



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Luiz Henrique Soares Machado**

**Metabolômica salivar em pacientes com covid longa**

**Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Câmpus de Botucatu, para obtenção  
do título de Doutor em Fisiopatologia  
em Clínica Médica.**

**Orientadora: Profa. Dra. Suzana Erico Tanni  
Co-orientadora: Dra. Mariana Gatto**

**Botucatu  
2023**

**Luiz Henrique Soares Machado**

**Metabolômica salivar em pacientes com covid longa**

**Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Câmpus de Botucatu, para obtenção  
do título de Doutor em Fisiopatologia  
em Clínica Médica**

**Orientadora:** Profa. Dra. Suzana Erico Tanni  
**Co-orientadora:** Dra. Mariana Gatto

Botucatu  
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Machado, Luiz Henrique Soares.

Metabolômica salivar de pacientes com covid longa /  
Luiz Henrique Soares Machado. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de  
Botucatu

Orientador: Suzana Erico Tanni

Coorientador: Mariana Gatto

Capes: 40101126

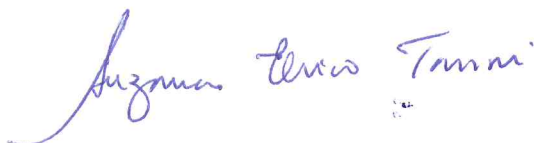
1. Síndrome Pós-COVID-19 Aguda. 2. COVID-19 (Doença).  
3. Metabólitos. 4. Metabolômica.

Palavras-chave: Covid longa; Covid-19; Metabólitos;  
Metabolomica.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE LUIZ HENRIQUE SOARES MACHADO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA EM CLÍNICA MÉDICA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.**

Aos 18 dias do mês de dezembro do ano de 2023, às 14:00 horas, no(a) Sala de Videoconferência do DGAA-HC/Unesp, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de LUIZ HENRIQUE SOARES MACHADO, intitulada **Metabolômica salivar em pacientes com covid longa**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. SUZANA ERICO TANNI (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. BRUNO GUEDES BALDI (Participação Virtual) do(a) FM/São Paulo - Usp, Profa. Dra. RENATA FERRARI CASTAN (Participação Virtual) do(a) Universidade Nove de Julho (Uninove) / Bauru/SP. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADA . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. SUZANA ERICO TANNI



## **Dedicatória**

Dedico essa tese de doutorado a minha noiva, por ser meu apoio desde o início. Aos meus pais, que são exemplos de luta e determinação para minha vida profissional.

## **Dedicatória especial**

Meus sinceros agradecimentos à Prof.<sup>a</sup> Dra. Suzana Erico Tanni pelo tempo dedicado, pelos direcionamentos e orientações e principalmente por confiar em meu trabalho, o qual pude conduzir este desafiador estudo sem intercorrência alguma. Seu profissionalismo e dedicação é e sempre será meu espelho para conduzir minhas condutas na vida profissional. À minha co-orientadora, Dra Mariana Gatto que teve sua participação na realização deste estudo, com tamanha importância e dedicação no conhecimento metodológico sobre a metabólica.

## **Agradecimentos**

Primeiramente à Deus. Por me permitir realizar este estudo e por sempre estar presente em minha vida. “Sou a perfeição de Deus conduzida pelo espírito santo”.

Como principal agradecimento, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa: Estefânia, Robson, Luana, Gustavo, Skalar, Mariana, Yasmin, Neto, Matheus e Ricardo, agradeço imensamente o apoio que me deram durante todo o período dedicado a este estudo.

À Prof.<sup>a</sup> Suzana por tornar possível o meu sonho em ser Doutor, por permitir a minha participação em grupos de pesquisas, congressos e até mesmo ao MECOR, uma formação que me trouxe uma excelente aprendizagem, bem como uma experiência incrível em formação sobre epidemiologia clínica.

Às funcionárias da função pulmonar: Rosângela, Fernanda e Jessica, pela atenção e por estarem sempre na torcida.

Aos funcionários da pós-graduação e do Departamento de Clínica Médica, pela disponibilidade e auxílio quando preciso.

## RESUMO

**Introdução:** Os pacientes após a infecção por covid-19 apresentam sintomas persistentes mesmo após longos períodos e a fisiopatologia dessas manifestações clínicas ainda carece de conhecimento. **Objetivos:** Avaliar a expressão total de metabólitos e vias biológicas da saliva de pacientes com covid-19 após 60 dias da alta hospitalar. **Métodos:** Foi utilizada a amostra de conveniência de 30 pacientes após sessenta dias da hospitalar e grupo controle com sete sujeitos não infectados por covid-19. Para avaliar a gravidade da doença, estado de saúde e disfunção de órgãos foram aplicados o *4C mortality score*, *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE)*, *Simplified Acute Physiology score version 3 (SAPS 3)*. Todos os pacientes com covid longa foram avaliados por características demográficas, função pulmonar, teste de caminhada de 6 minutos (TC6), Questionário do hospital de *Saint George* na Doença Respiratória (SGRQ), avaliação da composição corporal e de força muscular respiratória e periférica. A metabolômica foi realizada na saliva dos pacientes por espectrometria de massa, e foi utilizado filtro de 100% de diferença para detectar metabólitos diferentes entre os grupos. **Resultados:** Do total de pacientes pós covid, o gênero masculino foi predominante (66%), com  $60,4 \pm 14,3$  anos. A massa muscular esquelética foi de  $30,7 \pm 7,3$ kg e massa de gordura de  $34,4 \pm 13,7$ kg. Os resultados da espirometria simples mostraram CVF e  $3,84 \pm 0,97$  (L), VEF<sub>1</sub>  $3,11 \pm 0,83$  (L) e  $0,80 \pm 0,15$  na relação CVF/VEF<sub>1</sub>, o que não houve comprometimento nos valores obtidos. No entanto, os valores da força muscular respiratória com a porcentagem da pressão inspiratória máxima e expiratória máxima foi de  $85,8 \pm 20,5$  e  $87,6 \pm 17,5$  respectivamente. O questionário SGRQ mostrou a média de porcentagem da magnitude dos sintomas com  $32,3 \pm 15,2$ , atividade com  $41,9 \pm 25,6$ , impacto com  $13,7 \pm 11,4$  e total de  $24,3 \pm 14,9$ . A distância no TC6 ( $418,2 \pm 130$ m) correspondente a 73% (22,3-98,1) do previsto. O grupo controle foi composto por homens com  $44,1 \pm 10,7$  anos e índice de massa do corpo:  $26,5 \pm 1,66$  Kg/m<sup>2</sup>. A metabolômica mostrou 19 metabólitos expressos diferencialmente, no qual os pacientes pós-covid apresentaram menor expressão de 16 metabólitos em relação aos controles, além de apresentarem ausência de 2 metabólitos. Desses metabólitos, destacam-se Calendulósido G Metil éster ( $p=0,03$ ), Gly Pro Lys ( $p=0,0001$ ) e a Creatina ( $p=0,0001$ ) que foram pouco expressos nos pacientes em relação ao grupo controle. **Conclusão:** Os pacientes pós-covid apresentam características clínicas persistentes que podem estar associadas à menor expressão de metabólitos salivares.

**Palavras chaves:** covid-19, covid longa, metabólitos, metabolômica.



## ABSTRACT

**Introduction:** long covid patients have suffered persistent symptoms even after long periods. The pathophysiology of these clinical manifestations still lacks knowledge. **Objectives:** To evaluate the total expression of metabolites and biological pathways in the saliva of patients 60 days after hospital discharge for COVID-19. **Methods:** The convenience sample of 30 post-discharge patients and 7 non-COVID-19 patients were included. To assess the severity of the disease, health status and organ dysfunction, the 4C mortality score, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE), Simplified Acute Physiology score version 3 (SAPS 3) were applied. All COVID-19 patients were evaluated by demographic characteristics, spirometry, 6-minute walk test (6MWT), Saint George Respiratory Questionnaire (SGRQ), and body composition. Metabolomics was performed on the saliva using mass spectrometry and a 100% difference filter was used to detect different metabolites between groups. **Results:** From the total of long covid patients, 66% were male, 60.4±14.3 years old. The lean body mass was 30.7±7.3kg and fat mass 34.4±13.7kg. The spirometry results showed simple FVC 3.84±0.97(L), FEV1 3.11±0.83(L) and 0.80±0.15 in the FVC/FEV1 ratio, which did not compromise the values obtained. However, respiratory muscle strength presented the values of muscle inspiratory pressure 90.1±31.6 (cmH<sub>2</sub>O) and muscle expiratory pressure 97.3±31.0. The SGRQ showed a mean percentage of magnitude of symptoms 32.3±15.2, activities 41.9±25, impact of 13.7±11.4 and total de 24.3±14.9. Physical capacity measured by the distance in the 6MWT (418.2±130m) with correspondence of predictive 73.3% (22.3-98.1). The control group is composed by male with 44.1±10.7 years old and BMI presented 26.5±1.66 (Kg/m<sup>2</sup>). Metabolomics analysis showed 19 differentially expressed metabolites. Long covid patients showed lower expression of 16 metabolites compared to controls, in addition to exhibiting the absence of 2 metabolites. Of these metabolites, Calenduloside G Methyl ester (p=0.03), Gly Pro Lys (p=0.0001) and Creatine (p=0.0001) stand out, which were poorly expressed in patients compared to the control group. **Conclusion:** Long covid patients have persistent clinical features that may be associated with changes in poorly expressed metabolites demonstrated through metabolomics. **Keywords:** covid-19, long covid, metabolites, metabolomics.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	9
JUSTIFICATIVA.....	12
HIPÓTESE .....	12
OBJETIVOS .....	13
Primário.....	13
Secundário.....	13
MÉTODOS .....	14
Delineamento .....	15
.....	16
Critério diagnóstico para covid-19.....	17
Composição de corpo.....	17
Questionário de qualidade de vida e de dispneia (ANEXO 1).....	17
Oximetria de pulso e gasometria arterial.....	18
Exames laboratoriais.....	18
Espirometria pré e pós broncodilatador .....	18
Teste de caminhada de seis minutos (TC6) .....	18
4C mortality score.....	19
Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) .....	19
Simplified Acute Physiology score version 3 (SAPS 3).....	20
Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE) .....	20
Metabolômica.....	21
Análise estatística .....	23
ANEXO I .....	34

## INTRODUÇÃO

A Organização mundial de saúde (OMS) declarou em 11 de março de 2020 que a covid-19 é caracterizada como uma pandemia. Em 10 de março de 2022, o Brasil apresentou mais de 35 milhões de casos confirmados e com mais de 690 mil óbitos (OMS). Febre, tosse, dor torácica, dispneia, astenia e mialgia são sinais e sintomas mais frequentes e importantes para o diagnóstico de covid-19 (Romero-Gamero, 2021).

Na fase inicial da pandemia, previamente ao período de vacinação da população, 84% dos pacientes com diagnóstico confirmado para covid-19 apresentaram a necessidade de hospitalização pela presença da pneumonia viral associada à piora da troca gasosa baseada no grau da hipoxemia leve ( $200\text{mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$ ), moderada ( $100\text{mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$ ) e grave ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$ ), o que define a presença de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (Berlin, 2012). Essa condição clínica grave pode apresentar concomitantemente disfunção de múltiplos órgãos sendo uma das principais causas de óbito, com prevalência de 58% (Prompetchara, 2020; Wu et al., 2020; Huang et al., 2020).

Fatores de risco para maior gravidade e mortalidade já foram descritos na literatura, como idade avançada, gênero masculino, obesidade, hipertensão arterial e diabetes tipo II (Huang et al., 2020; Kakodkar et al., 2020; Simonnet, 2020; Palaiodimos, 2020). Estudos com dados epidemiológicos do Brasil mostraram que a prevalência de mortalidade é de 38% nos pacientes hospitalizados, com maior taxa (86%) quando em uso de ventilação mecânica (Ranzani et al., 2021).

A pandemia de covid-19 trouxe urgentes estudos que pudessem descrever a etiologia e o prognóstico da doença, no entanto, o conhecimento dos mecanismos envolvidos nas diferentes sequelas em longo prazo do covid-19 permanece escassos na literatura (Wiersinga et al., 2020). A Síndrome pós-covid-19, também denominada como covid longa, é definida por complicações com sintomas persistentes por mais de 12 semanas (NICE, 2021). Neste contexto, o presente estudo avaliou os pacientes com fase de pós-covid, ou seja, os pacientes foram avaliados com oito semanas após a alta hospitalar.

A incidência de sintomas pós-covid-19 atinge grande volume de pacientes e a literatura mostra que 70% dos indivíduos podem apresentar sintomas de dispneia e 60% apresentam fadiga (Levison, 2020). O estudo de Carfi et al (2020) demonstrou que 70% das pessoas com

um ou mais sintomas estavam fisicamente aptas antes de contrair a doença, mas que após o diagnóstico apresentam sedentarismo devido à gravidade da doença. A literatura mostra que estes sintomas impactam diretamente no estado geral de saúde de cada paciente, o que acarreta a sobrecarga no sistema de saúde pública (Greenhalgh et al., 2020; Huang et al., 2021).

Estes sintomas estão relacionados às vias fisiopatológicas danificadas por diversas condições de comorbidades, como respostas imunes celulares e tempestade de citocinas, as quais desempenham papel crucial na patogênese, manifestação clínica e desfechos negativos da doença. As citocinas pró-inflamatórias sistêmicas aumentam com a progressão da doença, com relação direta no aumento da morbi-mortalidade (Aggarwal et al., 2021; Tanni et al., 2021).

Para avaliar a perspectiva dos mecanismos envolvidos a síndrome de pós-covid, diferentes ferramentas de análises são utilizadas em amostras biológicas humanas, como sangue, tecidos e saliva. A avaliação de biomarcadores salivares pode ser baseada em sequenciamento de RNA, biópsia líquida, biossensores fluorescentes, métodos fotométricos e eletroquímicos, liberação induzida por campo elétrico e método de medição (Kaczor-Urbanowich et al., 2017; Kojima et al., 2020; Sapkota et al., 2021).

Deste modo, estudos mostram que a análise da saliva pode ajudar no diagnóstico de doenças (Zhang et al., 2016; Castro et al., 2018), servindo como reservatório para vírus presentes nas excreções orais, do trato respiratório inferior, nasofaringe e glândulas salivares, possivelmente infectadas (Braz-Silva et al., 2020; Sapkota et al., 2021). Chen et al (2020) observaram que o RNA do SARS-CoV-2 estava presente em amostras de saliva diretamente das glândulas salivares. Também há expressão dos receptores de enzima conversora de angiotensina (ECA), o que indica que a glândula salivar é uma das fontes de SARS-CoV-2, e facilitaria a avaliação progressiva da replicação viral durante o curso da doença (Zhou et al., 2020, Wyllie et al., 2020; To et al., 2020).

Diante da pandemia de covid-19, houve a utilização de estratégias diagnósticas para avaliar os casos de forma eficiente, com o intuito de fornecer informações sobre as consequências causadas pela doença. A partir dessas estratégias, existem vários estudos que aplicaram análises ômicas para a identificação de biomarcadores no plasma de pacientes com covid-19 (Ellinghaus et al., 2020; Silvin, et al., 2020; Shen et al., 2020) e, alguns estudos sugerem que perfis de metabólitos encontrados no soro/plasma de pacientes são úteis na estratificação de casos leves à graves de pacientes com covid-19 (Wu et al., 2020; Shen et al., 2020).

Dentre as análises ômicas, a metabolômica também pode oferecer a caracterização de circuitos bioquímicos influenciados pela covid-19 e seu tratamento, e identificar metabólitos

que possam estar relacionados com as características clínicas de pacientes em fase de pós-covid ou covid longa. A metabolômica tem como finalidade avaliar possíveis marcadores biológicos de processos celulares, teciduais, das metabolizações corporais, o que fornecem informações da fisiopatologia envolvida na doença (Sapkota et al., 2021; Banoei et al., 2017; Wu et al., 2020).

De fato, sintomas persistentes na síndrome pós-covid-19 podem levar a redução da capacidade física, mesmo que um terço dos pacientes apresentem comorbidades prévias. Chopra et al., (2021) realizaram um levantamento de dados com 1250 pacientes com covid longa que ainda estavam vivos após 60 dias de alta hospitalar entre 16 de março e 1 de julho de 2020. Os resultados mostraram que 6,7% dos pacientes morreram após 60 dias e 15,1% necessitaram de uma nova internação hospitalar por alterações de múltiplos sistemas na fase de pós-covid-19. Estudo Italiano realizado na fase de declínio da pandemia em abril de 2020, incluiu 143 pacientes com 60 dias após a hospitalar por covid-19, e observaram que 87% apresentavam um ou mais sintomas nesse período, com piora de 44% na qualidade de vida, tendo fadiga (53%) e dispneia (43,4%) como sintomas predominantes. (Carfi, et al., 2020)

Assim, o uso da metabolômica possibilitaria o entendimento fisiopatológico da síndrome covid longa com a identificação de quais metabólitos possam estar alterados, o que pode facilitar a compreensão do prognóstico da doença e o conhecimento do processo de recuperação e a reabilitação desses pacientes. Neste contexto, se faz necessário a identificação de possíveis vias metabólicas que possam estar relacionadas à persistência de sintomas da covid longa. Além disso, a identificação de vias metabolômicas possa sugerir novas estratégias de intervenção para o grande número de pessoas que sofrem destes sintomas.

## **JUSTIFICATIVA**

Não há dados robustos na literatura que possam descrever a fisiopatologia da covid longa.

## **HIPÓTESE**

A metabolômica de saliva identificará quais metabólitos que, possivelmente, estão modificados em pacientes com 60 dias após a alta hospitalar por infecção aguda de covid-19 em comparação a sujeitos não infectados.

## **OBJETIVOS**

### **Primário**

Avaliar e comparar os metabólitos predominantes da saliva de pacientes com covid longa, após 60 dias da alta hospitalar.

### **Secundário**

Avaliar as características clínicas e funcionais respiratórias de pacientes com covid longa, após 60 dias da alta hospitalar.

## MÉTODOS

### Desenho do estudo

Este estudo observacional e transversal foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu (número 312588/2020) e a inclusão dos pacientes que são acompanhados no ambulatório de pós-COVID foi realizada após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 1).

### Sujeitos:

Os critérios de elegibilidade são:

- ✓ Idade > 18 anos;
- ✓ Presença de sintomas característicos da doença de forma aguda do COVID-19: febre, tosse, mialgia e dispneia;
- ✓ Presença de teste confirmatório para COVID-19;
- ✓ Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO I).
- ✓ Foram incluídos tanto os pacientes de quadro leves e moderados que utilizaram suplementação de oxigênio durante a hospitalização quanto pacientes graves que apresentaram a necessidade de ventilação mecânica invasiva, não invasiva e máscara não-reinalante;
- ✓ Foram incluídos somente os pacientes que não apresentaram diagnóstico de outro vírus associado.

Os critérios de exclusão foram pacientes com diagnóstico clínico de outras doenças respiratórias.

### Sujeitos controles:

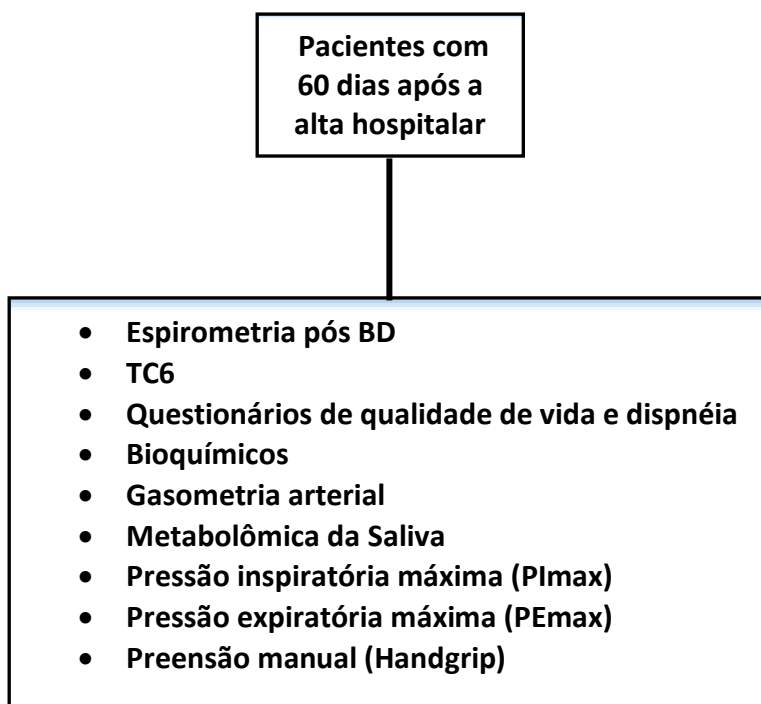
Foram convidados sujeitos controles, acompanhados na Universidade Federal de Uberlândia, nunca fumantes e que não tiveram infecção de covid-19 para análise de saliva para avaliação metabólica. Neste grupo não foram realizados os demais procedimentos do protocolo.



## **Delineamento**

Todos os pacientes foram avaliados 60 dias após a alta hospitalar, com a coleta de dados demográficos, histórico hospitalar da gravidade da infecção por covid-19, avaliação da composição de corpo, qualidade de vida e dispneia. Também foram realizadas a espirometria pré e pós broncodilatador, avaliação de força muscular respiratória e força muscular periférica, capacidade física do exercício com o teste de caminhada de seis minutos (TC6). No mesmo dia foram coletadas amostras de sangue venoso e arterial para a realização de hemograma completo, análise bioquímica e dos gases arteriais, e além disso, foi também coletada a amostra de saliva (FIGURA 1).

**Figura 1:** Delineamento do estudo



## **Critério diagnóstico para covid-19**

Para diagnóstico de infecção por covid-19, foram utilizados os critérios diagnósticos pelo Guia da OMS, no qual inclui testes moleculares com sequenciamento viral ou PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR) de amostras de swabs nasofaríngeal, lavados broncoalveolar, aspirado traqueal nasofaríngeal, sangue, soro e tecido de biópsias pulmonares ou outro teste orientado pela OMS com validade diagnóstica (OMS, 2020).

## **Composição de corpo**

A avaliação da composição de corpo foi realizada pela bioimpedância elétrica multifrequência pelo equipamento (Inbody 720). As variáveis mensuradas e utilizadas para análise foram: massa corporal (Kg), percentual de tecido adiposo corporal (%), massa muscular total (Kg) e massa muscular apendicular (Kg), que é a soma da massa muscular de cada membro do paciente. As variáveis avaliadas foram a massa muscular esquelética (MME) e massa de gordura. A estatura foi avaliada através da medida realizada em balança manual (em centímetros), com o paciente sem uso de calçados, membros superiores e inferiores estendidos e queixo horizontalizado.

## **Questionário de qualidade de vida e de dispneia (ANEXO 1)**

Para verificar o estado de saúde foi utilizada a versão validada para a língua e cultura brasileira do *Saint George Respiratory Questionnaire* (SGRQ).

O SGRQ é composto de três domínios: sintomas, relativo ao desconforto causado por sintomas respiratórios; impacto, que verifica o impacto global nas atividades de vida e no bem-estar do paciente; atividades, que avalia as alterações da atividade física e o escore total correspondente à somatória dos três domínios. O escore de cada domínio e o escore total varia de 0 a 100 pontos, onde a pontuação zero corresponde à ausência de disfunção e a pontuação 100 corresponde a disfunção máxima. Os resultados são expressos em porcentagem, sendo que modificações acima de 4% mostram diferença clinicamente significativa para cada domínio (Sousa et al., 2000).

A avaliação da dispneia foi realizada através da escala desenvolvido pela *Medical Research Council* modificado (mMRC) e validado para o idioma português (Kovelis et al., 2008). Com escala de cinco pontos, este instrumento é baseado nas atividades que desencadeiam a dispneia e, quanto mais elevada a pontuação, maior a sensação de dispneia.

Foi utilizada a versão traduzida para a língua e cultura brasileiras do Baseline Dyspnea Index (BDI) (Martinez & Padua, 2001). O BDI avalia três aspectos importantes: primeiro é

avaliada a intensidade da tarefa responsável por desencadear a dispneia, no segundo a intensidade de esforço responsável por desencadear dispneia é avaliada e, no terceiro é estimada a incapacidade funcional que a dispneia causa ao paciente. Cada item varia de zero a quatro, sendo o escore total obtido pela soma dos três itens. Quanto menor a pontuação maior a intensidade de dispneia.

### **Oximetria de pulso e gasometria arterial**

A monitorização da SpO<sub>2</sub> foi realizada com oxímetro portátil Onyx (Model 9500 Oximeter; Nonin Medical Inc., Minneapolis, MN, USA). Os gases arteriais por punção da artéria radial foram realizados de acordo com indicação da equipe médica, com dosagem realizada por analisador de gases (*Stat Profile 5 Plus - Nova Biomedical, Waltham, MA, USA*).

### **Exames laboratoriais**

Os exames laboratoriais como hemograma completo, Dimero D e gasometria foram realizados conforme os critérios empregados na realização dos exames de rotina pela equipe médica da Seção Técnica de Laboratório e Análises Clínicas de cada HC.

### **Espirometria pré e pós broncodilatador**

A espirometria foi realizada em sistema portátil computadorizado de função pulmonar (FERRARIS KOKO, LOUISVILLE, CO, USA), de acordo com os critérios da *American Thoracic Society* (ATS 2005). Serão medidos a CVF em litros (L) e o VEF<sub>1</sub> em litros (L), e calculada a razão entre as duas medidas (VEF<sub>1</sub>/CVF). As medidas foram obtidas antes e 20 minutos após o uso de fenoterol 400mcg como medicação broncodilatadora. Os valores de CVF e VEF<sub>1</sub> também foram expressos em porcentagem dos valores de referência (Pereira 2002).

### **Teste de caminhada de seis minutos (TC6)**

O TC6 foi realizado de acordo com as diretrizes da *American Thoracic Society* (ATS, 2002). Corredor de 30 metros será delimitado para ser seguido, e os pacientes foram instruídos a caminhar a maior distância possível por seis minutos. Foi dado encorajamento verbal padronizado a cada minuto. A distância percorrida foi medida em metros e a SpO<sub>2</sub> monitorada

durante todo o teste. Foram realizados dois testes para minimizar o efeito aprendido do paciente e considerado intervalo de 30 minutos entre cada teste para recuperação do paciente. A distância percorrida foi considerada do segundo teste. Os testes foram realizados sem suplementação de O<sub>2</sub> para ser avaliado a magnitude de dessaturação. Quando a SpO<sub>2</sub> se apresentar abaixo de 88% por mais de 1 minuto, foi considerada como dessaturação, e, acima deste valor, como sem dessaturação.

Para avaliar a presença de dispneia e de fadiga dos membros inferiores, a escala modificada de BORG foi aplicada antes e após os testes, para quantificar de 0 a 10 o grau de dispneia e fadiga dos membros inferiores relatada diretamente pelo paciente (BORG, 2000).

#### **4C mortality score**

A pontuação de mortalidade 4C foi classificada como um score de prognósticos que foi derivada e validada no estudo *ISARIC World Health Organization Clinical Characterization Protocol UK* (Docherty et al., 2020). O score 4C utiliza parâmetros que comumente são avaliados na admissão hospitalar como as características como idade, sexo, comorbidades, frequência respiratória, saturação periférica de oxigênio, Escala de coma de Glasgow, nitrogênio uréico no sangue e proteína C reativa. A pontuação varia de 0 a 21 com grupos de risco definidos como baixo (0-3), intermediário (4-8), alto (9-14) e muito alto ( $\geq 15$ ).

#### **Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)**

O “*European Society of Intensive Care Medicine*” criou em 1994 o score SOFA, para descrever quantitativamente e objetivamente a possibilidade de disfunção/falha de órgão ao longo do tempo em grupos de pacientes ou individualmente. O score é composto por características: 1) para melhorar ou entender a história natural da falha/disfunção de órgãos ou a inter-relação entre a falha de vários órgãos, 2) para avaliar os efeitos da nova terapia durante o curso da falha/disfunção de órgãos. Pode ser usado para caracterizar os pacientes na admissão ou para avaliar os efeitos do tratamento.

É um score simples e objetivo que, além de permitir o cálculo do número e da severidade da disfunção orgânica em seis sistemas como o respiratório, coagulatório, hepático, cardiovascular, renal e neurológico, também permite medir a disfunção orgânica individual ou agregada. O score gradua de 0 (normal) a 4 (muito anormal) as disfunções presentes em cada sistema. É importante entender que o score SOFA é projetado não para prever o resultado nem

a mortalidade, mas sim para descrever a sequência de complicações em pacientes críticos (Vincent et al., 1996).

### **Simplified Acute Physiology score version 3 (SAPS 3)**

O SAPS 3 é representado por escore fisiológico agudo e avaliação do estado prévio, visando estabelecer índice preditivo de mortalidade para pacientes admitidos em unidade de terapia intensiva (UTI) e ao paciente para avaliar a gravidade da doença e prever a mortalidade intra-hospitalar. É composto por 20 variáveis para avaliação como o menor valor estimado da escala de coma de Glasgow, maior frequência cardíaca, menor pressão arterial sistólica, maior valor de bilirrubina, maior temperatura corporal, maior valor de creatinina, maior valor de leucócitos, menor número de plaquetas, menor concentração de íons de hidrogênio (pH), suporte ventilatório e oxigenação. Sistemas prognósticos que incluem mensuração acima das primeiras 24 horas do período de UTI não são válidos para uso na triagem. Além disso, valores obtidos acima de 24 horas frequentemente capturam o cuidado-padrão mais do que o real estado clínico do paciente. Moreno et al., (2005) afirmaram que a probabilidade de morte hospitalar dos pacientes aumenta consideravelmente conforme maior a pontuação encontrada do escore.

### **Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE)**

O APACHE é frequentemente usado na prática médica em adultos na UTI. A classificação é composta por duas partes, sendo o escore fisiológico que representa o grau da doença aguda e a avaliação da saúde na pré-admissão hospitalar indicando o status de saúde após a doença aguda. A classificação é feita com a avaliação do prontuário nas primeiras 32 h de admissão para anormalidades entre 34 medidas fisiológicas possíveis.

A pontuação varia de 0 a 4 e é atribuída para cada medição registrada para refletir o quão doente o paciente está. Por exemplo, uma pontuação de 0 é dada para uma pressão arterial média variando de 70-110 mmHg, enquanto uma pontuação de 4 é dada para uma pressão arterial média menor que 50 ou maior que 160 mmHg. A soma dos pontos atribuídos para todas as medições registradas representa a pontuação total de fisiologia do paciente. Quanto maior a pontuação, mais doente será o paciente. Já o estado de saúde pré-admissão é atribuído pela revisão do histórico médico do paciente para obter detalhes sobre seu estado funcional, produtividade e atenção médica aproximadamente 6 meses antes da admissão. Com base em

um número limitado de perguntas, o paciente é colocado em um de quatro categorias de saúde crônica, caracterizadas de A a D.

## **Metabolômica**

### ***Extração de proteínas da saliva***

Amostras de proteínas de saliva foram preparadas para análise por espectrometria de massa (EM) em várias etapas. O primeiro passo é a redução de dissulfeto usando um agente redutor, ditioneitol (DTT). Os grupos sulfidrilo livres nos resíduos de cisteína foram então alquilados com iodoacetamida para impedir que os sulfidrilo livres formem ligações dissulfureto. Em seguida, as proteínas foram digeridas por tripsina, ligando o C-terminal à arginina ou à lisina para fragmentar as proteínas em peptídeos.

### ***Análise Metabolômica***

A metabolômica da saliva dos pacientes com covid longa e do grupo controle foi realizada na Universidade Federal de Uberlândia.

Extração de metabólitos: para a extração dos metabólitos, foram adicionados 100 µL de amostra (saliva e soro) com 1000 µL de grau espectroscópico de metanol em 2 mL de eppendorf e esta mistura foi incubada por 4 horas em ultra-congelador (-80°C). Em seguida, centrifugou-se por 15 min a 13000 g e o sobrenadante transferido para outro eppendorf de 2 mL, que foi concentrado em concentrador a vácuo por 30 min e liofilizado. O material foi armazenado em um ultracongelador (-80°C) até o momento da análise. Para as análises de espectrometria de massa, as amostras foram ressuspensas em 500 µL de metanol de grau espectroscópico e filtradas através de um filtro de 0,22 micrômetros.

Análise IES / MS por infusão direta: as análises IES / EM pôr infusão direta foram realizadas com um cromatógrafo líquido (marca Agilent modelo Infinity 1260) para injeção de amostra juntamente com um espectrômetro de massa de alta resolução Agilent® modelo 6520 B Q-TOF com fonte de ionização por electropulverização (IES). Os parâmetros cromatográficos são: fluxo constante de fase móvel de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> com a composição 90% de metanol e 10% de água acidificada com ácido fórmico (0,1% (vv - 1)), o volume de injeção da amostra foi de 10 µL. Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás de secagem a 8 L.min<sup>-1</sup> a uma temperatura de 220 ° C e uma energia de 4,5 KVa foi aplicada ao capilar.

Análise quimiométrica: as amostras de massa adquiridas por infusão direta foram extraídas para o formato TXT e submetidas ao programa MATLAB (MATrix LABoratory), no qual foram realizadas a análise de componentes principais (PCA) e PLS-DA (análise discriminante de mínimos quadrados com calibração multivariada).

HPLC / MS: as análises de cromatografia líquida de alta eficiência acopladas a um espectrômetro de massa (HPLC / MS) foram realizadas em um cromatógrafo líquido (marca Agilent modelo Infinity 1260) acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução tipo Q-TOF modelo Agilent® 6520 B com fonte de ionização por eletropulverização (IES). Parâmetros cromatográficos: coluna Agilent modelo Zorbax C18, 2,1 mm de diâmetro interno, 10 cm de comprimento, partículas de 2,7 µm, fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% (vv - 1)) (A) e metanol (B), com o gradiente: 2% B (0 min), 98% B (0 - 20 min); 100% B (20-23 min). Parâmetros de ionização: pressão do nebulizador de 20 psi, gás de secagem a 8 L.min - 1 a temperatura de 220 ° C e energia capilar de 4,5 KVa. A identificação dos constituintes foi realizada levando-se em consideração a massa de alta resolução (considerando o erro com a massa exata menor que 10 ppm) e os espectros de massa / massa (EM / EM) encontrados na literatura.

Essas análises nos permitiram identificar metabólitos supra-regulados, sub-regulados e exclusivos em amostras de saliva. Os metabólitos alterados exclusivos e os mais significativos que atingem a maior alteração dobrada foram selecionados para validar ainda mais a aplicação dessas biomoléculas como biomarcadores para o diagnóstico de lesões pulmonares e renais.



## **Análise estatística**

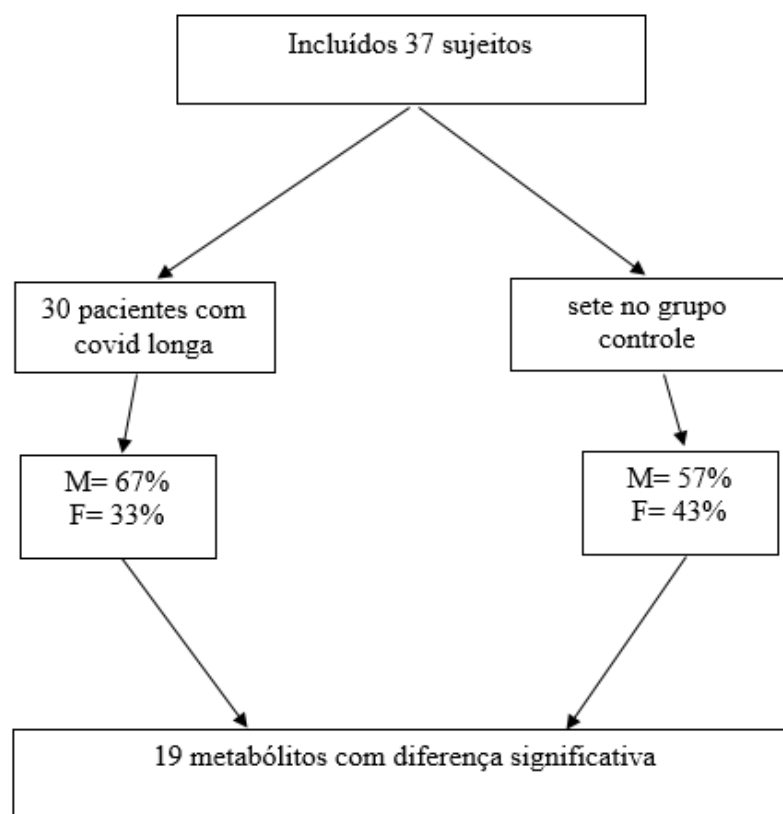
O tamanho de amostra não foi calculado devido à falta de avaliação metabólica neste tipo de pacientes. Uma amostra de conveniência de pelo menos 30 pacientes com Covid longa e sete sujeitos saudáveis nunca infectados pela Covid-19 foi considerada.

As características dos pacientes foram detalhadas em gráficos, figuras e tabelas. Estatística descritiva foi utilizada para descrever as características dos pacientes com Covid longa. As variáveis são expressas em valores médios e desvio padrão. Os resultados são apresentados como MÉDIA e DP.

Para a análise metabólica, os metabólitos foram categorizados com base em seu comportamento regulatório, e os métodos estatísticos destacaram diferenças entre os grupos. O agrupamento hierárquico destacou variações de grupo e o teste de Mann-Whitney com correções confirmou mudanças significativas, com significância estatística marcada em um valor de  $p$  inferior a 0,05.

Para descrever as vias metabólicas, os metabólitos foram considerados diferencialmente expressos e separados em regulados para cima ou para baixo com base na mudança em Log2. Figuras comprimidas com agrupamento hierárquico foram usadas para mostrar diferenças entre os grupos. A análise foi realizada com o teste não pareado de Mann-Whitney, com o teste de correção múltipla Benjamini-Hochberg. Um gráfico de volcano plot foi utilizado, e cada metabólito que apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos. Foi considerado significância estatística  $p < 0,05$ .

## Resultados



Após a análise descritiva dos dados, observou-se que quatro pacientes apresentaram necessidade de ventilação mecânica invasiva, e desses, três com necessidade de diálise.

As condições clínicas apresentadas pelos pacientes durante o período de internação estão descritas na tabela 1.

**Tabela 1.** Condições clínicas durante a internação.

Variáveis	N=30
<b>Tempo de internação (dias)</b>	10,4±6,16
<b>4C score (n=29)</b>	9 (1-13)
<b>SOFA (n=21)</b>	2 (0-9)
<b>SAPSIII (n=19)</b>	14,5 (0-46)
<b>APACHE II (n=20)</b>	8 (1-39)

A população estudada apresentou predominância para o gênero masculino (66%), e a média de idade de 60,4±14,3 anos. A média de peso 89,6±19,8 kg, altura 166,3±9,6cm com IMC de 32,2±7,04 kg/m<sup>2</sup>. As características da bioimpedância como MME e MG apresentaram média de 30,7±7,3 e 34,4±13,7kg respectivamente (Tabela 2).

Os pacientes atingiram 96% do predito de CVF com valores médios de  $3,84 \pm 0,97$  L e  $96 \pm 14,3\%$ . Apresentaram 98% do predito para  $VEF_1$  com valores médios de  $3,11 \pm 0,83$  L e  $VEF_1$   $97,9 \pm 15,9\%$  e relação  $VEF_1/CVF$   $80,9 \pm 5,81\%$ . Para o teste de força muscular respiratória, os pacientes atingiram 85.8% do predito para  $P_{\text{Imax}}$  cmH<sub>2</sub>O com média de  $97,3 \pm 31,1$  cmH<sub>2</sub>O e, para  $P_{\text{Emax}}$  cmH<sub>2</sub>O atingiram 87% do predito com média de  $87,6 \pm 17,5$  cmH<sub>2</sub>O (Tabela 1).

A qualidade de vida e a capacidade funcional foram avaliadas pelo questionário SGRQ que foi utilizado a porcentagem dos resultados finais como a porcentagem média dos sintomas de  $32,3 \pm 15,2$ , atividades  $41,9 \pm 25,6$ , impacto  $13,7 \pm 11,4$  e total de  $24,3 \pm 14,9$ . E também pela escala de mMRC com prevalência para grau 0 (43%), seguido de grau 1 (36%), grau 2 (10%) e 3 (10%) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Características demográficas dos pacientes com 60 dias após alta hospitalar.

Variáveis	N=30	Variáveis	N=30
<b>Gênero F/M</b>	10/20	<b><math>P_{\text{Imax}}</math> (cmH<sub>2</sub>O) (n=26)</b>	$90,1 \pm 31,6$
<b>Idade (anos)</b>	$60,4 \pm 14,4$	<b><math>P_{\text{Emax}}</math> (cmH<sub>2</sub>O) (n=26)</b>	$97,3 \pm 31,0$
<b>Peso (kg)</b>	$89,8 \pm 19,8$	<b>Handgrip (D)</b>	$35,5 \pm 12,4$
<b>Estatura (cm)</b>	$166 \pm 9,5$	<b>Handgrip (E)</b>	$30,7 \pm 11,3$
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	$32,2 \pm 7,04$	<b>Sintomas (%)</b>	$32,3 \pm 15,2$
<b>MME (kg)</b>	$30,7 \pm 7,30$	<b>Atividades (%)</b>	$41,9 \pm 25,6$
<b>MG (kg)</b>	$34,4 \pm 13,7$	<b>Impacto (%)</b>	$13,7 \pm 11,4$
<b>CVF (L) (n=29)</b>	$3,84 \pm 0,97$	<b>Total (%)</b>	$24,3 \pm 14,9$
<b>CVF (%) (n=29)</b>	$96,0 \pm 14,3$	<b>mMRC (score)</b>	0 (0-4)
<b><math>VEF_1</math> (L) (n=29)</b>	$3,11 \pm 0,83$	<b>BDI (score)</b>	$9,5 \pm 2,62$
<b><math>VEF_1</math> (%) (n=29)</b>	$97,9 \pm 15,9$	<b>DP6 (m) (n=24)</b>	$418,2 \pm 130,0$
<b><math>VEF_1/CVF</math> (%) (n=29)</b>	$80,9 \pm 5,81$	<b>SpO<sub>2</sub>(%)</b>	$96,7 \pm 1,45$

A apresentação dos dados de análises dos bioquímicos séricos e gases arteriais está na Tabela 3.

**Tabela 3.** Descritiva dos bioquímicos séricos e gases arteriais.

<b>Variáveis</b>	<b>N=30</b>
<b>G. brancos (<math>\times 10^3/\text{mm}^3</math>)</b>	6,68 $\pm$ 2,05
<b>Dimero-D (ng/mL) (n=15)</b>	503 (172-2221)
<b>PaO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	86,1 $\pm$ 9,62
<b>PaCO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	34,8 $\pm$ 3,87
<b>SaO<sub>2</sub>(%)</b>	96,7 $\pm$ 1,45

Por clusterização hierárquica, identificamos um total de 5.288 compostos e 338 metabólitos nas amostras salivares. Dos 338 metabólitos identificados, a N-Phenul-1-naphthylamina e Cyasterona estavam ausentes nos pacientes com covid longa.

Ademais, encontramos 19 metabólitos com diferença significativa entre o grupo controle e os pacientes covid longa.

## Discussão

O objetivo desse estudo foi avaliar e comparar os metabólitos predominantes da saliva, avaliar as características clínicas e funcionais respiratórias dos pacientes com 60 dias após a alta hospitalar por covid-19.

Através da análise descritiva dos dados, observou-se que quatro pacientes apresentaram necessidade de ventilação mecânica invasiva, e desses, três com necessidade de diálise. Assim, devido à pouca quantidade de pacientes, foi decidido em não correlacionar os achados da metabolômica com as características encontradas no período em que os pacientes estiveram hospitalizados.

Os resultados encontrados no presente estudo foram abordados descritivamente, com resposta ausente independentemente da idade, IMC e composição corporal desses pacientes. Esse foi um dos primeiros estudos que avaliou os pacientes com manifestações da covid longa, com características de um gerador da hipótese de que a metabolômica de saliva identificaria quais metabólitos que, possivelmente, estão modificados em pacientes com 60 dias após a alta hospitalar por infecção aguda de covid-19 em comparação a sujeitos não infectados. Esta característica abre espaços para novas investigações com possíveis elucidações de questionamentos da persistência de sintomas. Contudo, já existem estudos epidemiológicos de covid longa em pacientes com sintomas por mais de seis meses (Davis et al., 2020; Logue et al., 2021)

O conhecimento das alterações dos metabólitos como o triptofano que se apresentou alterado na via da quinurenina, que regula a inflamação e a imunidade em pacientes com covid aguda (Eroglu et al., 2021), de acordo com o objetivo do presente estudo, a avaliação com a metabolômica identificou metabólitos pouco expressos na saliva de pacientes com 60 dias após alta hospitalar por covid-19.

A metabolômica é estrategicamente capaz de identificar metabólitos que se diferenciam na saliva de pacientes com a covid longa. A metabolômica possibilitou encontrar 338 metabólitos, mas apenas 19 metabólitos apresentaram diferença significativa entre os grupos. Dentre os metabólitos que puderam se distinguir entre os grupos, dois deles, N-Fenil-1-naftilamina e Cyasterona, estavam ausentes no grupo de pacientes covid longa. De acordo com a composição de N-Fenil-1-naftilamina, que se trata de um sólido cristalino lipofílico usado como antioxidante encontrado em produtos como borrachas e pneus, optamos em não aprofundar sobre a sua ausência no grupo com covid longa devido a metabolômica salivar.

O metabólito Cyasterona, que também foi ausente nesses pacientes, exerce capacidade antitumoral em câncer de pele, além de exercer citotoxicidade em várias linhas celulares, como ação para aumentar o número de células-tronco mesenquimais, e também como reagente para mobilização e osteogênese, podendo acelerar a cicatrização de fraturas.

Calenduloside E 6'-metil éster é um metabólito encontrado somente no grupo pós-COVID. Representa a família dos triterpenóides do tipo oleanano, possui propriedades anticancerígenas e atividades anti-inflamatórias, além de também serem conhecidos por prevenir o estresse oxidativo, inflamação e hipertensão (Petronelli et al, 2009; Ryu et al., 2000; Yamaguchi et al., 2006). Além disso, Lee et al (2012) concluíram que o éster calendulosido E 6'-metílico induz apoptose e inibe o crescimento tumoral no carcinoma de cólon de camundongo CT-26 em vitro e in vivo.

O Gly Pro Lys, peptídeo responsável por inibir a ACE, estar pouco expresso em pacientes pós-COVID, isso permite a formação de novas ligações de hidrogênio com o seu receptor que tem afinidade com SARS-CoV-2, indicando a deficiência na homeostase cardiovascular que favorece a progressão da doença para a forma mais grave, como a presença de hipertensão cardíaca e, até mesmo, hipertensão pulmonar. Além disso, é compatível com o fato desse metabólito ser pouco expresso em pacientes com COVID-19. De fato, a deficiência relacionada a inibição dessa enzima faz com que a homeostase cardiovascular não aconteça, causando a hipertensão (Norderfeld, et al., 2021).

A gentiobiose é um dos principais componentes de um Gentiooligossacarídeo (GnOS), que é um dos tipos de oligossacarídeo, que foi relatado sobre a resistência à digestão tanto pela bactéria oral comum quanto por enzimas intestinais, tornando conhecido como um açúcar de baixa digestibilidade (Sanz et al., 2005). O GnOS contém ligações glicosídicas que não são fáceis de serem digeridas, o que faz exibir excelentes efeitos prebióticos intestinais.

D-(+)-Turanoose, isômero de sacarose, é um carboidrato dissacarídeo consistido de moléculas de glicose e frutose normalmente presente no mel (Chung, 2017). A turanoose é hidrolisada mais lentamente em glicose e frutose no intestino, o que representa uma alternativa de baixo índice glicêmico (Dahlqvist, 1960).

A creatina (Cr), por sua vez, pouco expressa nos pacientes pós-COVID, é um metabólito derivado de aminoácidos sintetizados no fígado, pâncreas e nos rins como a glicina, arginina e metionina, e que ocorre principalmente nas células musculares, a partir de ingestão de proteínas. Primeiro a aminotransferase sintetiza o guanidinoacetato (GAA) a partir da arginina e glicina. Em seguida, o guanidinoacetato metiltransferase metila GAA para formar a creatina, que é um componente fundamental de fosfato de alta energia, e necessária para o tamponamento,

transporte e regulação da energia celular (Wyss et al., 2000; Braissant et al., 2011; Hanna-El-Daher et al., 2016). A glicina, tanto negativa quanto positivamente, é conhecida por regular o fluxo metabólico e o ciclo de Krebs, respectivamente. É considerada um aminoácido não essencial e é condicionalmente essencial, pois o corpo sintetiza em condições fisiológicas, mas em situações especiais, como processos inflamatórios ou atividade física intensa, sua produção é insuficiente, sendo necessária sua suplementação. Da serina importada, derivada de um ramo da glicólise, fornece unidades de carbono para o metabolismo de um carbono (Braissant et al., 2011; Dunbar et al., 2014; Duran-trio et al., 2021).

No sistema imune, a creatina está envolvida na ativação de células T, que são conhecidas por desempenhar um papel importante na defesa imunológica contra infecções (Biase et al., 2019). Fosforilada em creatina fosfato, a creatina serve como doador de fosfato na conversão de adenosina difosfato (ADP) em adenosina trifosfato (ATP) para fornecer energia necessária para a contração muscular. A hidrólise de ATP ocorre em microcompartimentos funcionais ao redor da célula para liberar energia. Isso é alcançado por uma via de transferência de energia conhecida como transporte de energia creatina quinase/fosfocreatina (CK/PCr). Ou seja, esse evento nada mais é que a sintetização da creatina, transportada pelo transportador de energia CK/PCr. Sendo assim, a via de transporte CK/PCr fornece reposição imediata de ATP por meio de alta energia composta de fosfato. Então, a hidrólise de ATP ocorre no transporte de creatina. Como processo de geração de energia, a creatina é convertida em PCr pela enzima CK, que é usada para fosforilar compostos de adenina, especificamente na conversão de ADP em ATP (Tuner & Gant, 2014).

De fato, a síntese de ATP não ocorre sem a PCr de alta energia, que armazena energia como uma molécula inerte que indiretamente é utilizada com a necessidade de suprir energia das células e tecidos. Entende-se que a creatina é um componente do transporte de energia CK/PCr, que repõe imediatamente ATP. Para promover o ajuste da produção de ATP ao seu consumo, o transporte de elétrons e a síntese de ATP são processos intimamente acoplados, ou seja, ocorre a oxidação somente se houver síntese de ATP, e vice-versa. A PCr contém fonte de alta energia armazenada para ser utilizada quando necessário, principalmente na ausência de oxigênio e glicose, que também são fontes de energia assim como a creatina (Tuner & Gant, 2014).

Dessa forma, ao entender a função do sistema CK/PCr, a PCr é crucial para manter o metabolismo dos neurônios, os quais não apresentam capacidade de armazenar glicogênio, como está disponível no tecido muscular. Ou seja, tais mudanças no ambiente intracelular que podem ocorrer na ausência do sistema CK/PCr, como a falta de creatina, afetam várias proteínas

e enzimas celulares, com uma série de resultados prejudiciais. Resultados que incluem a acidificação local e global das células e a inativação de ATPases celulares (Meyer et al., 1986).

Neste contexto sobre a avaliação dos metabólitos supra-expressos e sub-expressos, a creatina pode ser considerada como um identificador de possível alteração de via metabólica que esteja envolvida nas manifestações clínicas e funcionais persistentes nos pacientes com covid longa. Para avaliar as possibilidades de associações dessas vias metabólicas, a manifestação clínica apresentada pelos pacientes como a dispneia, que pode impactar nas atividades diárias, como demonstram os resultados da presente pesquisa, pode estar relacionada a redução da expressão da creatina, que é um metabólito importante para o armazenamento fornecimento de energia celular, e impacta diretamente na resistência e força muscular. No entanto, esta associação ainda precisa ser aprofundada para que possamos entender o mecanismo relacionado da alteração da via metabólica até a manifestação sintomática.

A síndrome da covid longa pode ocorrer em quatro semanas a 9 meses ou mais semanas após a infecção inicial (Sudre, et al., 2021; Hanson et al., 2022). Uma das condições apresentadas no presente estudo, é o impacto da fadiga nas atividades diárias desses pacientes. Correlacionar possíveis mecanismos envolvidos na manifestação subjetiva de sintomas como a percepção de cansaço e/ou dispneia, condiz com a necessidade de serem melhor definidas nesta população de pacientes, pois a literatura evidencia que a fadiga pode estar presente mesmo em pacientes que apresentem a forma leve da doença. Atualmente, a única recomendação para recuperação do estado geral e redução sintomática é a atividade física ou reabilitação cardiopulmonar/motora para esses pacientes e, ainda assim, apresentam tempo de duração prolongada para recuperação sintomatológica (Pierce et al., 2022).

Em um estudo realizado por Benedetto et al. (2018) avaliou a suplementação de creatina somada a exercícios de reabilitação, os pacientes portadores de DPOC apresentaram melhora no TC6, melhora no índice de dispneia e escore de atividades de vida diárias. Essa questão pode ser estudada como uma estratégia na fase de reabilitação dos pacientes com covid longa.

É importante ressaltar que, possivelmente, as vias metabólicas também possam apresentar as alterações devido a condição alimentar dos pacientes, entretanto não foi possível realizar um histórico alimentar destes pacientes no momento em que foram avaliados.

Assim, por tratar-se de um estudo gerador da hipótese, sugerimos que a presença de fadiga e incapacidade funcional em pacientes com a síndrome pós-COVID-19 possa estar relacionada à baixa expressão do metabólito creatina.



## Referências

- 1- World Health Organization. WHO coronavirus disease (COVID-19) dashboard. Available at: <https://Covid19.who.int/>. Date last accessed: 10 March 2022.
- 2- Huang C, Wang Y and Li X et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; **395**:497-506.
- 3- Romero-Gameros CA, Waizel-Haiat S, Huerrero-Paz JÁ, et al. Diagnostic accuracy of symptoms as a diagnostic tool for SARS-CoV2 infection: a cross-sectional study in a cohort of 2,173 patients. *BMC Infectious Diseases* (2021) 21:255.
- 4- Ranzani, O, Bastos, LSL, Gelli, JGM, et al. Characterization of the first 250 000 hospital admissions for COVID-19 in Brazil: a retrospective analysis of nationwide data. *Lancet Respir Med* 2021; 9:407-18.
- 5- National Institute for Health and Care Excellence. COVID-19 rapid guideline: managing the long-term effects of COVID-19. 2020.
- 6- Levison, ME. (2020). Commentary: What we know so far about post-COVID syndrome. *Merck Manual Consumer Version*.
- 7- Carfi, A, Bernabei, R, Landi, F. Persistent symptoms in patients after acute COVID-19. *JAMA*, 324, 603-605. 10.1001/jama.2020.12603
- 8- Huang, C, Huang, L, Wang, Y, et al. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *Lancet* 2021; 397:220-32.
- 9- Tanni SE, Fabro AT, de Albuquerque A, et al. Pulmonary fibrosis secondary to COVID-19: a narrative review. *Expert Rev Respir Med*. 2021 Apr 27:1-13.
- 10- Chopra V. Sixty-Day Outcomes Among Patients Hospitalized With COVID-19. *Annals of Internal Medicine* (2020)
- 11- Kojima, NTF, Slepnev, V, Bacelar, A, et al. Self-Collected oral fluid and nasal swabs demonstrate comparable sensitivity to clinician collected nasopharyngeal swabs for Covid-19 detection. *medRxiv* 2020.
- 12- Sapkota, D, Soland, TM, Galtung HK, et al. COVID-19 salivary signature: diagnostic and research opportunities. *J Clin Pathol* 2021; **74**:344-349.
- 13- Castro, T, Sabalza, M, Barber, C, et al. Rapid diagnosis of Zika vírus through saliva and urine by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Journal of Oral Microbiology* 2018, vol10, 1510712.
- 14- Braz-Silva, PH, Pallos, D, Giannecchini, S, et al. SARS-CoV-2: What can saliva tell us? *Oral Diseases*. 2020;00:1-2.
- 15- Chen, L, Zhao J, Peng J, et al. Detection of SARS-CoV-2 in saliva and characterization of oral symptoms in COVID-19 patients. *Cell Prolif* 2020;53:e12923.
- 16- Wyllie, AL, Fournier, J, Casanovas-Massana, A, et al. Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs. *medRxiv* 2020.
- 17- Ellinghaus, D, Degenhardt, F, Bujanda, L, et al. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *N. Engl. J. Med*, 2020.
- 18- Schulte-Schrepping, J, Reusch, N, Paclik, D, et al. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment.(2020) *Cell* 182, 1419-1440

- 19- Silvin, A, Chapuis, N, Dunsmore, G, et al. Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. (2020) *Cell* 182, 1401-1418
- 20- Shen, B, Yi, X, Sun, Y, et al. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. (2020) *Cell* 182, 59-72
- 21- Wu C, Chen X, Cai Y, et al. Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. JAMA Intern Med. 2020 Mar 13.
- 22- Sousa TC, Jardim JR, Jones P. Validation of the Saint George Respiratory Questionnaire (SGRQ) in patients with chronic obstructive disease in Brazil. *J Bras Pneumol.*2000; 26:119-25.
- 23- Kovelis, D, Segretti NO, Probst, VS, et al. Validation of the Modified Pulmonary Functional Status and Dyspnea Questionnaire and the Medical Research Council scale for use in Brazilian patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Bras Pneumol.* 2008; 34: 1008-1018.
- 24- Martinez JAB, Padua AI. Dispneia: novos conhecimentos sobre um velho problema. In: Terra Filho M, Fernandes ALG, Stirbulov R. Pneumologia: atualização e reciclagem volume IV. São Paulo: Vivali; 2001. p.1-12.
- 25- American Thoracic Society. ATS/ERS Task Force: Standardization of lung function testing: standardization of spirometry. *Eur Respir J.* 2005; 26:319-38.
- 26- American Thoracic Society Committee on Proficiency Standards for Clinical Pulmonary Function Laboratories. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(1):111-7.
- 27- Vincent, J.L., Moreno, R., Takala, J., et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med* (1996) 22:707-710
- 28- Docherty AB, Harrison EM, Green CA, et al. Features of 20 133 UK patients in hospital with Covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterization Protocol: prospective observational cohort study. *BMJ.* 2020 May 22;369:m1985.
- 29- Moreno RP, Metnitz PG, Almeida E, et al. SAPS 3—from evaluation of the patient to evaluation of the intensive care unit. Part 2: development of a prognostic model for hospital mortality at ICU admission. *Intensive Care Med* 31 (10): 1345-1355.
- 30- Wang H, Wang D, Dzung R. Carcinogenicity of N-Phenyl-1-2-naphthylamine and N-Phenyl-1-naphthylamine in mice. (1984) *Cancer Res* 44:3098-3101.
- 31- Petronelli A, Pannitteri G and Testa Ugo. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anti-Cancer Drugs* 2009, 20;880-892
- 32- Yamaguchi Y, Yamada K, Yoshikawa N et al. Corosolic acid prevents oxidative stress, inflammation and hypertension in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sciences* 79 (2006) 2474-2479
- 33- Lee B, Lee DY, Yoo KH et al. Calenduloside E6'-methyl ester induces apoptosis in CT-mouse colon carcinoma cells and inhibits tumor growth in a CT-26 xenograft animal model. *Oncology Letters* 4: 22-28, 2012

- 34- Franks AH, Harmsen HJM, Raangs GC, et al. Variations of bacterial populations in human faeces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. (1998) *Appl Environ Microbiol* **64**: 3336-3354.
- 35- Gibson GR & Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* **125**: 1401-1412
- 36- Chung J, Kim Y, Kim Y et al. Regulation of inflammation by sucrose isomer, turanose, in raw 264.7 cells. *J Cancer Prev* 2017;22:195-201
- 37- Duran-Trio, LG. Fernandes-Pires, D. Simicic, J. Grosse, C. Roux-Petronelli, S. J. Bruce, P.A. Binz, C. Sandi, C. Cudalbu, O. Braissant, A new rat model of creatine transporter deficiency reveals behavioral disorder and altered brain metabolism, *Sci. Rep.* 11 (2021) 1636
- 38- Di Biase S, X. Ma, X. Wang, J. et al. Creatine uptake regulates CD8 T cell antitumor immunity, *J. Exp. Med.* 216 (2019) 2869–2882
- 39- Pierce JD, Shen Q, Cintron SA, Hiebert JB. Post-COVID-19 Syndrome. *Nursing Research*, March/April 2022, Vol, No 2, 164-174.
- 40- Benedetto F, Pastorelli R, Ferrario M, et al. Supplementation with Qter and Creatine improves functional performance in COPD patients on long term oxygen therapy. *Respiratory Medicine* 142 (2018) 86-93.

## ANEXO I

### Termo de consentimento livre e esclarecido

Título da pesquisa

#### **AValiação da Análise Metabólica Após 60 Dias nos Pacientes que foram Hospitalizados por Infecção de Coronavírus (COVID-19)**

Dentro da pandemia mundial do coronavírus no Brasil, ter o conhecimento sobre quais são as pessoas acometidas e o como foram suas hospitalizações, é importante saber para que se previna no futuro. O objetivo deste estudo será avaliar a via metabólica e sua função cardiopulmonar, de imagem, clínicas e laboratoriais nos pacientes que foram hospitalizados com diagnóstico de infecção de COVID-19. O(A) Senhor(a) é portador(a) desta doença e que foi hospitalizado para receber o melhor tratamento para o controle e resolução da causa. Caso o (a) Senhor(a) não tenha tido infecção por COVID-19, estará sendo convidado a ser participante para coletar apenas a amostra de saliva para análise metabólica.

Os seus dados demográficos como idade, sexo, profissão, escolaridade, estado civil, estado de residência serão coletados. Assim como, informações anotadas sobre a presença dos sintomas associados à esta doença, os remédios que o(a) Senhor(a) utilizaram para melhora do quadro, sobre as outras possíveis doenças que o Senhor(a) possui e quais são os remédios que usa todos os dias. Informações do seu exame físico (oxigenação do sangue, pressão arterial, frequência respiratória e cardíaca, temperatura), exames de sangue que colher durante sua hospitalização (hemograma, função renal, função do fígado, dímero-D, marcadores de inflamação, gasometria arterial) serão anotados de acordo com dados do seu prontuário. Após a alta hospitalar O (A) Sr(a) será com avaliação clínica e funcional, no qual inclui exame médico, de função pulmonar, gasometria arterial e de função renal. Terá também amostra da saliva coletada para avaliação metabólica. O (A) Sr(a) também realizará uma tomografia de tórax como acompanhamento após a alta hospitalar e será utilizado no estudo. Este estudo pode causar desconforto ou risco mínimo, pois estaremos realizando radiação para realização de tomografia de tórax e pode sentir cansaço respiratório para realizar a avaliação pulmonar. Poderá sentir um pouco de dor devido a coleta de gasometria arterial, mas será realizado por profissional capacitado. O benefício do Sr(a) participar neste estudo é para os profissionais de saúde terem mais conhecimento sobre a sua doença e melhor atender os demais que possam ficar doentes pela mesma doença.

Até este momento, não possuímos tratamentos alternativos para as sequelas que a doença que o Sr(a) apresenta e também não possuímos dados da população brasileira. Caso necessário, o Sr(a) terá garantido o direito à assistência integral e gratuita, devido a danos decorrentes da participação na pesquisa e pelo tempo que for necessário. O Sr(a) têm o direito de buscar indenizações diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa. Suas informações e dados pessoais serão utilizados apenas em reuniões de caráter científico e serão mantidos em sigilo profissional.

Qualquer dúvida em relação ao estudo será imediatamente esclarecida e o(a) Senhor(a) estará livre para retirar seu consentimento e desistir de participar do estudo, em qualquer momento, sem interferência no tratamento que recebe na instituição.

Ao entrar nesse estudo, sua identidade não será revelada.

Eu \_\_\_\_\_ entendo o que foi descrito acima e dou meu consentimento para ser incluído neste estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

Eu declaro que expliquei ao participante acima a natureza e os motivos, objetivos e métodos da pesquisa, os prováveis benefícios e possíveis riscos com a participação neste estudo. Este documento será elaborado em 02 vias, sendo uma entregue ao participante e outra será mantida em arquivo.

---

Assinatura do pesquisador

Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através dos fones: (14) 3880-1608/3880-1609. Endereço: Faculdade de Medicina de Botucatu- Universidade Estadual Paulista – UNESP – Chácara Butgnolli s/nº - Rubião Júnior -Botucatu- SP – CEP 18.618.970

**Qualidade de vida**  
**Questionário do Hospital Saint George na Doença Respiratória (SGRQ)**

**Parte 1**

Nas questões abaixo assinale aquela que melhor identifica seus problemas respiratórios no último ano.

Obs: Assinale um só quadro para as questões de 1 a 8.

	Maioria dos dias da semana (5-7 dias)	Vários dias da semana (2-4 dias)	Alguns dias no mês	Só com infecções respiratórias	Nunca
1. Durante o último ano tive tosse	( ) 80,6	( ) 63,2	( ) 29,3	( ) 28,1	( ) 0
2. Durante o último ano tive catarro	( ) 76,8	( ) 60,0	( ) 34,0	( ) 30,2	( ) 0
3. Durante o último ano tive falta de ar	( ) 87,2	( ) 71,4	( ) 43,7	( ) 35,7	( ) 0
4. Durante o último ano tive "chiado no peito"	( ) 86,2	( ) 71,0	( ) 45,6	( ) 36,4	( ) 0

5. Durante o último ano, quantas crises graves de problemas respiratórios você teve:

Mais de 3	3	2	1	
( )	( )	( )	( )	
86,7	73,5	60,3	44,2	

6. Quanto tempo durou a pior dessas crises?  
(passe para pergunta 7 se não teve crises graves)

1 semana ou mais	3 ou mais dias	1 ou 2 dias	Menos de 1 dias
( )	( )	( )	( )
89,7	73,5	58,8	41,9

7. Durante o último ano, em uma semana considerada como habitual, quantos dias bons (com poucos problemas respiratórios) você teve:

Nenhum dia	1 ou 2 dias	3 ou 4 dias	Quase todos os dias	Todos os dias
( ) 93,3	( ) 76,6	( ) 61,5	( ) 15,4	( ) 0

8. No caso de ter tido “chiado no peito”, ela é pior de manhã?

Não	Sim
( ) 0	( ) 62,0

## Parte 2

### Seção 1

A) Assinale um só quadrado para descrever sua doença respiratória:

É o meu maior problema	Causa-me muitos problemas	Causa-me alguns problemas	Não me p
( ) 83,2	( ) 82,5	( ) 34,6	

B) Em relação ao seu trabalho, assinale um dos quadrados:  
(passe para a Seção 2, se você não trabalha)

Minha doença respiratória obrigou-me a parar de trabalhar	( ) 88,9
Minha doença respiratória interfere com o meu trabalho normal ou já me obrigou a mudar de trabalho	( ) 77,6
Minha doença respiratória não afeta meu trabalho	( ) 0

### Seção 2

As respostas abaixo se referem às atividades que podem provocar falta de ar.

A) Assinale com um “x” no quadrado de cada questão abaixo, indicando a resposta Sim ou Não, de acordo com o seu caso atualmente:

	Sim	Não
Sentado ou deitado	( ) 90,6	( ) 0
Tomando banho ou vestindo-se	( ) 82,8	( ) 0

Caminhando dentro de casa	( ) 80,2	( ) 0
Caminhando em terreno plano	( ) 81,4	( ) 0
Subindo um lance de escada	( ) 76,1	( ) 0
Subindo ladeiras	( ) 75,1	( ) 0
Praticando esportes ou jogos que impliquem esforço físico	( ) 72,1	( ) 0

### Seção 3

- A) Assinale com um “x” no quadrado de cada questão abaixo, indicando a resposta Sim ou Não, para definir o estado de sua tosse e falta de ar atualmente:

	Sim	Não
Minha tosse causa-me dor	( ) 81,1	( ) 0
Minha tosse deixa-me cansado	( ) 79,1	( ) 0
Falta-me o ar quando falo	( ) 84,5	( ) 0
Falta-me o ar quando dobro o corpo para frente	( ) 76,8	( ) 0
Minha tosse ou falta de ar perturba o meu sono	( ) 87,9	( ) 0
Fico exausto com facilidade	( ) 84,0	( ) 0

### Seção 4

- A) Assinale com um “x” no quadrado de cada questão abaixo, indicando a resposta Sim ou Não, para definir o efeito que a doença respiratória tem sobre você:

	Sim	Não
Minha tosse ou falta de ar deixam-me envergonhado em publico	( ) 74,1	( ) 0
Minha doença respiratória é inconveniente para minha família, amigos ou vizinhos	( ) 79,1	( ) 0
Tenho medo ou mesmo pânico quando não consigo respirar	( ) 87,7	( ) 0
Sinto que minha doença respiratória escapa ao meu controle	( ) 90,1	( ) 0
Eu não espero nenhuma melhora da minha doença respiratória	( ) 82,3	( ) 0
Minha doença debilitou-me física e mentalmente, o que faz com que eu precise de ajuda de alguém	( ) 89,9	( ) 0
Parece-me perigoso fazer exercício	( ) 75,7	( ) 0



Tudo o que faço parece ser demais para minha capacidade	( ) 84,5	( ) 0
---	----------	-------

### Seção 5

A) Assinale com um “x” no quadrado de cada questão abaixo, indicando a resposta Sim ou Não, para definir os efeitos da medicação na sua doença respiratória: (passe para a se Seção 6 se não toma medicamentos)

	Sim	Não
Minha medicação não está me ajudando muito	( ) 88,2	( ) 0
Fico envergonhado ao tomar medicamentos em público	( ) 53,9	( ) 0
Minha medicação provoca-me efeitos colaterais desagradáveis	( ) 81,1	( ) 0
Minha medicação interfere muito com o meu dia a dia	( ) 70,3	( ) 0

### Seção 6

A) Assinale com um “x” no quadrado de cada questão abaixo, indicando a resposta Sim ou Não para indicar as atividades que podem ser afetadas pela sua respiração:

	Sim	Não
Levo muito tempo para lavar-me ou vestir-me	( ) 74,2	( ) 0
Demoro muito tempo ou não consigo tomar banho de chuveiro ou na banheira	( ) 81,0	( ) 0
Ando mais devagar que as outras pessoas, ou tenho que parar descansar	( ) 71,7	( ) 0
Demoro muito tempo para realizar as tarefas como o trabalho de casa, ou tenho que parar para descansar	( ) 70,6	( ) 0
Quando subo um lance de escada, vou muito devagar, ou tenho que parar para descansar.	( ) 71,6	( ) 0

Se estou apressado ou caminho mais depressa, tenho que parar descansar ou ir mais devagar	( ) 72,3	( ) 0
Por causa da minha respiração, tenho dificuldade para desenvolver atividades como: subir ladeiras, carregar objetos subindo escadas, dançar, praticar esporte leve	( ) 74,5	( ) 0
Por causa da minha respiração, tenho dificuldades para desenvolver atividades como: carregar grandes pesos, fazer "cooper" ou nadar	( ) 71,4	( ) 0
Por causa da minha respiração, tenho dificuldade para desenvolver atividades como: trabalho manual pesado, correr, andar de bicicleta, nadar rápido ou praticar esportes de competição.	( ) 63,5	( ) 0

### Seção 7

**A)** Assinale com um "x" no quadrado de cada questão abaixo, indicando a resposta Sim ou Não, para indicar outras atividades que geralmente podem ser afetadas pela sua doença respiratória:

	Sim	Não
Praticar esportes ou jogos que impliquem esforço físico	( ) 64,8	( ) 0
Sair de casa para me divertir	( ) 79,8	( ) 0
Sair de casa para fazer compras	( ) 81,0	( ) 0
Fazer o trabalho da casa	( ) 79,1	( ) 0
Sair da cama ou da cadeira	( ) 94,0	( ) 0

**B)** A lista seguinte descreve uma série de outras atividades que o seu problema respiratório pode impedir você de realizar.

- |  |
|--|
| - Dar passeios a pé ou passear com o seu cão |
| - Fazer o trabalho doméstico ou jardinagem   |

- Ter relações sexuais

- Ir à igreja, bar ou a locais de diversão

- Sair com mau tempo ou permanecer em locais com fumaça de cigarro

- Visitar a família e os amigos ou brincar com as crianças

Por favor, escreva qualquer outra atividade importante que seu problema respiratório pode impedi-lo de fazer.

---



---



---



---



---

Das questões abaixo relacionadas, assinale somente aquela que melhor define a forma como você é afetado pela sua doença respiratória:

Não me impede de fazer nenhuma das coisas que eu gostaria de fazer	( ) 0
Impede-me de fazer uma ou duas coisas que eu gostaria de fazer	( ) 42,0
Impede-me de fazer a maioria das coisas que eu gostaria de fazer	( ) 84,2
Impede-me de fazer tudo o que eu gostaria de fazer	( ) 96,7

**Each component of the questionnaire is scored separately in three steps:**

- i. The weights for all items with a positive responses are summed.
- ii. The weights for missed items are deducted from the maximum possible weight for each component. The weights for all missed items are deducted from the maximum possible weight for the Total score.
- iii. The score is calculated by dividing the summed weights by the adjusted maximum possible weight for that component and expressing the result as a percentage :

$$\text{Score} = 100 \times \frac{\text{Summed weights from positive items in that component}}{\text{Sum of weights for all items in that component}}$$

**The Total score is calculated in similar way:**

$$\text{Score} = 100 \times \frac{\text{Summed weights from positive items in the questionnaire}}{\text{Sum of weights for all items in the questionnaire}}$$

Sum of weights for all items in the questionnaire

**Sum of maximum possible weights for each component and Total:**

Symptoms	662.5
Activity	1209.1
Impacts	2117.8
Total	3989.4

**Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão (HAD)**

- 1)** Eu me sinto tensa (o) ou contraída (o):
  - 3- A maior parte do tempo
  - 2- Boa parte do tempo
  - 1- De vez em quando
  - 0- Nunca
  
- 2)** Eu ainda sinto gosto pelas mesmas coisas que antes:
  - 0- Sim, do mesmo jeito que antes
  - 1- Não tanto quanto antes
  - 2- Só um pouco
  - 3- Já não consigo ter prazer em nada
  
- 3)** Eu sinto uma especie de medo, como se alguma coisa ruim fosse acontecer.
  - 3- Sim, e de jeito muito forte
  - 2- Sim, mas não tão forte
  - 1- Um pouco, mas isso não me preocupa
  - 0- Não sinto nada disso
  
- 4)** Dou risada e me divirto quando vejo coisas engraçadas:
  - 0- Do mesmo jeito que antes
  - 1- Atualmente um pouco menos
  - 2- Atualmente bem menos
  - 3- Não consigo mais
  
- 5)** Estou com a cabeça cheia de preocupações:
  - 3- A maior parte do tempo
  - 2- Boa parte do tempo
  - 1- De vez em quando
  - 0- Raramente
  
- 6)** Eu me sinto alegre:
  - 3- Nunca
  - 2- Poucas vezes
  - 1- Muitas vezes
  - 0- A maior parte do tempo
  
- 7)** Consigo ficar sentado à vontade e me sentir relaxado:
  - 0- Sim, quase sempre
  - 1- Muitas vezes

2- Poucas vezes

3- Nunca

**8)** Eu estou lenta(o) para pensar e fazer alguma coisa:

3- Quase sempre

2- Muitas vezes

1- De vez em quando

0- Nunca

**9)** Eu tenho uma sensação ruim de medo, como um frio na barriga ou um aperto no estomago:

0- Nunca

1- De vez em quando

2- Muitas vezes

3- Quase sempre

**10)** Eu perdi o interesse em cuidar da minha aparência:

3- Completamente

2- Não estou mais me cuidando como eu deveria

1- Talvez não tanto quanto antes

0- Me cuido do mesmo jeito que antes

**11)** Eu me sinto inquieta(o), como se eu não pudesse ficar parada(o) em lugar nenhum:

3- Sim, demais

2- Bastante

1- Um pouco

0- Não me sinto assim

**12)** Fico animada(o) esperando animado as coisas boas que estão por vir:

0- Do mesmo jeito que antes

1- Um pouco menos que antes

2- Bem menos do que antes

3- Quase nunca

**13)** De repente, tenho a sensação de entrar em pânico:

3- A quase todo momento

2- Várias vezes

1- De vez em quando

0- Não senti isso

**14)** Consigo sentir prazer quando assisto um bom programa de televisão, de rádio, ou quando leio alguma coisa:

0- Quase sempre

1- Várias vezes

2- Poucas vezes

3- Quase nunca

**\*Pontuação Ansiedade: ( ) \*Pontuação Depressão: ( )**

**\*Alerta se >12 – verificar doenças de saúde mental**

**Baseline Dyspnea Index - BDI****1. Incapacidade Funcional**

Grau 4 Nenhuma incapacidade: Capaz de realizar atividades usuais do (cotidiano) e ocupações sem falta de ar.

Grau 3 Incapacidade discreta: Prejuízo em pelo menos uma atividade, mas nenhuma atividade completamente abandonada. Redução das atividades no trabalho ou nas atividades usuais (do cotidiano) que parece leve ou não claramente causada pela falta de ar.

Grau 2 Incapacidade moderada: O paciente trocou de atividade no trabalho e/ou pelo menos uma atividade do cotidiando pela falta de ar.

Grau 1 Incapacidade acentuada: Paciente incapaz de trabalhar e ou abandonou a maioria ou todas as atividades costumeiras pela falta de ar.

Grau 0 Incapacidade muito acentuada: Incapaz de trabalhar e abandonou a maioria ou todas as atividades habituais pela falta de ar.

W Quantidade incerta: O paciente tem incapacidade devido à dispneia, mas a intensidade não pode ser especificada. Os detalhes disponíveis não são suficientes para que a incapacidade seja categorizada.

X Desconhecido: Informação não disponível sobre dispneia e incapacidade

Y Incapacidade por outras causas que não a dispneia: Por exemplo, problemas neuromusculares ou dor torácica.

**2. Magnitude de Tarefa**

Grau 4 Extraordinária: Tem falta de ar apenas com atividades extraordinárias, tais como carregar cargas muito pesadas no plano, cargas mais leves ao subir ladeiras ou escadas, ou correndo. Nenhuma falta de ar com atividades ordinárias

Grau 3 Maior: Tem falta de ar com atividades maiores como subindo ladeira forte, mais de três lances de escadas, ou carregando carga moderada no plano.

Grau 2 Moderada: Tem falta de ar com atividades moderadas tais como subir uma ladeira suave, menos de três lances de escadas ou carregando uma carga leve no plano.

Grau 1 Leve: Tem falta de ar com atividades leves tais como andando no plano, tomando banho, permanecendo em pé ou fazendo compras.

Grau 0 Nenhuma tarefa: Falta de ar em repouso, enquanto sentado ou deitado.

W Quantidade incerta: A capacidade do paciente realizar tarefas está prejudicada devido à dispneia, mas a intensidade não pode ser especificada. Os detalhes não são suficientes para a incapacidade de ser categorizada.

X Desconhecido: Ausência da informação disponível relacionada à intensidade da tarefa



( ) Y Incapacidade por outras razões: Por exemplo, doenças neuromusculares ou dor torácica.

### 3. Magnitude do Esforço

( ) Grau 4 Extraordinário: Tem falta de ar com o maior esforço imaginável. Sem falta de ar com esforços ordinários

( ) Grau 3 Maior: Tem falta de ar com esforço distintamente submáximo, mas de proporção maior. Tarefas realizadas sem pausa, a menos que requeiram esforço extraordinário.

( ) Grau 2 Moderado: Falta de ar com esforço moderado. Tarefas realizadas com pausas ocasionais e precisando de mais tempo do que as pessoas normais

( ) Grau 1 Leve: Tem falta de ar com pouco esforço. Tarefas realizadas com muito esforço ou tarefas mais difíceis realizadas com pausas frequentes, requerendo um tempo 50 a 100% maior do que uma pessoa média.

( ) Grau 0 Nenhum esforço: Falta de ar em repouso, enquanto sentado ou deitado.

( ) W Quantidade incerta: A capacidade de se exercitar do paciente está prejudicada devido à dispneia, mas a intensidade não pode ser especificada

( ) X Desconhecido: Ausência da informação disponível relacionada à intensidade do esforço

( ) Y Incapacidade por outras razões: Por exemplo, doenças neuromusculares ou dor torácica.

**Pontuação Final:** ( )