



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO BIOMÉDICO
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

BEATRIZ MARQUES BRUNO DE ASSIS DIVINO

**EFEITO DO TRATAMENTO COM BROMETO DE PIRIDOSTIGMINA SOBRE
A HEMOSTASIA DE PACIENTES COM FADIGA CRÔNICA APÓS A COVID-**

19

Niterói, RJ

2023

BEATRIZ MARQUES BRUNO DE ASSIS DIVINO

**EFEITO DO TRATAMENTO COM BROMETO DE PIRIDOSTIGMINA SOBRE
A HEMOSTASIA DE PACIENTES COM FADIGA CRÔNICA APÓS A COVID-**

19

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal Fluminense, como requisito necessário para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina na área de Análises Clínicas.

Orientadora Dra. Eliza Prodel Coelho

Co-Orientadora: Profa. Dra. Natália Galito
Rocha Ayres

Niterói, RJ

2023

Ficha catalográfica automática - SDC/BIB
Gerada com informações fornecidas pelo autor

D618e Divino, Beatriz Marques Bruno de Assis
Efeito do tratamento com brometo de piridostigmina sobre a hemostasia de pacientes com fadiga crônica após a COVID-19 / Beatriz Marques Bruno de Assis Divino. - 2023.
47 f.: il.

Orientador: Eliza Prodel Coelho.
Coorientador: Natália Galito Rocha Ayres.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação)-Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Niterói, 2023.

1. COVID=longa. 2. Síndrome da fadiga crônica. 3. Hemostasia. 4. Brometo de piridostigmina. 5. Produção intelectual. I. Coelho, Eliza Prodel, orientadora. II. Ayres, Natália Galito Rocha, coorientadora. III. Universidade Federal Fluminense. Instituto Biomédico. IV. Título.

CDD - XXX

RESUMO

A fadiga crônica é uma importante sequela observada em pacientes após a COVID-19. Os tratamentos para esta síndrome ainda são limitados. O brometo de piridostigmina é um inibidor da enzima acetilcolinesterase, que permite o prolongamento da ação de acetilcolina, o que possibilitaria a melhora dos sintomas da fadiga crônica, por meio da melhora da contração muscular, e ação na hemostasia, por meio da inibição da agregação plaquetária. O objetivo deste estudo é testar o efeito do tratamento com brometo de piridostigmina na hemostasia de pacientes com fadiga crônica após a COVID-19. Para isso, o sangue de quinze voluntários que apresentavam sintomas de fadiga crônica foi coletado em três visitas ao laboratório: (1) Pré-Tratamento, (2) Placebo, (3) Tratamento. As visitas Placebo e Tratamento foram realizadas de forma randomizada. Foram medidos no plasma pobre em plaquetas citratado dos voluntários, pelo coagulômetro *Human Clot Junior*: tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e concentração de fibrinogênio. Os resultados obtidos foram expressos em média e desvio padrão, e a ANOVA de um caminho com medidas repetidas foi utilizada para testar possível efeito do tratamento. A administração do brometo de piridostigmina não provocou efeito no TP (Placebo: $14,1 \pm 1$; Piridostigmina: $14,8 \pm 0,7$; $p=0,08$), TTPa (Placebo: $31,1 \pm 4$; Piridostigmina: $31,4 \pm 5$; $p=0,95$) e concentração de fibrinogênio (Placebo: $326,8 \pm 70$; Piridostigmina: 316 ± 71 ; $p=0,76$). Com os achados deste estudo podemos concluir que o brometo de piridostigmina não promove alterações na hemostasia de pacientes acometidos de fadiga crônica após a COVID-19.

Palavras-Chave: COVID-longa, síndrome da fadiga crônica, hemostasia, brometo de piridostigmina

ABSTRACT

Chronic fatigue is an important sequelae observed in patients after COVID-19. Treatments for this syndrome are still limited. Pyridostigmine bromide is an inhibitor of the enzyme acetylcholinesterase, which allows the prolongation of the action of acetylcholine, which would enable the improvement of symptoms of chronic fatigue, through the improvement of muscle contraction, and action on haemostasis, through the inhibition of aggregation platelet. The aim of this study is to test the effect of treatment with pyridostigmine bromide on haemostasis in patients with chronic fatigue after COVID-19. For this, the blood of fifteen volunteers who showed symptoms of chronic fatigue was collected in three visits to the laboratory: (1) Pre-Treatment, (2) Placebo, (3) Treatment. The Placebo and Treatment visits were carried out in a randomized manner. The following were measured in the volunteers' citrated platelet-poor plasma using the Human Clot Junior coagulometer: prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT) and fibrinogen concentration. The results obtained were expressed as mean and standard deviation, and one-way ANOVA with repeated measures was used to test possible treatment effects. The administration of pyridostigmine bromide had no effect on PT (Placebo: 14.1 ± 1 ; Pyridostigmine: 14.8 ± 0.7 ; $p=0.08$), aPTT (Placebo: 31.1 ± 4 ; Pyridostigmine: 31.4 ± 5 ; $p=0.95$) and fibrinogen concentration (Placebo: 326.8 ± 70 ; Pyridostigmine: 316 ± 71 ; $p=0.76$). With the findings of this study, we can conclude that pyridostigmine bromide does not promote changes in haemostasis in patients suffering from chronic fatigue after COVID-19.

Key-words: long-COVID, chronic fatigue syndrome, haemostasis, pyridostigmine bromide

Lista de Figuras

- Figura 1:** Representação esquemática da neurotransmissão de acetilcolina no músculo esquelético com inibição enzimática de brometo de piridostigmina. ACh=acetilcolina; AChE= enzima acetilcolinesterase; P= piridostigmina; ME= músculo esquelético. Adaptado de Goodman & Gilman, 2012. 17
- Figura 2:** Modelo da cascata de coagulação a partir da lesão tecidual com exposição de colágeno. T= trombina; FT= fator tecidual; VWF= fator de Von Willebrand. Adaptado de Hoffbrand.A. Fundamentos de Hematologia, 2017. . 23
- Figura 3:** Desenho experimental. 28
- Figura 4:** Tempo de protrombina apresentado em segundos, porcentagem de atividade e Razão Internacional Normalizada. ANOVA de um caminho, Sidak. 32
- Figura 5:** Tempo de tromboplastina parcial ativada apresentado em segundos e razão. ANOVA de um caminho, Sidak. 33
- Figura 6:** Concentração de fibrinogênio apresentada em segundos e mg/dL. ANOVA de um caminho, Sidak. 34

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características Demográficas.....	31
--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

SARS-Cov2: Síndrome respiratória aguda severa.

COVID-19: *Coronavirus Disease 2019.*

RNA: Acido ribonucléico

ACh: Acetilcolina

AChE: Enzima acetilcolinesterase

ME/CFS: Encefalomielite miálgica/ Síndrome da fadiga crônica

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças

VWF: Fator de Von Willebrand

GPIIb/IIIa: Glicoproteína integrina α IIb β 3.

AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina

TXA2: Tromboxano A2

ADP: Adenosina Difosfato

FT: Fator tecidual

PL: Enzima fosfolipase citosólica

TPA: Ativador tecidual de plasminogenio

TP: Tempo de Protrombina

TTPa: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 COVID-longa	12
2.2 Síndrome da fadiga crônica	13
2.3 Brometo de Piridostigmina.....	14
2.4 Hemostasia	17
2.4.1 Hemostasia primária	18
2.4.2 Hemostasia secundária.....	18
2.4.3 Fibrinólise.....	21
2.5 Células Endoteliais e Hemostasia	22
3. LACUNA CIENTÍFICA	24
4. OBJETIVOS	25
4.1 Geral	25
4.2 Específicos	25
5. MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1 Participantes.....	26
2.2 Protocolo Experimental	26
5.3 Medidas Plasmáticas.....	28
5.4 Análise Estatística	30
6. RESULTADOS	31
7. DISCUSSÃO	34
8. CONCLUSÃO	38
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

A pandemia do novo coronavírus emergida no início de 2020 causou impactos em todo o mundo e surpreendeu a comunidade científica, tendo em vista a complexidade dos fatores associados à infecção pelo vírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-Cov2) (1). O insuficiente conhecimento sobre o vírus, assim como sua velocidade de disseminação e capacidade de provocar mortes, causaram vários problemas sociais, econômicos e, principalmente, no sistema básico de saúde do Brasil (2).

A doença provocada pelo SARS-Cov2, *Coronavirus Disease-19* (COVID-19), é caracterizada principalmente pela ativação de diversas vias inflamatórias, o que leva a tempestade de citocinas e hiperinflamação, resultando em danos teciduais e falência de órgãos (3). No Brasil, foram mais de 30 milhões de casos confirmados e aproximadamente 700 mil mortes documentadas até junho de 2023 (16).

O SARS-Cov2 é um vírus de RNA envelopado de, aproximadamente, 80 a 160 nm de diâmetro. Existem 4 proteínas estruturais codificadas em seu genoma: espícula (*spike*), envelope, proteína de membrana e nucleocapsídeo, todas necessárias para a formação da partícula viral, sendo a proteína S (*spike*) a mais discutida, porque, a partir dela, o vírus é capaz de invadir as células do hospedeiro humano (4).

É sabido que o principal sítio de infecção do vírus é o trato respiratório humano (4). Os sintomas mais comuns da fase aguda da COVID-19 são tosse seca e dores no peito, enquanto os mais graves são dificuldade de respirar e falta de ar (1). Entretanto, sua ação pode comprometer outros sistemas do corpo, como o cardiovascular, por exemplo (17), onde, as principais manifestações

observadas são injúria do miocárdio, insuficiência cardíaca e hipertensão arterial (17).

No endotélio, observa-se principalmente um desequilíbrio na regulação da hemostasia e comprometimento da cascata de coagulação do organismo, devido à lesão da parede vascular a partir da infecção pelo vírus (5). A infecção pelo SARS-Cov2 induz uma alta resposta inflamatória em diversos tecidos do organismo, levando a uma resposta anti-inflamatória descontrolada (5). A interação entre o vírus e as células do hospedeiro, assim como a sua inflamação prolongada, foi capaz de gerar danos no endotélio e uma disfunção com excessiva produção de fatores pró-trombóticos, contribuindo para uma coagulação exacerbada (6). Além disso, a ruptura das células endoteliais, durante a fase aguda da COVID-19 e a liberação de diversas citocinas inflamatórias contribuiu para a ocorrência de trombose nos pacientes (6).

Diversos estudos têm mostrado que alguns pacientes permanecem com sintomas meses após a recuperação da fase infecciosa, os quais estão sendo chamados de COVID longa (7). Em alguns pacientes, as manifestações clínicas que mais se mostraram prevalentes são a síndrome da fadiga crônica, anosmia, cansaço e hipóxia (7). A síndrome da fadiga crônica é caracterizada por: indisposição pós esforço físico, sono não reparador, sensibilidade nos linfonodos e dores generalizadas onde, mesmo em uma situação de repouso, não há melhora (8). Os tratamentos ainda se baseiam na administração dos sintomas, a partir da realização de exercícios físicos, porém, não há ainda medidas terapêuticas farmacológicas comprovadas capazes de reverter esta condição (8).

O brometo de piridostigmina é um fármaco inibidor da enzima acetilcolinesterase, que atua competitivamente na fenda sináptica impedindo a degradação de acetilcolina (Ach) (9). O aumento da biodisponibilidade da Ach promove ativação dos receptores muscarínicos e nicotínicos, o que favorece a contração muscular (9). Dessa maneira, poderia minimizar os sintomas da fadiga crônica.

A hiperinflamação, induzida pelo coronavírus estabelece um ambiente vascular pró-trombótico nesses indivíduos (10). As plaquetas expressam uma subunidade dos receptores nicotínicos de Ach (6). A ativação desses receptores promove a diminuição de agregação plaquetária exacerbada em processos inflamatórios (6). Assim, a atividade do brometo de piridostigmina se torna algo favorável para combater a possível formação de trombos nos vasos sanguíneos (6).

Considerando estes fatores, é possível levantar a hipótese de que um tratamento com brometo de piridostigmina, em pacientes com fadiga crônica pode atenuar os sintomas de cansaço causados por esta síndrome e reverter o ambiente pró-trombótico gerado pela infecção por COVID-19.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 COVID Longa

A Organização Mundial da Saúde estabeleceu que o termo COVID longa se aplica a pessoas que, em um período de 3 meses ou mais, apresentam sintomas persistentes, mesmo após a fase aguda da infecção pelo coronavírus (16). Esta prevalência está associada a diversos fatores, entretanto, é discutido que, intrinsecamente, tanto as pessoas que tiveram comprometimento de algum órgão durante a fase aguda de infecção, como aqueles que foram acometidos por sintomas leves têm experienciado a persistência dos sintomas (11).

Constantemente têm sido documentados casos na população mundial, que ainda sofrem com problemas relacionados a COVID longa, fatores estes que impactam negativamente as vidas sociais e profissional e nas atividades comuns do dia a dia (11).

Indivíduos acometidos pela COVID longa, necessitam de constante monitorização desses sintomas a longo prazo, assim como uma medida de tratamento para total reabilitação física e de saúde mental (12). A literatura aponta uma prevalência principal de diversos sintomas, tanto físicos como mentais ou psicológicos (12). Os levantamentos realizados apontam a prevalência de 10 sintomas principais (12). São estes: fadiga, falta de ar, dores musculares, dores nas articulações, tosse seca, dores no peito, alterações no paladar e olfato, dores de cabeça e diarreia (12).

Além destes, foi observado que a infecção pelo SARS-COV2 proporcionou o comprometimento cognitivo, causando perda de memória, ansiedade e distúrbios do sono (13).

Dentre os sintomas neurológicos e neuropsiquiátricos agudos e crônicos, estão incluídos anosmia, ageusia, deficiências cognitivas, depressão e ansiedade (13). A neuroinflamação proporcionada pelo coronavírus é capaz de causar uma desregulação das células gliais e neuronais (13). Essa desregulação promove diversas lesões neuronais, como isquemia, infecção do sistema nervoso ou até reações imunes citotóxicas (13). É sabido que, diversas infecções virais, bacterianas e parasitárias podem levar ao comprometimento neurocognitivo em síndromes pós-infecção aguda (14). Neste caso, por consequência, podendo levar ao desenvolvimento de doenças como encefalomielite miálgica, ou síndrome da fadiga crônica (ME/CFS), uma condição crônica e debilitante com sintomas neurológicos e imunológicos acompanhados de fadiga crônica que não é aliviada pelo sono ou repouso (14).

2.2 Síndrome da Fadiga Crônica

A síndrome da fadiga crônica é caracterizada pela prevalência de uma fadiga debilitante intensa em que o indivíduo não se recupera mesmo em uma situação de repouso (8). Os principais sintomas associados à fadiga intensa são: dores musculares e de cabeça, problemas de memória e concentração, sono não reparador e sensibilidade nos gânglios linfáticos (8). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estabeleceu o critério para determinação da síndrome da fadiga crônica pela prevalência de fadiga severa por mais de 6 meses, além da prevalência de pelo menos quatro dos seus principais sintomas (8). Associado a estes fatores, a Organização Mundial da Saúde ainda estabelece que a síndrome da fadiga crônica pode ser categorizada por uma desordem neurológica, e segue os mesmos padrões de reconhecimento que o CDC para determinação do diagnóstico (8). Seu diagnóstico é principalmente

clínico e na maioria dos casos sua etiologia é desconhecida (8). As principais causas investigadas são principalmente disfunções imunológicas ou problemas adrenais, associadas a fatores genéticos e histórico individual de traumas e estresse (8).

Tendo em vista a complexidade de diagnóstico, os tratamentos ainda são voltados diretamente para o combate dos sintomas e não para uma remissão completa dessa síndrome (8). São realizadas terapias cognitivo-comportamentais e de exercícios graduais a fim de amenizar o sintoma da fadiga excessiva e controlar os ambientes de trabalho e quaisquer outros passíveis de promover estresse (8). Pessoas acometidas de síndrome fadiga crônica tem maior predisposição para a ocorrência de depressão, dores constantes e problemas para dormir, por isso precisam sempre ser monitoradas e em tratamento constante (8).

A níveis farmacológicos, ainda não existem terapias comprovadamente eficazes para combater essa doença (8). O brometo de piridostigmina é um inibidor da colinesterase que diminui os efeitos colinérgicos como fraqueza muscular, disfunção neuromuscular, taquicardia e hipertensão (8). Dessa forma, sua administração em pacientes acometidos com a síndrome da fadiga crônica pode amenizar estes sintomas musculares e possivelmente minimizar esse comprometimento do sistema nervoso (8).

2.3 Brometo de Piridostigmina

A acetilcolina (ACh) é um potente neurotransmissor, armazenado em vesículas, encontrado no citoplasma das terminações nervosas, presentes nas junções neuromusculares do músculo esquelético e nas terminações pré e pós-

ganglionares simpáticas e parassimpáticas que inervam glândulas sudoríparas e sinapses do SNC (18).

A ação da ACh no músculo esquelético é a contração muscular (18). O encontro do neurotransmissor com os receptores nicotínicos da membrana das células efetoras desencadeia o potencial de ação muscular promovendo assim a contração do músculo (18). Além das junções neuromusculares do músculo esquelético, os receptores nicotínicos de ACh podem ser encontrados em todo o sistema nervoso periférico, SNC, e em tecidos não neuroniais, como a superfície plaquetária (18). Os receptores nicotínicos possuem cinco subunidades α , β , γ , δ , e ϵ , de ligação as células do organismo (18). Nas superfícies das plaquetas é expressa a subunidade α , mais especificamente, a α -7 do receptor de ACh, que, em presença do neurotransmissor, inibe a agregação plaquetária (18). Além da ação nos receptores nicotínicos, a acetilcolina exerce um papel importante sobre os receptores muscarínicos, atuando diretamente sobre os vasos sanguíneos com controle de dilatação e sobre diversos tecidos do corpo como coração e pulmão (18).

Nas sinapses colinérgicas, existe uma alta concentração da enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável por eliminar o impulso nervoso gerado pela acetilcolina, entretanto, quando a atividade desta enzima é inibida, o hormônio neurotransmissor é difundido lateralmente pelo organismo, o que, permite sua ligação a diversos novos receptores e conseqüentemente os efeitos dessa ACh liberada são potencializados e prolongados (18).

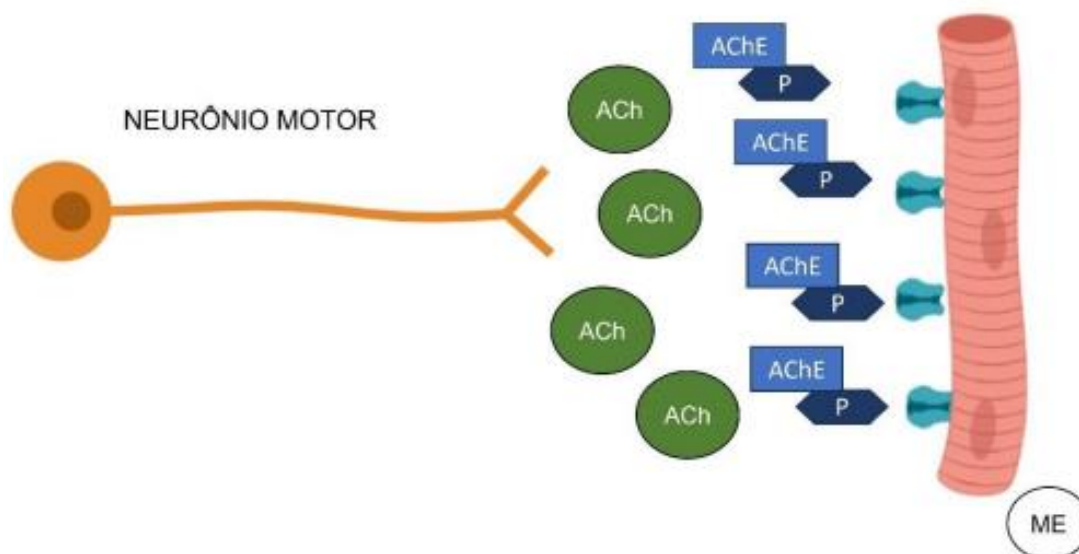


Figura 1: Representação esquemática da neurotransmissão de acetilcolina no músculo esquelético com inibição enzimática de brometo de piridostigmina. ACh=acetilcolina; AChE=enzima acetilcolinesterase; P= piridostigmina; ME= músculo esquelético. Adaptado de Goodman & Gilman, 2012.

O brometo de piridostigmina é um agente anticolinesterásico, um fármaco inibidor reversível da enzima acetilcolinesterase (AChE) capaz de promover a estimulação excessiva dos receptores colinérgicos em todo o sistema nervoso central e periférico (18). O fármaco se liga a enzima impedindo que este hidrolise a molécula de ACh nos locais de transmissão colinérgica (18). A consequente estimulação excessiva dos receptores de ACh resulta em um prolongamento do tempo de declínio do potencial de ação da placa nervosa, o que causa excitações assíncronas e fasciculações nas fibras musculares (18). Além dessa inibição o fármaco possui uma ação direta sobre o musculo esquelético promovendo sua contratilidade (18).

Administrado de forma oral, pirdostigmina possui uma meia vida de 1 a 2 horas e sua eliminação é feita por esterases plasmáticas e álcoois aromáticos, para que ocorra sua excreção pela urina (18).

No caso de indicação terapêutica, este fármaco é comumente utilizado no tratamento de miastenia gravis, uma doença neuromuscular caracterizada por fraqueza e fadiga acentuada do músculo esquelético (18). A piridostigmina aumenta a resposta a impulsos nervosos do músculo fadigado, por preservação da ACh endógena e pela inibição da AChE (18). Assim como a miastenia gravis, na síndrome da fadiga crônica, este fármaco é capaz de induzir constante despolarização neuronal e contração muscular capaz de minimizar os sintomas frequentes da doença (18). No caso da hemostasia, a utilização do brometo de piridostigmina compromete a agregação plaquetária, permitindo desta forma uma diminuição de um processo de coagulação exacerbada (18). Além disso, sua utilização produz efeitos colinomiméticos pela ativação dos receptores muscarínicos, como: diminuição de frequência e débito cardíaco e diminuição da pressão arterial (18).

2.4 Hemostasia

O sangue é o fluido vascular rico dividido em dois principais hemocomponentes: sangue total, composto pelas hemácias, e plasma, constituído de diversas macromoléculas como lipoproteínas por exemplo, necessário para o transporte de oxigênio para todos os tecidos do corpo (19).

A hemostasia é definida pela resposta fisiológica controlada aos danos vasculares (19). Resposta esta que precisa ser rápida para evitar o sangramento excessivo e controlada para que previna a formação exacerbada de coágulos e reestabeleça a fluidez normal do sangue nos vasos sanguíneos (19). O organismo possui uma rede estruturada de componentes coagulantes e anticoagulantes, associada a um processo de fibrinólise, que regularão este processo. Mantendo, dessa forma o ambiente vascular em equilíbrio (19).

A resposta hemostática ao dano vascular depende diretamente da relação entre a parede dos vasos, as plaquetas circulantes e os fatores de coagulação do sangue. Se iniciam então três processos fundamentais: hemostasia primária, secundária a fibrinólise (19).

2.4.1 Hemostasia primária

Durante a hemostasia primária, a constrição vascular é a primeira resposta à lesão ou injúria endotelial, neste processo o Tromboxano A₂ liberado pelas plaquetas atua nesta função vasoconstritora, gerando um espasmo vascular afim de reduzir o fluxo sanguíneo nessa região (19). Em resposta a esta vasoconstrição, as plaquetas (fragmentos celulares provenientes dos megacariócitos) circulantes nesta região, são direcionadas ao ponto da lesão e formam ali um tampão hemostático primário (19). Estas são aderidas à parede vascular e então agregam-se umas às outras para interromper o sangramento. O fator de von *Willebrand* (VWF) é um dos responsáveis por mediar os processos de adesão e agregação plaquetária (19). A agregação plaquetária, mediada pelo VWF, é feita de uma ligação cruzada de pontes de fibrinogênio com receptores ativos das superfícies das plaquetas GPIIb/IIIa (19). A estimulação plaquetária leva ao aumento das moléculas GPIIb/IIIa, promovendo assim a ligação cruzada das plaquetas, via VWF, com pontes de fibrinogênio (19). A ativação plaquetária primária promove a liberação de grânulos α e a exposição dos fosfolipídeos de membrana que induzem os processos da cascata de coagulação para formação de um coágulo de fibrina estável (19).

2.4.2 Hemostasia secundária

Neste processo, são iniciadas sequências de amplificação e retroalimentação negativas que asseguram a produção limitada e localizada de reparação da

lesão endotelial a fim de estabilizar o tampão hemostático primário (19). O tromboxano A₂ (TXA₂), importante na amplificação secundária de ativação plaquetária para formação do agregado estável atua potencializando a agregação das plaquetas ampliando sua liberação pela diminuição dos níveis de AMPc (19). De forma antagônica, algumas substâncias agem inibindo a agregação plaquetária a fim de evitar o excesso da sua deposição no endotélio vascular normal (19). São essas as prostaciclina, sintetizadas pelas células endoteliais vasculares, que inibem a reação de liberação plaquetária, assim como o ADP, liberado pelos grânulos plaquetários densos, os quais inibem a ativação plaquetária por retroalimentação (19).

Para que aconteça a coagulação sanguínea, uma cascata de proteínas precursoras circulantes, fatores enzimáticos da coagulação são então ativados em sequência, por proteólise, culminando na formação de trombina (19). A trombina formada converterá o fibrinogênio plasmático solúvel em fibrina (19). A fibrina infiltrará os agregados de plaquetas para converter os tampões primários instáveis em tampões hemostáticos estáveis (19). Acontecem duas reações simultâneas a partir da exposição do fator tecidual (FT), mediadas por fosfolípidos e dependentes de íons cálcio, que culminam em uma via comum resultando na formação de fibrina estável (19). São essas as vias: extrínseca, onde os fatores IXa, VIIIa e X são ativados para a formação do fator Xa, e intrínseca, onde os fatores IXa e VIIIa interagem também para a formação do fator Xa. São desencadeadas então três fases: iniciação, amplificação e propagação (19).

Para o processo de iniciação, após a injúria endotelial e a interação do fator tecidual com o fator VII plasmático, o complexo fator VIIIa-TF (via extrínseca)

ativa os fatores IX e X, que em seguida ativam o fator Xa (19). Este, por sua vez, com a ausência de seu cofator gera uma quantidade insuficiente de trombina para a subsequente produção de fibrina (19). Desta forma, são necessárias as fases de amplificação e propagação, para a obtenção de uma quantidade suficiente de trombina (19). Durante a amplificação, a via extrínseca é inativada por um inibidor da via do fator tecidual, então a formação de trombina passa a ser realizada pela via intrínseca (19). Nesta via, os fatores VIII e V são convertidos para suas formas ativadas pelas pequenas moléculas de trombina geradas na fase de iniciação (19). Na fase de propagação, os fatores da via intrínseca IXa e VIIIa encontrados na superfície de fosfolipídeos, em presença de íons Ca^{2+} , ativam o fator Xa suficiente, que, juntamente com o fator Va e a enzima fosfolipase citosólica (PL) formam o complexo protrombinase, resultando na alta formação de trombina que atua no fibrinogênio para formar o coágulo de fibrina estável (19). A trombina formada hidrolisa o fibrinogênio liberando fibrinopeptídeos que irão formar os monômeros de fibrina. Estes, por sua vez, são unidos espontaneamente por meio de ligações de hidrogênio para formar um polímero insolúvel de fibrina (19). O fator XIII, também ativado por trombina, estabiliza os polímeros de fibrina através da formação de ligações covalentes. O fator XI atua em um papel suplementar na coagulação, ativando o fator IX, importante para a atuação em condições de cirurgias, onde o paciente corre risco de sangramento excessivo (19). Além dele, fatores como II, VII, IX e X, dependentes de vitamina K são importantes para a síntese de íons cálcio para a ativação da cascata de coagulação. Fatores V e VIII atuam como cofatores, auxiliando na formação de fibrina estável (19). Esta fibrina, componente do tampão hemostático secundário, aumenta à medida que as plaquetas fundidas

se degranulam e se lisam. Depois de algumas horas, todo o tampão hemostático é transformado em uma massa sólida de fibrina com ligações cruzadas (19).

2.4.3 Fibrinólise

Finalizando o processo de coagulação, acontece a fibrinólise, onde o plasminogênio, proenzima circulante no sangue e fluido tecidual, é convertido em plasmina, responsável por lisar a fibrina formada (19). Essas enzimas são ativadas a partir da lesão tecidual, onde os ativadores da parede vascular vindos das células endoteliais, formam o complexo ativador tecidual do plasminogênio (TPA) (19). Este se liga a fibrina aumentando a capacidade de conversão do plasminogênio ligado ao trombo em plasmina (19). Esta reação é específica ao coágulo formado o que restringe a formação de plasmina, limitando a extensão do trombo. A plasmina é capaz de digerir fibrinogênio, fibrina e fatores como V e VIII_m, além de outras proteínas (19). Os produtos da degradação de fibrina, em grandes quantidades, podem ser detectados no plasma sanguíneo, contribuindo para o diagnóstico de doenças como coagulação intravascular disseminada, por exemplo (19).

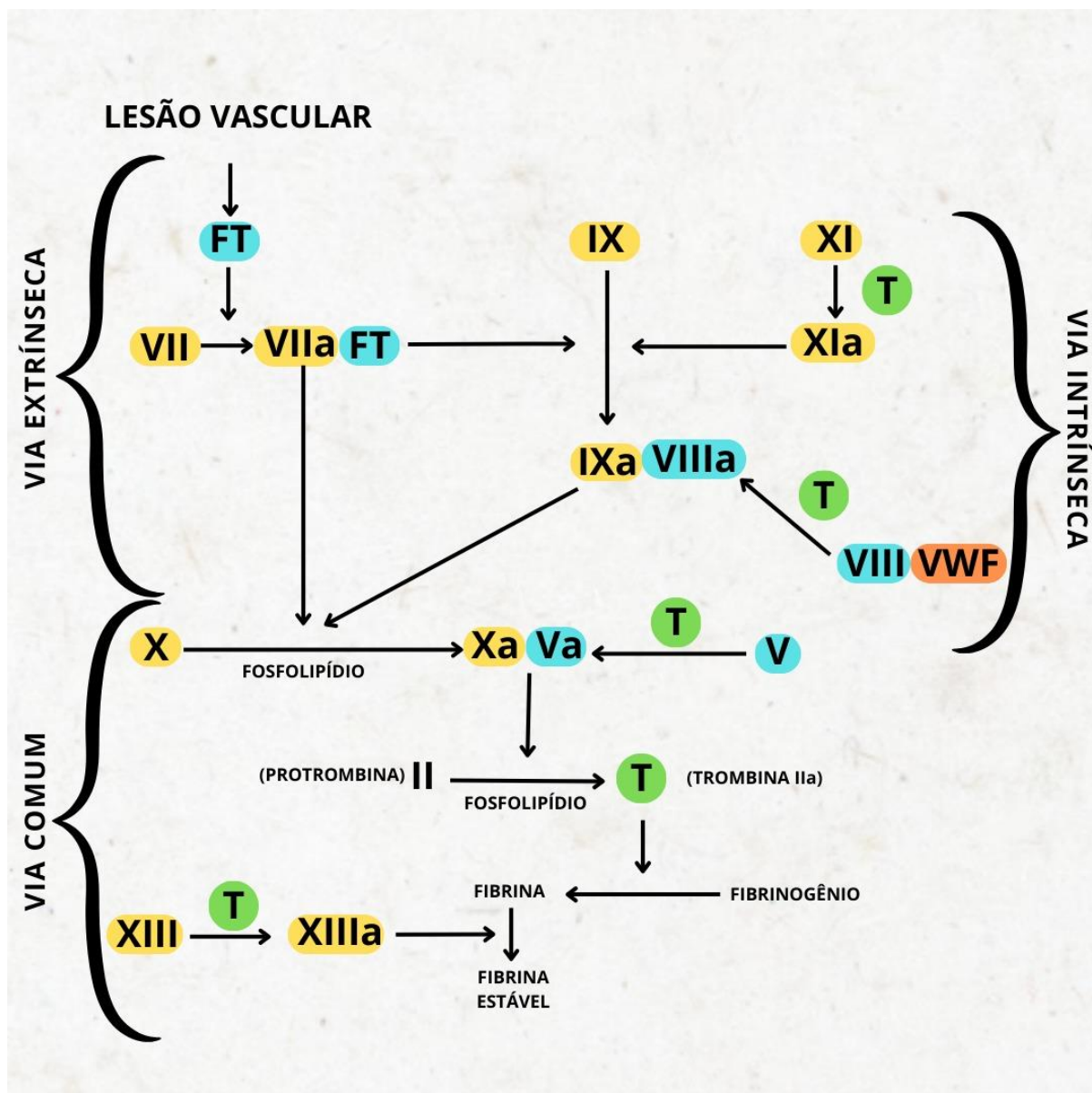


Figura 2: Modelo da cascata de coagulação a partir da lesão tecidual com exposição de colágeno. T= trombina; FT= fator tecidual; VWF= fator de Von Willebrand. Adaptado de Hoffbrand.A. Fundamentos de Hematologia, 2017.

2.5 Células Endoteliais e Hemostasia

As células endoteliais exercem um papel fundamental na manutenção da integridade vascular no processo de coagulação sanguínea (19). O dano ou comprometimento no endotélio resulta em hemorragia e ativação do mecanismo hemostático (19). A partir das células endoteliais é possível sinalizar tanto os ativadores como os inibidores da cascata de coagulação (19). No caso do

comprometimento endotelial gerado pela COVID-19, onde a hemostasia é comprometida, a hiperinflamação marcada pela tempestade de citocinas, desencadeada pela resposta imune disfuncional provoca uma alta injúria endotelial, o que favorece o aparecimento de trombos nos vasos sanguíneos e a permanência de um ambiente vascular pró-trombótico (19). Pessoas hospitalizadas, em situação aguda da infecção pelo coronavírus, apresentavam aumento da ativação plaquetária e aumento da expressão do fator tecidual, conseqüentemente levando-os a desregulação da cascata de coagulação (19).

3. LACUNA CIENTÍFICA

O conhecimento das consequências a longo prazo da infecção pelo coronavírus ainda é uma questão relevante a ser estudada, dada a prevalência e gravidade de sintomas observados até então. A fadiga crônica é uma doença que ainda não tem cura. Estima-se que aproximadamente 0,3% da população mundial foram acometidas desta síndrome, que traz como principal sintoma o cansaço pós esforço físico sem a melhora, mesmo após um estado de repouso ou sono (16). O brometo de piridostigmina é um fármaco de interesse, utilizado para minimizar os sintomas de fadiga crônica (18). Assim como na hemostasia, este fármaco é capaz de diminuir a agregação plaquetária exacerbada e consequentemente a possível formação de trombos nos vasos sanguíneos (6). Pacientes com fadiga crônica pós-covid-19 convivem com esta condição que impacta negativamente suas vidas e rotina, desta forma, é necessário este estudo para compreender como o tratamento com piridostigmina influencia na hemostasia desses indivíduos, e apurar se este inibidor da enzima acetilcolinesterase promoverá alívio dos sintomas de fadiga e evitará a ocorrência de trombose.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Testar o efeito do tratamento com brometo de piridostigmina na hemostasia de pacientes com fadiga crônica após a COVID-19.

4.2 Específicos

Observar o impacto do tratamento com brometo de piridostigmina nas seguintes *variáveis hemostáticas em pacientes com fadiga crônica após a COVID-19:*

- *Tempo de tromboplastina parcial ativa (TTPa);*
- *Tempo de protombina (TP);*
- *Concentração de fibrinogênio;*

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFF (CAAE: 38735720.6.0000.5243), e os experimentos realizados no Laboratório de Ciências do Exercício (LACE) no Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense (Anexo 1). Todos os voluntários receberam informações verbais e escritas sobre os procedimentos do experimento e assinaram um termo de consentimento. Os participantes foram informados que poderiam desistir do protocolo em qualquer momento.

5.1 PARTICIPANTES

Foram selecionados e avaliados 15 adultos (homens 46 ± 6 anos; 32 ± 3 Kg/m² e mulheres 36 ± 8 anos; 27 ± 5 Kg/m²). Seus valores de frequência cardíaca de repouso encontravam-se em (69 ± 8 bpm). Todos apresentaram resultados PCR positivos, comprovados pelo teste de reação de transcriptase reversa (RT-qPCR) e se incluíam no critério de apresentar prevalência de sintomas de fadiga crônica até 1 ano após a fase aguda da infecção. Foi instruído aos voluntários, no dia antecedente ao experimento a não realizarem esforço físico e que não ingerissem álcool e cafeína. Também foram orientados para que estivessem descansados e alimentados. O ambiente foi controlado em uma temperatura entre 22 e 24°C.

5.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O protocolo do estudo consistiu em um ensaio clínico randomizado, controlado por placebo, cruzado e duplo cego, em que todos os voluntários foram submetidos a 3 visitas ao (LACE) com um intervalo de 30 dias entre uma visita e outra. Inicialmente, os voluntários receberam instruções dos procedimentos a

serem realizados, em seguida, preencheram um questionário para avaliação do diagnóstico de fadiga crônica e então as medidas antropométricas foram coletadas.

Inicialmente foi realizada a primeira coleta do sangue venoso, depois disso, os voluntários foram randomizados de forma cega para o grupo placebo (PL) ou tratamento (T) com brometo de piridostigmina. Em um intervalo de 30 dias, a segunda coleta de sangue venoso foi realizada, depois disso, houve o cruzamento para que os voluntários que tomaram o placebo passassem para o tratamento com brometo de piridostigmina, e os que foram tratados com brometo de piridostigmina tomassem o placebo. Passados mais 30 dias, os participantes retornaram ao laboratório para a última coleta de sangue, como mostra a Figura 3.

O tratamento consistiu na administração oral de 60mg de brometo de piridostigmina (Mestinon®), administrado de 8 em 8 horas.

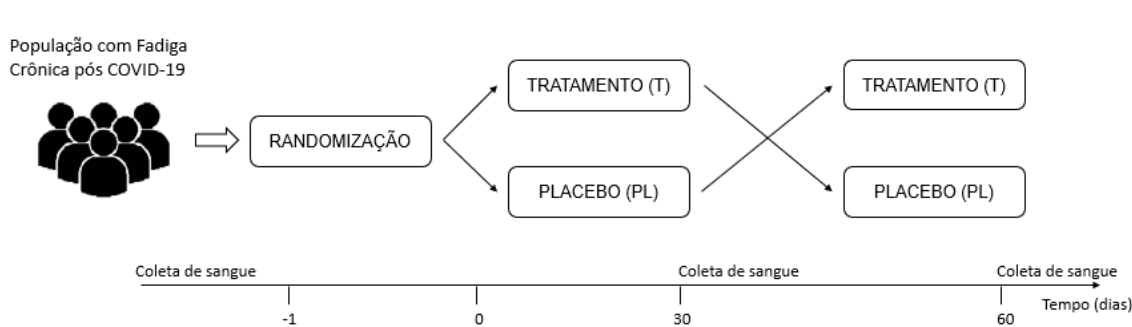


Figura 3: Desenho experimental.

Para a coleta de sangue, foi realizada a antissepsia do local, então um cateter endovenoso foi posicionado na fossa cubital. Foram coletados dois tubos de citrato (3,2% citrato de sódio, Labor Import, BRA), com capacidade de 3,6mL. Estes seguiram para o processamento, onde foram centrifugados (EPPENDORF Centrífuga 5430R, GER) por 15 minutos a 20°C em uma rotação de 2500 rpm,

possibilitando o isolamento do plasma rico em plaquetas. Foi retirada a porção do plasma rico em plaquetas e então uma nova centrifugação, executada nas mesmas condições, foi realizada para a obtenção do plasma pobre em plaquetas.

Alíquotas de 300 μ L do plasma pobre em plaquetas foram colocados em microtubos, congelados instantaneamente em nitrogênio líquido, e armazenados em ultrafreezer a -80C° para posterior análise das variáveis hemostáticas.

5.3 MEDIDAS PLASMÁTICAS

Foram medidos em duplicata o tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), e as concentrações de fibronogênio, usando um fotômetro monocanal capaz de detectar a formação do coágulo pelo aumento da turbidez do plasma (coagulômetro; HumaClot Jr., Human GmbH Max; Wiesbaden, GER). Essas medidas foram realizadas em duplicata ou triplicata quando houve uma divergência maior que 20% entre os resultados.

Tempo de Protrombina (TP).

A análise do tempo de protrombina se baseia na formação de trombina seguido da formação de um coágulo de fibrina solúvel. A partir deste teste, é possível avaliar as vias extrínseca e comum da cascata de coagulação através da adição de uma fonte de fator tecidual (tromboplastina), que na presença de íons cálcio, leva a ativação do fator VII. A formação do complexo entre a tromboplastina e o fator VIIa leva a formação de trombina, resultando na ativação do fator X. Esse fator ativado, por fim, leva a conversão do fibrinogênio em fibrina e, conseqüentemente, a formação do coágulo. Em indivíduos saudáveis, os valores de TP variam entre 10 e 14 segundos. Para a realização da análise de TP, foram

adicionados 200 μL de tromboplastina em 100 μL de plasma citratado. Os resultados foram apresentados em segundos, percentual da atividade em relação ao normal (atv.%) e razão normalizada internacional (RNI) calculada pela fórmula: $(\text{TP paciente} / \text{TP normal})\text{ISI}$.

Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa)

Este teste avalia a atividade das vias intrínseca e comum da cascata de coagulação. Para realização dessa análise, um reagente composto de um ativador plasmático (ácido elágico) e fosfolipídios são adicionados ao plasma citratado pobre em plaquetas. Após uma incubação é adicionado a esta amostra o cloreto de cálcio (CaCl_2) para que haja a formação do coágulo. Os valores de referência para o TTPa variam entre 25 e 35 segundos, porém, fatores como anticoagulantes, gravidez e o uso de contraceptivos orais podem alterar os resultados encontrados. Neste estudo, utilizou-se 50 μL do primeiro reagente com o ativador em 50 μL da amostra do participante. Essa mistura foi incubada, e então, foram adicionados 50 μL de CaCl_2 para início do processo de coagulação. Os resultados foram expressos em tempo (segundos) e razão (resultado do teste dividido pelo valor de um plasma normal).

Concentração de Fibrinogênio

A análise da concentração plasmática de fibrinogênio se baseia na conversão do fibrinogênio, uma proteína solúvel no plasma, em fibrina, um polímero insolúvel, através da ação da trombina. A concentração plasmática normal de fibrinogênio encontra-se entre 200 e 400 mg/dL. Seus valores diminuídos indicam desordens hemorrágicas. No presente estudo o plasma dos participantes foi diluído em 1:20 com solução salina tamponada de Imidazol (0,05 mol/L) e incubado. Em seguida,

foram adicionados 50 μ L do reagente, para a formação do coágulo. Seus resultados foram demonstrados em segundos e concentração.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como de média \pm desvio padrão da média (DP). Para testar o possível efeito do tratamento, a ANOVA de um caminho com medidas repetidas foi utilizada. Foi considerado estatisticamente significativo quando o valor de $P \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas através do programa SPSS *Statistics* v23.0 (IBM, EUA) e os gráficos criados no GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, EUA).

6. RESULTADOS

As características dos participantes se encontram na Tabela 1.

Tabela 1: Características Demográficas	
	N = 15 (8 H e 7 M)
Idade (anos)	42 ± 9
Peso (Kg)	85 ± 16
Altura (cm)	169 ± 6
IMC (Kg.m ⁻²)	29 ± 4

As respostas hemostáticas à infusão de brometo de piridostigmina foram avaliadas pelo tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e concentração de fibrinogênio.

A resposta do tempo de protrombina sobre a administração do brometo de piridostigmina, em pacientes com fadiga crônica não foi significativa (Placebo: 14,1±1; Piridostigmina: 14,8±0,7; p=0,08, Figura 4).

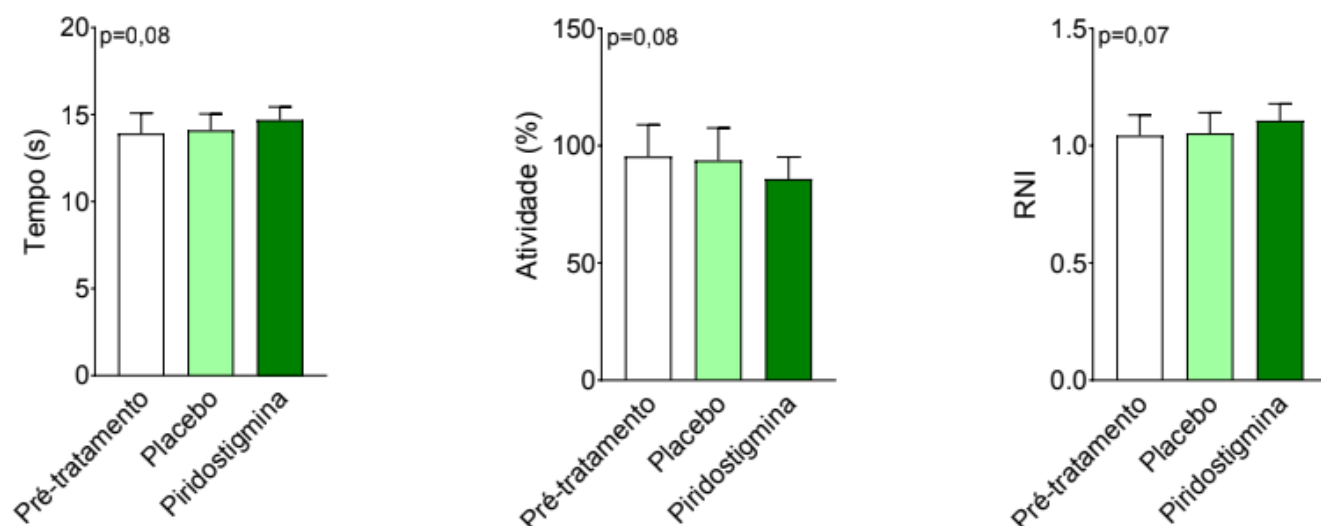


Figura 4: Tempo de protrombina apresentado em segundos, porcentagem de atividade e Razão Internacional Normalizada. ANOVA de um caminho, Sidak.

Os resultados do tempo de tromboplastina parcial permaneceram semelhantes tanto com a administração do placebo, quanto com o inibidor da AchE (Placebo: $31,1 \pm 4$; Piridostigmina: $31,4 \pm 5$; $p=0,95$, Figura 5).

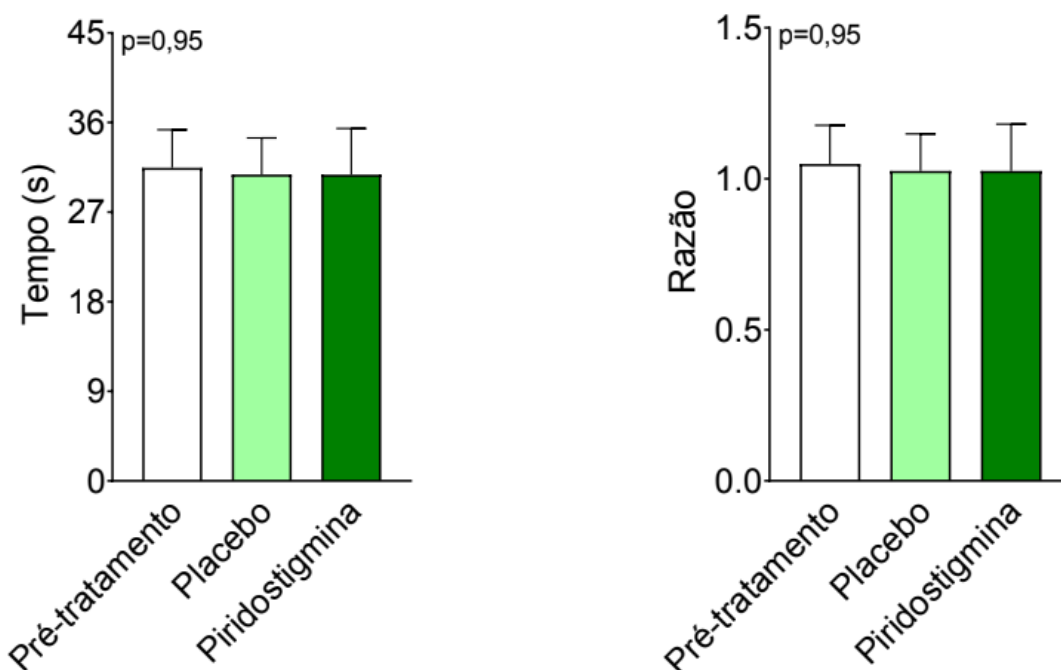


Figura 5: Tempo de tromboplastina parcial ativada apresentado em segundos e razão. ANOVA de um caminho, Sidak.

O tratamento com brometo de piridostigmina não modificou a concentração de fibrinogênio nos pacientes com fadiga crônica, quando comparado ao placebo. (Placebo: $326,8 \pm 70$; Piridostigmina: 316 ± 71 ; $p=0,76$, Figura 6).

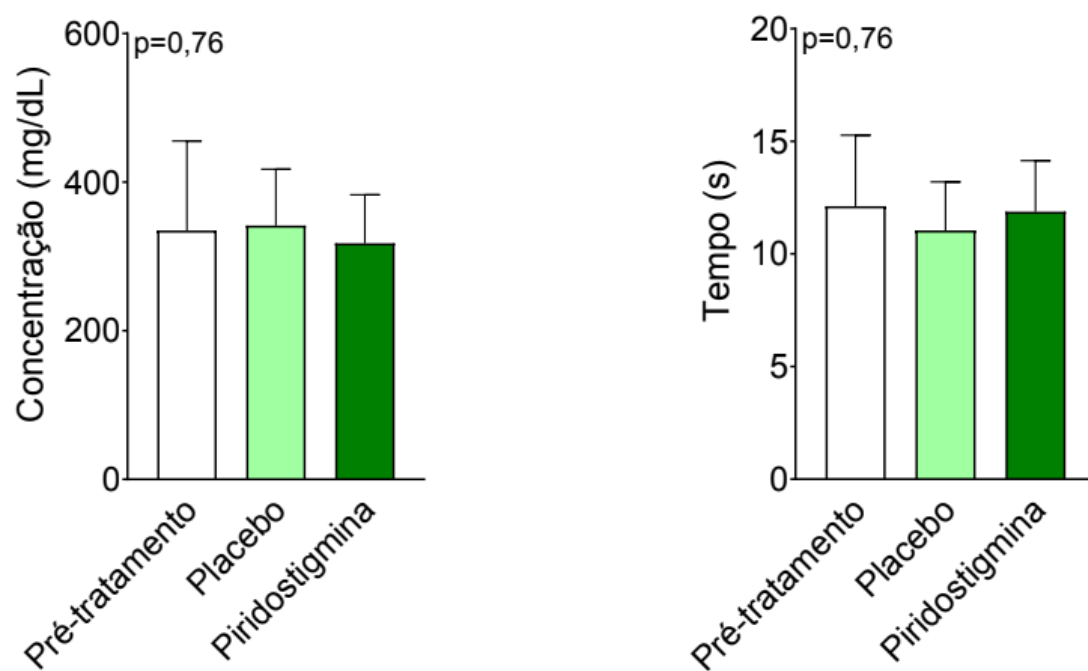


Figura 6: Concentração de fibrinogênio apresentada em segundos e mg/dL. ANOVA de um caminho, Sidak.

7. DISCUSSÃO

O principal achado deste trabalho foi que o tratamento com o brometo de piridostigmina não alterou os valores das variáveis hemostáticas estudadas, TP, TTPa e concentração de fibrinogênio, considerando que todas se enquadravam nos valores de referência já estabelecidos.

Os sintomas a longo prazo da COVID-19 são observados mesmo em casos leves da infecção (12). Um estudo desenvolvido no Reino Unido constatou que, 59% dos pacientes acometidos de infecção leve, apresentaram a prevalência de sintomas passados 3 meses da fase aguda da doença (12). Dos pacientes com infecção moderada, 75% apresentavam ainda alguns sintomas e 89% dos casos graves, em que foi necessária a suplementação de oxigênio, permaneceram com os sintomas, também em um período de 3 meses (12). Os sintomas prevalentes que mais foram apontados foram, a falta de ar e a fadiga intensa, independente do grau de severidade da infecção (12). Neste estudo foram incluídas pessoas que, mesmo após um ano da fase aguda de infecção, sofriam ainda com o cansaço extremo. Outros estudos demonstram que, passados 6 meses da infecção aguda, 76% dos pacientes avaliados, principalmente as mulheres, ainda reportavam a persistência da fadiga intensa e de fraqueza muscular (15). As razões para a prevalência das complicações dessa doença ainda são pouco conhecidas(15). Um dos mecanismos apontados na literatura é que a ocorrência de encefalite, convulsões e outras condições de confusão mental e problemas cognitivos, reportados em pacientes meses após a fase aguda da doença, sugerem problemas estruturais e funcionais da integridade cerebral (15). Considerando a capacidade neuroinvasiva do vírus, esta hipótese fomenta seu potencial para promover as consequências a longo prazo (14).

A fadiga crônica é uma condição debilitante de cansaço extremo e dores nas articulações, que pode ser observada em diversas infecções, não só virais, como também bacterianas (14). Já foi apontado que a infecção por vírus como: Epstein-Barr, Herpesvírus humana, Citomegalovírus, entre outros, pode induzir o desenvolvimento da fadiga crônica (14). No caso da COVID-19, uma infecção viral respiratória, fatores como o estresse oxidativo, o aumento de interleucinas citotóxicas e a inflamação aguda foram essenciais para a ocorrência de fadiga crônica nas pessoas infectadas (14). Em um estudo conjunto de pesquisadores do Reino Unido e dos Estados Unidos, foi levantado que 57% dos pacientes com sintomas persistentes, num estudo que englobava mais de 50 países, reportaram o mal-estar pós esforço físico, principal sintoma da síndrome da fadiga crônica (14). A prevalência de diversos sintomas da COVID-19 pode ser observada em grupo específico de pessoas: pessoas em idade avançada, pessoas do sexo feminino, tabagistas e pessoas que não foram vacinadas (15). Nestes grupos de não vacinados, são observados quadros mais prolongados dessa fadiga extenuante, e estes apresentam mais frequentemente o mal-estar pós esforço físico, característico da fadiga crônica (15). Neste estudo, dos 15 voluntários avaliados, 6 não tomaram nenhuma vacina contra a COVID-19, fato que sustenta a hipótese de que, a falta de vacinação influencia na prevalência da fadiga crônica e de outros sintomas associados.

O brometo de piridostigmina já é um fármaco de interesse para tratamento de miastenia gravis (18). No caso da fadiga crônica, a utilização do inibidor da enzima acetilcolinesterase, seria capaz de prolongar o efeito de contração muscular, minimizando dessa forma a fadiga muscular e revertendo temporariamente este cansaço promovido pela fadiga crônica. Além do efeito

sobre o músculo, o brometo de piridostigmina é capaz de inibir a agregação plaquetária (6). Em uma situação de coagulação descontrolada, como na fase aguda da infecção por SARS-COV-2, este fármaco, a curto prazo poderia ser útil para controle de uma coagulação disseminada, além agir sobre a hemostasia dos pacientes, controlando o ambiente vascular e impedindo a formação de trombos de maneira exacerbada, o que em casos mais severos, pode evoluir para uma embolia pulmonar. Além disso, já foi comprovado que, com a maior liberação de acetilcolina, os receptores de superfície plaquetários, α_7nAChR , encontrados em diversas outras células imunes, neuronais e endoteliais, são mais estimulados, o que resulta em uma resposta anti-inflamatória (6). A estimulação desse receptor é extremamente importante para a promoção de respostas anti-inflamatórias, tendo em vista que este é um mediador encontrado em diversas células, e que se associa a imunidade humoral e intrínseca do organismo, o que em casos de doenças respiratórias graves, como a COVID-19, contribui para uma melhor resposta imunológica (6).

Pacientes acometidos de COVID-19 apresentam um perfil vascular pró-trombótico, passada a fase aguda de infecção (10). A hiperinflamação, marcada pela tempestade de citocinas pro-inflamatórias contribui para o aumento da expressão de fatores teciduais, promovendo a iniciação da cascata de coagulação, contribuindo para a disfunção endotelial e o desenvolvimento de trombose (10). Sabendo disso, a administração do brometo de piridostigmina seria eficiente para a manutenção da hemostasia durante a fase aguda e após alguns meses passados da infecção, tendo em vista a possibilidade de prevenção da ocorrência de trombose.

A análise dos valores de TP e TTPa, que avaliam as vias extrínseca e intrínseca, respectivamente, são essenciais para observação de distúrbios na cascata de coagulação (19). Assim como a concentração de fibrinogênio, que se encontra aumentada em processos inflamatórios. Tais marcadores são preditivos de doenças como coagulação intravascular disseminada e embolia pulmonar (19). Sabendo que, na fase aguda de infecção pelo coronavírus, os pacientes graves apresentavam este quadro, é possível supor que a longo prazo, os valores de TP e TTPa estariam diminuídos e a concentração de fibrinogênio aumentada e fora dos seus valores de referência, indicando os distúrbios hemostáticos, entretanto, o presente estudo não foi capaz de constatar alterações nos principais marcadores da cascata de coagulação desses pacientes com fadiga crônica, nem provar que as variáveis hemostáticas analisadas estavam alteradas. Sendo assim, não foi possível demonstrar que, a longo prazo, haveria alterações na cascata de coagulação desses pacientes acometidos pelo coronavírus, e que esta poderia ser amenizada pela administração do brometo de piridostigmina.

8. CONCLUSÃO

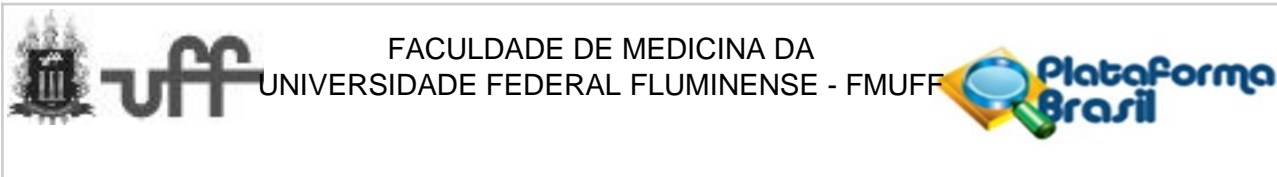
Com os achados deste estudo podemos concluir que o brometo de piridostigmina não promove alterações na hemostasia de pacientes acometidos de fadiga crônica após a COVID-19. Mais estudos sobre as consequências a longo prazo desta doença precisam ser desenvolvidos, a fim de investigar e promover um tratamento adequado para esta população.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shahriar S, Rana MS, Hossain MS, Karim A, Mredula TN, Nourin N, et al. COVID-19: Epidemiology, Pathology, Diagnosis, Treatment, and Impact. *Curr Pharm Des.* 2021;27(33):3502-25.
2. Nicola M, Alsafi Z, Sohrabi C, Kerwan A, Al-Jabir A, Iosifidis C, et al. The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review. *Int J Surg.* 2020;78:185-93.
3. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA.* 2020;324(8):782-93.
4. Yang H, Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(11):685-700.
5. Henry BM, Vikse J, Benoit S, Favaloro EJ, Lippi G. Hyperinflammation and derangement of renin-angiotensin-aldosterone system in COVID-19: A novel hypothesis for clinically suspected hypercoagulopathy and microvascular immunothrombosis. *Clin Chim Acta.* 2020;507:167-73.
6. Jankauskaite L, Malinauskas M, Snipaitiene A. Effect of stimulated platelets in COVID-19 thrombosis: Role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:1037369.
7. Anaya JM, Rojas M, Salinas ML, Rodriguez Y, Roa G, Lozano M, et al. Post-COVID syndrome. A case series and comprehensive review. *Autoimmun Rev.* 2021;20(11):102947.
8. Yancey JR, Thomas SM. Chronic fatigue syndrome: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician.* 2012;86(8):741-6.

9. Barboza CA, Fukushima AR, Carrozzi N, Machi JF, Dourado PMM, Mostarda CT, et al. Cholinergic Stimulation by Pyridostigmine Bromide Before Myocardial Infarction Prevent Cardiac and Autonomic Dysfunction. *Sci Rep.* 2019;9(1):2481.
10. Gomez-Mesa JE, Galindo-Coral S, Montes MC, Munoz Martin AJ. Thrombosis and Coagulopathy in COVID-19. *Curr Probl Cardiol.* 2021;46(3):100742.
11. Castanares-Zapatero D, Chalon P, Kohn L, Dauvrin M, Detollenaere J, Maertens de Noordhout C, et al. Pathophysiology and mechanism of long COVID: a comprehensive review. *Ann Med.* 2022;54(1):1473-87.
12. Aiyegbusi OL, Hughes SE, Turner G, Rivera SC, McMullan C, Chandan JS, et al. Symptoms, complications and management of long COVID: a review. *J R Soc Med.* 2021;114(9):428-42.
13. Monje M, Iwasaki A. The neurobiology of long COVID. *Neuron.* 2022;110(21):3484-96.
14. Sukocheva OA, Maksoud R, Beeraka NM, Madhunapantula SV, Sineelnikov M, Nikolenko VN, et al. Analysis of post COVID-19 condition and its overlap with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *J Adv Res.* 2022;40:179-96.
15. Lippi G, Sanchis-Gomar F, Henry BM. COVID-19 and its long-term sequelae: what do we know in 2023? *Pol Arch Intern Med.* 2023;133(4).
16. WHO. COVID-19 situation reports. 2020. Disponible em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>>

17. Martins, J. D. N., Sardinha, D. M., Silva, R. R. da, Lima, K. V. B., & Lima, L. N. G.C. (2020). As implicações da COVID-19 no sistema cardiovascular: prognóstico e intercorrências. *Journal of Health & Biological Sciences*. <https://doi.org/10.12662/2317-3076jhbs.v8i1.3355.p1-9.2020>. Disponível em: <<https://unichristus.homologacao.emnuvens.com.br/jhbs/article/view/3355>>
18. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. Organizadores: Laurence L. Brunton, Bruce A, et.al.; revisão técnica: Almir Lourenço da Fonseca. – 12. ed. – Dados eletrônicos. Porto Alegre: AMGH, 2012.
19. Fundamentos em hematologia de Hoffbrand. A. V. Hoffbrand, P. A. H. Moss; tradução e revisão técnica: Renato Failace. – 7. ed. Porto Alegre, Artemed, 2018.

ANEXO 1**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Estimulação colinérgica com brometo de piridostigmina no tratamento da fadigasecundária à infecção por SARS-Cov2.

Pesquisador: Joelma Dominato Rocha Carvalho

Área Temática:

Versão: 7

CAAE: 38735720.6.0000.5243

Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Ciências Cardiovasculares

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.493.119

Apresentação do Projeto:

Trata-se de solicitação de Emenda ao protocolo de pesquisa que foi aprovado no dia 18 de janeiro de 2021 (nº parecer 4.501.909).

Justificativa da Emenda: Frente à dificuldade de recrutamento de voluntários e buscando o aprimoramento e adequação do projeto de pesquisa submetido previamente ao CEP sob o número CAAE: 38735720.6.0000.5243, encaminho esta emenda com a finalidade de incluir novos critérios de inclusão e forma de recrutamento de voluntários. Ao longo dos anos de pandemia, uma grande parcela dos pacientes infectados pelo SARS-Cov2 evoluíram com permanência de sintomas além de 4 semanas do início da doença, sendo esta, recentemente classificada como COVID Longa1-3. Dentre os sintomas mais comuns, encontram-se fadiga, cansaço, palpitações e dores musculares. Por apresentarem comprometimento na sua qualidade de vida, ainda não existir nenhum tratamento proposto para esses pacientes e alguns artigos sugerirem que muitos desses sintomas podem ser consequentes à disautonomia presente nessa etapa da doença4,5, optamos por ampliar os nossos critérios de inclusão no estudo, a fim de determinarmos o benefício da piridostigmina na qualidade de vida desses pacientes. Para isto, tornou-se necessário reformular a seção de “amostra”.

« • Indivíduos que foram submetidos à intubação orotraqueal e suporte ventilatório invasivo durante a infecção pelo COVID-19. • Pacientes com ritmo cardíaco diferente do ritmo sinusal,

com fibrilação atrial, frequentes ectopias ventriculares e/ou supraventriculares. Amostra: Vinte indivíduos com história recente de infecção por SARS-Cov2, comprovado por RT-PCR positiva, que concordem em participar do estudo, com faixa etária entre 18 e 65 anos e queixas de fadiga e cansaço permanentes. Cenário do estudo: O Complexo Hospitalar de Niterói dispõe de ambulatório para acompanhamento de pacientes infectados por SARS-CoV2. Segundo os pesquisadores, os pacientes fazem consultas regulares de acompanhamento, procurando atendimento por meios próprios. Metodologia de Análise de Dados: Para o cálculo amostral, o poder do teste estatístico foi ajustado para 0,8 e o erro tipo alfa para 0,05, gerando um número mínimo de doze indivíduos. A normalidade dos dados será verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. A comparação das respostas cardiovasculares será realizada com a ANOVA de dois fatores para medidas repetidas, onde o medicamento utilizado (pós-piridostigmina vs. pós-placebo) e o momento (basal vs. avaliação realizada) serão os principais fatores e, posteriormente, seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni para identificar as diferenças significativas. Quando apropriado, para a comparação entre os grupos pós-placebo e pós-piridostigmina, será utilizado o Teste t de Student pareado no caso de variáveis com distribuição normal (paramétricas) e teste de Wilcoxon no caso de variáveis não paramétricas. As variáveis descontínuas serão analisadas utilizando o Teste do Qui quadrado. As análises de correlação serão feitas usando o Coeficiente de Correlação Linear de Pearson. Os dados serão apresentados como média \pm erro-padrão da média para as variáveis com distribuição paramétrica. A significância estatística será considerada quando p bicaudal $< 0,05$. Todas as análises serão realizadas através do programa STATISTICA (versão 7.0, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA). Desfecho Primário: Melhora da fadiga em pacientes acometidos pela COVID-19. Desfecho Secundário: Melhora da disautonomia dos pacientes acometidos pela COVID 19. Tamanho da Amostra no Brasil: 20 - Grupos em que serão divididos em dois grupos: uso de piridostigmina (10 participantes) e grupo placebo (10 participantes). Não haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc). Instituição Co-participante: IMPAR SERVICOS HOSPITALARES S/A, cuja responsável descrita nas IBP é a pesquisadora principal.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário: Analisar a resposta ao uso da piridostigmina em pacientes com fadiga após serem acometidos pela COVID19. Objetivos Secundários: 1. Descrever as alterações autonômicas em pacientes com diagnóstico de COVID19. 2. Avaliar o impacto da piridostigmina na qualidade de vida desse perfil de pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Efeitos colaterais da piridostigmina, mas que são raros e melhoram após a interrupção do uso da droga. Além desses riscos, há os riscos relativos aos incômodos para a realização dos exames propostos e o risco de quebra de sigilo e vazamento de informações.

Benefícios: Melhora nos sintomas e qualidade de vida dos pacientes. Mesmo com a possibilidade de efeitos colaterais, os benefícios superam os riscos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se cumprimento de pendências ao parecer nº 5.392.726 de 06 de maio de 2022 onde foi feita solicitação de Emenda ao protocolo de pesquisa que foi aprovado no dia 18 de janeiro de 2021 (nº parecer 4.501.909).

Justificativa da Emenda:

« Submissão de emenda referente ao projeto intitulado: Estimulação colinérgica com brometo de piridostigmina no tratamento da fadiga secundária à infecção por SARS-CoV-2. CAAE: 38735720.6.0000.5243 Niterói, 21 de março de 2022.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa, Frente à dificuldade de recrutamento de voluntários e buscando o aprimoramento e adequação do projeto de pesquisa submetido previamente ao CEP sob o número CAAE: 38735720.6.0000.5243, encaminho esta emenda com a finalidade de incluir novos critérios de inclusão e forma de recrutamento de voluntários. Ao longo dos anos de pandemia, uma grande parcela dos pacientes infectados pelo SARS-Cov2 evoluíram com permanência de sintomas além de 4 semanas do início da doença, sendo esta, recentemente classificada como COVID Longa1-3 . Dentre os sintomas mais comuns, encontram-se fadiga, cansaço, palpitações e dores musculares. Por apresentarem comprometimento na sua qualidade de vida, ainda não existir nenhum tratamento proposto para esses pacientes e alguns artigos sugerirem que muitos desses sintomas podem ser consequentes à disautonomia presente nessa etapa da doença4,5, optamos por ampliar os nossos critérios de inclusão no estudo, a fim de determinarmos o benefício da piridostigmina na qualidade de vida desses pacientes. Para isto, tornou-se necessário reformular a seção de “amostra”. Encaminho em anexo: 1- A reestruturação da seção de amostra, com todos os critérios de inclusão e forma de recrutamento de voluntários. (ANEXO I).

Referências: 1- César Fernández-de-las-Peñas et al. Defining Post-COVID Symptoms (PostAcute COVID, Long COVID, Persistent Post-COVID): An Integrative Classification. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021, 18, 2621. 2- Ani Nalbandian et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nature Medicine* 2021, Vol 27: 601–615. 3- Betty Raman et al. Long COVID: post-acute sequelae of COVID-19 with a cardiovascular focus. *European Heart Journal* 2022, vol 43: 1157-1172. 4- Melanie Dani et al. Autonomic dysfunction in 'long COVID': rationale, physiology and management strategies. *Clinical Medicine* 2021 Vol 21, No 1: e63–7. 5- Kamal Shouman et al. Autonomic dysfunction following COVID 19 infection: an early experience. *Clinical Autonomic Research*. DOI: 10.1007/s10286- 021- 00803-8.

ANEXO I

EMENDA: INCLUSÃO DE NOVOS CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E FORMA DE RECRUTAMENTO DE VOLUNTÁRIOS.

Projeto: Estimulação colinérgica com brometo de piridostigmina no tratamento da fadiga secundária à infecção por SARS-CoV2.

CAAE:

38735720.6

.0000.5243

MATERIAIS

E

MÉTODOS

Amostra: Vinte indivíduos com história recente de infecção por SARS-Cov2, comprovado por RT-PCR positiva, que concordem em participar do estudo, com faixa etária entre 18 e 65 anos e mantiverem sintomas permanentes após 4 semanas do início da doença.

Os pacientes serão recrutados através de mídias eletrônica e/ou impressa, além daqueles provenientes dos ambulatórios e/ou internações no Hospital Universitário Antonio Pedro

e/ou Complexo Hospitalar de Niterói. Os que apresentarem critérios de inclusão para a realização do nosso estudo, serão convidados a participar do mesmo. Todos os indivíduos deverão assinar Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO I), concordando em participar do estudo para que sejam incluídos no mesmo.

Para inclusão no estudo todos os indivíduos serão submetidos à anamnese e exame físico. Serão excluídos do estudo: • Indivíduos que apresentem algum tipo de incapacidade motora ou mental que impeça a realização dos testes propostos. • Gestantes. • Indivíduos com hipersensibilidade conhecida à piridostigmina. • Indivíduos com condições que contraindiquem o uso da piridostigmina, como glaucoma, asma e obstrução urinária. • Indivíduos que foram submetidos à intubação orotraqueal e suporte ventilatório invasivo durante a infecção pelo COVID-19. • Pacientes com ritmo cardíaco diferente do ritmo sinusal, com fibrilação atrial, frequentes ectopias ventriculares e/ou supraventriculares. »

PENDÊNCIA 1: apresentar todas as alterações/inclusões no projeto detalhado que deve ser anexado no cumprimento de pendências desta Emenda. Este colegiado solicita que os trechos alterados/inclusos sejam iluminados com cor diferente do restante do texto para facilitar a identificação.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: “Vinte indivíduos com história recente de infecção por SARS-Cov2, comprovado por RT-PCR positiva, que concordem em participar do estudo, com faixa etária entre 18 e 65 anos e mantenham sintomas permanentes após 4 semanas do início da doença. Os pacientes serão recrutados através de mídias eletrônica e/ou impressa, além daqueles provenientes dos ambulatórios e/ou internações no Hospital Universitário Antonio Pedro e/ou Complexo Hospitalar de Niterói. Aqueles que apresentarem os critérios de inclusão para a realização do nosso estudo, serão convidados a participar do mesmo e recrutados.”

SITUAÇÃO: atendida.

PENDÊNCIA 2: segundo o texto da emenda o recrutamento ocorrerá através de mídias eletrônica e/ou impressa.

2.1 Em se tratando de pesquisa em ambiente virtual, é preciso deixar claro como será realizado o convite e apresentar o conteúdo do mesmo para análise do CEP. Assim como esclarecer de que forma será realizado o recrutamento dos potenciais participantes e as etapas do processo de consentimento e esclarecimento, RCLE/TCLE e instrumentos (questionário, formulário, entrevista). OFÍCIO CIRCULAR Nº 2/2021/CONEP/SECNS/MS.

2.2. para recrutamento por mídia impressa deve ser apresentado o cartaz de divulgação para avaliação deste colegiado.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: A pesquisa não será realizada em ambiente virtual! Será presencial. Segue o cartaz de divulgação em anexo (ANEXO 1).

SITUAÇÃO: atendida

PENDÊNCIA 3: a pesquisadora insere o HUAP como local de recrutamento, portanto, deve solicitar a inclusão deste local e apresentar a carta de anuência. Para obtenção da Carta

de Anuência do HUAP, há uma plataforma específica para o cadastro de projetos de pesquisa a fim de obter a carta de anuência da Gerência de Ensino e Pesquisa do HUAP/EBSERH online, para os casos do recrutamento dos participantes ser nas enfermarias desse hospital. Por meio do link: <http://cep.uff.br/2021/07/30/orientacoes-para-obtencao>

-de-carta-de-anuencia-da-gerencia-de-ensino-e-pesquisa-do-huap-ebserh/
RESPOSTA DO PESQUISADOR: Segue em anexo a carta de anuência do HUAP (ANEXO 2).SITUAÇÃO: atendida

PENDÊNCIA 5: apresentar TCLE com as adequações que julgar necessárias provenientes das alterações realizadas.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: Segue o TCLE em anexo (ANEXO 3).

SITUAÇÃO: atendida

PENDÊNCIA 5: levando em consideração que o cronograma do projeto aprovado se encerra no final de 2022, a pesquisadora deve considerar a solicitação de extensão do cronograma quando do envio da emenda.

RESPOSTA DO PESQUISADOR: novo cronograma anexadoSITUAÇÃO: atendida

AVALIAÇÃO DO CEP: este colegiado entende que a solicitação da pesquisadora é pertinente dado sua dificuldade no recrutamento até o momento e que todas as pendências foram atendidas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sobre os termos de apresentação obrigatória, foram apresentados os documentos:

PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1917502_E1.pdf

Carta_CEP_anexos.

pdf

Carta_de_anuencia_

huap_assinada.pdf

Projeto_doutorado_Joelma_Dominato_emedas_recrutamento.pdf

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O colegiado deste CEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação desta emenda.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquívio	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_191750_2_E1.pdf	31/05/2022 21:37:31		Aceito
Solicitação registrada pelo CEP	Carta_CEP_anexos.pdf	31/05/2022 21:35:22	Joelma Dominato Rocha Carvalho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_anuencia_huap_assinada.pdf	31/05/2022 11:37:03	Joelma Dominato Rocha Carvalho	Aceito

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_doutorado_Joelma_Dominato_e_medita_recrutamento.pdf	31/05/2022 11:24:20	Joelma Dominato Rocha Carvalho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_novo.pdf	31/05/2022 11:22:07	Joelma Dominato Rocha Carvalho	Aceito
Outros	EMENDA_CEP_2.pdf	26/04/2022 21:14:42	Joelma Dominato Rocha Carvalho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_Anuencia.pdf	09/11/2020 12:04:30	Joelma Dominato Rocha Carvalho	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	09/11/2020 11:51:37	Joelma Dominato Rocha Carvalho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

NITEROI, 27 de Junho de
2022

Assinado por:

**PATRICIA DE FÁTIMA
LOPES DE ANDRADE**

Endereço: Rua Marquês de Paraná, 303 - 4º Andar (Prédio Anexo)
Bairro: Centro **CEP:** 24.033-900
UF: RJ **Município:** NITEROI
Telefone: (21)2629-9189 **Fax:** (21)2629-9189 **E-mail:** etica.ret@id.uff.br