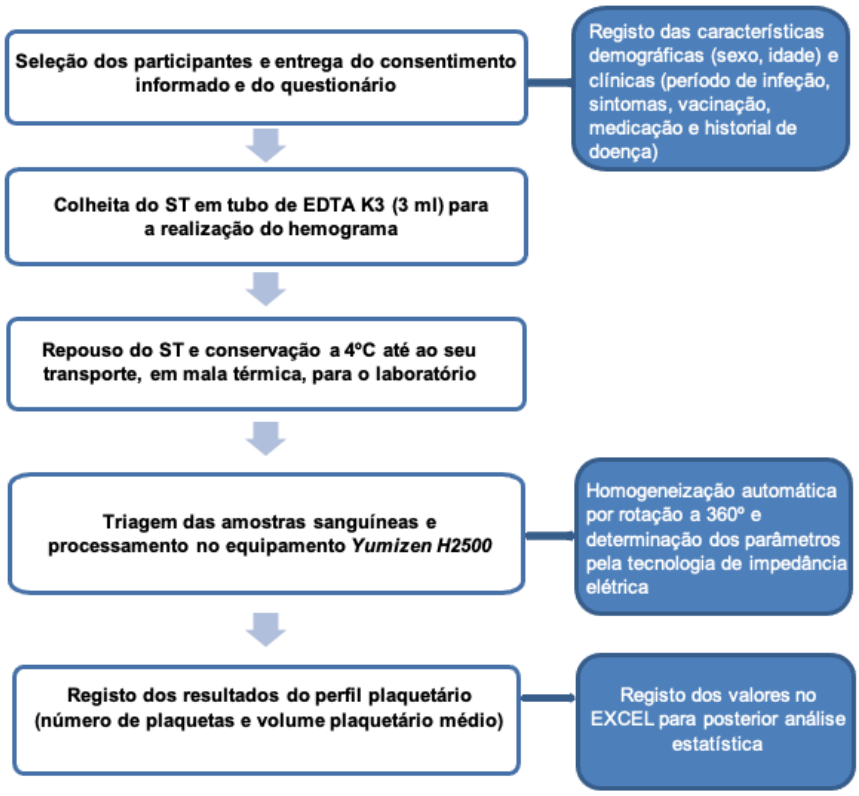

Figura 3.1 – Etapas do estudo relativamente à recolha das amostras e dos respetivos valores.

3.5. Variáveis do estudo

Em relação às variáveis a ser estudadas, podemos classificá-las como qualitativa nominal (sexo, período de infeção, medicação e as comorbilidades), sendo a variável sexo ainda considerada como dicotómica; quantitativa contínua (VPM); quantitativa discreta (idade, vacinação e número de plaquetas).

3.6. Análise estatística

Face ao enquadramento das variáveis, recorreu-se a dois tipos de análise estatística, designadamente, univariada e bivariada[68].

No que diz respeito à análise univariada, utilizou-se a estatística descritiva para descrever os fenómenos através das seguintes medidas: média e medidas de dispersão (por exemplo, amplitude de dados, valor mínimo e máximo, desvio padrão e variância)[68]. A representação das variáveis nominais expressou-se em gráficos circulares e de barras.

Na análise bivariada, verificou-se a normalidade da distribuição das variáveis em estudo, através dos testes de normalidade, designadamente o de *Kolmogorov-Sminov* devido ao facto do tamanho da amostra ser superior a 30 ($n>30$)[68]. As hipóteses estatísticas para a normalidade foram: Hipótese nula (H_0) - a distribuição da variável é normal e Hipótese alternativa (H_1) - a distribuição da variável não é normal[68]. Se o valor de $p \leq 0.05$, então rejeitamos a H_0 que os dados são normalmente distribuídos ao nível de significância (N.S.) 0.05[68]. Caso contrário, se valor de $p > 0.05$, rejeitamos a H_1 ao N.S. de 0.05[68]. Numa fase posterior, foi testada a hipótese da existência de uma associação entre infeção por COVID-19 e alterações nos parâmetros do perfil plaquetário, através do teste de *t-student*, sendo que as hipóteses estatísticas utilizadas foram: H_0: Sem correlação com o plaquetograma; H_1: Existe correlação com o plaquetograma. Se valor de $p \leq 0.05$, então rejeita-se a H_0 ao N.S. de 0.05 a favor da H_1 que existe correlação entre as variáveis.

Os dados obtidos foram registados em tabelas *EXCEL*® (representado no Apêndice 4) e exportados para o programa *SPSS*® Versão 27.

3.7. Ética

Este trabalho foi aprovado no Conselho de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde com a referência interna CE-ESTeSL-Nº 125-2022 (Anexo 1) e também pela Direção Técnica do Laboratório Affidea - Hormofuncional (Anexo 2), de modo a garantir a salvaguarda de todas as questões éticas inerentes. Estas questões ético-legais constituem uma componente fundamental da pesquisa moderna, relacionada não apenas com o assunto em estudo, mas também com o investigador[72]. Os investigadores têm o dever de proteger a vida, a saúde, a dignidade, a integridade, o direito à autodeterminação, a privacidade e a confidencialidade das informações pessoais dos indivíduos que decidem participar na investigação[73]. O Relatório de Belmont também refere 3 princípios éticos primordiais: (1) respeito pelas pessoas, isto é, a exigência de reconhecer a autonomia e proteger aqueles que apresentam uma autonomia reduzida; (2) beneficência, ou seja, acima de tudo não causar danos, maximizar os potenciais benefícios e minimizar os possíveis danos; (3) justiça a nível individual e social[72]. Nesse sentido, sendo um projeto em que foram utilizadas amostras biológicas de indivíduos para fins estritamente investigacionais, existiu o compromisso de ter em consideração os direitos da autonomia, ou seja, todos os participantes aderem de forma voluntária ao estudo e o direito à privacidade, preservada através da confidencialidade do tratamento dos dados obtidos nos questionários garantindo os princípios de ética de acordo com a Declaração de Helsínquia e Convenção de Oviedo[74]

e em acordo com a Lei Portuguesa nº 58/2019 de 8 de agosto sobre a proteção de dados[75], mediante leitura e assinatura de um consentimento informado de todos os indivíduos, ou dos pais/tutores legais no caso de menores ou indivíduos com deficiência intelectual (Apêndice 2). Todas as amostras recolhidas foram identificadas com um código previamente estabelecido.

4. Resultados

4.1. Caracterização geral dos participantes do estudo

4.1.1. Sexo

Da análise descritiva da amostra do presente estudo, verificou-se que a maioria dos participantes são do sexo feminino.

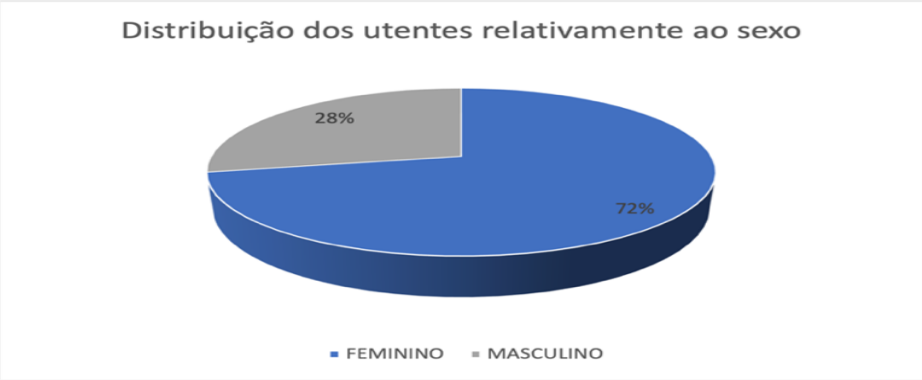

Figura 4.1 - Distribuição dos utentes consoante o sexo.

4.1.2. Idade

Na figura 4.2 observa-se que 76% dos participantes apresenta uma faixa etária entre os 18 e 64 anos de idade.

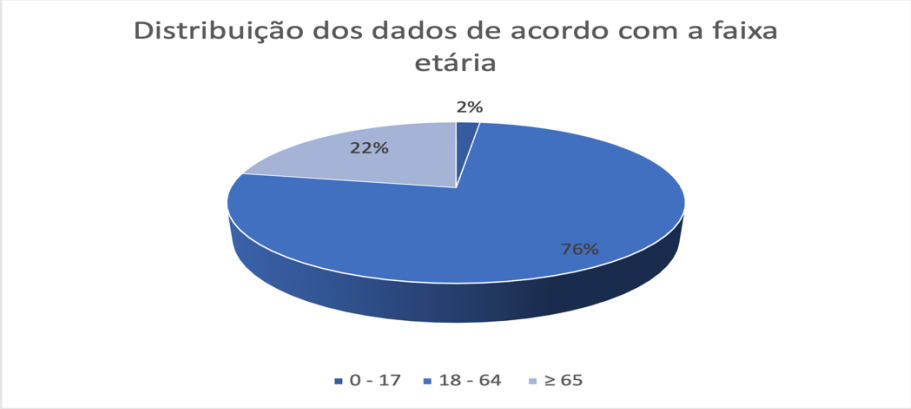

Figura 4.2 - Distribuição dos utentes de acordo com a faixa etária (a estratificação por faixas etárias foi realizada com base nas diretrizes da *National Institutes of Health*).

Analisando a figura 4.3, a maior parte dos participantes quer do sexo masculino como do feminino, pertencem à faixa etária entre os 18 e 64 anos.

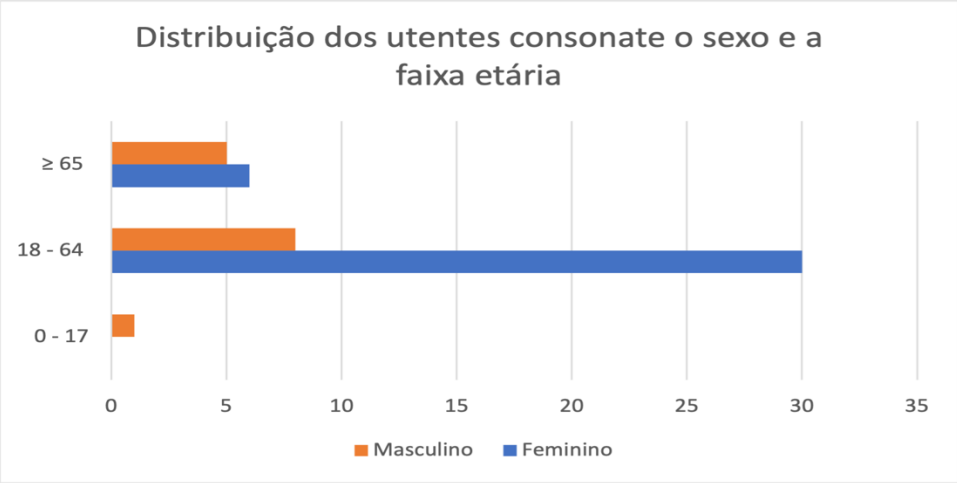

Figura 4.3 - Distribuição dos utentes consoante o sexo e a faixa etária.

Conforme representado na tabela 4.1, a média da idade para o sexo masculino foi de 56,50±19,138 anos, e para o sexo feminino de 45,89±15,048 anos. Da análise da informação relativa à idade, verificou-se que a idade mínima foi de 4 anos e a máxima de 84 anos.

Tabela 4.1 - Estatísticas descritivas da variável idade para ambos os sexos.

	Sexo			Estatística	Estatística do teste Padrão
Idade	Masculino	Média		56.50	5.115
		95% de Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	45.45	
			Limite superior	67.55	
		5% da média aparada		57.89	
		Mediana		60.00	
		Variância		366.269	
		Erro Padrão		19.138	
		Mínimo		4	
		Máximo		84	
		Amplitude		80	
		Amplitude interquartil		20	
		Assimetria		-1.524	.597
		Curtose		3.834	1.154
	Feminino	Média		45.89	2.508
		95% de Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	40.80	
			Limite superior	50.98	
		5% da média aparada		45.31	
		Mediana		44.50	
		Variância		226.444	
		Erro Padrão		15.048	
		Mínimo		23	
		Máximo		81	
		Amplitude		58	
		Amplitude interquartil		17	
		Assimetria		.721	.393
		Curtose		-.215	.768

4.1.3. Período de infeção

No que concerne ao período de infeção, apenas 2% (1/50) dos participantes contraiu a doença em meados de dezembro de 2021, numa altura em que foi identificada a nova variante Ómicron. Esta variante, que se veio a descobrir que era mais transmissível que a variante Delta, levou a uma quinta vaga da pandemia, sendo que neste presente estudo correspondeu a 22% (11/50) dos casos em janeiro. Em fevereiro e março de 2022, 12% (6/50) e 2% (1/50) dos pacientes desenvolveram a infeção, respetivamente. Depois, 12% (6/50) dos participantes testaram positivo em abril, seguindo-se o mês de maio com 18% (9/50) e junho com 22% (11/50). A partir de junho, o número de doentes com infeção veio a diminuir com 10% (5/50) dos casos em julho, 4% (2/50) em setembro e em outubro.

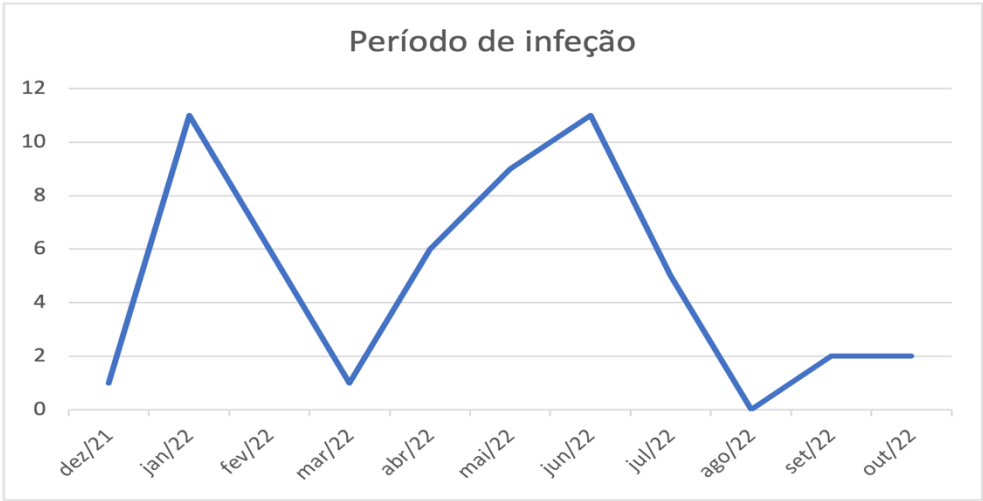

Figura 4.4 - Distribuição dos utentes mediante o período de infeção.

4.1.4. Sintomas

Do ponto de vista clínico, 10% (5/50) dos participantes foram assintomáticos e apenas realizaram o teste COVID-19 por terem contactado com um caso positivo. Quanto aos indivíduos que apresentaram sintomas ao longo da infeção, 12% (6/50) desenvolveu doença leve, nomeadamente febre ou apenas tosse. Enquanto 22% (11/50) dos participantes referem ter tido dois sintomas, sendo os mais comuns, dor de garganta e mialgias. Por outro lado, 16% (8/50) dos indivíduos apresentaram três sintomas (p.e. febre, tosse, cansaço e alguns com astenia), e 20% (10/50) desenvolveu doença moderada, cujos sintomas variavam de febre, tosse a perda de paladar e olfato. Por fim, 6% (3/50) dos participantes manifestaram cinco sintomas, incluindo sintomas menos comuns como vómitos, e outros 14% (7/50) reportaram um quadro clínico mais delicado em que um deles descreve sintomas raros como petéquias.

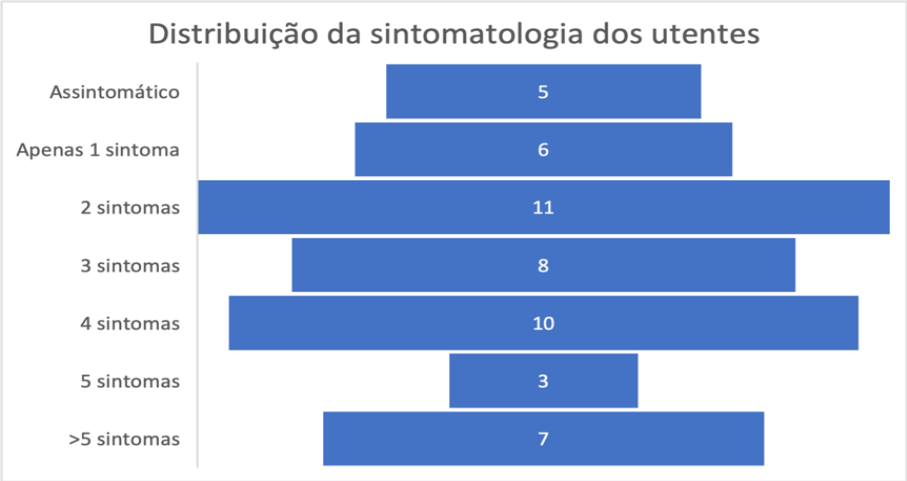

Figura 4.5 - Distribuição da sintomatologia dos utentes.

4.1.5. Vacinação

Quanto ao estado de vacinação, verificou-se que a maioria dos participantes foram vacinados com 3 doses.

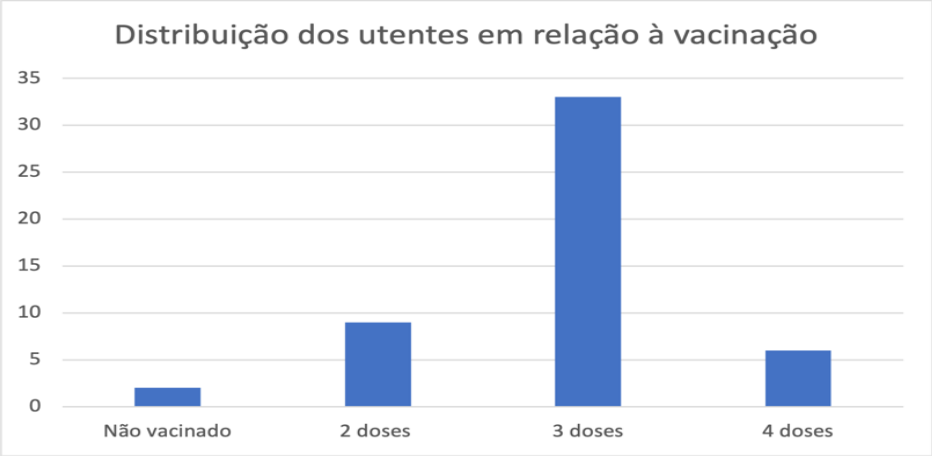

Figura 4.6 - Distribuição dos utentes em relação ao estado de vacinação.

4.1.6. Comorbilidades

Dos 50 participantes, 56% (28/50) não têm histórico de doenças crónicas, enquanto 44% (22/50) apresentam comorbilidades que constituem um fator de risco no desenvolvimento de infeção por COVID-19. Destes, 10% (5/50) possuem Hipertensão Arterial (HT), 4% (2/50) têm Diabetes *Mellitus* (DM) e outros 4% (2/50) têm HT e DM. 26% (13/50) dos pacientes apresentam outras condições clínicas, como doença cardiovascular, alterações na tiróide, tumores ou doenças autoimunes (por exemplo,

artrite reumatóide e síndrome de Sjögren). Os dados das comorbilidades estão resumidos na figura 4.7.

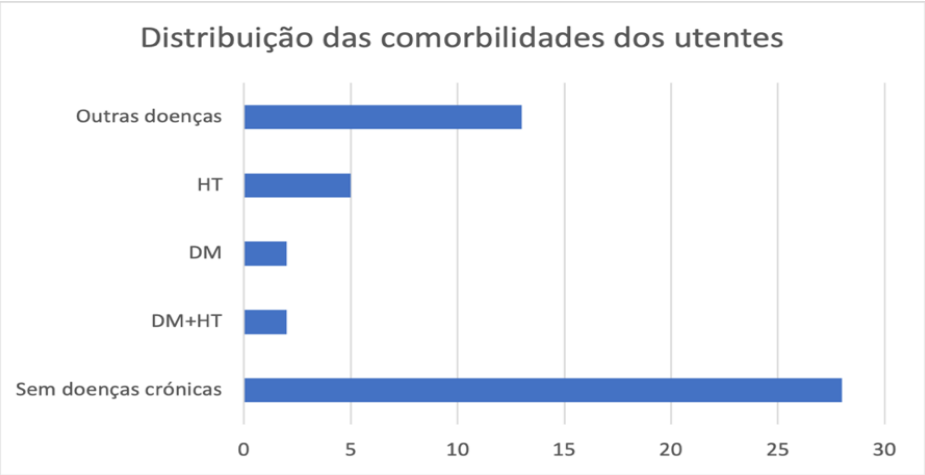

Figura 4.7 - Distribuição das comorbilidades pré-existentes dos utentes.

4.1.7. Medicação

No presente estudo, 8% (4/50) dos participantes tomam anticoagulantes orais tais como, ácido acetilsalicílico e xarelto, o que já indica problemas ao nível da coagulação. Por outro lado, 26% (13/50) dos utentes tomam regularmente medicação para a HT, como por exemplo, indapamida, peridonpril, entre outros. Outra classe de medicamentos muito utilizada em associação com anti-hipertensivos são as estatinas, tais como a atorvastatina no tratamento de dislipidemias. 12% (6/50) dos participantes tomam medicação para alterações na tiróide, nomeadamente eutirox e 10% (5/50) referem que tomam antidepressivos. Numa pequena fração de participantes, 4% (2/50) tomam anti-histamínicos como o zyrtec no tratamento de alergias e 4% (2/50) da população feminina do estudo toma a pílula. Quanto aos distúrbios gastrointestinais mencionados por 6% (3/50) dos participantes, estes tomam fármacos como o omeprazol e relativamente às doenças autoimunes, 4% (2/50) dos participantes tomam drogas como o sctrutum ou metotrexato. Apenas 2% (1/50) dos indivíduos tomam combodart para hiperplasia prostática, assim como corticóides. No que diz respeito aos suplementos, existe 8% (4/50) dos participantes que tomam vários tipos de suplementos, sendo os mais mencionados, os de ferro, lyprinol e sctructomax. E para as diabetes, 8% (4/50) tomam fármacos como a metformina, xigduo e a administração de insulina. Por fim, 4% (2/50) dos participantes tomam ansiolíticos, anti-asmáticos e realizam medicação para problemas ósseos.

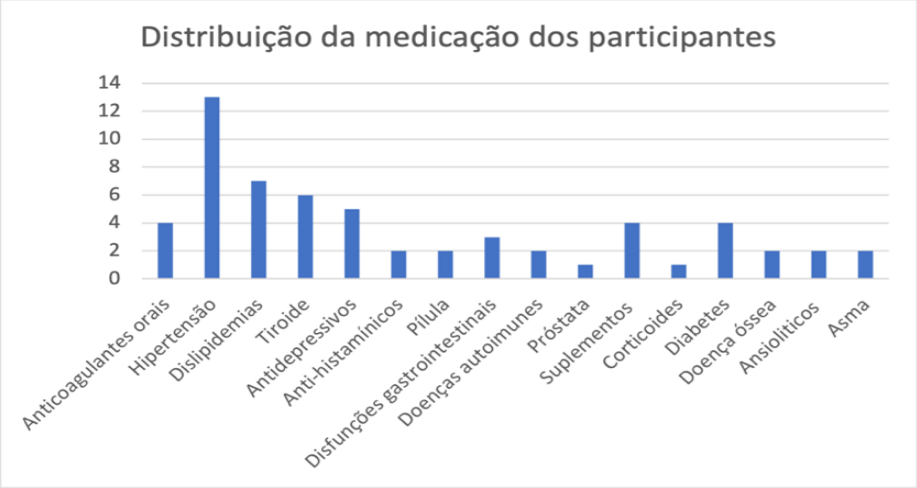

Figura 4.8 - Distribuição da medicação dos utentes.

4.2. Plaquetograma antes e depois da infeção

Para a realização do estudo do perfil plaquetário dos participantes, foram analisados os seguintes parâmetros: contagem total de plaquetas, VPM, *ratios* PLT/VPM e VPM/PLT, antes e depois da infeção por COVID-19.

4.2.1. Contagem total de plaquetas

A contagem basal (pré-diagnóstico de COVID-19) e pós COVID-19 para cada paciente foi avaliada para verificar a alteração da contagem de plaquetas durante a infeção viral, tendo sido obtido o seguinte gráfico. O intervalo de referência do número de plaquetas para uma pessoa saudável é de 150-450 x 10^9/L[76].

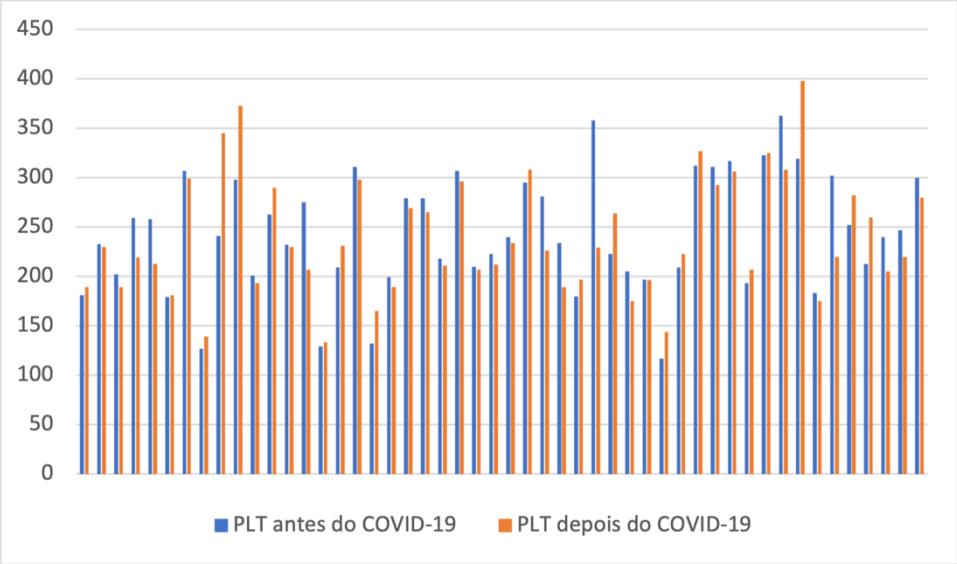

Figura 4.9 - Número de plaquetas pré e pós diagnóstico de COVID-19.

De seguida, foi realizado o teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov* (n>30) para averiguar se as variáveis seguem a distribuição normal no que diz respeito ao teorema do limite central. A tabela 4.2 demonstra que o parâmetro número de plaquetas antes do COVID-19 segue a distribuição normal (p > 0.05), e apesar do valor de *p* do número de plaquetas depois do COVID-19 ser inferior a 0.05, pode-se considerar como tendo distribuição normal devido ao facto do tamanho da amostra ser superior a 30[(77)].

Tabela 4.2 - Teste de normalidade para o parâmetro número de plaquetas antes e depois da infeção por COVID-19.

Testes de Normalidade

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Estatística	gl	Sig.	Estatística	gl	Sig.
Nº de plaquetas antes do COVID-19	.087	50	.200*	.974	50	.341
Nº de plaquetas depois do COVID-19	.155	50	.004	.961	50	.095

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Deste modo, foi realizado o teste de comparação de médias, nomeadamente o teste *t-student* (amostras emparelhadas) para o número de plaquetas antes e depois da infeção, uma vez que seguem a distribuição normal, para averiguar se existe diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros do perfil plaquetário. De acordo com os dados da tabela 4.3, a hipótese alternativa é rejeitada, uma vez que o valor p=0.471 (p > 0.05), logo não existe evidência de que há diferenças significativas nos valores médios do número de plaquetas antes e depois da infeção por COVID-19. Assim sendo, pode-se concluir que não existe correlação entre infeção por COVID-19 e alterações do perfil plaquetário, pelo que se pode validar a segunda hipótese investigacional do estudo.

Tabela 4.3 - Teste *t-student* emparelhado para o parâmetro número de plaquetas antes e depois do COVID-19.

Teste de amostras emparelhadas

		Diferenças emparelhadas					t	df	Sig. (2 extremidades)
		Média	Erro Desvio	Erro padrão da média	95% Intervalo de Confiança da Diferença Inferior	Superior			
Par 1	Nº de plaquetas antes do COVID-19 - Nº de plaquetas depois do COVID-19	4.040	39.294	5.557	-7.127	15.207	.727	49	.471

4.2.2. Volume plaquetário médio (VPM)

A contagem basal (pré-diagnóstico de COVID-19) e pós COVID-19 para cada indivíduo foi avaliada para verificar a alteração no VPM durante a infeção, conforme representado na figura 4.10. O intervalo de referência do VPM para uma pessoa saudável é de 6-12 fL[76].

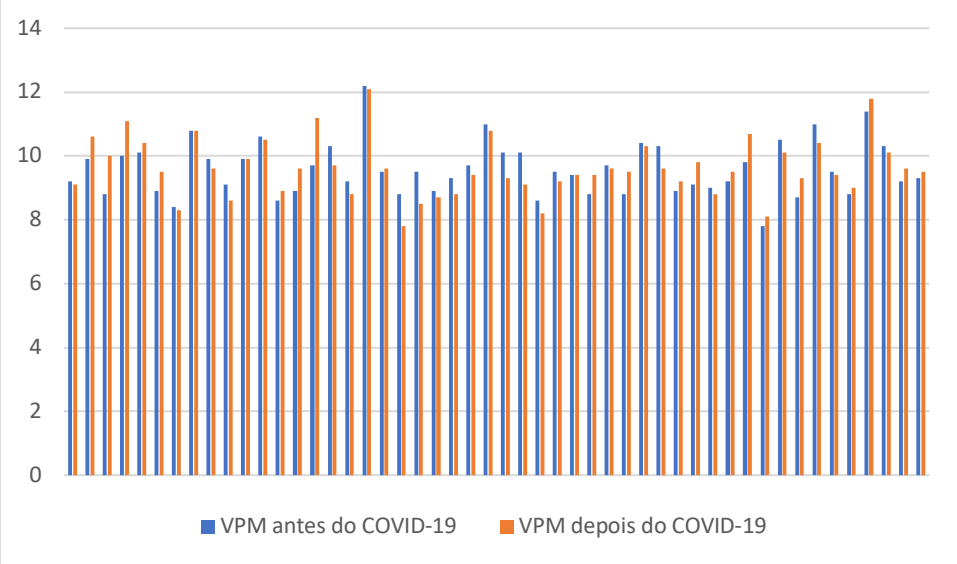

Figura 4.10 - Volume plaquetário médio pré e pós diagnóstico de COVID-19.

À semelhança do número de plaquetas, foi também realizado o teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov* (n>30) para o VPM para verificar se as variáveis seguem a distribuição normal no que diz respeito ao teorema do limite central. Analisando a tabela 4.4 e tendo em consideração o tamanho da amostra (n>30), podemos afirmar que os dois parâmetros seguem a distribuição normal[77].

Tabela 4.4 - Teste de normalidade para o parâmetro VPM antes e depois da infeção por COVID-19.

Testes de Normalidade

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Estatística	gl	Sig.	Estatística	gl	Sig.
Volume plaquetário médio antes do COVID-19	.102	50	.200*	.962	50	.107
Volume plaquetário médio depois do COVID-19	.150	50	.007	.972	50	.275

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Depois, foi realizado o teste paramétrico *t-student (*amostras emparelhadas*)* para o VPM antes e depois da infeção, uma vez que seguem a distribuição normal, para averiguar se existe diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros do perfil plaquetário. Da análise dos resultados da tabela 4.5, constatou-se que também não existem diferenças significativas nos valores médios do VPM antes e depois da infeção por COVID-19, com um valor p > 0.05 (p=0.676). Assim sendo, pode-se concluir que não existe correlação entre infeção por COVID-19 e alterações do perfil plaquetário, pelo que se pode validar a segunda hipótese investigacional do estudo.

Tabela 4.5 - Teste *t-student* emparelhado para o parâmetro VPM antes e depois do COVID-19.

Teste de amostras emparelhadas

		Diferenças emparelhadas					t	df	Sig. (2 extremidades)
		Média	Erro Desvio	Erro padrão da média	95% Intervalo de Confiança da Diferença Inferior	Superior			
Par 1	Volume plaquetário médio antes do COVID-19 - Volume plaquetário médio depois do COVID-19	-.0340	.5709	.0807	-.1963	.1283	-.421	49	.676

4.2.3. Ratio PLT/VPM e VPM/PLT (MPR)

Após obtenção dos valores do número de plaquetas e VPM, foi realizado o *ratio* PLT/VPM e VPM/PLT ou vulgarmente conhecido como MPR (*mean platelet volume to platelet count ratio*) antes e depois da infeção por COVID-19, por serem considerados fatores de prognóstico da doença[78].

Em primeiro lugar, utilizou-se o teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov* (n>30) para averiguar se as variáveis seguem a distribuição normal, no que diz respeito ao teorema do limite central, conforme representado nas tabelas 4.6 e 4.7 para o *ratio* PLT/VPM e MPR, respetivamente. Tal como os outros parâmetros, os dois *ratios* seguem a distribuição normal, tendo em conta o tamanho da amostra do estudo[77].

Tabela 4.6 - Teste de normalidade para o *ratio* PLT/VPM antes e depois da infeção por COVID-19.

Testes de Normalidade

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Estatística	gl	Sig.	Estatística	gl	Sig.
Ratio PLT/VPM antes do COVID-19	.093	50	.200*	.975	50	.366
Ratio PLT/VPM depois do COVID-19	.129	50	.038	.953	50	.047

*. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Tabela 4.7 - Teste de normalidade para o *ratio* VPM/PLT antes e depois da infeção por COVID-19.

Testes de Normalidade

	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
	Estatística	gl	Sig.	Estatística	gl	Sig.
Ratio VPM/PLT antes do COVID-19	.153	50	.005	.833	50	.000
Ratio VPM/PLT depois do COVID-19	.114	50	.107	.928	50	.004

a. Correlação de Significância de Lilliefors

Por último, foi realizado o teste *t-student (*amostras emparelhadas*)* para os dois *ratios* antes e depois da infeção, visto que seguem a distribuição normal, para verificar se existe diferença estatisticamente significativa entre as variáveis. Da análise dos resultados da tabela 4.8, observou-se o valor de *p* é > 0.05, pelo que a nível de decisão estatística rejeitamos a hipótese alternativa de que existem diferenças significativas das médias nos *ratios* PLT/VPM e VPM/PLT antes e depois da infeção.

Tabela 4.8 - Teste *t-student* emparelhado para o *ratio* PLT/VPM e VPM/PLT antes e depois do COVID-19.

Teste de amostras emparelhadas

		Diferenças emparelhadas					t	df	Sig. (2 extremidades)
		Média	Erro Desvio	Erro padrão da média	95% Intervalo de Confiança da Diferença Inferior	Superior			
Par 1	Ratio PLT/VPM antes do COVID-19 - Ratio PLT/VPM depois do COVID-19	.4700	4.5899	.6491	-.8344	1.7744	.724	49	.472
Par 2	Ratio VPM/PLT antes do COVID-19 - Ratio VPM/PLT depois do COVID-19	-.000460	.007454	.001054	-.002578	.001658	-.436	49	.664

5. Discussão de resultados e conclusão

5.1. Discussão

O presente estudo tem como questão de partida as alterações e fatores preditivos que o plaquetograma apresenta em doentes com positividade para a infeção por COVID-19. Embora a amplitude dos mecanismos subjacentes à coagulopatia observada no COVID-19 não seja totalmente conhecida, estudos recentes fornecem evidências de que as plaquetas hiper-reativas e o aumento da quantidade de megacariócitos nos pulmões contribuem para a desregulação da hemostasia[79]. As funções imunológicas mediadas por plaquetas em resposta a infeções virais surgiram como mecanismos-chave na defesa do hospedeiro que, quando desreguladas, podem contribuir para a progressão da doença[79]. O estado trombótico na infeção por COVID-19 decorre de alterações na coagulação e disfunção endotelial, que têm sido objeto de estudo por parte da investigação científica[79].

Com base em estudos realizados, o objetivo deste projeto foi avaliar o número de plaquetas e VPM nas amostras obtidas através de punção venosa, comparando os valores obtidos com os dados antes da infeção e correlacionar com outros parâmetros específicos, como a idade, sexo e estado de vacinação, bem como pesquisar fatores preditivos do plaquetograma no desenvolvimento da doença de COVID-19.

Para isso, foram recolhidas amostras de sangue de voluntários obtidos no laboratório de Análises Clínicas da Affidea.

Analisou-se retrospetivamente dados de 50 pacientes que tiveram infeção por SARS-CoV-2 e observou-se que pacientes com aumento mais acentuado do número de plaquetas após infeção eram significativamente mais jovens e sem comorbilidades. Isto pode ser explicado pelo facto de ter existido reinfeção nestes casos, o que aumenta a probabilidade de lesão endotelial que estimula a libertação do fator de Von Willebrand (vWF), que por sua vez interage com os megacariócitos através da ligação à glicoproteína Ib da membrana plaquetária (GPIbvWP), levando assim ao aumento da produção de plaquetas[80]. Ao avaliarmos o VPM destes indivíduos, é possível constatar que na criança há um aumento do VPM, enquanto nos restantes utentes com reinfeção existe uma ligeira diminuição do VPM, embora em ambos os casos os valores se encontram dentro do intervalo da normalidade. Em crianças, é especialmente comum as infeções virais serem acompanhadas por trombocitose reativa[81]. Na patologia pediátrica, os achados mais frequentes são plaquetas de diferentes tamanhos devido ao aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias, que desempenham um papel

importante na migração de leucócitos para o local da infeção[81]. Contudo, nas crianças a imunidade inata mais forte, a menor expressão de recetores ACE2 e a eliminação mais rápida do vírus devido a uma maior quantidade de anticorpos produzidos na sequência de infeções respiratórias frequentes, podem explicar o melhor prognóstico de COVID-19 em crianças[82,83]. Por outro lado, nos adultos com reinfeção como houve aumento na contagem de plaquetas, a produção de trombopoietina é inibida e consequentemente não existe a produção acelerada de plaquetas por não haver necessidade de compensação, pelo que a morfologia das plaquetas é homogénea, o que se reflete num valor de VPM aproximadamente semelhante ou ligeiramente inferior aos valores antes da infeção[84].

Ao avaliarmos o efeito da sintomatologia na variação dos parâmetros, verificou-se que nos participantes assintomáticos existe uma relação inversamente proporcional dos analitos, isto é, têm tendência a ter um aumento ligeiro no número de plaquetas, mas uma diminuição do VPM, enquanto na maioria dos doentes sintomáticos se observa o oposto. Tal facto pode dever-se ao aumento no consumo das plaquetas em casos onde há agravamento da sintomatologia que leva a uma maior disfunção imunitária, tal como demonstrado no estudo efetuado por Chen *et al*.[85], e que pode ser causado por três situações diferentes: 1) o vírus é capaz de infetar as células da medula óssea, resultando em hematopoiese anormal e diminuição da produção de trombopoietina; 2) a infeção por COVID-19 pode aumentar os níveis de autoanticorpos e complexos imunológicos, resultando na destruição específica das plaquetas pelo sistema imunológico; 3) a infeção viral e a inflamação resultam em danos nos pulmões, sendo que tecidos pulmonares danificados e células endoteliais pulmonares podem ativar as plaquetas nos pulmões, resultando na agregação e formação de microtrombos, o que aumenta o consumo de plaquetas[86]. Nestas situações, o endotélio é danificado por mediadores inflamatórios, e as plaquetas são ativadas num estado de hipercoagulabilidade, resultando no aumento significativo do consumo de plaquetas e um aumento compensatório do volume plaquetário na medula óssea. Como resultado, o VPM torna-se mais elevado[87].

Em relação aos efeitos da vacinação, observou-se que os indivíduos não vacinados demonstraram uma ligeira trombocitopenia com aumento do VPM, embora dentro da normalidade, após infeção por COVID-19. Contudo, na população vacinada, independentemente do número de doses, existe casos em que há diminuição do número de plaquetas e VPM, assim como o contrário. Isto poderá ser explicado pelo diferente impacto das quatros vacinas COVID-19 nos parâmetros de ativação plaquetária, coagulação e inflamação, cuja distinção não foi feita neste estudo e de haver outros fatores intrínsecos ao próprio indivíduo, tais como doenças subjacentes ou a nível de

medicação que pode induzir alterações nos parâmetros analisados, os quais não são provocados pela vacinação. Dados de outros estudos anteriores revelaram que após a vacinação, a contagem de plaquetas não se alterou com nenhum tipo de vacina, independentemente da presença ou ausência de infeção prévia por COVID-19, assim como não foram observadas diferenças no fenótipo de ativação plaquetária (por exemplo, na expressão de p-selectina, aGPIIbIIIa e agregados de plaquetas-leucócitos), visto que a vacinação apenas induz uma resposta inflamatória transitória[88].

Relativamente à influência das comorbilidades, constatou-se que a maior parte dos indivíduos são diabéticos e hipertensos, sendo que estes apresentam um maior número de plaquetas após infeção, embora dentro da normalidade. Hardy *et al*., relataram que os pacientes com diabetes são geralmente mais velhos, com maior propensão a desenvolver hipertensão arterial e hiperglicemia na admissão hospitalar, de tomar medicamentos inibidores da ACE (ACEIs) ou bloqueadores dos recetores da angiotensina II (ARBs) e apresentarem um aumento no número total de plaquetas após infeção por COVID-19[89]. Isto pode ser justificado pelo facto de que estas condições médicas estão associadas à disfunção endotelial e a um estado pró-inflamatório, que inclui níveis mais elevados de angiotensina II, proteína C reativa, quimiocinas e citocinas, incluindo IL-1β, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10 e fator de necrose tumoral-α (TNF-α) que estimulam a produção aumentada das plaquetas para que possam atuar como células imunomoduladoras, evitando complicações mais graves decorrentes da infeção[90]. Além disso, o controle destas comorbilidades com ACEIs e ARBs resultam numa regulação positiva da ACE2[91]. Dado os efeitos anti-inflamatórios da ativação do recetor ACE2/Ang(1–7)/Mas, presume-se que a regulação positiva de ACE2 por bloqueadores RAS pode ser útil para lidar com o sistema imunitário desregulado infligido pelo SARS-CoV-2, e o facto da maioria destes utentes fazer regulação da glicémia com metformina, pode ter conferido um efeito protetor ao diminuir os valores do VPM nos doentes diabéticos devido aos seus efeitos imunorreguladores na redução da inflamação pulmonar e sistémica[89,91]. Todavia, nos indivíduos hipertensos verifica-se o oposto, ou seja, há um aumento do VPM após infeção, possivelmente devido a um desequilíbrio do RAS com diminuição da expressão da ACE2 no miocárdio (processo mediado pela tempestade de citocinas)[92], o que favorece o estado pró-inflamatório que subsequentemente estimula a adesão de plaquetas ao endotélio, pelo que o uso de ACEIs ou ARBs nestes pacientes não deve ser descontinuado, visto que existem evidências de que estes medicamentos protegem da severidade do dano pulmonar e das anormalidades cardiovasculares resultantes da infeção pelo COVID-19[93].

Ainda assim, a maior parte dos utentes apresentou uma ligeira redução no número de plaquetas após infeção ($\bar{x}$= 239.28 *vs.* $\bar{x}$= 243.32 antes da infeção), embora

dentro do intervalo de normalidade, contudo esta relação não é estatisticamente significativa. Enquanto alguns doentes apresentam trombocitopenia imediatamente após a infeção, outros apresentam trombocitopenia durante a progressão da doença ou várias semanas após a infeção (trombocitopenia de fase tardia)[94]. No entanto, num estudo conduzido por Rampotas *et al*. refere que a trombocitopenia em pacientes com COVID-19 ocorre na UCI e afeta apenas o prognóstico de casos severos de COVID-19, não sendo o caso deste estudo em questão[95]. É pertinente destacar também o facto de que muitos estudos realizados neste âmbito avaliaram indivíduos sujeitos a terapêuticas que causam trombocitopenia, como a hidroxicloroquina e azitromicina, que foram administradas a pacientes com infeção no início da pandemia, pelo que a trombocitopenia poderá não ter sido causada pela progressão da doença[96]. À semelhança deste estudo, outros estudos reportaram a preservação da contagem de plaquetas após infeção, possivelmente devido a um equilíbrio entre o consumo aumentado e a produção, por exemplo impulsionada pelo efeito da tempestade de citocinas que estimula a produção de trombopoietina em indivíduos com infeção não severa[95,97].

Da mesma forma que a contagem de plaquetas, a maioria dos utentes apresentou um ligeiro aumento no VPM após infeção ($\bar{x}$= 9.622 *vs.* $\bar{x}$= 9.588 antes da infeção), dentro do intervalo de normalidade, no entanto os resultados não alcançaram significância estatística, o que vai de encontro com alguns estudos já realizados, tal como no estudo conduzido por Aktas *et al*. no qual os autores não determinaram nenhuma diferença no nível de VPM, mortalidade e prognóstico entre pacientes idosos e jovens com COVID-19[98]. Ozenen *et al*. fizeram a mesma comparação em crianças e chegaram aos mesmos resultados[99]. Também importa salientar que alguns parâmetros laboratoriais retornam aos níveis normais ao longo de um período, pelo que os valores laboratoriais e a associação com a infeção podem ter desaparecido e, portanto, não terem demonstrado significância no estudo.

Centrando-nos agora nos *ratios* PLT/VPM e VPM/PLT (MPR), alguns estudos reportam que a combinação do VPM e a contagem de plaquetas pode ser clinicamente mais significativo do que a análise de cada um dos parâmetros isoladamente[100]. Tendo em conta os valores obtidos neste estudo, verificou-se que 50% dos utentes apresentou um aumento do *ratio* MPR e consequentemente uma diminuição do *ratio* PLT/VPM e os outros 50% uma diminuição do MPR e por sua vez um aumento do *ratio* PLT/VPM, mas estatisticamente não significativo. Os mecanismos pelos quais o *ratio* aumenta ou diminui nestas doenças infeciosas permanecem desconhecidos, no entanto de acordo com estudos prévios pensa-se que possa estar relacionado com a capacidade de a IL-1β, IL-6, TNF-α, M-CSF e G-CSF modular o tamanho das plaquetas em doenças com

inflamação sistémica, especialmente a citocina IL-6[100]. Importa salientar que nos doentes com aumento de MPR após infeção, este aumento está associado a um prognóstico adverso, visto que o *ratio* reflete a proliferação dos megacariócitos e a produção de plaquetas na medula óssea[100]. Nestes casos, a inflamação na infeção por COVID-19 leva a uma diminuição na contagem de plaquetas, induzindo a produção de trombopoietina, que por sua vez acelera a produção de plaquetas[84]. As plaquetas jovens libertadas da medula óssea geralmente são maiores e metabolicamente mais ativas, o que se traduz num aumento do VPM, que em conjunto com a trombocitopenia leva ao aumento do MPR associado a um maior risco de stress oxidativo, trombose e apoptose em plaquetas ativadas[78,84,101].

Ao longo do desenvolvimento do estudo foram encontradas algumas limitações que merecem consideração. Primeiro, este foi um estudo com uma amostra pequena, uma vez que o contador hematológico *Horiba Medical Yumizen H2500* apenas armazena os dados por um período de um ano, pelo que o recrutamento de participantes foi substancialmente impedido dada os critérios exigentes de seleção de amostragem, o que poderá ter contribuído para uma falha na deteção de associação entre as variáveis. Em segundo lugar, os parâmetros hematológicos não foram medidos dinamicamente e, portanto, ainda não está claro se eles exibem mudanças graduais quando a condição do paciente melhora, ou seja, os parâmetros não foram avaliados quando a infeção estava ativa. Além disso, o estudo carece de amostras de doentes críticos com infeção severa ou internadas na UCI. Por último, outra grande limitação foi a falta de evidência científica acerca do *ratio* PLT/VPM, pois existem algumas pesquisas direcionadas ao *ratio* VPM/PLT e o seu potencial preditivo na progressão da doença, mas muito pouco sobre o papel que o *ratio* PLT/VPM desempenha na patogénese da infeção por COVID-19.

5.2. Conclusão

A infeção por SARS-CoV-2 pode induzir diferentes graus de trombocitopenia, dependendo da gravidade da doença[90]. Sabe-se desde o início da pandemia que os distúrbios de hemostasia representam um ponto chave da doença e estão associados a uma morbilidade significativa[102]. A segurança e a eficácia das estratégias convencionais de tratamento anti-plaquetário e anticoagulante no controle do risco trombótico são um dos principais focos de interesse translacional e clínico[102]. A etiologia da hipercoagulabilidade na infeção por COVID-19 é provavelmente multifatorial, mas pensa-se que seja causada pela resposta inflamatória acentuada que surge após a infeção[102].

Com o presente estudo conclui-se que relativamente às hipóteses investigacionais a ser estudadas:

1) Existe correlação entre valores diminuídos do número de plaquetas e níveis aumentados do VPM na infeção por COVID-19: apesar de ter havido pequenas alterações nos valores destes parâmetros, os dados deste estudo indicam que não existe diferença estatisticamente significativa nos níveis do número de plaquetas e VPM antes e depois da infeção. Como resultado, estes parâmetros podem não ser úteis na prática clínica, pois nem a contagem de plaquetas nem o VPM são suficientemente sensíveis para avaliar a ativação plaquetária em indivíduos não severos;

2) Não existe correlação entre infeção por COVID-19 e alterações do perfil plaquetário: os dados obtidos demonstram que não se verificou qualquer associação significativa entre infeção por COVID-19 e as variáveis em estudo. A não existência de correlação entre os parâmetros poderá ser explicada pelo facto de o mecanismo de trombocitopenia estar fortemente correlacionado com a severidade da doença e das características das plaquetas serem dinâmicas ao longo do tempo[96].

Consequentemente, uma caracterização adicional da disfunção plaquetária na infeção por COVID-19 e a avaliação da terapia anti-plaquetária como adjuvante das medidas atuais de prevenção da trombose são claramente justificadas.

6. Perspetivas futuras

Em termos de inovação, os dados deste estudo podem servir como base para estudos clínicos em curso que estejam a investigar se as plaquetas podem servir como alvo terapêutico no melhoramento do prognóstico do paciente.

Para dar continuidade a este estudo, seria importante aumentar o tamanho da amostragem (amostras da comunidade bem como hospitalares) com a mesma proporção de participantes femininos e masculinos e eventualmente com o mesmo número de efetivos por faixas etárias, possibilitando assim uma análise estatística mais equilibrada e completa.

Seria pertinente englobar no estudo a visualização de esfregaços de sangue periférico, visto que pode haver alterações na morfologia plaquetária que pode não se refletir na contagem de plaquetas, como por exemplo a presença de agregados plaquetários que pode ser um marcador útil de agravamento da doença.

Tendo em conta que a ativação plaquetária é também determinada por outros fatores adicionais, seria relevante avaliar a expressão dos seguintes parâmetros, que não foram incluídos neste estudo, nomeadamente: D-dímeros, fibrinogénio, vWF, p-seletina e fração de plaquetas reticuladas (rP), de modo a obter mais informações sobre o turnover plaquetário e a atividade hematopoiética em pacientes com COVID-19, bem como um acompanhamento de longo prazo e estudos prospetivos também serão necessários para compreender a utilidade destes marcadores na infeção[103].

A avaliação de todas estas variáveis permitirá uma análise mais rigorosa do papel das plaquetas na patogénese da infeção por COVID-19, podendo no futuro servir de premissa para a mudança de abordagem farmacológica no tratamento da infeção, por exemplo uma terapia anti-plaquetária personalizada.

7. Referências bibliográficas

1. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. N Engl J Med. 26 de março de 2020;382(13):1199–207;

2. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Nature Microbiology. 1 de abril de 2020;5(4):536–44;

3. World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report, 51 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2020 mar. Disponível em: https://apps.who.int/iris/handle/10665/331475;

4. Pereira AF, Terra AKA, Oliveira CHS, Terra MC, Oliveira CM de, Carvalho LP de, et al. Hematological alterations and hemostasis in COVID-19: a literature review. RSD. 27 de agosto de 2021;10(11):e171101119409;

5. Sanyaolu A, Okorie C, Marinkovic A, Patidar R, Younis K, Desai P, et al. Comorbidity and its Impact on Patients with COVID-19. SN Compr Clin Med. 25 de junho de 2020;2(8):1069–76;

6. Zhang S, Liu Y, Wang X, Yang L, Li H, Wang Y, et al. SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19. Journal of Hematology & Oncology. 4 de setembro de 2020;13(1):120;

7. Güçlü E, Kocayiğit H, Okan HD, Erkorkmaz U, Yürümez Y, Yaylacı S, et al. Effect of COVID-19 on platelet count and its indices. Rev Assoc Med Bras. agosto de 2020;66(8):1122–7;

8. Repsold L, Joubert AM. Platelet function, role in thrombosis, inflammation, and consequences in chronic myeloproliferative disorders. Cells. 5 de novembro de 2021;10(11):3034;

9. Manjili RH, Zarei M, Habibi M, Manjili MH. COVID-19 as an acute inflammatory disease. J Immunol. 1 de julho de 2020;205(1):12–9;

10. Bamola VD, Chaudhry R. Recent discovery and development on SARS-CoV-2: A review of current literature. J Family Med Prim Care. outubro de 2020;9(10):5113–21;

11. Zandi M, Soltani S, Feyzi K. SARS-CoV-2 as a betacoronavirus comprises five structural proteins? Infect Genet Evol. outubro de 2021;94(105011):105011;

12. Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology. 1 de junho de 2009;7(6):439–50;

13. Pal M, Berhanu G, Desalegn C, Kandi V. Severe acute respiratory syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An update. Cureus. 26 de março de 2020;12(3):e7423;

14. Firth AE. A putative new SARS-CoV protein, 3c, encoded in an ORF overlapping ORF3a. J Gen Virol. outubro de 2020;101(10):1085–9;
15. Weiss SR, Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. Microbiol Mol Biol Rev. dezembro de 2005;69(4):635–64;
16. Dhama K, Khan S, Tiwari R, Sircar S, Bhat S, Malik YS, et al. Coronavirus disease 2019-COVID-19. Clin Microbiol Rev [Internet]. 16 de setembro de 2020;33(4). Disponível em: http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00028-20;
17. Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. Adv Virus Res. 2006;66:193–292;
18. McBride R, van Zyl M, Fielding BC. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. Viruses. 7 de agosto de 2014;6(8):2991–3018;
19. Li F. Structure, function, and evolution of Coronavirus spike proteins. Annu Rev Virol. 29 de setembro de 2016;3(1):237–61;
20. Weiss SR, Leibowitz JL. Coronavirus pathogenesis. Adv Virus Res. 2011;81:85–164;
21. Snijder EJ, Decroly E, Ziebuhr J. The nonstructural proteins directing Coronavirus RNA synthesis and processing. Adv Virus Res. 14 de setembro de 2016;96:59–126;
22. Zhang Q, Xiang R, Huo S, Zhou Y, Jiang S, Wang Q, Yu F. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. Signal Transduct Target Ther. 2021 Jun 11;6(1):233;
23. Patel KP, Vunnam SR, Patel PA, Krill KL, Korbitz PM, Gallagher JP, et al. Transmission of SARS-CoV-2: an update of current literature. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. novembro de 2020;39(11):2005–11;
24. Wang Y, Wang Y, Chen Y, Qin Q. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. J Med Virol. junho de 2020;92(6):568–76;
25. McArthur L, Sakthivel D, Ataide R, Chan F, Richards JS, Narh CA. Review of burden, clinical definitions, and management of COVID-19 cases. Am J Trop Med Hyg. agosto de 2020;103(2):625–38;
26. Petersen E, Koopmans M, Go U, Hamer DH, Petrosillo N, Castelli F, et al. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. Lancet Infect Dis. setembro de 2020;20(9):e238–44;
27. Li J, Huang DQ, Zou B, Yang H, Hui WZ, Rui F, et al. Epidemiology of COVID-19: A systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. J Med Virol. março de 2021;93(3):1449–58;

28. Falzone L, Gattuso G, Tsatsakis A, Spandidos DA, Libra M. Current and innovative methods for the diagnosis of COVID-19 infection (Review). Int J Mol Med. 2021 Jun;47(6):100;
29. Robson F, Khan KS, Le TK, Paris C, Demirbag S, Barfuss P, et al. Coronavirus RNA proofreading: Molecular basis and therapeutic targeting. Mol Cell. 3 de setembro de 2020;79(5):710–27;
30. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. Cell. 16 de abril de 2020;181(2):271-280.e8;
31. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. Nature Microbiology. 1 de abril de 2020;5(4):562–9;
32. Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. Proc Natl Acad Sci U S A. 7 de abril de 2009;106(14):5871–6;
33. Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA. The molecular virology of coronaviruses. J Biol Chem. 11 de setembro de 2020;295(37):12910–34;
34. Ogando NS, Ferron F, Decroly E, Canard B, Posthuma CC, Snijder EJ. The curious case of the nidovirus exoribonuclease: Its role in RNA synthesis and replication fidelity. Front Microbiol. 7 de agosto de 2019;10:1813;
35. Alanagreh L, Alzoughool F, Atoum M. The human Coronavirus disease COVID-19: Its origin, characteristics, and insights into potential drugs and its mechanisms. Pathogens. 29 de abril de 2020;9(5):331;
36. Direção-Geral da Saúde, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Diagnóstico COVID-19 - Testes de pesquisa de antigénio [Internet]. 2020 [citado 20 de outubro de 2022]. Disponível em: https://www.insa.min-saude.pt/diagnostico-covid-19-testes-de-pesquisa-de-antigenio/;
37. FDA. COVID-19 Test Basics [Internet]. 2023 [citado 20 de outubro de 2022]. Disponível em: https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/covid-19-test-basics#:~:text=Samples%20for%20COVID%2D19%20diagnostic,%2C%20oropharyngeal%2C%20or%20saliva%20samples;
38. D'Cruz RJ, Currier AW, Sampson VB. Laboratory testing methods for novel severe acute respiratory syndrome-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). Front Cell Dev Biol. 4 de junho de 2020;8:468;
39. Alves AR. SARS-CoV-2: um problema mundial [Dissertação]. [Lisboa]: Instituto Universitário Egas Moniz; 2021;

40. Galbraith MD, Kinning KT, Sullivan KD, Baxter R, Araya P, Jordan KR, et al. Seroconversion stages COVID19 into distinct pathophysiological states. Elife [Internet]. 16 de março de 2021;10. Disponível em: http://dx.doi.org/10.7554/eLife.65508;
41. Lai CKC, Lam W. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. Biochem Biophys Res Commun. 29 de janeiro de 2021;538:226–30;
42. Ravi N, Cortade DL, Ng E, Wang SX. Diagnostics for SARS-CoV-2 detection: A comprehensive review of the FDA-EUA COVID-19 testing landscape. Biosens Bioelectron. 1 de outubro de 2020;165(112454):112454;
43. Parasher A. COVID-19: Current understanding of its Pathophysiology, Clinical presentation and Treatment. Postgrad Med J. maio de 2021;97(1147):312–20;
44. Grant P, Turner M, Shin G, Nastouli E, Levett L. Extraction-free COVID-19 (SARS-CoV-2) diagnosis by RT-PCR to increase capacity for national testing programmes during a pandemic. bioRxiv. 1 de janeiro de 2020;2020.04.06.028316;
45. Majumder J, Minko T. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. AAPS J. 2021 Jan 5;23(1):14;
46. Infarmed. Terapêuticas farmacológicas disponíveis para a COVID-19 [Internet]. [citado 8 de dezembro de 2022]. Disponível em: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/terapeuticas-farmacologicas-disponiveis-para-a-covid-19;
47. Gavriatopoulou M, Ntanasis-Stathopoulos I, Korompoki E, Fotiou D, Migkou M, Tzanninis IG, et al. Emerging treatment strategies for COVID-19 infection. Clin Exp Med. maio de 2021;21(2):167–79;
48. Tsai SC, Lu CC, Bau DT, Chiu YJ, Yen YT, Hsu YM, et al. Approaches towards fighting the COVID-19 pandemic (Review). Int J Mol Med. janeiro de 2021;47(1):3–22;
49. Kaka AS, MacDonald R, Greer N, Vela K, Duan-Porter W, Obley A, et al. Major update: Remdesivir for adults with COVID-19 : A living systematic review and meta-analysis for the American college of physicians practice points. Ann Intern Med. maio de 2021;174(5):663–72;
50. Santoro MG, Carafoli E. Remdesivir: From Ebola to COVID-19. Biochem Biophys Res Commun. 29 de janeiro de 2021;538:145–50;
51. Tuccori M, Ferraro S, Convertino I, Cappello E, Valdiserra G, Blandizzi C, et al. Anti-SARS-CoV-2 neutralizing monoclonal antibodies: clinical pipeline. MAbs. janeiro de 2020;12(1):1854149;
52. Ordem dos Farmacêuticos. UE aprova primeiro antiviral oral para tratar a COVID-19 [Internet]. 2022 [citado 10 de dezembro de 2022]. Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/noticias/ue-aprova-primeiro-antiviral-oral-para-tratar-a-covid-19/;

53. Ghosn L, Chaimani A, Evrenoglou T, Davidson M, Graña C, Schmucker C, et al. Interleukin-6 blocking agents for treating COVID-19: a living systematic review. Cochrane Database Syst Rev. 18 de março de 2021;3(3):CD013881;
54. Ordem dos Farmacêuticos. Utilização do tocilizumab no tratamento da COVID-19 [Internet]. 2021 [citado 10 de dezembro de 2022]. Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/artigos/utilizacao-do-tocilizumab-no-tratamento-da-covid-19/;
55. Ordem dos Farmacêuticos. Utilização de corticosteroides no tratamento da COVID-19 [Internet]. 2021 [citado 10 de dezembro de 2022]. Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/artigos/utilizacao-de-corticosteroides-no-tratamento-da-covid-19/;
56. Silva T, Almeida E. Vacinas SARS-CoV-2: principais características e perspetivas futuras – revisão da bibliografia. 2021;57–65;
57. EMA. COVID-19 vaccines: authorised [Internet]. [citado 14 de dezembro de 2022]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/vaccines-covid-19/covid-19-vaccines-authorised;
58. D'Amico C, Fontana F, Cheng R, Santos HA. Development of vaccine formulations: past, present, and future. Drug Deliv Transl Res. abril de 2021;11(2):353–72;
59. Lamb YN. BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine: First approval. Drugs. março de 2021;81(4):495–501;
60. Izda V, Jeffries MA, Sawalha AH. COVID-19: A review of therapeutic strategies and vaccine candidates. Clin Immunol. janeiro de 2021;222(108634):108634;
61. Rawat K, Kumari P, Saha L. COVID-19 vaccine: A recent update in pipeline vaccines, their design and development strategies. Eur J Pharmacol. 5 de fevereiro de 2021;892(173751):173751;
62. Chilamakuri R, Agarwal S. COVID-19: Characteristics and therapeutics. Cells. 21 de janeiro de 2021;10(2):206;
63. Lundstrom K. Viral vectors for COVID-19 vaccine development. Viruses. 19 de fevereiro de 2021;13(2):317;
64. Machlus KR, Italiano JE Jr. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. Journal of Cell Biology. 10 de junho de 2013;201(6):785–96;
65. Coelho T, Moreira A. Função hemostática e sua avaliação. Texto de apoio. [Porto]: Faculdade de Medicina do Porto; 2001;
66. Ali MAM. Editorial commentary: The platelet in COVID-19: A critical participant or a bystander? Trends Cardiovasc Med. janeiro de 2022;32(1):10–1;

67. Iba T, Levy JH. The roles of platelets in COVID-19-associated coagulopathy and vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia. Trends Cardiovasc Med. janeiro de 2022;32(1):1–9;
68. Fortin, M. F. O processo de investigação: Da concepção à realização. Lusociência. 1999;
69. Affidea. Sobre a Affidea [Internet]. [citado 3 de outubro de 2023]. Disponível em: https://affidea.pt/sobre/#affidea-portugal;
70. Horiba. Yumizen H2500/H1500 Hematology Analyzer [Internet]. [citado 10 de outubro de 2023]. Disponível em: https://www.horiba.com/gbr/products/detail/action/show/Product/yumizen-h2500-h1500-1856/;
71. Coulter Principle: Foundation of an Industry. JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation. 1 de dezembro de 2003;8(6):72–81;
72. Yip C, Han NLR, Sng BL. Legal and ethical issues in research. Indian J Anaesth. setembro de 2016;60(9):684–8;
73. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. JAMA. 27 de novembro de 2013;310(20):2191–4;
74. Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial [Internet]. 2013 Disponível em: https://www.ucp.pt/sites/default/files/2019-03/declaracao-de-helsinquia_2013.pdf;
75. Assembleia da república [Internet]. Diário da República. 2019. Disponível em: https://dre.pt/application/file/a/123813850;
76. Bain B, Bates I, Laffan M. Dacie and Lewis Practical Haematology. 12th ed. Londres: Elsevier; 2016. 600 p;
77. Pestana, M. H. & Gageiro, J. N., Análise de dados para as Ciências Sociais. A complementaridade do SPSS, Lisboa, Edições Sílabo, 2003;
78. Zhong Q, Peng J. Mean platelet volume/platelet count ratio predicts severe pneumonia of COVID-19. J Clin Lab Anal. janeiro de 2021;35(1):e23607;
79. Conway EM, Mackman N, Warren RQ, Wolberg AS, Mosnier LO, Campbell RA, et al. Understanding COVID-19-associated coagulopathy. Nature Reviews Immunology. 1 de outubro de 2022;22(10):639–49;
80. Kenya C, Bunawan NC, Nugroho HM, Harlivasari AD, Sigarlaki ED, Rinaldi I. COVID-19 with extreme thrombocytosis: A case report and its possible mechanisms. Caspian J Intern Med. 2022;13(Suppl 3):289–94;
81. Dobrijević D, Antić J, Rakić G, Andrijević L, Katanić J, Pastor K. Could platelet indices have diagnostic properties in children with COVID-19? J Clin Lab Anal. dezembro de 2022;36(12):e24749;

82. Nikolopoulou GB, Maltezou HC. COVID-19 in Children: Where do we Stand? Arch Med Res. janeiro de 2022;53(1):1–8;
83. Alkan G, Sert A, Emiroglu M, Tuter Oz SK, Vatansev H. Evaluation of hematological parameters and inflammatory markers in children with COVID-19. Ir J Med Sci. agosto de 2022;191(4):1725–33;
84. Wei T, Li J, Cheng Z, Jiang L, Zhang J, Wang H, et al. Hematological characteristics of COVID-19 patients with fever infected by the Omicron variant in Shanghai: A retrospective cohort study in China. J Clin Lab Anal. janeiro de 2023;37(1):e24808;
85. Chen J, Han T, Huang M, Yang Y, Shang F, Zheng Y, et al. Clinical characteristics of asymptomatic carriers of novel coronavirus disease 2019: A multi-center study in Jiangsu Province. Virulence. dezembro de 2020;11(1):1557–68;
86. Xu P, Zhou Q, Xu J. Mechanism of thrombocytopenia in COVID-19 patients. Ann Hematol. junho de 2020;99(6):1205–8;
87. Wang H, Xing Y, Yao X, Li Y, Huang J, Tang J, et al. Retrospective study of clinical features of COVID-19 in inpatients and their association with disease severity. Med Sci Monit. 21 de dezembro de 2020;26:e927674;
88. Brambilla M, Canzano P, Valle PD, Becchetti A, Conti M, Alberti M, et al. Head-to-head comparison of four COVID-19 vaccines on platelet activation, coagulation and inflammation. The TREASURE study. Thromb Res. março de 2023;223:24–33;
89. Hardy YO, Libhaber E, Ofori E, Amenuke DAY, Kontoh SA, Dankwah JA, et al. Clinical and laboratory profile and outcomes of hospitalized COVID-19 patients with type 2 diabetes mellitus in Ghana - A single-center study. Endocrinol Diabetes Metab. janeiro de 2023;6(1):e391;
90. Boccatonda A, D'Ardes D, Rossi I, Grignaschi A, Lanotte A, Cipollone F, et al. Platelet count in patients with SARS-CoV-2 infection: A prognostic factor in COVID-19. J Clin Med. 15 de julho de 2022;11(14):4112;
91. Hosseinzadeh R, Goharrizi MASB, Bahardoust M, Alvanegh AG, Ataee MR, Bagheri M, et al. Should all patients with hypertension be worried about developing severe coronavirus disease 2019 (COVID-19)? Clinical Hypertension. 15 de janeiro de 2021;27(1):3;
92. Wiese OJ, Allwood BW, Zemlin AE. COVID-19 and the renin-angiotensin system (RAS): A spark that sets the forest alight?. *Med Hypotheses*. 2020;144:110231;
93. Gul R, Kim UH, Alfadda AA. Renin-angiotensin system at the interface of COVID-19 infection. *Eur J Pharmacol*. 2021;890:173656;
94. Delshad M, Safaroghli-Azar A, Pourbagheri-Sigaroodi A, Poopak B, Shokouhi S, Bashash D. Platelets in the perspective of COVID-19; pathophysiology of

thrombocytopenia and its implication as prognostic and therapeutic opportunity. Int Immunopharmacol. outubro de 2021;99(107995):107995;
95. Rampotas A, Pavord S. Platelet aggregates, a marker of severe COVID-19 disease. J Clin Pathol. novembro de 2021;74(11):750–1;
96. Daniels S, Wei H, van Tongeren M, Denning DW. Are platelet volume indices of clinical use in COVID-19? A systematic review. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:1031092. Published 2022 Oct 18. doi:10.3389/fcvm.2022.1031092;
97. Thachil J. What do monitoring platelet counts in COVID-19 teach us? J Thromb Haemost. agosto de 2020;18(8):2071–2;
98. Ahmet Aktaş et al, "Is Mean Platelet Volume Useful for Predicting the Prognosis of COVID-19 Diagnosed Patients?", International Journal of Research Studies in Medical and Health Sciences. 2020; 5(7): 08-11;
99. Guner Ozenen G, Sahbudak Bal Z, Umit Z, Bilen NM, Yildirim Arslan S, Yurtseven A, et al. Demographic, clinical, and laboratory features of COVID-19 in children: The role of mean platelet volume in predicting hospitalization and severity. J Med Virol. maio de 2021;93(5):3227–37;
100. Li J, Li Y, Sheng X, Wang F, Cheng D, Jian G, et al. Combination of mean platelet volume/platelet count Ratio and the APACHE II score better predicts the short-term outcome in patients with acute kidney injury receiving continuous renal replacement therapy. Kidney Blood Press Res. 29 de março de 2018;43(2):479–89;
101. Jiang N, Ye M, Yan J, Liao C, Shang M, Wang G, et al. Platelet indices are the promising biomarkers in monitoring disease activities in patients with syphilis. Int J Infect Dis. maio de 2022;118:230–5;
102. Comer SP, Cullivan S, Szklanna PB, Weiss L, Cullen S, Kelliher S, et al. COVID-19 induces a hyperactive phenotype in circulating platelets. PLoS Biol. fevereiro de 2021;19(2):e3001109;
103. Barale C, Melchionda E, Morotti A, Russo I. Prothrombotic phenotype in COVID.

8. Anexos

8.1. Parecer do Conselho de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

REFERÊNCIA INTERNA DO PROJETO: **CE-ESTeSL-Nº.125-2022 –** Jiaxin Ye
TÍTULO DO PROJETO: Estudo do perfil plaquetário em doentes com COVID-19
Tipo de Projeto/Estudo: Investigação 2ºciclo
INVESTIGADOR/A RESPONSÁVEL: Drª. Jiaxin Ye
Orientador: Prof. Doutor Renato Abreu
INSTITUIÇÃO PROMOTORA: Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Instituto Politécnico de Lisboa
I**nstituição(ões) envolvidas**: ESTeSL-IPL; Affidea - Hormofuncional
SUBMISSÃO PROJETO: 2 janeiro

Exmo. Senhor Prof. Doutor Renato Abreu

Exma. Senhora Drª. Jiaxin Ye, estudante de Mestrado

Após os esclarecimentos, a Comissão de Ética da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (CE-ESTeSL) aprovou por unanimidade a emissão de parecer favorável, com a recomendação que seja informado aos participantes, e fazendo constar no documento de consentimento informado, que após a apresentação dos resultados finais do presente estudo, todos os dados originais serão destruídos.

O presente parecer tem em consideração a versão submetida do projeto e demais documentação enviada. Eventuais alterações nestes documentos determinam a necessidade de revisão do presente parecer.

Lembramos que todos os estudos que envolvem a autorização dos participantes e a recolha de amostras e dados anonimizados e/ou codificados têm de cumprir com o estabelecido no Regulamento Geral sobre a Proteção de Dados de 27 de abril de 2016.

Por último, solicita-se que, ao abrigo do artº 19 da Lei 21/2014 de 16 de abril e do disposto no nº 23 da atual versão da Declaração de Helsínquia, seja dado conhecimento à CE-ESTeSL do relatório final, com as conclusões do estudo, bem como de eventuais alterações ao protocolo de investigação e demais informações tidas por relevantes.

Aproveitamos ainda para desejar o maior sucesso no desenvolvimento deste trabalho.

Com os melhores cumprimentos,

Rute Borrego

Rute Borrego | Professora Adjunta
Presidente da Comissão de Ética

Av. D. João II, lote 4.69.01- Parque das Nações
1990-096 Lisboa | Portugal
conselhodeetica@estesl.ipl.pt
+351 218980488 (ext. 647)

8.2. Documento de aceitação da instituição envolvida

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

POLITÉCNICO DE LISBOA

Lisboa, 15 de Dezembro de 2022

Exmo. Doutor.

O meu nome é Jiaxin Ye, exerço funções como Técnica de Análises Clínicas no laboratório Hormofuncional e sou estudante do mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa. De momento estou a desenvolver uma investigação, cujo tema é: "Estudo do perfil plaquetário em doentes com COVID-19". O objetivo principal é avaliar o plaquetograma em indivíduos que testaram positivo para COVID-19. Secundariamente, o presente estudo pretende também avaliar o número de plaquetas e o volume plaquetário médio em indivíduos com COVID-19, comparando estes dados com os dados antes da infeção e correlacioná-los com outros parâmetros específicos, como a idade, sexo e estado de vacinação, assim como pesquisar fatores preditivos do plaquetograma no desenvolvimento da doença de COVID-19. As amostras serão recolhidas no posto de colheitas da Affidea Saldanha.

A referida investigação tem como orientador o professor Doutor Renato Abreu e co-orientador o Doutor José Carlos Gouveia.

Para tal, gostaria de solicitar a sua autorização para recolher dados dos utentes que se dirigem às instalações da Affidea – Hormofuncional no âmbito das análises de rotina. A recolha de dados consiste na possibilidade de acesso aos valores do hemograma obtidos através da punção venosa. Esta recolha de dados envolve duas fases, com duração de dois meses: a primeira, que irá decorrer durante o ato da punção venosa e a segunda, que será realizada no laboratório através da base de dados do equipamento *Horiba Yumizen H2500*.

Saliento ainda que o estudo não envolve qualquer alteração nos resultados das análises e que o pedido de colaboração dos utentes será feito mediante consentimento informado, sendo todos os dados abordados de forma anónima e confidencial. Após a apresentação dos resultados finais, todos os dados originais serão destruídos.

Certa de que o seu contributo me irá ajudar a desenvolver este estudo, agradeço antecipadamente a sua colaboração e disponibilidade.

PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO AO RESPONSÁVEL DO LABORATÓRIO

Eu MARCO ALEXANDRE MATEUS PRAZERES MARQUES,
responsável do(a) HORMOFUNCIONAL - AFFIDEA LABORATÓRIOS, autorizo a recolha de dados no âmbito do estudo de investigação "Estudo do perfil plaquetário em doentes com COVID-19".

O(A) Responsável

HORMOFUNCIONAL - Centro Hormonologia Funcional, Lda
NIPC 501 [illegible] 945
Av.ª Almirante Reis, n.º 65-A
Edifício A (piso 0, piso -1 e piso -2)
1150-013 LISBOA

15 de DEZEMBRO de 2022

9. Apêndices

9.1. Cronograma do estudo

Tabela 9.1 - Cronograma do presente estudo.

Atividades	Período Cronológico 2022/2023											
	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Maio	Jun.	Jul.
Revisão da literatura												
Recolha de dados												
Tratamento estatístico dos dados												
Interpretação dos resultados												
Definição das considerações finais												
Conclusão da investigação												
Redação do Relatório de Investigação												
Revisão do Relatório de Investigação												
Entrega da tese												

9.2. Consentimento Informado

CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM INVESTIGAÇÃO

Projeto de investigação

Estudo do perfil plaquetário em doentes com COVID-19

Este estudo tem como principal objetivo determinar o número de plaquetas e o volume plaquetário médio (VPM) nas amostras obtidas através de punção venosa de indivíduos que testaram positivo ao COVID-19 e comparar com os seus valores antes da pandemia, de modo a avaliar o papel que as plaquetas desempenham na fisiopatologia da COVID-19.

Os dados necessários para o desenvolvimento do estudo serão recolhidos aproximadamente ao longo de dois meses em que os indivíduos se dirigirem às instalações da Affidea – Hormofuncional no âmbito das análises de rotina. A recolha de dados consiste na possibilidade de acesso aos valores do hemograma obtidos através da punção venosa. Incluem-se neste estudo todos os indivíduos que demonstrarem interesse em participar, sendo os únicos critérios de inclusão o facto de ter testado positivo ao COVID-19 e ter feito análises nomeadamente hemograma antes da infeção no serviço da Affidea. Assim, a escolha de participar ou não no estudo em questão é completamente voluntária, sendo que o estudo não acarreta qualquer risco ou vantagem a quem nele participar. Todo o material e dados recolhidos serão codificados e abordados de forma anónima e confidencial e serão utilizados para responder aos objetivos descritos com total responsabilidade do investigador responsável pela realização do presente estudo. A informação que permite a identificação do participante (nome, contactos) será arquivada separadamente da restante informação e apenas será acessível aos responsáveis pela investigação. De acordo com as regras nacionais de proteção de dados, toda a informação recolhida poderá ser posteriormente modificada, atualizada ou retirada pelo participante/tutor legal. Os resultados do estudo serão apresentados no âmbito da realização da dissertação do mestrado de Tecnologias Clínico-Laboratoriais proposto pela unidade curricular de Dissertação, não sendo os participantes identificados de forma individual.

Assinatura do investigador responsável: _____

Lisboa, ___ de _____ de 20__

Identificação do participante

Nome: _____	Telefone: _____
Número de processo: _____	Correio eletrónico: _____

Código do participante: _____ Colocar a etiqueta do nº de colheita. (a preencher pelo investigador)		**Rubrica**
1	Li a informação ao participante "Consentimento informado e esclarecido para participação em investigação" fornecido. Tive oportunidade de analisar as informações, de colocar as questões que julguei necessárias e de obter respostas satisfatórias.	
2	Tomei conhecimento de que a minha participação é voluntária e de que posso desistir em qualquer altura, sem necessidade de justificação e sem prejuízo para os meus direitos assistenciais ou legais. A equipa de investigação mantém o direito, contudo, de utilizar quaisquer amostras colhidas antes da desistência, de forma confidencial.	
3	Autorizo a equipa de investigação a transferir as minhas amostras e/ou dados pessoais, de forma codificada para proteger a minha identidade, com fim de as analisar.	
4	Autorizo a equipa de investigação a conservar as minhas amostras e dados pessoais para futuros estudos que receberam aprovação ética (idade, sexo, período de infeção, sintomas, vacinação, comorbilidades, medicação, contagem do número de plaquetas e VPM)	
5	Os meus dados de contacto podem ser conservados exclusivamente para esta finalidade e não serão divulgados a terceiros.	
6	Tenho conhecimento de que não receberei qualquer contrapartida financeira pela participação neste estudo.	
7	Fui informado de que receberei informações sobre os meus resultados. Além disso, quando o estudo estiver concluído, receberei o resumo dos resultados coletivos finais do estudo. Desejo receber o resumo por correio eletrónico/correio no seguinte endereço: _____	

Se concorda com a proposta que lhe foi feita, queira **assinar este documento**.

Declaro ter lido e compreendido este documento, bem como as informações verbais que me foram fornecidas pela pessoa que acima assina. Foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura, recusar participar neste estudo sem qualquer tipo de consequências. Desta forma, aceito participar neste estudo e permito a utilização dos dados que de forma voluntária forneço, confiando em que apenas serão utilizados para esta investigação e nas garantias de confidencialidade e anonimato que me são dadas pelo investigador.

Data: _____ de _____ de 20____

Nome completo do participante:
_____

Assinatura do participante:
_____

Agradecemos a sua colaboração e estamos disponíveis para fornecer informação adicional ou esclarecer eventuais dúvidas.

Doutor Renato Abreu | e-mail: renato.abreu@estesl.ipl.pt

Jiaxin Ye | e-mail: jiaxinye7@gmail.com

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Laboratório Affidea – Hormofuncional

ESTE DOCUMENTO É COMPOSTO DE TRÊS PÁGINAS E É FEITO EM DUPLICADO: UMA VIA PARA A INVESTIGADORA, OUTRA PARA A PESSOA QUE CONSENTE

9.3. Inquérito para participantes

Identificação/ nº de amostra: _____

Data de colheita: _____

Sexo: M ☐ F ☐

Idade: _____

Quando é que testou positivo ao COVID-19? _____

Quais foram os sintomas mais frequentes durante a infeção?

Febre ☐ Tosse ☐ Dor de cabeça ☐ Dor muscular ☐ Dor de garganta ☐ Cansaço ☐
Perda de paladar e/ou olfato ☐ Outro ☐ _____

É vacinado contra a COVID-19? Sim ☐ Não ☐

Se respondeu "Sim" na questão anterior, quantas doses?

_____

_____

Tem alguma doença conhecida? Sim ☐ Não ☐

Se respondeu "Sim" na questão anterior, qual a doença?

_____

_____

Toma algum tipo de medicação regularmente? Sim ☐ Não ☐

Se respondeu "Sim" na questão anterior, qual a medicação tomada?

_____

_____

9.4. Base de dados – EXCEL

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1WrbyUfYjWScLsSp4ikMeH8hk5LvV9wBm/edit?usp=drive_link&ouid=106729172083440201561&rtpof=true&sd=true