



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

PEDRO HENRIQUE DE SOUSA PALMEIRA

AValiação de Linfócitos T Reguladores em Pacientes
Convalescentes da COVID-19

JOÃO PESSOA - PB

2022

PEDRO HENRIQUE DE SOUSA PALMEIRA

**AVALIAÇÃO DE LINFÓCITOS T REGULADORES EM PACIENTES
CONVALESCENTES DA COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal da Paraíba como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatjana Keesen de Souza Lima

Co-orientadora: Dr^a. Bárbara Guimarães Csordas Cabral

JOÃO PESSOA - PB

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



Ata da Sessão de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Associada Universidade Federal da Paraíba, realizada em 30 de setembro de 2022.

Na data de trinta de setembro do ano de dois mil e vinte e dois às 09h (horário local), foi realizada remotamente através da plataforma Google Meet, a defesa pública da Dissertação de Mestrado do(a) discente **Pedro Henrique de Sousa Palmeira**. O trabalho tem como título "AVALIAÇÃO DE LINFÓCITOS T REGULADORES EM PACIENTES CONVALESCENTES DA COVID-19." A banca examinadora foi constituída pelo(a) orientador(a) Prof.^a Dr.^a Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente na qualidade de presidente da banca, pelo 1º examinador (examinador interno) Prof.^a Dr.^a Sandra Rodrigues Mascarenhas (UFPB) e pelo 2º examinador (examinador externo) Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida (UNIFAL). Após a apresentação pública do trabalho, iniciou-se a arguição do(a) candidato(a) por cada membro da banca examinadora, tendo o(a) candidato(a) o mesmo tempo para responder a cada questionamento. Na sequência, a banca examinadora se reuniu em caráter sigiloso e considerou o(a) candidato(a) APROVADO(A). De acordo com o Artigo 98 §1 §2 da Resolução 35/2019 do CONSEPE, o(a) discente terá até 60 (sessenta) dias, a partir da presente data, para fazer as correções solicitadas pela banca examinadora e entregar as cópias corrigidas da dissertação à Biblioteca Central da UFPB e à secretaria deste programa, contendo obrigatoriamente a ficha catalográfica fornecida pela Biblioteca Central da UFPB.

Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

Prof.^a Dr.^a Tatjana Keesen de S. L. Clemente

Leonardo Augusto de Almeida

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida

sandra rodrigues mascarenhas

Prof.^a Dr.^a Sandra Rodrigues

Mascarenhas

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P172a Palmeira, Pedro Henrique de Sousa.

Avaliação de linfócitos T reguladores em pacientes
convalescentes da COVID-19 / Pedro Henrique de Sousa
Palmeira. - João Pessoa, 2022.

118 f. : il.

Orientação: Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente.

Coorientação: Bárbara Guimarães Csordas Cabral.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBiotec.

1. Coronavírus - SARS-CoV-2. 2. Covid-19. 3. Células
T Reguladoras. 4. Imunomodulação. I. Clemente, Tatjana
Keesen de Souza Lima. II. Cabral, Bárbara Guimarães
Csordas. III. Título.

UFPB/BC

CDU 578.834(043)

AGRADECIMENTOS

Agradeço este trabalho primeiramente a Deus por me conceder sabedoria e coragem para realizar, junto com os meus amigos e colegas de laboratório, os experimentos que revelaram os dados aqui expostos.

Um profundo agradecimento a todos os voluntários que, mesmo diante de todas as adversidades enfrentadas durante esse período pandêmico, cederam um pouco do seu tempo para contribuir com essa pesquisa.

Trago a minha profunda gratidão aos meus pais e irmãos que foram fundamentais durante todos os momentos do mestrado: por me ajudarem a manter a calma e acreditarem em mim mesmo quando eu não acreditei; por me darem forças para enfrentar os momentos desafiadores; por suportarem meus momentos de stress e me ajudarem a enxergar as situações de um outro ângulo; por sempre me fazerem enxergar que tudo poderia ter uma solução; e por fim, por serem compreensivos em todos os momentos que me fiz ausente ou estive mais introspectivo.

Não poderia deixar de agradecer a tantos familiares que de maneira direta e indireta ajudaram a mim e a minha família durante esses anos de mestrado (mas não apenas). Não queria citar nomes para não cair em injustiças, mas seria injusto da minha parte não citar minha tia Lourdes e família. Obrigado tia, por todo o apoio que a senhora nos deu (uso o plural pois sei que falo em nome de minha família). Quero que saiba que a senhora é uma das pessoas mais incríveis que eu conheço e que serei eternamente grato por todo o apoio.

Agradeço aos meus amigos de graduação conhecidos como sextetoscópio: Emmely, Lua, Amanda, Anchieta e Rodrigo. Obrigado pelas saídas, conselhos e risadas. Também não posso deixar de mencionar Natan e Ray. Que nossa amizade perdure por muito tempo.

Não poderia finalizar os agradecimentos sem mencionar a família LABIDIC. Primeiramente a minha orientadora Tatjana (Tat) que foi e é a minha mãe científica desde o início da minha graduação. Aquela que me deu tantas oportunidades, me ajudou, me aconselhou e buscava entender nossas dificuldades. Aquela que acerta em escolher as melhores pessoas para compor um grupo de pesquisa. E aquela que foi a responsável pela minha paixão pelo campo da imunologia das doenças infecciosas. Obrigado por tudo, Tat! Espero um dia retribuir toda a ajuda.

As minhas amigas e amigos de laboratório que já passaram e que ainda estão comigo nessa caminhada acadêmica. Em especial, gostaria de citar Fany e Nanda. Vocês foram essenciais durante tantos momentos. Demos boas risadas (inclusive de nossos desesperos). Compartilhamos conhecimentos, momentos, conselhos. Obrigado por me aguentarem por tanto

tempo. Desejo um futuro brilhante a todos nós. E conhecendo vocês, tenho plena certeza de que o alcançarei.

Gostaria de explicitar minha gratidão a minha co-orientadora Bárbara que foi essencial para o sucesso dos trabalhos realizados. Muito obrigado por nos incentivar, nos ajudar diante de nossas inseguranças e por compartilhar seus conhecimentos conosco. Pude observar seu comprometimento com a pesquisa. Tens muito a contribuir com a comunidade científica assim como tenho plena convicção de seu sucesso profissional.

Finalizo os meus agradecimentos a todos os profissionais da UFPB em especial dona Mônica, seu Wanderley, seu Chico e seu Wellington. Sou extremamente grato por toda a ajuda na organização do ambiente de trabalho durante tantos momentos que não apenas o período pandêmico. Que Deus os abençoe com muita saúde, coragem, fé, paz e amor!

Finalizo essa seção deixando registrado a felicidade que está presente em meu coração nesse momento. A palavra que se destaca em minha mente é: OBRIGADO!

Dedico este trabalho a DEUS, aos meus pais e irmãos por sempre me tranquilizarem e acreditarem em mim quando eu mesmo não acreditei.

RESUMO

A infecção ocasionada pelo Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), responsável pela Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19), provoca uma gama de manifestações clínicas que podem levar ao óbito. Embora diversos estudos demonstrem a importância da participação do sistema imune do hospedeiro no desenvolvimento dos distintos perfis clínicos, muitos questionamentos ainda permanecem. No presente estudo, análises comparativas em células T Reguladoras (Treg) de voluntários não previamente infectados com SARS-CoV-2 (CTL) e aqueles que se recuperaram das formas leve (Leve Recuperado) e grave (Grave Recuperado) da COVID-19 foram realizadas. Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC) de voluntários foram coletadas e estimuladas com peptídeos relacionados ao SARS-CoV-2 (Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2) ou Staphylococcal enterotoxin B (SEB). Mediante ensaio de citometria de fluxo, foram relatados, no grupo Leve Recuperado, níveis mais elevados de Tregs bem como da expressão de IL-10, IL-17, perforina, granzima B, PD-1 e coexpressão CD39⁺CD73⁺ pelas células estudadas em comparação com grupos Grave Recuperado e/ou CTL em alguns estímulos relacionados ao SARS-CoV-2. Além disso, PBMCs do grupo Leve Recuperado não estimuladas também apresentaram maior frequência de Tregs e expressão de IL-10 e granzima B, comparado ao CTL, sugerindo alterações imunológicas de longa duração após resolução da doença. Comparado ao estímulo Pool CoV-2, Pool Spike CoV-2 reduziu a expressão de IL-10, enquanto melhorou a expressão de PD-1 pelas Tregs de voluntários Leve Recuperado. Curiosamente, Pool Spike CoV-2 provocou uma diminuição na frequência Tregs IL-17⁺ no grupo Grave Recuperado. No grupo CTL, por sua vez, a expressão de LAP e a coexpressão de grânulos citotóxicos perforina⁺granzima B⁺ pelas Treg foram maiores em amostras estimuladas com Pool CoV-2 sugerindo uma reatividade cruzada. No presente estudo também foram realizadas análises comparativas dos dados imunológicos entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não alguns sintomas durante a fase aguda da COVID-19. Os principais dados revelam que o estímulo Pool Spike CoV-2 provocou um padrão de redução na frequência de Tregs IL-10⁺ e Tregs CTLA-4⁺ em PBMC de voluntários, que não experimentaram alguns sintomas. Em conjunto, níveis mais elevados de perforina e da coexpressão perforina⁺granzima B⁺ pelas células T Reguladoras foram encontrados em voluntários Leve Recuperado, que desenvolveram dispneia. Finalmente, foram observadas expressão diferencial das ectonucleotidases CD39 e CD73 em Tregs de voluntários Leve Recuperado, que se queixaram de dores musculoesqueléticas. Em resumo, o estudo sugere que mudanças nas ferramentas de imunossupressão dos linfócitos T Reguladores poderiam influenciar o desenvolvimento dos distintos perfis clínicos associados à COVID-19. Considerando os dados comparativos do grupo Leve Recuperado, o presente trabalho revelou possíveis modulações a nível de Treg que poderiam auxiliar no estabelecimento de formas mais leves da doença possuindo, assim, grande potencial para contribuir com os esforços científicos na compreensão do sistema imune durante a COVID-19.

Palavras-Chave: Células T Reguladoras; COVID-19; Imunomodulação; SARS-CoV-2

ABSTRACT

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), the causative agent of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), causes a range of clinical symptoms that can lead to death. Although several studies have demonstrated the pivotal role of the host immune system in the development of distinct clinical profiles, many questions still remain. In the present study, comparative analyses in Regulatory T cells (Treg) of the volunteers not previously infected with SARS-CoV-2 (HC) and volunteers who recovered from mild (Mild Recovered) and severe (Severe Recovered) COVID-19 were performed. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) from enrolled volunteers were stimulated with SARS-CoV-2 related peptides (Pool Spike CoV-2 and Pool CoV-2) or Staphylococcal enterotoxin B (SEB). Using a multicolor flow cytometric assay were reported higher levels of Treg frequency and expression of IL-10, IL-17, perforin, granzyme B, PD-1, and CD39⁺CD73⁺ coexpression by studied lymphocytes in Mild Recovered compared to Severe Recovered and/or HC groups in some SARS-CoV-2 related stimulus. Moreover, Mild Recovered unstimulated PBMCs also presented more frequency of Tregs and expression of IL-10 and granzyme B than HC, suggesting long-term immunomodulation after disease resolution. Compared to Pool CoV-2 stimuli, Pool Spike CoV-2 reduced the IL-10 while improving PD-1 expression by Tregs from Mild Recovered volunteers. Curiously, Pool Spike CoV-2 elicited a decrease in Tregs IL-17⁺ frequency in Severe Recovered. In HC, the expression of LAP and cytotoxic granules coexpression by Treg were higher in Pool CoV-2 stimulated samples suggesting an immunological cross-reactivity. In the present study, comparative analyses of the immunological data between Mild Recovered volunteers who experienced or did not experience some symptoms during the acute phase of COVID-19 were also performed. The main results showed that Pool Spike CoV-2 stimulus elicited a decreased pattern of Tregs IL-10⁺ and Tregs CTLA-4⁺ frequency in PBMC from volunteers who did not develop some symptoms. Moreover, higher levels of perforin and perforin⁺granzyme B⁺ coexpression by regulatory T cells were found in Mild Recovered volunteers who experienced dyspnea. Finally, were observed differential expressions of the ectonucleotidases CD39 and CD73 in Tregs between Mild Recovered volunteers that experienced musculoskeletal pain. Collectively, this study suggests that changes in immunosuppressive tools of Tregs could influence the development of a distinct COVID-19 clinical profile. Considering the comparative data of the Mild Recovered group, this work revealed a possible modulation at the Treg level that could help in the establishment of mild disease, thus having a great potential to contribute to the scientific efforts in understanding COVID-19 immunity.

Keywords: Regulatory T cells; COVID-19; Immunomodulation; SARS-CoV-2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Linha do tempo acerca dos principais eventos iniciais associados a pandemia provocada pelo SARS-CoV-2.	25
Figura 2. Estrutura do SARS-CoV-2.....	29
Figura 3. Formas de transmissão do SARS-CoV-2.....	31
Figura 4. Sinais e sintomas da COVID-19.	32
Figura 5. Estratégia de análise para a seleção de linfócitos T Reguladores.	50
Figura 6. Estratégia de análise para a seleção de linfócitos T Reguladores expressando os marcadores de interesse.	51
Figura 7. Resumo do protocolo de citometria de fluxo e das análises realizadas nos grupos inseridos no estudo.	53
Figura 8. Dados demográficos – (A) idade - e clínicos – (B) Duração de sintomas, (C) Tempo de coleta de amostras e (D) Prevalência de sintomas.	56
Figura 9. Frequência de linfócitos T Reguladores em sangue periférico de voluntários.	59
Figura 10. Frequência de linfócitos T Reguladores expressando IL-10, IL-17 e LAP em sangue periférico de voluntários.	61
Figura 11. Frequência de linfócitos T Reguladores expressando perforina e granzima B em sangue periférico de voluntários.	63
Figura 12. Frequência de linfócitos T Reguladores expressando PD-1 e CTLA-4 em sangue periférico de voluntários.	64
Figura 13. Frequência de linfócitos T Reguladores expressando CD39 e CD73 em sangue periférico de voluntários.	66
Figura 14. Comparação da frequência de linfócitos T Reguladores expressando IL-10, IL-17 e LAP entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não certos sintomas.	68
Figura 15. Comparação da frequência de linfócitos T Reguladores expressando perforina e granzima B entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não certos sintomas.	70
Figura 16. Comparação da frequência de linfócitos T Reguladores expressando CTLA-4 e PD-1 entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não certos sintomas.	72
Figura 17. Comparação da frequência de linfócitos T Reguladores expressando CD39 e CD73 entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não certos sintomas.	74
Figura 18. Resumo dos principais resultados encontrados no estudo.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de peptídeos escolhidos no estudo.	46
Tabela 2. Aspectos demográficos e clínicos de voluntários inseridos nos grupos Controle (CTL), Leve Recuperado e Grave Recuperado.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2019-nCoV	Novo Coronavírus 2019
nAbs	Anticorpos neutralizantes
AR	Artrite Reumatoide
BSA	Albumina Sérica Bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
Cauda poli-A	Poliadenilamento
CC	Cauda Citoplasmática
CD4 – CTL	Células T CD4 citotóxicas
CD39	NTPDase1
CD73	5'-ribonucleotideo fosfohidrolase
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019
CIA	Artrite induzida por colágeno
CTD	Domínio C Terminal
CTL	Grupo controle
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
DTM	Domínio transmembranar
DMC	Domínio central
E	Proteína do Envelope
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
FR	Fator Reumatoide
FT	Fator de transcrição
Grave Recuperado	Voluntários Recuperados da forma grave
gRNA	RNA genômico
+gRNA	RNA genômico de sentido positivo
-gRNA	RNA genômico de sentido negativo
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HR1	<i>Heptad repeat 1</i>
HR2	<i>Heptad repeat 2</i>

HULW	Hospital Universitário Lauro Wanderley
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus
IEDB	Banco de Dados de Epítomos Imunes e Recurso de Análise
IFN	Interferons
IL	Interleucina
IRF3	Fator de Transcrição Regulador de Interferon 3
JIA	Artrite idiopática juvenil
LAP	Peptídeo Associado à Latência
Leve Recuperado	Voluntários Recuperados da forma leve
LLBA	Líquido de lavagem bronco alveolar
M	Proteína de Membrana
MAIT	Células T invariantes associadas a mucosa
MERS CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MPO	Mieloperoxidase
N	Proteína do Nucleocapsídeo
N7-MTase	Metiltransferase de Guanina-N7
NET	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
NF-κB	Fator Nuclear-κB
NK	<i>Natural Killers</i>
NKT	<i>Natural Killer T</i>
NLR	Taxa de neutrófilos/linfócitos
nsp	Proteínas não estruturais
NTD	Domínio N Terminal
OMS	Organização Mundial de Saúde
Orf	Janelas De Leitura Aberta
PB	<i>Permeabilization Buffer</i>
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Solução Fosfato Salina
PD-1	Proteína de Morte Celular Programada 1
PD-L1	Ligante de Receptor de Morte Celular Programada 1
PF	Peptídeo de fusão
PMI	Período médio de incubação
RBD	Região Domínio de Ligação com o Receptor
RE	Retículo Endoplasmático

RIPK1	<i>Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 1</i>
-RNA	RNA de sentido negativo
RNA_m	RNA mensageiro
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSV	Vírus Sincicial Respiratório
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real
S	Proteína <i>Spike</i>
SARS CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV-2	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
SEB	Staphylococcal enterotoxin B
SEM	Erro padrão da média
SFB	Soro Fetal Bovino
sgRNA	RNA subgenômico
+sgRNA	RNA subgenômico de sentido positivo
-sgRNA	RNA subgenômicos de sentido negativo
STAT	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição
TA	Temperatura ambiente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tem	Linfócitos T de memória efetora (Tem)
TEMRA	Linfócitos T de memória terminalmente diferenciadas
Tfh	Linfócitos T foliculares
Tfh – CTL	Células T foliculares citotóxicas
Tfr	Linfócitos T foliculares reguladores
Tm	Linfócitos T de memória
Th	<i>T helper</i>
TIM3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin-domain-3</i>
TM	Taxa de Mortalidade
TMPRSS2	Serina Protease Transmembranar 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Tr17	Tregs produtoras de IL-17
Treg	Células/Linfócitos T Reguladoras
UH	<i>Upstream helix</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

UTR

Regiões Não Traduzidas

VMD

Vesículas de membrana dupla

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1 Histórico e epidemiologia	23
2.2 Estrutura e interação vírus-célula.....	25
2.3 Formas de transmissão, sinais e sintomas	30
2.4 Diagnóstico	33
2.5.1 Sistema imune inato na COVID-19	33
2.5.2 Sistema imune adaptativo na COVID-19	36
3. OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo Geral.....	42
3.2 Objetivos Específicos	42
4. METODOLOGIA.....	44
4.1 Considerações Éticas	44
4.2 Amostras Clínicas	44
4.3 Ensaio de RT qPCR.....	45
4.4 Desenho e preparação do Pool de peptídeos do SARS-CoV-2.....	45
4.5 Processamento de Amostras e Obtenção do Soro	47
4.6 Sorologia para Diagnóstico de Anticorpos IgG.....	47
4.7 Imunofluorescência para Análise de Células Reguladoras.....	47
4.8 Análise de dados por citometria de fluxo.....	49
4.9 Aquisição e Análise dos dados por Citometria de Fluxo	52
4.10 Análise estatística	52
5. RESULTADOS	55
5.1 Análises demográficas e clínicas dos voluntários inseridos nos grupos CTL, Leve Recuperado, Grave Recuperado.	55

5.2	Frequência de linfócitos T Reguladores em PBMCs de voluntários inseridos nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado.	58
5.3	Expressão de IL-10, IL-17 e LAP pelos linfócitos T Reguladores em PBMCs de voluntários inseridos nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado.....	60
5.4	Expressão de perforina e granzima B pelos linfócitos T Reguladores em PBMCs de voluntários inseridos nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado.....	62
5.5	Expressão de PD-1 e CTLA-4 pelos linfócitos T Reguladores em PBMCs de voluntários inseridos nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado.....	64
5.6	Expressão de CD39 e CD73 pelos linfócitos T Reguladores em PBMCs de voluntários inseridos nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado.....	65
5.7.	Comparação da expressão de citocinas pelas células T Reguladoras e sintomas desenvolvidos no grupo Leve Recuperado durante a COVID-19 aguda.....	67
5.8.	Comparação da expressão de grânulos citotóxicos pelas células T Reguladoras e sintomas desenvolvidos no grupo Leve Recuperado durante a COVID-19 aguda.	69
5.9.	Comparação da expressão de receptores inibitórios pelas células T Reguladoras e sintomas desenvolvidos no grupo Leve Recuperado durante a COVID-19 aguda.....	71
5.10.	Comparação da expressão de ectonucleotidases pelas células T Reguladoras e sintomas desenvolvidos no grupo Leve Recuperado durante a COVID-19 aguda.	73
6.	DISCUSSÃO	77
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
8.	REFERÊNCIAS	89
9.	APÊNDICES	103

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Desde a década de 60, seis coronavírus que são capazes de causar infecções em humanos já haviam sido identificados, sendo quatro deles (OC43, 229E, NL63 e HKU1) responsáveis por provocarem quadros clínicos geralmente leves, além de dois coronavírus descobertos nos anos 2000 (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*) - SARS CoV) e Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) - MERS CoV) causadores de infecções mais graves (HELMY et al., 2020). Em dezembro de 2019, na província de Wuhan (China), surtos associados a casos de pneumonia de etiologia até então desconhecida foram observados. Análises posteriores auxiliaram na identificação do patógeno como sendo pertencente ao grupo dos coronavírus (HU et al., 2021). O vírus, mais tarde nomeado de Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (*Severe acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2* - SARS-CoV-2), se espalhou rapidamente para outros países levando a Organização Mundial de Saúde (OMS) a decretar pandemia em 11 de março de 2020 (MARTELLUCCI et al., 2020; HU et al., 2021).

Estruturalmente, o SARS-CoV-2 é um vírus envelopado apresentando um material genético de RNA de fita simples que codifica para uma série de proteínas (YAO et al., 2020; PENG et al., 2021). Dentre estas, estão as proteínas estruturais denominadas de Envelope (E), Nucleocapsídeo (N), Membrana (M) e *Spike* (S) (YAO et al., 2020). O componente *Spike*, um dos principais componentes virais alvo de modelos vacinais contra o SARS-CoV-2, atua na interação vírus-célula mediante a associação da Região Domínio de Ligação com o Receptor (*receptor binding domain* - RBD) com o receptor Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) presente no hospedeiro (PATEL et al., 2022; YAO et al., 2020). As estruturas E e M, por sua vez, são importantes para a formação das partículas virais em conjunto com a proteína N. Esta também efetua o empacotamento do RNA viral em ribonucleocapsídeos helicoidais (MITTAL et al., 2020). Em conjunto, o RNA viral também codifica para estruturas proteicas acessórias bem como polipeptídios que quando clivados darão origem a proteínas não estruturais (*non-structural proteins* (nsps) - fundamentais para a replicação viral) (PENG et al., 2021).

A transmissão do SARS-CoV-2 pode ocorrer mediante contato direto com pessoas contaminadas (aperto de mãos e posterior manuseio do membro à boca, nariz e olhos) e gotículas de saliva expelidas via espirro ou tosse, por exemplo (BRASIL, 2021a). O comportamento dessas gotículas varia com o seu diâmetro (mas não apenas) influenciando no

tempo de permanência no ar (ROBLES-ROMERO et al., 2022). Nesse aspecto, o papel dos aerossóis (pequenas partículas sólidas ou líquidas dispersas no ambiente) se mostraram cada vez mais relevantes na transmissão do SARS-CoV-2 tornando-se uma das principais rotas de disseminação do patógeno (GENG; WANG et al., 2022; ROBLES-ROMERO et al., 2022). Uma vez infectados, os indivíduos podem não desenvolver sintomas (assintomático) ou podem apresentar sinais clínicos que variam de leve a grave (BRASIL, 2021c). Dentre os sinais leves estão febre, coriza, dor de garganta, calafrios, mialgia, cefaleia, fadiga, anosmia, ageusia e dores abdominais (BRASIL, 2021c). O agravamento do quadro pode ser acompanhado de pressão persistente no tórax, saturação de oxigênio menor que 95%, cianose, sepse, Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo, pneumonia com gravidade, insuficiência respiratória grave, disfunção de múltiplos órgãos, necessidade de suporte respiratório e internações em unidades de terapia intensiva (UTI) (BRASIL, 2021c).

Estudos mostram que o sistema imune inato e adaptativo podem se correlacionar aos distintos quadros clínicos. Na imunidade inata, pesquisas revelam um processo de infiltração de macrófagos e monócitos no microambiente pulmonar, podendo auxiliar no aumento de mediadores inflamatórios como a interleucina (IL)-6, Fator de Necrose Tumoral (*Tumour Necrosis Factor* - TNF), IL-1 β , CCL2, CCL3, CCL4 e CCL7 (CODO et al., 2020; LIAO et al., 2020; SETHI; HOTAMISLIGIL, 2021). A nível circulatório, modificações subpopulacionais de monócitos podem ser observadas mediante aumento de monócitos não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) e intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) com redução de monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) (ZHANG D. et al., 2021). Considerando a diferença funcional entre as citadas subpopulações, é possível que tais alterações possam auxiliar na modulação da responsividade imunológica frente a infecção pelo SARS-CoV-2 contribuindo para o direcionamento dos distintos perfis clínicos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 8^{ed}, 2015; NARASIMHAN et al., 2019, GATTI et al., 2020). Em conjunto, pesquisas sugerem susceptibilidade de monócitos ao SARS-CoV-2 no qual, mediante glicólise e aumento nos níveis de glicose, os monócitos infectados podem apresentar níveis mais elevados de mediadores envolvidos com a tempestade de citocinas como IL-6, TNF e IL-1 β além de interferons (IFN) α , β e λ bem como maior replicação viral (CODO et al., 2020). Acerca dos INFs, um interessante estudo conduzido por Csordas et al. (2022) demonstrou elevada expressão de INF γ e diminuída expressão de INF α em células *Natural Killers* (NK) periféricas de voluntários recuperados da forma grave comparados aqueles que se recuperaram da forma leve da Doença do Coronavírus 2019 (*Coronavirus disease* 2019 - COVID-19). A resposta antiviral via IFN tipo I parece, de fato,

ser importante na luta contra o SARS-CoV-2. Este, no entanto, apresenta componentes que podem driblar vias de sinalização associadas a este grupo de citocinas (LEI et al., 2020; KIM; SHIN, 2021).

Neutrófilos também podem manifestar características que espelham um quadro de gravidade da doença como níveis celulares mais elevados, aumento na taxa neutrófilo/linfócitos (*neutrophil-to-lymphocyte ratio* - NLR) bem como crescimento no número de neutrófilos infiltrantes nas vias aéreas superiores e no espaço bronco alveolar (AGRATI et al., 2020; LIU et al., 2020; YAN et al., 2020; REUSCH et al., 2021). Nos casos de pacientes acometidos pela forma grave da doença, os neutrófilos parecem manifestar reduzida capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) e aumento na degranulação de grânulos primários bem como formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (*neutrophil extracellular traps* - NET), estes estando enriquecidos em autopsias pulmonares e encontradas elevadas em plasma de enfermos graves (REUSCH et al., 2021). Nestes, também são identificados atenuada atividade citotóxica de células NK e *Natural Killer T* (NKT) em comparação a indivíduos com um perfil mais leve da doença (VIGÓN et al., 2021; KOAY et al., 2022).

Na imunidade adaptativa, Tan et al. (2021) sugerem uma correlação entre uma resposta celular mais rápida e a resolução da doença no qual, em conjunto, maiores níveis de células secretoras de IFN- γ em estágios iniciais e tardios parecem se associar à quadros mais leves. De fato, a proteína *Spike* parece direcionar a uma resposta de IFN- γ nos linfócitos T, mas não a um perfil *T helper 2* (Th2) e Th17 (NEIDLEMAN et al., 2020; GIL-ETAYO et al., 2021). Em casos mais graves, marcadores de ativação (KI-67 e CD25), imunossupressão (*T-cell immunoglobulin and mucin-domain-3* - TIM3, *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* - CTLA-4) e quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL4, CCL7, CCL8 e CXCL8) podem estar aumentadas em células T CD4⁺ presentes no líquido de lavagem bronco alveolar (LLBA) (ROSHANRAVAN; HALLIDAY; SANSOM, 2018; KALFAOGLU et al., 2020; MODABBER et al., 2021). Mesmo a gravidade da doença podendo elevar a expressão de grânulos citotóxicos em células T CD4⁺ e T CD8⁺, nestas a atividade citotóxica parece estar prejudicada em pacientes graves (KANG et al., 2020; VIGÓN et al., 2021).

Acerca da frequência dos linfócitos T reguladores, alguns estudos revelam resultados contrários na COVID-19 nos quais fatores como a idade dos voluntários, marcadores de identificação para as Tregs, critérios de inclusão e exclusão (ou mesmo a composição de cada grupo) para a formação dos grupos e/ou o período de coleta das amostras poderiam influenciar.

Chen et al. (2020) e Tan et al. (2020) mostram que a doença pode provocar aumento na frequência e, possivelmente, funcionalidade de Tregs ($CD4^+CD25^+CD127^{low}$) circulantes. Em conjunto, Vigón et al. (2021) revelaram níveis mais elevados de Tregs (mediante uso dos marcadores CD4, CD25 e CD127) em Células Mononucleares do Sangue Periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cell* - PBMC) de pacientes gravíssimos em comparação ao grupo controle. No entanto, enquanto Mohebbi et al. (2020) revelaram diminuição nos níveis de expressão de RNA mensageiro (RNAm) em marcadores característicos de Tregs (CD25 e *Forkhead box P3* - FOXP3) em amostras sanguíneas de voluntários acometidos pela COVID-19, Qin et al. (2020) demonstram atenuação dessa célula ($CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{low}$) ainda mais acentuada em pacientes graves. Nestes, foi encontrado menor expressão de FOXP3 em $CD4^+CD25^+$ comparados a um quadro moderado (KALFAOGLU et al., 2020).

Diante do exposto, compreende-se que alterações nas características imunológicas podem se correlacionar com o quadro clínico observado na infecção pelo SARS-CoV-2. Sendo assim, torna-se fundamental a compreensão acerca da participação dos diferentes grupos celulares do sistema imune no curso da COVID-19. Considerando o papel imunomodulador das células T Reguladoras sob respostas inatas e adaptativas frente a patógenos, bem como as incertezas associadas à contribuição dessas células nos distintos perfis da COVID-19, o presente trabalho teve por objetivo avaliar as Tregs de voluntários recuperados das formas leve e grave da doença na busca por biomarcadores que pudessem se associar aos diferentes perfis clínicos (GROVER; GOEL e GREENE, 2021; RAHIMZADEH; NADERI, 2021; WANG H. et al., 2021; WANG Y. et al., 2021; SIMSEK et al., 2022).

REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico e epidemiologia

Os séculos XX e XXI foram marcados pelo surgimento de um conjunto de doenças infecciosas causadas por patógenos componentes do grupo dos coronavírus (HELMY et al., 2020; HU et al., 2021). Do intervalo que se estendeu da década de 60 ao período pré-pandêmico atual, seis coronavírus que infectam humanos foram identificados sendo quatro deles (OC43, 229E, NL63 e HKU1) caracterizados por causarem doenças semelhantes apenas a um resfriado leve ou mesmo uma infecção do trato gastrointestinal (HELMY et al., 2020). No entanto, em 2002 e 2012, respectivamente, o surgimento do SARS-CoV e MERS-CoV trouxe considerável preocupação por serem altamente patogênicos e apresentarem elevada taxa de mortalidade (HELMY et al., 2020; HU et al., 2021).

Em dezembro de 2019, uma pneumonia de causas desconhecidas foi relatada na província de Wuhan, China. Estudos retrospectivos revelaram que o primeiro caso havia sido notificado ainda em oito de dezembro. Desde então, foi observado que a maioria das 27 primeiras hospitalizações estavam epidemiologicamente associadas a um mercado que comercializava frutos do mar, animais selvagens e aves. O surto, no entanto, foi noticiado à população e a OMS apenas em 31 de dezembro pela Comissão Municipal de Saúde de Wuhan (HU et al., 2021). Estudos posteriores permitiram identificar o patógeno como sendo um novo coronavírus pertencente a ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, gênero *Betacoronavirus* e subgênero *Sarbecovirus* (HU et al., 2021; JACKSON et al., 2022; HELMY et al., 2020).

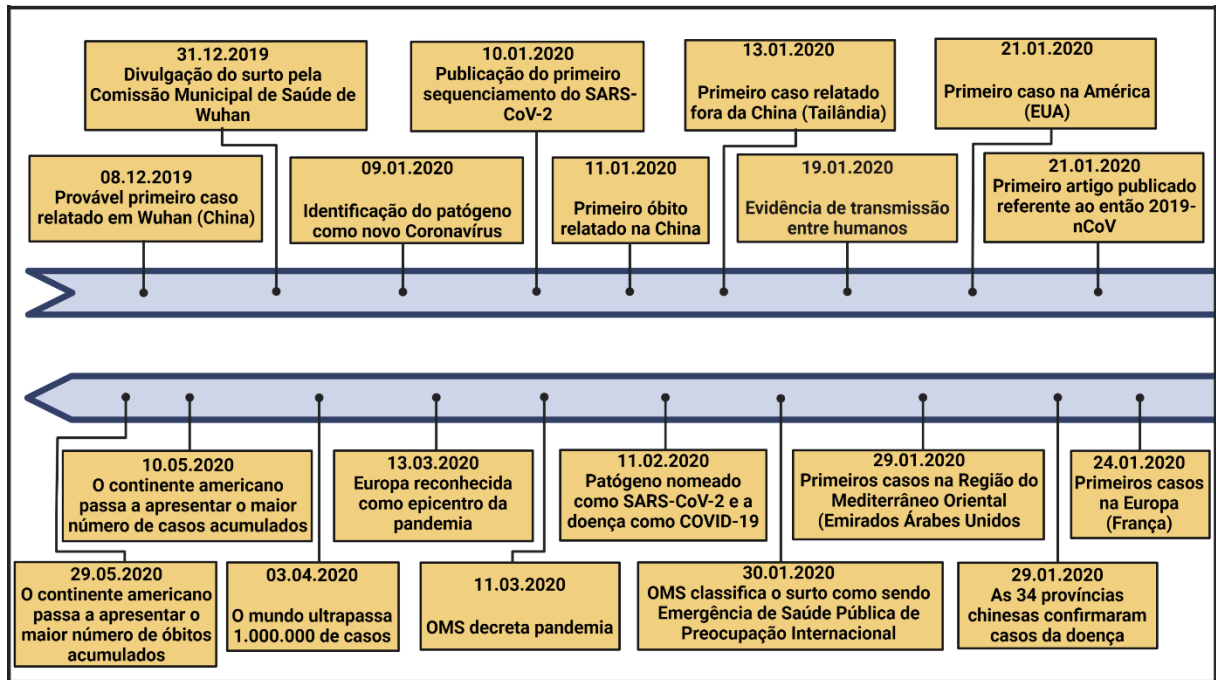
O primeiro sequenciamento completo do vírus, publicado em 10 de janeiro de 2020, auxiliou pesquisadores na identificação do patógeno pela técnica de reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* - RT-PCR) (BHAT et al., 2021; HU et al., 2021). Um dia após a divulgação, a mídia chinesa revelou a primeira morte suscitada pelo novo coronavírus e, em dois dias, o primeiro caso fora da China foi relatado na Tailândia. Após evidências sugerirem a transmissão entre humanos, houveram confirmações de casos nos Estados Unidos (21 de janeiro de 2020), França (três casos em 24 de janeiro de 2020) e Emirados Árabes Unidos (29 de janeiro de 2020), sendo os primeiros relatos nas Américas, Europa e Região do Mediterrâneo Oriental, respectivamente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022a). A publicação do primeiro artigo referente ao então denominado novo coronavírus 2019 (2019 *novel coronavirus* - 2019-nCoV) mostrou um compartilhamento genético de 79,5% e 95%, respectivamente, com o

SARS-CoV e o coronavírus de morcegos SL-CoV-RaTG13, respectivamente (BHAT et al., 2021).

Ao fim de janeiro de 2020, todas as 34 províncias chinesas já haviam identificado casos da doença enquanto que a OMS classificava o surto provocado pelo novo coronavírus como sendo de Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional (BHAT et al., 2021; HU et al., 2021). Em 11 de fevereiro do mesmo ano, o vírus foi renomeado como SARS-CoV-2 pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (*International Committee of Taxonomy of Viruses* - ICTV), enquanto a OMS batizava a enfermidade de COVID-19 (HELMY et al., 2020; HU et al., 2021). Devido a elevada capacidade de transmissão somada a abundância de viagens internacionais, o patógeno rapidamente se disseminou para outros países, levando a OMS decretar pandemia em 11 de março de 2020 (HU et al., 2021; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022a).

Após dois dias do anúncio de pandemia, a Europa foi reconhecida como epicentro pandêmico relatando o maior número de infecções e óbitos diários. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022a). Nos primeiros dias de abril (2020), o mundo registrou mais de 1.000.000 de casos e 55.242 óbitos, enquanto o mês de maio, do mesmo ano, trouxe ao continente americano o maior número de casos e óbitos notificados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022a). Até 14 de setembro de 2022, Estados Unidos, Índia e Brasil foram responsáveis por 28,51% e 34,67% do total de infecções e mortes, respectivamente, em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022b). A figura 1 detalha os principais eventos associados ao período inicial da atual pandemia.

Figura 1. Linha do tempo acerca dos principais eventos iniciais associados a pandemia provocada pelo SARS-CoV-2.



Fonte: de Sousa Palmeira et al., 2022. Criado com BioRender.com

No Brasil, a atualização realizada pelo Ministério da Saúde em 14 de setembro de 2022 mostrava um acúmulo de 34.558.902 casos e 685.121 óbitos conferindo ao país uma taxa de mortalidade (TM) de 1,98%, quase 1% acima da TM mundial (1,07%). Entre as regiões brasileiras, o Sudeste possui maior número de casos e mortes por COVID-19. No entanto, em notificações acumuladas por 100 mil habitantes, o Sul se configura como líder seguido da região Centro-Oeste enquanto que para óbitos, o Centro-Oeste e Sudeste são os mais afetados. Em conjunto, apenas o Sudeste possui uma TM acima da média nacional com 2,40%. Porém, todas as regiões brasileiras apresentam TM acima da média mundial: o Nordeste com 1,91%; Norte com 1,85%, Centro-Oeste com 1,65% e Sul com 1,47% (BRASIL, 2022; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022b).

2.2 Estrutura e interação vírus-célula

SARS-CoV-2 é caracterizado por um formato esférico de 60-140 nm de diâmetro, sendo composto por uma bicamada lipídica (envelope) encapsulando o material genético de RNA de fita simples e sentido positivo (Figura 2) (MITTAL et al., 2020; CHEN et al., 2021; PENG et al., 2021). Este apresenta cerca de 30.000 nucleotídeos de comprimento sendo encontrado, nas regiões 5' e 3' respectivamente, as estruturas m⁷G-cap e um poliadenilamento (causa poli-A),

ambos conferindo estabilização e proteção contra a digestão celular exercida por exoribonucleases (MITTAL et al., 2020; BRANT et al., 2021; PENG et al., 2021). Em conjunto, também são observadas duas regiões flanqueadas não traduzidas (*untranslated region* - UTR) além de várias janelas de leitura aberta (*open reading frames* - orf) (MITTAL et al., 2020). A UTR da porção 5' contém elementos que regulam a tradução viral, síntese de subgenomas, empacotamento do RNA viral além de conferir resistência à degradação de RNAm do vírus (BRANT et al., 2021). Por outro lado, a UTR da porção 3' é dotada de região de ligação com o complexo de replicação e transcrição associadas ao intermediário RNA de sentido negativo (-RNA) (BRANT et al., 2021). Em conjunto, na região 5' é observada a orf1a/b (orf1a e orf1b) ocupando cerca de 70% do genoma viral, sendo codificante dos polipeptídeos pp1a e pp1ab (MITTAL et al., 2020; BRANT et al., 2021). Este processo ocorre após acesso do RNA viral ao citoplasma celular no qual posteriormente, duas proteases autoativadas - as nsp3 e nsp5 - codificadas pelo próprio genoma viral, clivam as pp1a e pp1a/b em 16 nsps, responsáveis pela síntese do RNA do vírus (MITTAL et al., 2020; BRANT et al., 2021; PENG et al., 2021).

Como caracterizadas abaixo, as nsps codificadas pelo genoma viral desempenham papel fundamental no processo de replicação e evasão da responsividade imunológica:

1. a nsp1 inibe a tradução do RNAm do hospedeiro e facilita a tradução do RNAm viral em células infectadas;
2. a nsp2 pode estar associada com a troca de cálcio no retículo endoplasmático bem como na biogênese das mitocôndrias além de, possivelmente, apresentarem capacidade de interação com estruturas celulares como endossomos, RNA ribossomal e probitinas (1 e 2) celulares;
3. a nsp3 atua na clivagem do polipeptídeo viral NSP1-4 bem como na clivagem de Fator de Transcrição Regulador de Interferon (*interferon regulatory transcription factor* - IRF)3 podendo, portanto, causar perturbações na responsividade antiviral;
4. a nsp4 desempenha papel importante na replicação viral além de, possivelmente, contribuir com a homeostase do Retículo Endoplasmático (RE);
5. a nsp5 pode interagir com proteínas associadas com resposta imune, interferindo na mesma. É possível que esta proteína possa afetar a responsividade de IFN tipo I enquanto eleva os níveis de citocinas pró-inflamatórias;
6. estudos sugerem que a nsp6 pode inibir a autofagia, o que poderia conduzir a ativação de inflamassomas, resultando em morte celular grave mediante inflamação;
7. a nsp9 aparenta atuar na replicação viral, sendo também caracterizada como uma proteína de ligação ao RNA, além de apresentar um sítio de interação com a nsp12;

8. a nsp11, por sua vez, parece contribuir para a interação do vírus com a membrana celular do hospedeiro;
9. a nsp12 pode ativar o *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1* (RIPK1), um mediador que contribui com a inflamação e morte celular;
10. a nsp13 é uma helicase importante na replicação do material genético viral, podendo formar um único complexo com as nsp7, nsp8 e nsp12 a qual desempenham função de NTPase, dNTPase, helicase e RNA 5'-trifosfatase;
11. a nsp15 é dotada de atividade de endoribonuclease. Em conjunto, nsp13 e nsp15 podem atuar de forma antagonista ao interferon.

Além das funções acima mencionadas, as nsps podem se organizar em complexos fundamentais para a multiplicação do patógeno no organismo hospedeiro:

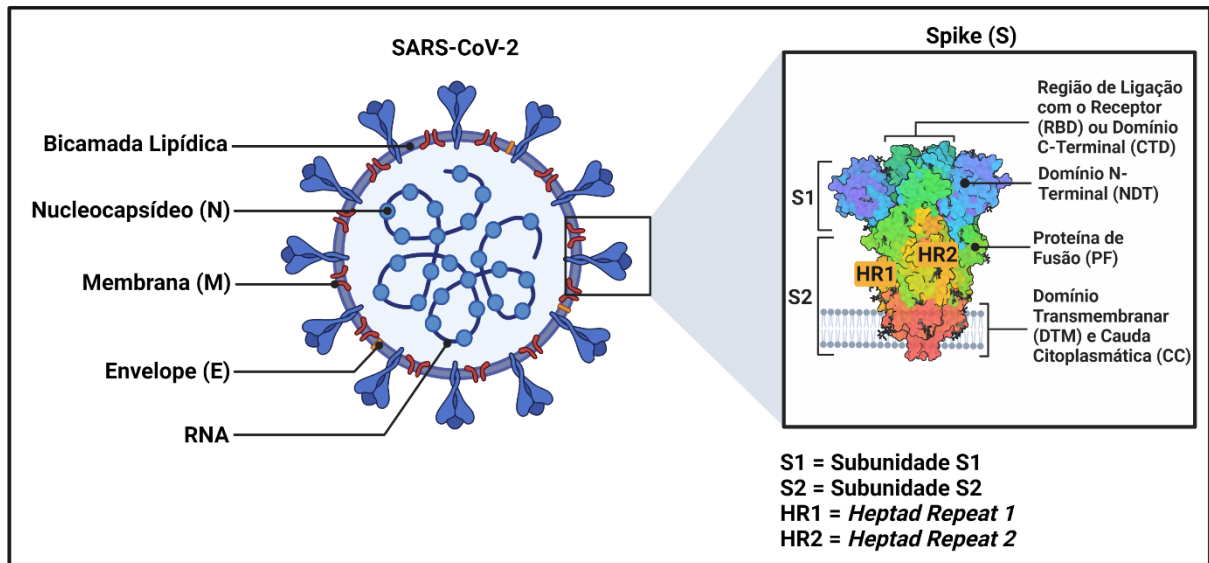
1. A nsp7, nsp8 e np12 formam um complexo de RNA polimerase sendo, as duas primeiras, cofatores enquanto a última é dotada da subunidade catalítica;
2. a nsp10 pode agir como cofator em dois complexos: o complexo formado com a nsp14 (metiltransferase de guanossina-N7 (*guanosine-N7 methyltransferase*) - N7-MTase) (nsp10-nsp14), que atua como RNases sendo, esta atividade, aparentemente importante para o reparo de RNA durante a replicação. Além disso, estudos sugerem que tal atividade de RNase pode ser melhorada na presença de nsp7-nsp12 e nsp8; O complexo nsp10-nsp16 (RNA metiltransferase), que atua na metilação do RNA viral resultando em uma mudança de estrutura que imita a RNAm hospedeiro. Com isso, é possível que tais metilações possam auxiliar o vírus no escape da resposta imune inata (MITTAL et al., 2020; BRANT et al., 2021; ZHANG; YANG, 2022).

Acerca da porção 3' do RNA viral, essa codifica 4 proteínas estruturais (M, E, N e S) importantes para a interação com o receptor celular, montagem, morfologia e liberação das partículas virais da célula (Figura 2) (MITTAL et al., 2020; PENG et al., 2021). A proteína transmembranar M é a mais abundante proteína de superfície do vírus auxiliando no brotamento viral bem como em sua morfogênese (MITTAL et al., 2020; BRANT et al., 2021; ZHANG; YANG, 2022). A estrutura E, por sua vez, é o menor componente estrutural, importante não apenas para a morfogênese viral (com a criação de um canal iônico na membrana), mas também contribuindo com a patogenicidade viral (MITTAL et al., 2020; BRANT et al., 2021; ZHANG; YANG, 2022). Além disso, estudos revelam capacidade de interação entre a proteína E com *tight junctions* no epitélio pulmonar, bem como uma habilidade em modular o inflamassoma NLRP3 em diferentes estágios da doença (ZHANG; YANG, 2022).

Por fim, a proteína N é responsável pelo empacotamento do RNA do vírus em um ribonucleocapsídeo helicoidal (MITTAL et al., 2020). No entanto, estudos demonstram o envolvimento dessa estrutura com a replicação do genoma do vírus, uma vez que o bloqueio na etapa de separação entre N e RNA interrompem o ciclo do viral (ZHANG; YANG, 2022). Além disso, é possível que a estrutura N possa inibir a fosforilação dos fatores de transcrição Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição (*signal transducer and activator of transcription* - STAT) 1 e STAT2 enquanto induz a fosforilação do Fator Nuclear- κ B (*nucleic factor* – (NF)- κ B), assim, prejudicando a resposta antiviral do IFN enquanto modula a síntese de citocinas pró-inflamatórias (TANIGUCHI; KARIN, 2018; ZHANG; YANG, 2022). Distribuídos entre os genes estruturais estão os nove componentes acessórios (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF14 e ORF10) que, assim como as proteínas estruturais, são derivados do RNA subgenômico (sgRNA) (MITTAL et al., 2020; BRANT et al., 2021; PENG et al., 2021; ZHANG; YANG, 2022). Acredita-se que essas proteínas sejam importantes na evasão da resposta imune além de auxiliarem na patogênese viral (PENG et al., 2021; ZHANG; YANG, 2022).

Emergindo da camada lipídica, estão cerca de 30-60 trímeros da glicoproteína *Spike* com 9-12 nm de comprimento que dão a aparência de coroa solar ao vírus (MITTAL et al., 2020; CHEN et al., 2021; PENG et al., 2021). Cada monômero da S é composto de duas subunidades (S1 e S2 - que se ligam covalentemente na “região de fronteira”), do domínio transmembranar e da porção citoplasmática (MITTAL et al., 2020; CHEN et al., 2021). A subunidade S1 é formada por um domínio N terminal (*N-terminal domain* - NTD) e um domínio C terminal (*C-terminal domain* - CTD) também conhecido por RBD (CHEN et al., 2021; PENG et al., 2021). A subunidade S2, por sua vez, é dotada da maquinaria de fusão (CHEN et al., 2021). Nesta subunidade, pode-se identificar os seguintes elementos: a região *upstream helix* (UH), o peptídeo de fusão (PF), o *heptad repeat* 1 (HR1), o domínio central (DMC), o *heptad repeat* 2 (HR2 - que protege o PF), o domínio transmembranar (DTM) e a cauda citoplasmática (CC) (Figura 2) (PENG et al., 2021).

Figura 2. Estrutura do SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de BioRender.com

A interação covalente entre S1/S2 é fundamental para a estabilidade pré-fusional da proteína S (CHEN et al., 2021). Além disso, cada unidade do trímero de S pode apresentar uma conformação aberta ou fechada que pode, respectivamente, se ligar ou não com o receptor ECA2, expresso na célula e que interage com a RBD (PENG et al., 2021). Embora a conformação das unidades de S seja assimétrica (podendo uma estar apta para interação com ECA2 enquanto as outras não), acredita-se que a interação de uma *Spike* com a ECA2 provoque alterações conformacionais nas demais unidades que podem, assim, adquirir conformação aberta (PENG et al., 2021).

A interação entre RBD e receptor promove a desestabilização e dissociação das subunidades S1/S2 através da clivagem na região de fronteira S1/S2, o que transforma a proteína S em uma forma competente de fusão e facilita a posterior clivagem dentro da subunidade S2 (CHEN et al., 2021; PENG et al., 2021). Nesta, a Serina Protease Transmembranar 2 (*Transmembrane Protease Serine 2* - TMPRSS2), na superfície celular, realiza uma clivagem logo acima do PF resultando na remoção do domínio UH a fim de ativar a capacidade de fusão da proteína S através de alterações conformacionais irreversíveis da subunidade S2 (CHEN et al., 2021; PENG et al., 2021). Nesse processo, é pensado que a porção DMC, HR1 e HR2 se associem e formem uma estrutura responsável pela aproximação entre as membranas viral e celular facilitando o acesso da PF à membrana celular (PENG et al., 2021). Em células que não expressam a TMPRSS2, a cathepsina L pode exercer um importante papel. Nesse contexto, após o SARS-CoV-2 sofrer endocitose em um processo dependente de clatrina,

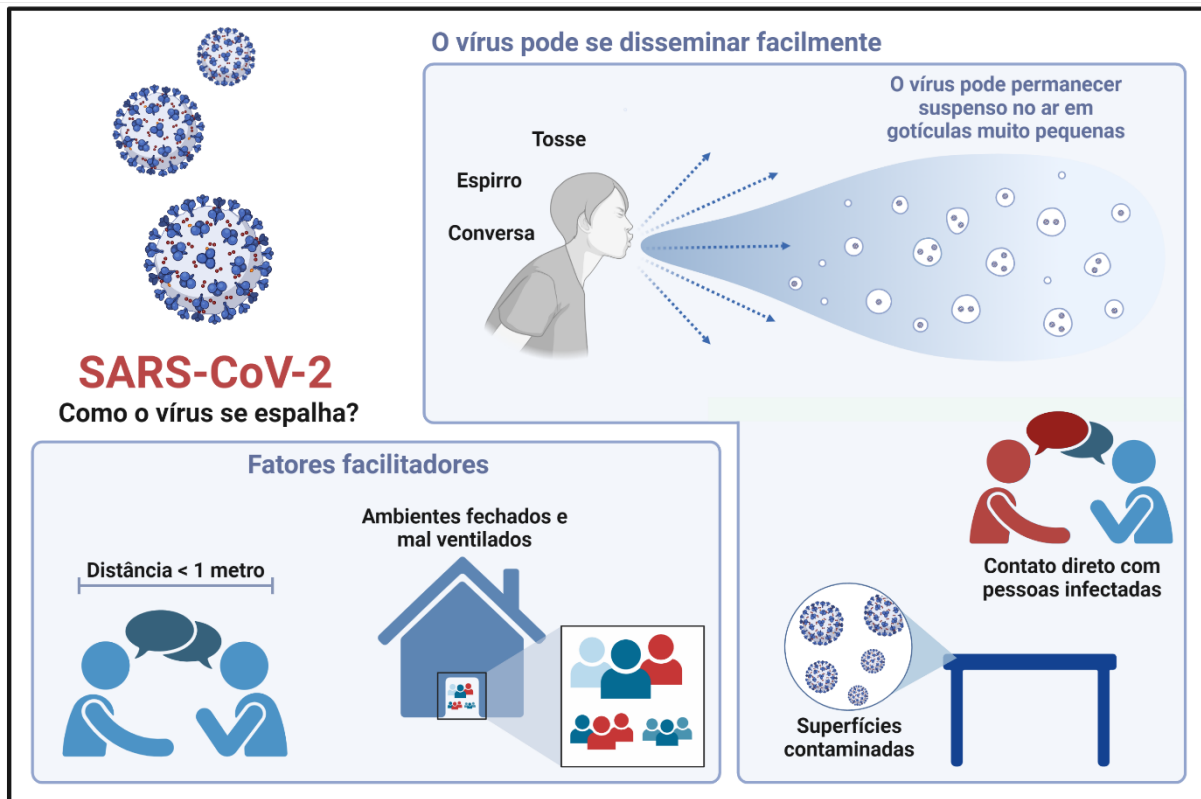
a cathepsina L endossomal pode mediar a fusão entre as membranas viral e endossomal (CHEN et al., 2021).

Uma vez lançado no citoplasma celular, o RNA viral será inicialmente desempacotado das proteínas N mediante ação de proteases celulares (BRANT et al., 2021). Sendo assim, o RNA genômico (gRNA) servirá de base para a transcrição de intermediários de -RNA além de agir como RNAm para a tradução das ORF1a e ORF1b (BRANT et al., 2021). No interior de vesículas de membrana dupla (VMD), nsps derivadas da clivagem das poliproteínas oriundas das citadas ORFs darão origem ao mencionado complexo de replicação e transcrição (BRANT et al., 2021). Tal complexo é responsável pela síntese de RNA genômico de sentido positivo (+gRNA) e RNA subgenômico de sentido positivo (+sgRNA) através da transcrição de um intermediário de RNA genômico de sentido negativo (-gRNA) e de transcrições descontínuadas de RNA subgenômicos de sentido negativo (-sgRNA) (BRANT et al., 2021). O sgRNA irá codificar proteínas estruturais e acessórias enquanto que o +gRNA será empacotado com as proteínas N, encapsulado no envelope viral e, finalmente, lançado fora da célula (BRANT et al., 2021).

2.3 Formas de transmissão, sinais e sintomas

O SARS-CoV-2 pode ser transmitido mediante gotículas de saliva e, principalmente, partículas menores (aerossóis) - que podem pousar nas mucosas oculares, nasais e boca de indivíduos próximos - expelidas durante tosses, espirros e conversas de pessoas contaminadas. O risco de contaminação aumenta quando os interlocutores se encontram a uma distância inferior a um metro. Ambientes fechados e dotados de tratamento de ar inadequado facilitam o processo de transmissão. O patógeno também pode ser disseminado através do contato direto com uma pessoa infectada (como um aperto de mão) e a posterior condução do membro a regiões do nariz, boca e olhos. Objetos e superfícies contaminadas também podem apresentar certo risco infeccioso. (BRASIL, 2021a; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022a; GENG; WANG et al., 2022; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021b). A figura 3 esquematiza as principais formas de transmissão do SARS-CoV-2.

Figura 3. Formas de transmissão do SARS-CoV-2.

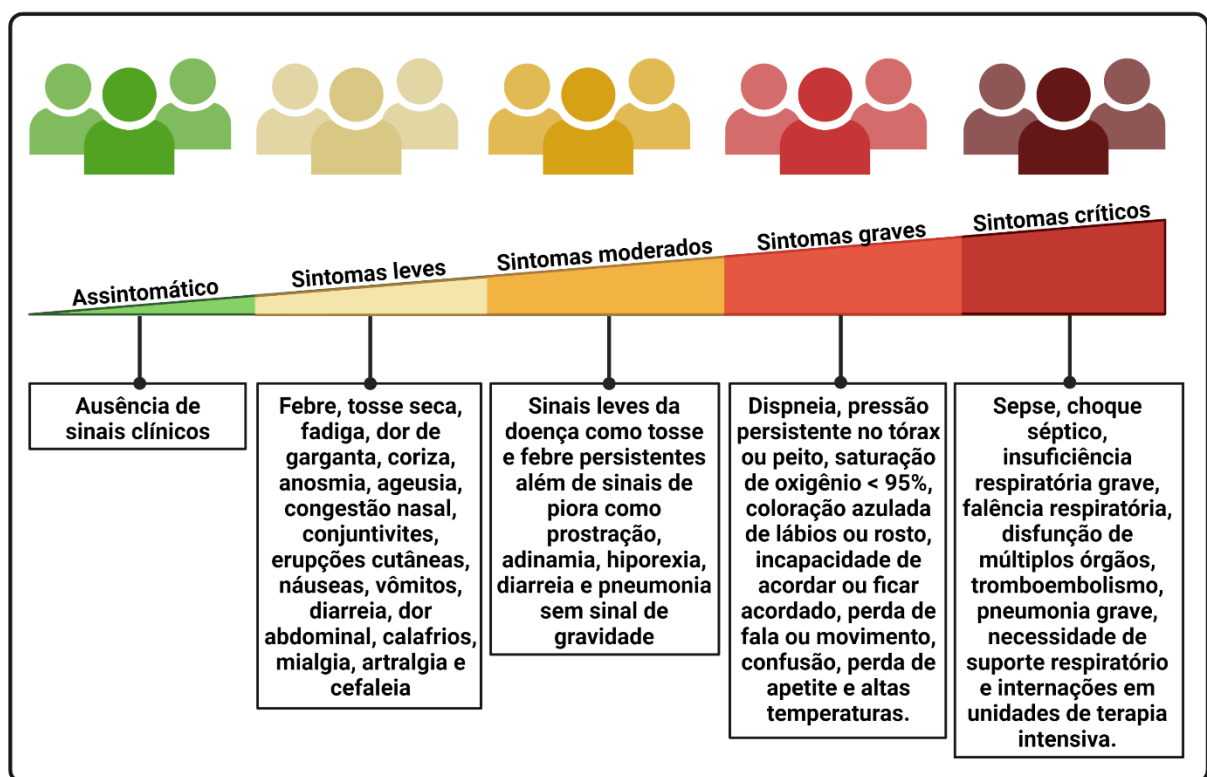


Fonte: de Sousa Palmeira et al., 2022. Criado com BioRender.com

Uma vez infectados, os indivíduos podem desenvolver sintomas após um período médio de incubação (PMI) viral que difere entre as variantes (BRASIL, 2021c; DU et al., 2022; WU et al., 2022). Nesse cenário, análises mostram que o PMI para a cepa original do SARS-CoV-2 é de 6.3-6.65 dias, seguido de um PMI de 5 dias para a variante Alfa, 4.5 dias para a Beta, 4.41-4.8 dias para a Delta e 3.6 dias para a Omicron (BRASIL, 2021c; DU et al., 2022; WU et al., 2022). Quando contaminados, pacientes podem não serem acometidos por sinais clínicos (assintomáticos) ou podem apresentar sintomas que variam entre leve, moderado, grave e crítico (Figura 4). No primeiro, há a possibilidade de serem observadas febre, tosse seca, fadiga, dor de garganta e coriza. Porém, sinais como anosmia, ageusia, congestão nasal, conjuntivites, erupções cutâneas, náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, calafrios, mialgia, artralgia e cefaleia podem ocorrer. De acordo com o Ministério da Saúde, sintomas moderados podem abranger sinais leves da doença como tosse e febre persistentes além de sinais de piora como prostração, adinamia, hiporexia, diarreia e pneumonia sem sinal de gravidade (BRASIL, 2021c; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021a).

Para os casos graves, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention* - CDC), OMS e Ministério da Saúde elencam os seguintes sintomas: dificuldade respiratória, pressão persistente no tórax ou peito, saturação de oxigênio menor que 95% em ar ambiente, coloração azulada de lábios ou rosto, incapacidade de acordar ou ficar acordado, perda de fala ou movimento, confusão, perda de apetite e altas temperaturas (acima de 38°C). Há aqueles que experimentam a forma crítica desenvolvendo quadros de sepse, choque séptico, insuficiência respiratória grave, falência respiratória, disfunção de múltiplos órgãos, tromboembolismo, pneumonia grave, necessidade de suporte respiratório e internações em unidades de terapia intensiva. Importante salientar que a infecção pelo SARS-CoV-2 pode ocasionar manifestações mentais e neurológicas como as já citadas anosmia e ageusia, além de irritabilidade, confusão, dano no nervo, ansiedade, delírio, encefalopatia, agitação, acidente vascular cerebral, inflamação cerebral, meningoencefalite, distúrbios do sono e depressão (BRASIL, 2021c; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021a).

Figura 4. Sinais e sintomas da COVID-19.



Fonte: de Sousa Palmeira et al., 2022. Criado com BioRender.com

2.4 Diagnóstico

Atualmente, algumas formas de diagnóstico são utilizadas para a confirmação da infecção aguda ou prévia pelo SARS-CoV-2:

- Diagnóstico clínico: um profissional de saúde observa os sinais clínicos e realiza uma anamnese com o indivíduo. Faz-se necessário o conhecimento acerca de possíveis contatos com pessoas positivas para COVID-19 nos últimos 14 dias do início dos sintomas.
- Diagnóstico Molecular: Objetiva a detecção do RNA do SARS-CoV-2 mediante amostras de secreção respiratória. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (*real-time quantitative polymerase chain reaction* - RT-qPCR) é uma das utilizadas na detecção do componente viral.
- Sorologia: Busca identificar a presença de anticorpos IgM, IgA ou IgG sintetizados em decorrência da infecção pelo SARS-CoV-2.
- Teste rápido: Os testes inseridos nesse grupo podem identificar a presença de anticorpos IgM e/ou IgG (teste de anticorpo) em amostras de soro, plasma ou sangue ou mesmo antígenos virais (teste de antígeno) em material biológico coletado da naso/faringe. Esses testes utilizam a metodologia de imunocromatografia. Também há a possibilidade de realização de autotestes, podendo ser realizados em qualquer lugar, independente do status de vacinação ou se o indivíduo possui ou não sintomas.
- Diagnóstico por imagem: Através de uma tomografia computadorizada de alta resolução, objetiva observar alterações tomográficas que sejam compatíveis com a COVID-19 (BRASIL, 2021b; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022c).

2.5 Sistema imune na COVID-19

A infecção desencadeada pelo SARS-CoV-2 resulta em uma doença cujo quadro clínico pode se caracterizar por sinais leves, moderados e graves (BRASIL, 2021c). Compreender o comportamento responsivo do sistema imune nos diferentes estágios e formas clínicas torna-se fundamental para a adoção de medidas terapêuticas mais adequadas.

2.5.1 Sistema imune inato na COVID-19

Avaliando proteínas séricas, Long et al. (2020) mostraram níveis semelhantes em uma considerável quantidade de citocinas, entre pacientes assintomáticos e indivíduos saudáveis enquanto que, comparado ao grupo sintomático, este apresentou concentrações mais elevadas, o que sugere uma resposta inflamatória mais atenuada em indivíduos que não manifestaram

sinais clínicos. No entanto, evidências sugerem um papel do sistema imune inato em casos graves da COVID-19, no qual tanto uma ação hiper inflamatória quanto um perfil imunossupressor podem se manifestar (PEYNEAU et al., 2022).

Referente aos neutrófilos, embora estudos em sangue periférico revelem níveis elevados dessas células na doença, pacientes moderados e graves possuem uma quantidade mais acentuada (EKŞİOĞLU-DEMIRALP et al., 2022; VITTE et al., 2020). Nos últimos, a capacidade de síntese de ROS pelos neutrófilos parece estar prejudicada enquanto que maior competência para degranulação de grânulos primários e construção de NETs são observadas (REUSCH et al., 2021). Ademais, pacientes graves podem apresentar maior taxa NLR (um biomarcador de inflamação clínica) que se correlacionam com níveis de IL-2, IL-6 e IL-10 e menor contagem de células T CD4⁺ (CAVALCANTE-SILVA et al., 2020; ZHANG B et al., 2020). O aumento da NLR também foi observado ser um fator de risco de mortalidade em pacientes hospitalizados em decorrência da doença (CAVALCANTE-SILVA et al., 2020). Embora marcadores de ativação tanto no plasma (mieloperoxidase - MPO, lipocalina-2, calprotectina e NETs), quanto em superfície celular (CD66b e CD11b) estejam elevadas em pacientes graves ou críticos, nestes, alguns componentes parecem estar mais intensificados (PEYNEAU et al., 2022). Em pacientes críticos, a redução de CD62L e CD16 pode ser observada. De fato, marcadores que caracterizam neutrófilos maduros (CD10 e CD16) parecem atenuados durante a infecção, sendo mais evidente em quadros que levaram à óbito (EKŞİOĞLU-DEMIRALP et al., 2022; PEYNEAU et al., 2022). Diante de perfis graves e críticos, neutrófilos com fenótipo imunossupressor podem estar mais elevados (PEYNEAU et al., 2022).

Peyneau et al. (2022) demonstraram que em pacientes hospitalizados, monócitos e neutrófilos apresentaram atenuada capacidade de fagocitose sendo, nos monócitos, até mais acentuado naqueles que foram submetidos à UTI. O mesmo estudo também sugere que a queda nesse mecanismo pelas referidas células pode se correlacionar com a mortalidade e o desenvolvimento de choque séptico (PEYNEAU et al., 2022). Além disso, pesquisas referentes à explosão oxidativa (EO) em neutrófilos revelam divergências de resultados no qual em um estudo observa-se ausência de mudanças significativas entre grupos enquanto em outro, mostra-se uma EO mais elevada em pacientes críticos (EKŞİOĞLU-DEMIRALP et al., 2022; PEYNEAU et al., 2022). Em conjunto, estudos conduzidos por Peyneau et al. (2022) sugerem uma disfunção na competência dessas células no combate a patógenos já que a capacidade de NETosis em níveis basais ou estimuladas estava prejudicada sendo, em alguns estímulos, até mais acentuada em voluntários críticos. No entanto, estudos prévios também encontraram

elevados níveis de NETs em pacientes com COVID-19 no qual altos níveis séricos poderiam se correlacionar com a gravidade da doença (CAVALCANTE-SILVA et al., 2020). Assim como nos monócitos, a doença parece não afetar a capacidade de apoptose inicial e tardia dos neutrófilos (EKŞİOĞLU-DEMIRALP et al., 2022).

Análises em citometria de fluxo mostram aumento na frequência de monócitos em pacientes apresentando a forma leve da doença comparado às formas moderada e grave (EKŞİOĞLU-DEMIRALP et al., 2022). Em monócitos circulantes de pacientes graves e críticos, há aumento na expressão do marcador de ativação CD11b. Por outro lado, a expressão de Antígeno Leucocitário Humano (*human leukocyte antigen* - HLA) - DR se mostra reduzida durante a doença no qual parece estar mais acentuada em indivíduos críticos (CHARONIS; JAMES; GEORGOPOULOS, 2022; EKŞİOĞLU-DEMIRALP et al., 2022; PEYNEAU et al., 2022). Em conjunto, pacientes graves possuem aumento na expressão do Ligante do Receptor de Morte Celular Programada 1 (*Programmed Cell Death Ligand 1* - PD-L1) sendo um marcador importante por atuar como um inibidor checkpoint (VITTE et al., 2020). Monócitos intermediários (CD14⁺CD16⁺), por sua vez, se mostraram elevados em pacientes graves enquanto que em comparação com estes, pacientes críticos apresentaram redução na frequência dessas células (PEYNEAU et al., 2022).

A expressão de CD16 em monócitos (que define característica de um perfil inflamatório) parece estar elevada na doença, embora em comparação com grupo leve, pacientes graves apresentem atenuação (EKŞİOĞLU-DEMIRALP et al., 2022). Em conjunto, em monócitos CD16⁺ assim como em cDC, é observada elevada expressão de genes estimulados por interferon bem como genes HLA (YU et al., 2020). Curiosamente, esses monócitos inflamatórios foram detectados em todos os grupos estudados (fase pré-grave, fase grave, fase pós-grave, fase pós-leve e convalescentes da fase leve), indicando sua persistência responsiva para a infecção (YU et al., 2020). Embora a doença pareça atenuar a capacidade de fagocitose em monócitos em pacientes graves e críticos, esse quadro é mais proeminente no último (PEYNEAU et al., 2022).

Acerca das células NKs, a contagem absoluta demonstra uma queda significativa no número de NKs circulantes, porém com aumento de CD8⁺NKs, sem distinções entre indivíduos acometidos pelas formas leve, moderada e grave da COVID-19 (EKŞİOĞLU-DEMIRALP et al., 2022). Nestes, as NKs parecem estar mais ativadas, também expressando de forma mais acentuada o PD-L1, além de apresentarem um fenótipo exausto pela expressão da Proteína de Morte Celular Programada 1 (*Programmed Cell Death Protein 1* - PD-1) (VITTE et al., 2020; VIGÓN et al., 2021). Em estudo conduzido por Csordas et al. (2022), diferenças na coexpressão

de perforina⁺granzima B⁺ e na expressão de INF α e γ por NKs foram observadas em entre voluntários recuperados das formas leve e grave da COVID-19. Nestes, níveis de NK IFN γ ⁺ estavam mais elevados enquanto que NK IFN α ⁺ e NK perforina⁺granzima B⁺ foram mais acentuados no primeiro grupo (CSORDAS et al., 2022). Os níveis de basófilos, por sua vez, podem estar reduzidos na doença além de, aparentemente, sofrerem diminuição na expressão de CD294 (o que também ocorre em eosinófilos), um receptor de prostaglandina D2, e CD11b, este também diminuído em neutrófilos (VITTE et al., 2020). A redução de CD294 foi ainda mais evidente em pacientes graves (VITTE et al., 2020). Não obstante, a expressão de PD-L1 em basófilos e eosinófilos também foi mais acentuada em casos graves, se correlacionando positivamente com a gravidade da doença enquanto que neutrófilos CD11b e eosinófilos CD294 apresentaram correlação negativa com o referido grupo (VITTE et al., 2020). Sendo assim, possíveis alterações na frequência subpopulacional e de marcadores funcionais nos granulócitos parecem se intensificar em casos graves sugerindo a participação de componentes da imunidade inata no direcionamento de distintos perfis clínicos (VITTE et al., 2020).

2.5.2 Sistema imune adaptativo na COVID-19

Em consonância com a imunidade inata, a resposta adaptativa coordenada pelos linfócitos se apresenta como uma importante linha de defesa no qual, através de ações humorais e celulares, desempenham um papel protetivo de elevada especificidade (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 8ªed, 2015). Na infecção desencadeada pelo SARS-CoV-2, a frequência de linfócitos periféricos se mostra reduzida em pacientes apresentando as formas moderada e grave em comparação ao grupo leve (EKŞİOĞLU-DEMIRALP et al., 2022). Além disso, a linfopenia parece ser mais frequente em pessoas idosas, principalmente a partir de 80 anos (YU et al., 2020).

Investigações conduzidas por Ekşioğlu-Demiralp et al. (2022) revelaram diminuído número de células B circulantes durante a infecção pelo SARS-CoV-2. Porém, a presença de linfócitos B efetores podem ser consideravelmente mais elevados em casos graves (YU et al., 2020). Nestes, a resposta humoral, mensurada por linfócitos plasmáticos e B ativadas, de fato conseguiu ser mais robusta enquanto a responsividade celular, aferida via identificação de células T CD4⁺ e CD8⁺ efetoras, estava relativamente baixa (YU et al., 2020). Tendo em vista o papel da resposta celular no combate a infecção viral, Yu et al. (2020) sugerem que o resultado pode apontar para um parâmetro de progressão da doença através da chamada “infecção viral melhorada dependente de anticorpos”. Kaneko et al. (2020) levantam a hipótese de uma resposta humoral prejudicada associada à forma grave da COVID-19, na qual em pacientes que vieram

a óbito foi observada ausência do centro germinativo dos linfonodos torácicos e queda na frequência de células B Bcl6⁺ nos linfonodos e baço.

Em alguns indivíduos, anticorpos podem ser detectados ainda nos primeiros dias de sintomas ao contrário de uma parcela expressiva de infectados que desenvolve esse mediador humoral entre duas e três semanas (KOBLSCHKE et al., 2020; WANG et al., 2020). Nesse aspecto, ao avaliarem pacientes moderados, graves ou que vieram a óbito, Koblschke et al. (2020) revelaram correlação negativa entre os níveis de anticorpos neutralizantes e a carga viral sem haver, no entanto, diferenças significativas no nível platô entre os distintos grupos. Já Zhang B. et al. (2020) identificaram correspondência entre a concentração de IgG e a gravidade da COVID-19. Por outro lado, também é demonstrado elevados níveis de anticorpos neutralizantes (*neutralizing antibodies* - nAbs) contra as proteínas S e N, maior carga viral e capacidade mais atenuada de proporcionar o *clearance* patogênico em pacientes graves. Assim, é possível que uma exposição mais robusta e prolongada a antígenos virais possa contribuir com tais resultados (KOBLSCHKE et al., 2020; WANG et al., 2020). Já pessoas assintomáticas, menores níveis de IgG e maior durabilidade de RNA viral é visto comparado ao grupo sintomático. Adicionalmente, nos primeiros a taxa de redução de IgG bem como a frequência de soronegatividade durante a fase convalescente é maior (LONG et al., 2020).

Acerca dos linfócitos T, alterações são observadas durante a COVID-19 podendo haver variações a depender do quadro clínico (EKŞİOĞLU-DEMIRALP et al., 2022). Em contagem absoluta, Ekşioğlu-Demiralp et al. (2022) encontraram aumento de células T em pacientes apresentando a forma leve, enquanto em termos de frequência, indivíduos moderados e graves demonstraram redução em comparação ao grupo controle. Além disso, níveis mais acentuados de células T PD-1⁺ são encontrados em pacientes graves. Em conjunto, indivíduos com COVID-19 (sem distinção de grupos) podem apresentar níveis elevados de células T CD3⁺CD56⁺ (consideradas citotóxicas contra tumores e patógenos) (EKŞİOĞLU-DEMIRALP et al., 2022).

Acerca dos linfócitos T CD8⁺ na COVID-19, Ekşioğlu-Demiralp et al. (2022) revelaram aumento celular em pacientes leves ou mesmo redução em moderados e graves considerando a forma de mensuração realizada. Este último também manifestou níveis mais elevados de linfócitos T CD8⁺CD69⁺ além de CD8⁺CD28⁻, uma subpopulação de células T reguladoras (EKŞİOĞLU-DEMIRALP et al., 2022). Ademais, dois grupos de células T CD8⁺ de memória (Tm1 e Tm2) foram identificados, estando a classe Tm2 presente em elevadas proporções na fase grave e pós-grave. Curiosamente, análises diferenciais na expressão genética revelaram

que o grupo Tm2 era dotado de características de células T de memória de células tronco altamente proliferativas formadas recentemente durante a doença (YU et al., 2020).

Em consonância com as informações acima descritas, pesquisas desenvolvidas por Yu et al. (2020) durante a infecção e na fase de convalescência de casos leves demonstraram a presença de alguns grupos de linfócitos T CD8⁺ como *naive*, efetores, de memória e células T invariantes associadas a mucosa (*mucosal-associated invariant T cells* - MAIT), sendo o segundo mais atenuado em casos graves e pós-graves. Porém, diferentes pesquisas também explicitam resultados distintos acerca de linfócitos T CD8⁺ de memória efetora (T *effector memory* - Tem) em casos mais graves enquanto elevada presença de células T CD8⁺ de memória terminalmente diferenciadas (*Terminally Differentiated Effector Memory* - TEMRA) podem ser observadas (MAZZONI et al., 2020; VIGÓN et al., 2021).

Os linfócitos T CD4⁺ podem se mostrar reduzidos durante a fase aguda da COVID-19 sendo mais expressivo em pacientes moderados e graves. Nestes, a expressão de CD69⁺ parece estar mais acentuada nas citadas células sugerindo um quadro mais ativado nesse grupo clínico (EKŞİOĞLU-DEMIRALP et al., 2022). Além disso, uma robusta montagem responsiva em pacientes hospitalizados com um quadro moderado e grave é observada no qual se correlacionam negativamente com a carga viral (KOBLSCHKE et al., 2020). Nesse contexto, as proteínas virais S e M podem ser responsáveis por 78% das células T CD4⁺ reativas (KOBLSCHKE et al., 2020). Por outro lado, quatro grupos de CD4⁺ foram identificados durante a infecção e em fases de convalescência: *naive*, memória, efetores e regulatórias, sendo o terceiro menos frequente em todos os estágios da doença (YU et al., 2020).

Em quadros mais graves, o perfil Th1 parece estar prejudicado enquanto que a expansão de células T foliculares (T *follicular helper cells* - Tfh) direcionadas a um fenótipo Th2 e Th17 sugere uma resposta celular CD4⁺ não adequada em um quadro de infecção viral (FENOGLIO et al., 2021). De fato, Meckiff et al. (2020) sugerem que a infecção pelo SARS-CoV-2 pode conduzir a uma falha responsiva considerável de células Th1 polifuncionais bem com uma diminuída frequência de Th17 entre células T CD4⁺ reativas. Em pacientes hospitalizados também foi observado maior presença de células T foliculares citotóxicas (*cytotoxic follicular helper cells* - Tfh - CTL) durante o início da doença que se correlacionaram negativamente com os níveis de anticorpos IgG anti-S (MECKIFF et al., 2020).

Células T CD4⁺ parecem contribuir com a extensão da reposta humoral frente a infecção pelo SARS-CoV-2. Análises em pacientes que vieram a óbito revelam uma diminuída presença de células Tfh Bcl6⁺ que poderia contribuir com a prejudicada formação do centro germinativo nesses indivíduos (KANEKO et al., 2020). Estes resultados são de extrema relevância uma vez

que é bem estabelecido a importância dos linfócitos T CD4⁺ na síntese de anticorpos de alta afinidade e na mudança de classe de isotipo refletindo na correlação positiva entre tais células e os níveis de IgG encontradas em pacientes hospitalizados (KOBLSCHKE et al., 2020). Nestes, podem haver níveis mais elevados de células T CD4 citotóxicas (*cytotoxic CD4⁺ T cells* - CD4 - CTL) (MECKIFF et al., 2020).

Embora Fenoglio et al. (2021) tenham demonstrado níveis semelhantes de linfócitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) entre voluntários com COVID-19 grave e indivíduos saudáveis, Meckiff et al. (2020) revelaram que pacientes hospitalizados podem experimentar uma queda nos níveis de células T reguladoras e T foliculares reguladoras (*follicular regulatory T cells* - Tfr) circulantes comparados aqueles não hospitalizados. Neste estudo, uma correlação negativa entre Treg e CD4 - CTL foi revelada sugerindo que a deficiência nas primeiras contribuiria com uma resposta mais robusta da segunda (MECKIFF et al., 2020). Interessantemente, o mesmo trabalho conduzido por Fenoglio et al. (2021) mostra a expansão de células T CD8 com perfil regulador (CD8⁺CD28⁻CD127^{low}CD39⁺) sugerindo uma tentativa de controle inflamatório, mas que poderia interferir na velocidade de *clearance* viral em indivíduos com a forma grave da doença (WANG et al., 2020; FENOGLIO et al., 2021).

Por outro lado, Sadeghi et al. (2021) revelaram um desbalanço entre as subpopulações Treg (CD4⁺CD25⁺CD127⁻) e Th17 em pacientes submetidos a UTI no qual, comparado aqueles que apresentaram uma melhora no quadro clínico, indivíduos que vieram a óbito foram caracterizados por maior taxa entre Treg/Th17 bem como fatores associados e esses subtipos celulares (RORγt/FOXP3 e IL-17/IL-10), demonstrando uma importante participação dessas células no curso da doença.

De fato, modificações a nível de subpopulações de células T reguladoras parecem se relacionar a distintos perfis clínicos. Diante disso, pacientes que experienciaram formas mais graves da COVID-19 apresentaram níveis mais elevados de Treg (CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) IL-10⁺ (NEUMANN et al., 2020). De modo interessante, um importante estudo conduzido por Vick et al. (2021) revelou assinatura diferencial no compartimento de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺CD127⁻) em indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 comparado a outras doenças respiratórias. Além disso, pacientes acometidos pela forma crítica da COVID-19 apresentaram Tregs (CD4⁺CD25⁺CD127⁻FOXP3⁺) com fenótipo mais supressivo bem como com maior potencial de migração, resultados não encontrados em diferentes perfis clínicos de doenças respiratórias como influenza e Vírus Sincicial Respiratório (*Respiratory Syncytial Virus* - RSV) (VICK et al., 2021).

Diante do exposto, e considerando seu importante papel na modulação da resposta imune, o presente trabalho propôs comparar a frequência de linfócitos T reguladores ($CD3^+CD4^+CD25^+FOXP3^+$) e a expressão de marcadores importantes para a atuação dessas células entre grupos de voluntários não previamente infectados pelo SARS-CoV-2 e grupos de voluntários recuperados das formas leve e grave da COVID-19. Em conjunto, para o grupo de voluntários recuperados da forma leve da doença, foram realizadas análises comparativas dos parâmetros imunológicos entre aqueles que experienciaram um sintoma e aqueles que não se queixaram do mesmo sinal clínico durante a fase aguda. Estas análises, no entanto, não foram exploradas no grupo grave devido ao pequeno número de voluntários.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho compreendeu identificar linfócitos T reguladores ($CD3^+CD4^+CD25^+FOXP3^+$) bem como avaliar marcadores chave para sua atividade, em grupos de voluntários saudáveis e voluntários recuperados das formas leve e grave da COVID-19, na busca por biomarcadores que pudessem se correlacionar ao prognóstico da doença.

3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos englobaram os pontos abaixo elencados:

- ✓ Análise das características clínico-epidemiológicas dos voluntários recuperados da COVID-19;
- ✓ Reconhecimento de marcadores celulares relevantes bem como identificação de marcadores de gravidade na COVID-19 a partir da utilização de estímulos por peptídeos antigênicos do SARS-COV-2. Diante disso, objetivou-se:
 - Caracterizar fenotipicamente as células T reguladoras através da análise da expressão das proteínas CD3, CD4, CD25 e FOXP3;
 - Verificar a produção de citocinas de caráter pró-inflamatório (IL-17) e imunossupressor (IL-10 e LAP);
 - Caracterizar marcadores citotóxicos das células T reguladoras mediante análise de produção de perforina e granzima B;
 - Avaliar a expressão de receptores inibitórios PD-1 e CTLA-4 como ferramentas de modulação negativa pelas células T reguladoras;
 - Avaliar a expressão de enzimas envolvidas no metabolismo purinérgico representadas pelas CD39 e CD73.
 - Avaliar, no grupo de voluntários recuperados do quadro leve da doença, diferenças quanto a frequência de linfócitos T reguladores bem como a expressão de IL-10, IL-17, LAP, perforina, granzima B, PD-1, CTLA-4, CD39 e CD73 pela célula estudada entre voluntários que desenvolveram um determinado sintoma e voluntários que não experienciaram do mesmo sinal clínico durante a fase aguda da COVID-19.

METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1 Considerações Éticas

O presente estudo está inserido no projeto denominado “PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE NO PADRÃO DE RESPOSTAS PATOGÊNICAS OU SUPRESSORAS DESENCADEADA POR ANTÍGENOS PEPTÍDICOS EM PACIENTES COM COVID-19” o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Lauro Wanderley – CEP/HULW (Número do Parecer: 4.101.879 e CAAE:31354720.0.0000.5188) do Centro de Ciências da Saúde da UFPB (APÊNDICE 1).

4.2 Amostras Clínicas

Para o estudo, foram coletadas amostras de PBMCs provenientes de 24 voluntários distribuídos em 3 grupos. O recrutamento dos voluntários foi realizado entre os meses de maio de 2020 e maio de 2021, período que englobou o vírus em sua linhagem original, as variantes alfa e gama (detectadas pela primeira vez no 4º trimestre de 2020), finalizando poucos dias após a variante delta ser identificada no país (26 de abril de 2021) (ADAMOSKI, 2022; BRASIL, 2021d). Para o grupo controle (CTL, n = 8), foram incluídos voluntários saudáveis, assintomáticos nas últimas 10 semanas, sem enfermidades crônicas, que não faziam uso contínuo de medicamentos além de apresentarem exames sorológicos e de RT-qPCR negativos para a infecção pelo SARS-CoV-2. Voluntários recuperados da COVID-19 foram confirmados mediante prévio diagnóstico por RT-qPCR, durante a fase aguda bem como teste sorológico para IgG após a cura. Nesse contexto, o grupo leve (Leve Recuperado, n = 9) foi composto por voluntários recuperados da COVID-19, que manifestaram sinais e sintomas leves compatíveis com a infecção, não necessitando de internação. O grupo grave (Grave Recuperado, n = 7), por sua vez, foi caracterizado por voluntários anteriormente acometidos pela infecção por SARS-CoV-2, desenvolvendo sinais mais graves compatíveis com a COVID-19 e apresentando sintomas pulmonares que necessitaram de internação. Para fins epidemiológicos, a COVID-19 grave foi definida mediante sintomas de dispneia grave, taxa respiratória de 30 ou mais respirações por minuto, saturação de oxigênio no sangue de 93% ou menos, e infiltração em mais de 50% do pulmão (WU; MCGOOGAN, 2020).

Objetivando garantir que todos os voluntários inseridos nos grupos estudados não enfrentavam um quadro de reinfecção (para os grupos Recuperado) ou de uma infecção primária (para o grupo CTL), foram coletadas amostras da nasofaringe ou orofaringe, mediante *swab*, para posterior realização do diagnóstico molecular RT-qPCR. Também foi realizado

diagnóstico sorológico para a detecção de anticorpos IgG específicos ao SARS-CoV-2. Todos os voluntários apresentaram idade igual ou superior a 18 anos, não sendo previamente vacinados contra a infecção pelo SARS-CoV-2, não gestantes e não acometidos por problemas neurológicos (como síndrome de Guillain-Barré, Alzheimer, Parkinson, Esclerose Múltipla e Esclerose Lateral Amiotrófica - ELA). Os participantes da pesquisa foram informados sobre a importância da mesma bem como, via assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), participaram voluntariamente do projeto (APÊNDICE 2). Ademais, os voluntários preencheram um questionário clínico epidemiológico contendo dados gerais somados a informações acerca de sua saúde bem como aspectos clínicos e laboratoriais relacionados ao início da doença (APÊNDICE 3).

4.3 Ensaio de RT qPCR

A técnica de RT-qPCR foi realizada como descrito anteriormente (GUERRA-GOMES et al., 2021), em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Durante a coleta do sangue, amostras da nasofaringe ou orofaringe foram coletadas com o uso de swab para a extração e isolamento do RNA (QIAprep& Viral RNA UM Kit QIAGEN, USA). Este foi então amplificado através da técnica de RT-qPCR (SARS-CoV-2 N1+N2 Assay Kits - QIAGEN, USA) para a detecção do material genético do SARS-CoV-2 objetivando, assim, descartar um quadro de reinfecção em voluntários inseridos nos grupos leve e grave e confirmar a inserção dos voluntários no grupo controle.

4.4 Desenho e preparação do Pool de peptídeos do SARS-CoV-2

Nossas análises consistiram na busca dos alelos mais frequentes de HLA de classe I/II na população brasileira, excluindo os alelos de populações isoladas. Em seguida, realizamos análises de afinidade de ligação, predição de antigenicidade e dinâmica molecular peptídica entre MHC-I e II e proteínas do SARS-CoV-2. Assim, os peptídeos específicos do SARS-CoV-2 para CD4⁺ e CD8⁺ (Tabela 1), foram sintetizados (GenOne Biotechnologies, Rio de Janeiro, Brasil), liofilizados, e armazenados a -20 °C até o uso. Posteriormente, foram eluídos em H₂O (MiliQ) e agrupados (Pool CoV-2 o qual contém peptídeos da proteína *Spike* e não *Spike* / Pool *Spike* CoV-2 o qual contém apenas peptídeos da proteína *Spike*).

Tabela 1. Lista de peptídeos escolhidos no estudo.

		Nome	Peptídeos	Posição a.a.*	Fonte
Pool CoV-2	Pool Spike CoV-2	ORF1a	ILASFSASTSAFVET	476-490	Este estudo
		ORF1a	FLHFLPRVFSAVGNICYTP	2880- 2890	Este estudo
		ORF1b	FVDGVPFVVSTGYHFR	4726- 4741	Este estudo
		SPIKE_NT D	NIDGYFKIYSKHTPINLV	196-210	STEINHAGEN et al., 2021
		SPIKE_RB D	ATRFASVYAWNRKRI	344-358	STEINHAGEN et al., 2021
		SPIKE_S2	ALQIPFAMQMAYRFN	893-907	STEINHAGEN et al., 2021
		ORF3	KKRWQLALSKGVHVFV	66-80	Este estudo
		E	FYVYSRVKNLNSSRV	56-70	Este estudo
		M	LYLYALVYFLQSINFVRII M	114-123	Este estudo
		M	KEITVATSRTLSTYYK	166-180	Este estudo
		ORF8	FYSKWYIRVGARKSA	41-55	Este estudo

Fonte: Adaptado de CSORDAS et al., 2022. *a.a = aminoácidos.

Para os estudos de predição dos epítomos SARS-CoV-2 foram utilizadas as sequências proteicas derivadas das sequências brasileiras de SARS-CoV-2 depositadas no GenBank e no Banco de Dados de Epítomos Imunes e Recurso de Análise (*Immune Epitope Database and Analysis Resource* - IEDB). A predição do epítomo do SARS-CoV-2 para as células T CD4⁺ foi realizada, como relatado anteriormente, usando o algoritmo NetMHCIIpan 4.0 e a previsão de imunogenicidade de CD4⁺ (IEDB), (HLA-DRB*1:03:01; HLA-DRB*1:07:01; HLA-DRB*1:15:01; HLA-DRB*3:01:01; HLA-DRB*3:02:02; HLA-DR*4:01:01 e HLA-DRB*5:01:01). Sabendo que a população brasileira é extremamente heterogênea, tivemos o cuidado de adicionar HLA I e II mais frequentes nessas populações, além das populações HLA mais frequentes do mundo. A predição de epítomo do SARS-CoV-2 para células T CD8⁺ foi desenvolvida como relatado anteriormente, utilizando o algoritmo NetMHCpan4.0 (HLA-A* 01: 01; HLA-A* 02: 01; HLA-A* 11: 01; HLA-A* 24: 02; HLA-A* 68: 01; HLA-A* 23: 01; HLA-A* 26: 01; HLA-A* 30: 02; HLA-A* 31: 01; HLA-B* 07: 02; HLA-B* 51: 01; HLA-B* 35: 01; HLA-B* 44: 02; HLA-B* 35: 03; HLA-C* 05: 01; HLA-C* 07: 01 e HLA-C* 15: 02). O Processo de desenvolvimento dos polipeptídeos antigênicos de coronavírus da síndrome respiratória aguda grave e sua aplicação descrita acima está sob proteção patentearia (Número do processo: BR 10 2022 005518 1) do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (APÊNDICE 4).

4.5 Processamento de Amostras e Obtenção do Soro

Para a aquisição do soro dos voluntários, os tubos de coleta com as amostras foram mantidos à temperatura ambiente (TA) por, no mínimo, 1 hora para que houvesse a retração do coágulo. Em seguida, os tubos foram centrifugados à 1.500 rpm durante 5 minutos à TA e encaminhados para câmara de fluxo laminar, local onde o soro foi transferido para tubos eppendorfs de 1,5mL, estéreis e devidamente identificados. Por fim, o soro foi mantido por 24h à -20°C e, posteriormente, transferidos para um freezer -80°C, onde ficaram armazenados até a utilização para o teste sorológico.

4.6 Sorologia para Diagnóstico de Anticorpos IgG

O teste sorológico foi realizado utilizando o Kit Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG (EUROIMMUN a Perkin Elmer company – REF. El 2606-9601 G) em amostras sanguíneas dos voluntários inseridos em todos os grupos estudados. O teste foi realizado seguindo todas as orientações do fabricante, visando confirmar ou descartar a presença dos anticorpos contra o SARS-CoV-2 nas amostras coletadas.

4.7 Imunofluorescência para Análise de Células Reguladoras

Aproximadamente 25 mL de sangue periférico foram coletados em tubos à vácuo contendo anticoagulante heparina sódica para obtenção de PBMC, mediante separação por gradiente de densidade (Ficoll PaqueTMPlus - GE Healthcare, Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA). Inicialmente, uma diluição 1:1 do volume de sangue coletado com Solução Fosfato Salina (*Phosphate Buffered Saline* - PBS) foi realizada em tubos Falcon 50 mL estéreis. Em seguida, as amostras diluídas foram, cuidadosamente, inseridas sobre o Ficoll e posteriormente submetidas à centrifugação (40min, 2000rpm, 20°C). Com isso, o anel de PBMC foi coletado, lavado por 3 vezes com PBS e, em cada ciclo de lavagem, as amostras eram centrifugadas (10min, 1200rpm, 4°C) e o sobrenadante descartado. Na sequência, as células foram mantidas em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementadas com 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) e 10% Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma-Aldrich). Uma concentração de $2,5 \times 10^5$ células/poço foi utilizada em placas de 96 poços de fundo U e incubadas em 4 condições: **1.** células não estimuladas (meio); **2.** estimuladas com Pool Spike CoV-2 (1ug/poço); **3.** estimuladas com Pool CoV-2 (1ug/poço); **4.** estimuladas com Staphylococcal enterotoxin B (SEB) (1ug/poço) das *Staphylococcus aureus* (Sigma-Aldrich),

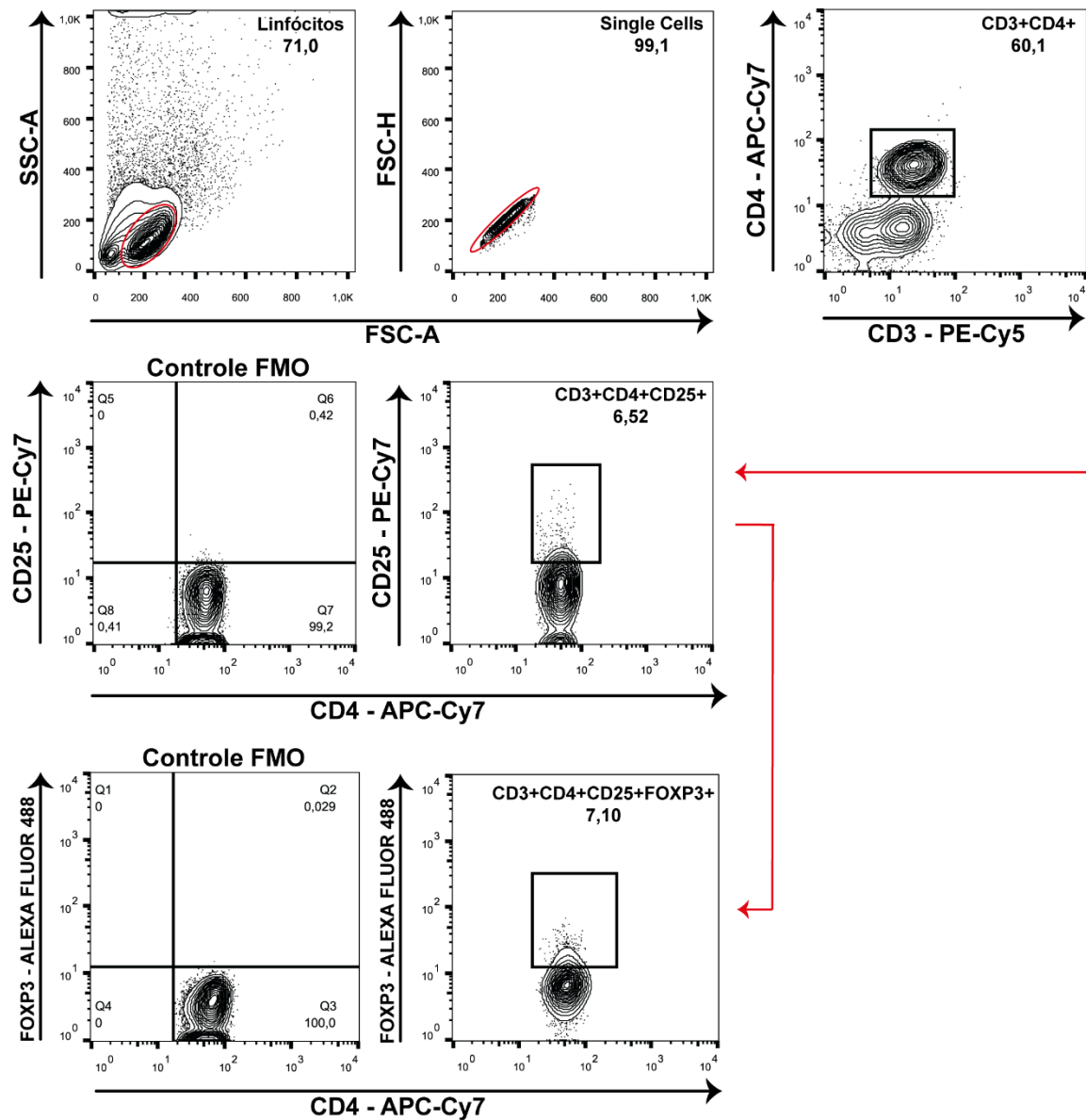
por 16 horas em estufa 5% CO₂ à 37°C. Em seguida, 10µL/poço de Brefeldina A (1mg/mL) - (Sigma Aldrich) - para marcação intracelular - foi adicionada e as amostras novamente incubadas em estufa 5% CO₂ à 37°C durante 4 horas. A Brefeldina A atua sobre a estrutura do complexo de Golgi impedindo, deste modo, que haja exportação de proteínas para o meio extracelular. Posteriormente, a placa foi retirada da estufa e centrifugada por 8 minutos (1300rpm, 4°C). O sobrenadante foi desprezado e as células suspensas por agitação. Em seguida, os anticorpos para estruturas de superfície (BD Biosciences, CA, USA), já diluídos conforme titulação padronizada na fase de padronização dos reagentes, num volume final de 40µL foram adicionados: anti-CD3-PE-Cy5 (clone UCHT1, isotipo. Mouse BALB/c IgG1, κ, cat. 555334, espécie. Mouse), anti-CD4-APC-Cy7 (clone RPA-T4, isotipo. Mouse IgG1, κ, cat. 557871, espécie. Mouse), anti-CD25-PE-Cy7 (clone M-A251, isotipo. Mouse BALB/c IgG1, κ, cat. 557741, espécie. Mouse), anti-CD39-PE (clone TU66, isotipo: Mouse IgG2b, κ, cat. 555464, espécie. Mouse), anti-CD73-APC (clone AD2, isotipo: Mouse IgG1, κ, cat. 560847, espécie. Mouse), anti-PD1-PE (clone MIH4, isotipo. Mouse IgG1, κ, cat. 557946, espécie. Mouse), anti-LAP-PE (clone TW4-2F8, isotipo. Mouse BALB/c IgG1, κ, cat. 562260, espécie. Mouse) e os anticorpos controle de isotipo IgG3-FITC (clone J606, isotipo. Mouse BALB/c IgG3, κ, cat. 555578, espécie. Mouse), IgG3-Alexa Fluor 647 (clone J606, isotipo. Mouse BALB/c IgG3, κ, cat. 560803, espécie. Mouse), IgG1-APC-H7 (clone MOPC-21, isotipo. Mouse IgG1, κ, cat. 560167, espécie. Mouse), IgG1-PE-Cy-7 (clone MOPC-21, isotipo. Mouse IgG1, κ, cat. 557872, espécie. Mouse) e IgG1-PE-Cy5 (clone MOPC-21, isotipo. Mouse IgG1, κ, cat. 555750, espécie. Mouse). Após adição dos anticorpos, a placa foi incubada a 4°C por 30 minutos ao abrigo da luz. Terminado o período de incubação, realizou-se uma lavagem das células adicionando 150 µL de PBS/ poço. A placa foi então centrifugada durante 8 minutos (1300rpm, 4°C), seguida da remoção do sobrenadante e na sequência, agitada para suspensão das células. Em seguida, 100µL de PBS e 100µL de solução de formaldeído 4% foram adicionados em cada poço de marcação extracelular por 20 min à TA sob abrigo da luz, para a fixação da marcação. Após remover a solução de fixação por centrifugação (8min, 1300rpm, 4°C) e lavar as células com 150µL de PBS, a permeabilização celular foi realizada, incubando as células por 10 minutos com *Permeabilization Buffer* (PB) (0,5% BSA, w/v e 0,5% saponina, w/v, em PBS) à TA. Após o processo, a placa foi centrifugada durante 8 minutos (1300rpm, 4°C), o sobrenadante desprezado e as células ressuspensas. Em seguida, 40µL da solução de anticorpos intracelulares (BD Biosciences, CA, USA) adequadamente diluídos em solução de PB foi adicionada aos poços: anti-Perforina- Alexa Fluor 647 (clone δG9, isotipo. Mouse

BALB/c IgG2b, κ , cat. 563576, espécie. Mouse), anti-Granzima B-PE (clone GB11, isotipo. Mouse BALB/c IgG1, κ , cat. 561142, espécie. Mouse), anti-CTLA-4-PE (clone BNI3, isotipo. Mouse BALB/c IgG2a, κ , cat. 555853, espécie. Mouse), anti-IL10-APC (clone JES3-19F1, isotipo. Rat IgG2a, κ , cat. 554707, espécie. Rat), anti-IL-17-PE (clone SCPL1362, isotipo. Mouse IgG1, κ , cat. 560436, espécie. Mouse), anti-FOXP3-Alexa Fluor 488 (clone 236A/E7, isotipo. Mouse BALB/c IgG1, κ , cat. 561181, espécie. Mouse) e os anticorpos controle de isotipo IgG1-PE (clone MOPC-21, isotipo. Mouse IgG1, κ , cat. 559320, espécie. Mouse). As amostras foram, então, incubadas por 45 minutos à TA. Após este período, 150 μ L/poço de PB foi adicionada, a placa foi centrifugada durante 8 minutos (1300rpm, 4°C) e o sobrenadante desprezado. Posteriormente, 200 μ L/poço de solução Wash B (PBS/BSA) foi adicionada. Por fim, o volume final de 200 μ L/poço de solução contendo as células marcadas foi transferido para tubos próprios para leitura no citômetro de fluxo FACS CANTO II (BD Biosciences). As células foram mantidas a 4°C, ao abrigo da luz para que as fluorescências não fossem perdidas até o momento da leitura.

4.8 Análise de dados por citometria de fluxo

O limite para a posição dos quadrantes foi baseado na utilização de controles negativo (células), de isotipo e *Fluorescence Minus One* (FMO), quando apropriado. Para a caracterização dos linfócitos T Reguladores e a análise de expressão de marcadores imunológicos pelas células em estudo, foram associados 5 ou 6 fluorocromos conjugados a anticorpos específicos para os parâmetros de interesse. Quatro diferentes fluorocromos, anti-CD3 PE-Cy5, anti-CD4 APC-Cy7, anti-CD25 PE-Cy7 e anti-FOXP3 Alexa Fluor 488 foram usados para a caracterização das células T Reguladoras (CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺). A figura 5 explicita a estratégia de análise utilizada para a caracterização dos linfócitos T Reguladores. Inicialmente selecionamos a região correspondente aos linfócitos totais mediante os parâmetros tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) seguida pela identificação das *singles cells* (FSC-A x FSC-H). Em seguida, linfócitos T CD3⁺CD4⁺ foram identificados e, dentro dessa população, foram selecionadas as células CD25⁺. Na sequência, os linfócitos T CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ foram revelados.

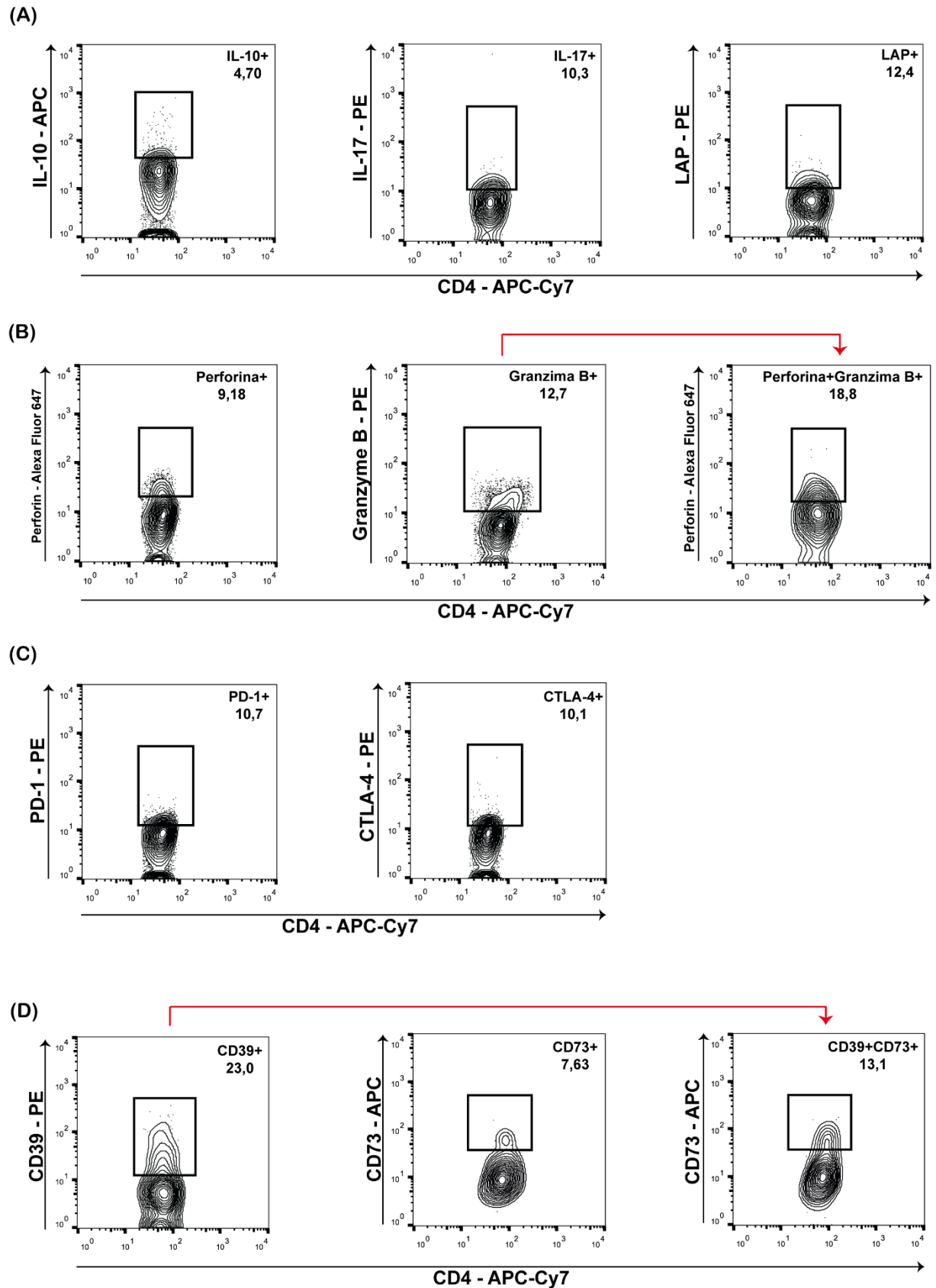
Figura 5. Estratégia de análise para a seleção de linfócitos T Reguladores.



Fonte: de Sousa Palmeira et al., 2022.

Dois outros fluorocromos (PE e APC/ Alexa Fluor 647) foram utilizados para a análise da expressão de IL-10, IL-17, LAP, Perforina, Granzima B, PD-1, CTLA-4, CD39 e CD73 pela célula estudada no presente trabalho. Sendo assim, após a identificação dos linfócitos T Reguladores, a frequência destas expressando os marcadores supracitados foram exploradas (Figura 6). Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos da companhia BD Biosciences (CA, USA).

Figura 6. Estratégia de análise para a seleção de linfócitos T Reguladores expressando os marcadores de interesse.



Fonte: de Sousa Palmeira et al., 2022.

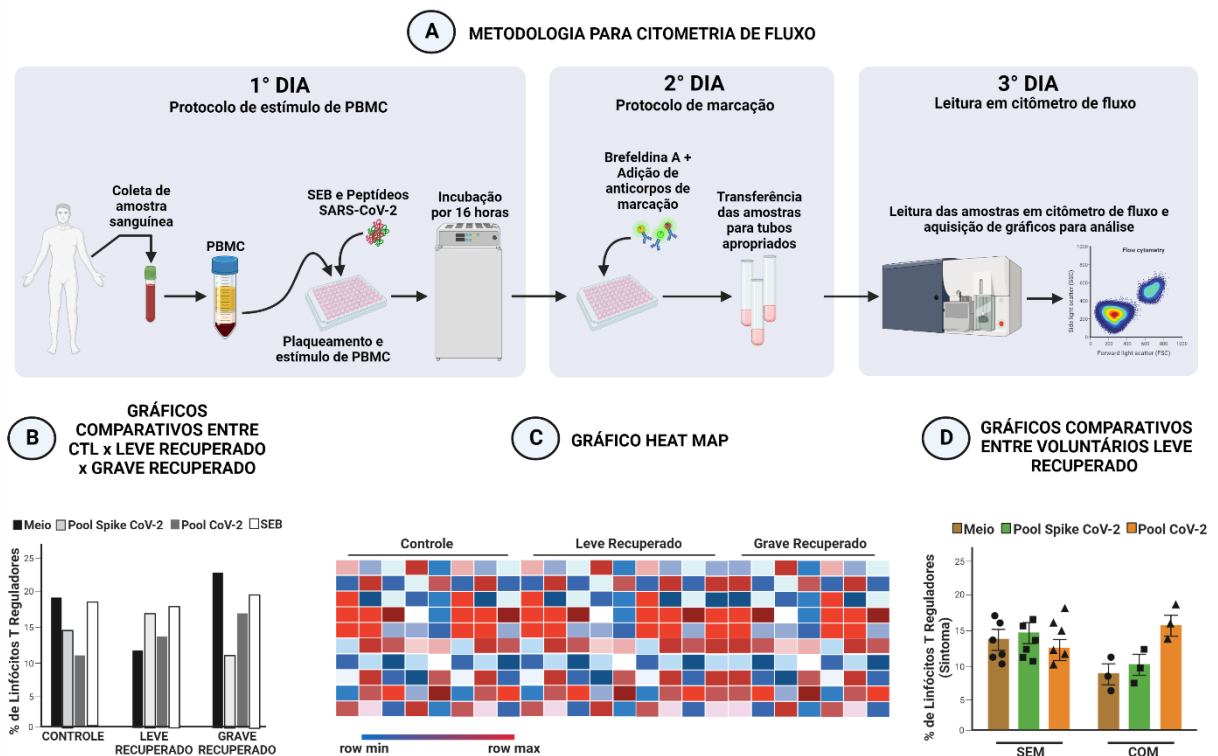
4.9 Aquisição e Análise dos dados por Citometria de Fluxo

As amostras celulares previamente marcadas com os anticorpos monoclonais fluorescentes acima revelados foram adquiridas em citômetro de fluxo modelo FACS CANTO II (BD Biosciences). Durante a aquisição dos dados foram coletados pelo menos 70.000 eventos (células)/poço sendo, os mesmos, analisados utilizando o software *Flowjo* v.10.8.1 (BD, Ashland - EUA).

4.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism versão 8.4.3. O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi realizado. Para a comparação de múltiplos grupos, os testes *two-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) e *one-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn) foi utilizado onde apropriado. Para análises comparativas entre dois grupos, teste t de Student ou Mann-Whitney foram usados onde apropriado. Para as análises comparativas dos dados imunológicos entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram um determinado sintoma e voluntários do mesmo grupo que não desenvolveram do mesmo sintoma durante a fase aguda da COVID-19, os seguintes sinais clínicos foram considerados: dispneia, dor de garganta, obstrução nasal, mialgia, artralgia, fadiga, diarreia, anosmia e ageusia. Para estas análises, foram utilizados os testes *one-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey ou Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn, onde apropriado. Os resultados foram mostrados como média $\pm$ erro padrão da média (*Standard Error of the Mean* - SEM). O intervalo de confiança foi de 95% e os valores foram considerados significativos quando $p < 0.05$. Para criar o *heat map* acerca dos marcadores imunológicos analisados, foi utilizado o software Morpheus no qual foi ajustado para o Z-score (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>). A figura 7A traz um esquema resumido acerca do protocolo de citometria de fluxo enquanto a figura 7B-7D explicita as análises realizadas no presente trabalho.

Figura 7. Resumo do protocolo de citometria de fluxo e das análises realizadas nos grupos inseridos no estudo.



Legenda: (A) 1º dia - PBMCs foram coletadas de voluntários não infectados pelo SARS-CoV-2 (Controle - CTL, n = 8) e voluntários recuperados das formas leve (Leve Recuperado, n = 9) e grave (Grave Recuperado, n = 7) da COVID-19, formando os grupos do estudo. As amostras foram incubadas por 16 horas sob 4 condições (subgrupos): não estimuladas (meio) ou estimuladas com peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2 ou SEB. PBMCs não estimuladas e estimuladas com SEB foram usadas como controles negativo e positivo, respectivamente. 2º dia - Na sequência, a Brefeldina A foi adicionada às amostras que foram incubadas por mais 4 horas. Posteriormente, anticorpos monoclonais para identificação das proteínas extracelulares e intracelulares de interesse foram adicionados e as amostras foram transferidas para tubos apropriados para leitura em citômetro de fluxo. 3º dia - A leitura das amostras em citômetro de fluxo foi realizada seguida, em dias posteriores, pela análise de dados no software *Flowjo*. (B) comparação dos parâmetros imunológicos entre os grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado; (C) dados oriundos das análises no *Flowjo* foram convertidos em gráficos *heat map*; (D) comparação dos parâmetros imunológicos entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não certos sintomas (os sintomas foram avaliados isoladamente). **Fonte:** de Sousa Palmeira et al., 2022. Criado com BioRender.com

RESULTADOS

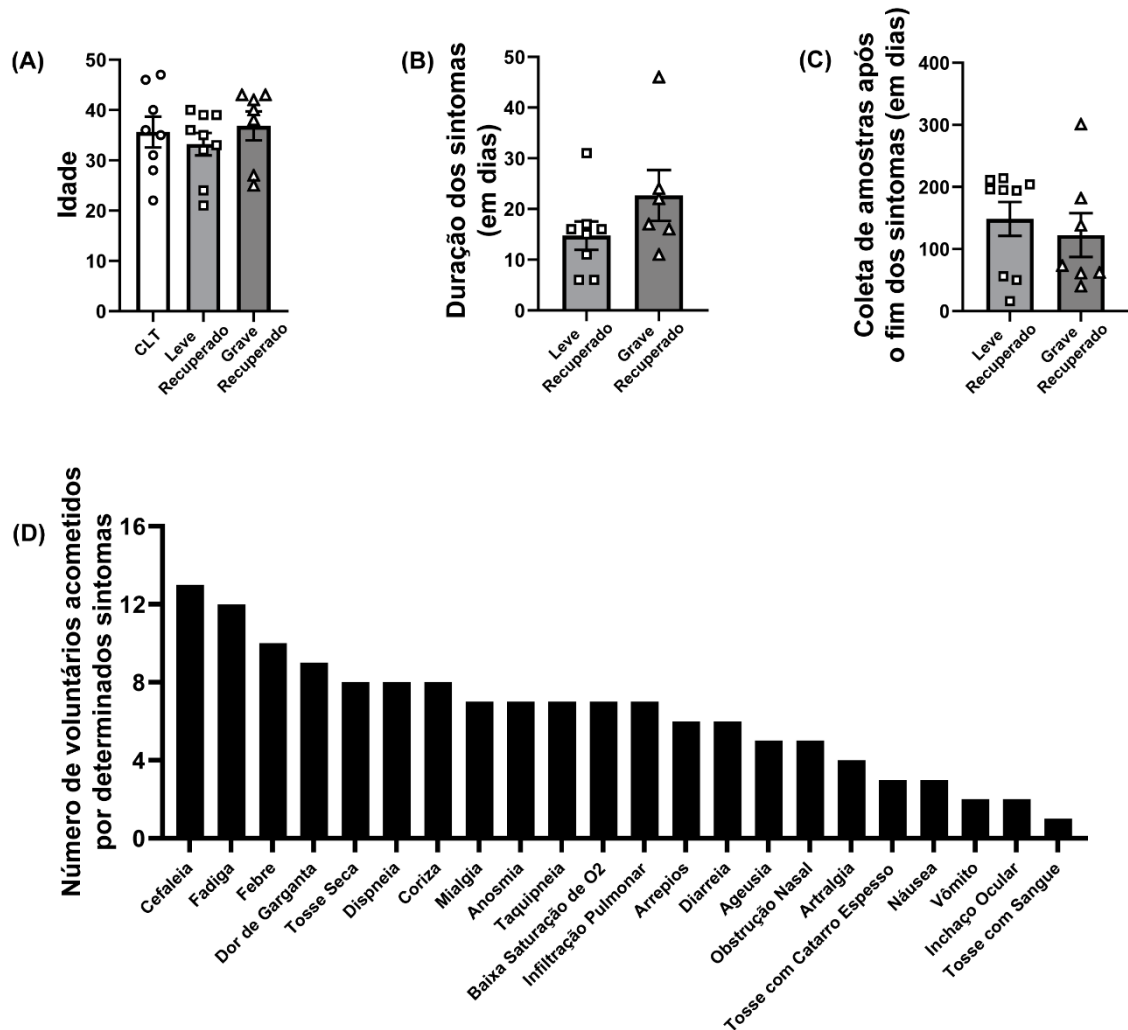
5. RESULTADOS

5.1 Análises demográficas e clínicas dos voluntários inseridos nos grupos CTL, Leve Recuperado, Grave Recuperado.

Para o presente estudo, um total de 24 voluntários distribuídos em 3 grupos foram recrutados. Para o grupo CTL, foram inscritos 8 voluntários, sendo 4 homens e 4 mulheres com média de idade de 35,62 ($\pm 8,63$). O grupo Leve Recuperado foi composto por 4 mulheres e 5 homens com média de idade de 33,22 ($\pm 6,70$). Por fim, do grupo Grave Recuperado participaram 7 voluntários com uma distribuição de 3 e 4 componentes do sexo feminino e masculino, respectivamente. A idade média para o grupo foi de 36,85 ($\pm 7,64$) (Tabela 2). Diferenças significativas na idade não foram encontradas entre os grupos estudados (Figura 8A).

A tabela 2 explicita a média de dias acerca da duração dos sintomas em ambos os grupos recuperados. Nesse contexto, o grupo Leve Recuperado apresentou uma média de duração de sinais clínicos de 14,75 ($\pm 7,92$) enquanto que o grupo Grave Recuperado possuiu uma média de 22,66 ($\pm 12,32$). A tabela 2 também expõe a média de dias cujas amostras foram coletadas após o fim dos sintomas. Os grupos Leve Recuperado e Grave Recuperado apresentaram uma média de 148,44 ($\pm 81,83$) e 122,42 ($\pm 93,40$), respectivamente. Ainda quanto ao tempo de coleta, observa-se a presença de dois grupos com distribuição mais homogênea em Leve Recuperado enquanto que Grave Recuperado revelou uma distribuição mais heterogênea (Figura 8C). Perfil heterogêneo também foi observado quanto à duração dos sintomas em ambos os grupos Recuperado (Figura 8B). Não foram observados resultados estatísticos significativos quanto aos dados explicitados (Figura 8B e 8C).

Figura 8. Dados demográficos – (A) idade - e clínicos – (B) Duração de sintomas, (C) Tempo de coleta de amostras e (D) Prevalência de sintomas.



Legenda: PBMCs foram coletadas de voluntários não infectados pelo SARS-CoV-2 (Controle - CTL, n = 8) e voluntários recuperados das formas leve (Leve Recuperado, n = 9) e grave (Grave Recuperado, n = 7) da COVID-19, formando os grupos do estudo. Os símbolos $\circ$, $\square$ e Δ representam, respectivamente, voluntários componentes dos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado. 1) Para o grupo Grave Recuperado, um voluntário não soube informar a duração dos sintomas fornecendo, portanto, um intervalo entre os meses de maio e junho de 2020; 2) para o grupo Leve Recuperado, um voluntário não soube informar a duração dos sintomas fornecendo um intervalo entre os meses de abril e junho de 2020. Nesse contexto, os dados referentes às observações 1 e 2 não foram inseridas na figura 8B; 3) para os grupos Leve Recuperado e Grave Recuperado, respectivamente, dois voluntários e um voluntário não recordam o dia exato, mas apenas o mês/ano do fim dos sintomas. Sendo assim, foi realizado um cálculo aproximado do intervalo entre o fim dos sintomas e a coleta de amostras sendo, os resultados, inseridos na figura 8C. 4) Um dos voluntários do grupo Grave Recuperado foi infectado duas vezes em um intervalo de 68 dias (contados do fim dos sintomas da primeira infecção até o início dos sintomas referentes à segunda infecção). Portanto, as informações inseridas nas figuras 8B e 8C são referentes à última infecção.

Múltiplos grupos foram comparados mediante análises estatísticas *one-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn) onde apropriado. Análises comparativas entre dois grupos foram realizadas mediante teste t de

Student ou Mann-Whitney onde apropriado. As barras de erro nas figuras 8A-8C mostram erro padrão da média (SEM) para cada subgrupo. **Fonte:** de Sousa Palmeira et al., 2022.

Por fim, todos os voluntários recrutados responderam a um questionário clínico. Entre os 16 indivíduos previamente acometidos por infecção pelo SARS-CoV-2, cefaleia, fadiga e febre foram os sintomas mais prevalentes (Figura 8D). Dentro do grupo Leve Recuperado, cefaleia, fadiga e coriza foram mais expressivas enquanto que todos os voluntários Grave Recuperado experienciaram cefaleia, baixa saturação de oxigênio e infiltração pulmonar seguido de fadiga, febre e taquipneia. Não foram observadas comorbidades no grupo controle enquanto que a obesidade foi a comorbidade prevalente nos grupos Recuperado. A tabela 2 detalha a distribuição de sinais e sintomas experienciados durante a fase ativa da COVID-19 além das comorbidades relatadas pelos voluntários componentes dos grupos Leve e Grave Recuperado.

Tabela 2. Aspectos demográficos e clínicos de voluntários inseridos nos grupos Controle (CTL), Leve Recuperado e Grave Recuperado.

Parâmetros	Total de Voluntários		
	Controle	Leve Recuperado	Grave Recuperado
Total de Voluntários	8	9	7
Gênero – F ⁺ /M ⁺	4F/4M	4F/5M	3F/4M
Média de Idade (DP [#])	35,62(±8,63)	33,22 (±6,70)	36,85 (±7,64)
Tempo de Coleta (dias) após o fim dos sintomas	X	148,44 (±81,83)	122,42 (±93,40)
Média (dias) de duração de sintomas (DP [#])	X	14,75 (±7,92)	22,66 (±12,32)
Sinais e Sintomas			
Cefaleia (%)	X	6 (66,66%)	7 (100%)
Fadiga (%)	X	6 (66,66%)	6 (87,71%)
Febre (%)	X	4 (44,44%)	6 (87,71%)
Dor de Garganta (%)	X	4 (44,44%)	5 (71,42%)
Tosse Seca (%)	X	4 (44,44%)	4 (57,14%)
Dispneia (%)	X	3 (33,33%)	5 (71,42%)
Coriza (%)	X	6 (66,66%)	2 (28,57%)
Mialgia (%)	X	3 (33,33%)	4 (57,14%)
Arrepios (%)	X	3 (33,33%)	3 (42,85%)
Anosmia (%)	X	3 (33,33%)	4 (57,14%)
Taquipneia (%)	X	1 (11,11%)	6 (87,71%)
Baixa Saturação de O ₂ (%)	X	0 (0%)	7 (100%)
Infiltração Pulmonar (%)	X	0 (0%)	7 (100%)
Ageusia (%)	X	2 (22,22%)	3 (42,85%)
Obstrução Nasal (%)	X	3 (33,33%)	2 (28,57%)
Diarreia (%)	X	3 (33,33%)	3 (42,85%)
Artralgia (%)	X	2 (22,22%)	2 (28,57%)
Tosse com Catarro Espesso (%)	X	2 (22,22%)	1 (14,28%)
Náusea (%)	X	1 (11,11%)	2 (28,57%)
Vômito (%)	X	1 (11,11%)	1 (14,28%)
Inchaço Ocular (%)	X	0 (0%)	2 (28,57%)
Tosse com Sangue (%)	X	0 (0%)	1 (14,28%)
Comorbidades			
Hipertensão (%)	X	0 (0%)	2 (28,57%)
Obesidade (%)	X	4 (44,44%)	5 (71,42%)
Asma (%)	X	0 (0%)	1 (14,28%)

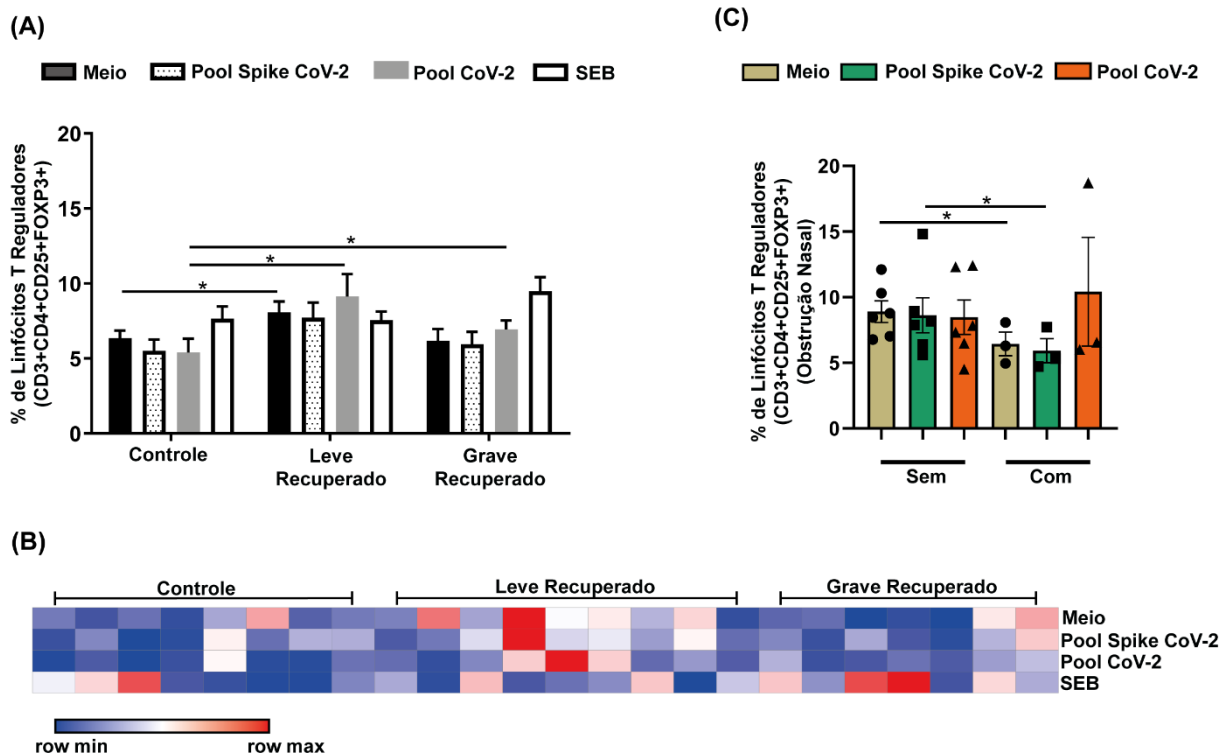
⁺F = Feminino, ⁺M = Masculino; [#]DP = Desvio Padrão. **Fonte:** de Sousa Palmeira *et al.*, 2022.

5.2 Frequência de linfócitos T Reguladores em PBMCs de voluntários inseridos nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado.

A análise em PBMCs de voluntários recuperados da COVID-19 revela que em amostras não estimuladas, comparado ao grupo CTL, houve maior frequência de células T reguladoras em Leve Recuperado. Neste, assim como em Grave Recuperado, PBMCs estimuladas com Pool CoV-2 apresentaram níveis mais elevados de células T reguladoras em comparação ao CTL (Figura 9A). Também foram realizadas análises comparativas entre a frequência de Treg e voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não os seguintes sintomas durante a fase aguda da COVID-19: dispneia, mialgia, dor de garganta, artralgia, fadiga, obstrução nasal,

diarreia, anosmia e ageusia. Com isso, foi observado que em voluntários não acometidos por obstrução nasal houve níveis mais elevados de Tregs em PBMCs não estimuladas e estimuladas com Pool Spike CoV-2 comparado a voluntários com o sintoma (Figura 9C). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas relacionadas aos demais sintomas citados (dados não mostrados).

Figura 9. Frequência de linfócitos T Reguladores em sangue periférico de voluntários.



Legenda: PBMCs foram coletadas de voluntários não infectados pelo SARS-CoV-2 (Controle - CTL, n = 8) e voluntários recuperados das formas leve (Leve Recuperado, n = 9) e grave (Grave Recuperado, n = 7) da COVID-19, formando os grupos do estudo. As amostras foram incubadas por 20 horas sob 4 condições (subgrupos): não estimuladas (meio) ou estimuladas com peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2 ou SEB. PBMCs não estimuladas e estimuladas com SEB foram usadas como controles negativo e positivo, respectivamente. **(A)** Frequência de linfócitos T Reguladores em CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado. **(B)** Heat Map da frequência de linfócitos T Reguladores dos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado com base nas análises de citometria de fluxo. Cada linha indica a condição em que as PBMCs foram submetidas (mostradas à direita). Cada coluna indica um voluntário inserido no estudo. **(C)** Comparação da frequência de linfócitos T reguladores entre voluntários Leve Recuperado acometidos ou não por obstrução nasal durante a fase aguda da COVID-19. Os símbolos ●, ■ e ▲ representam cada voluntário Leve Recuperado cujas amostras foram inseridas nas condições meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2, respectivamente.

Múltiplos grupos foram comparados mediante análises estatísticas *two-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) e *one-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn) onde apropriado. As barras de erro mostram erro padrão da média (SEM) para cada subgrupo. As linhas horizontais acima das barras

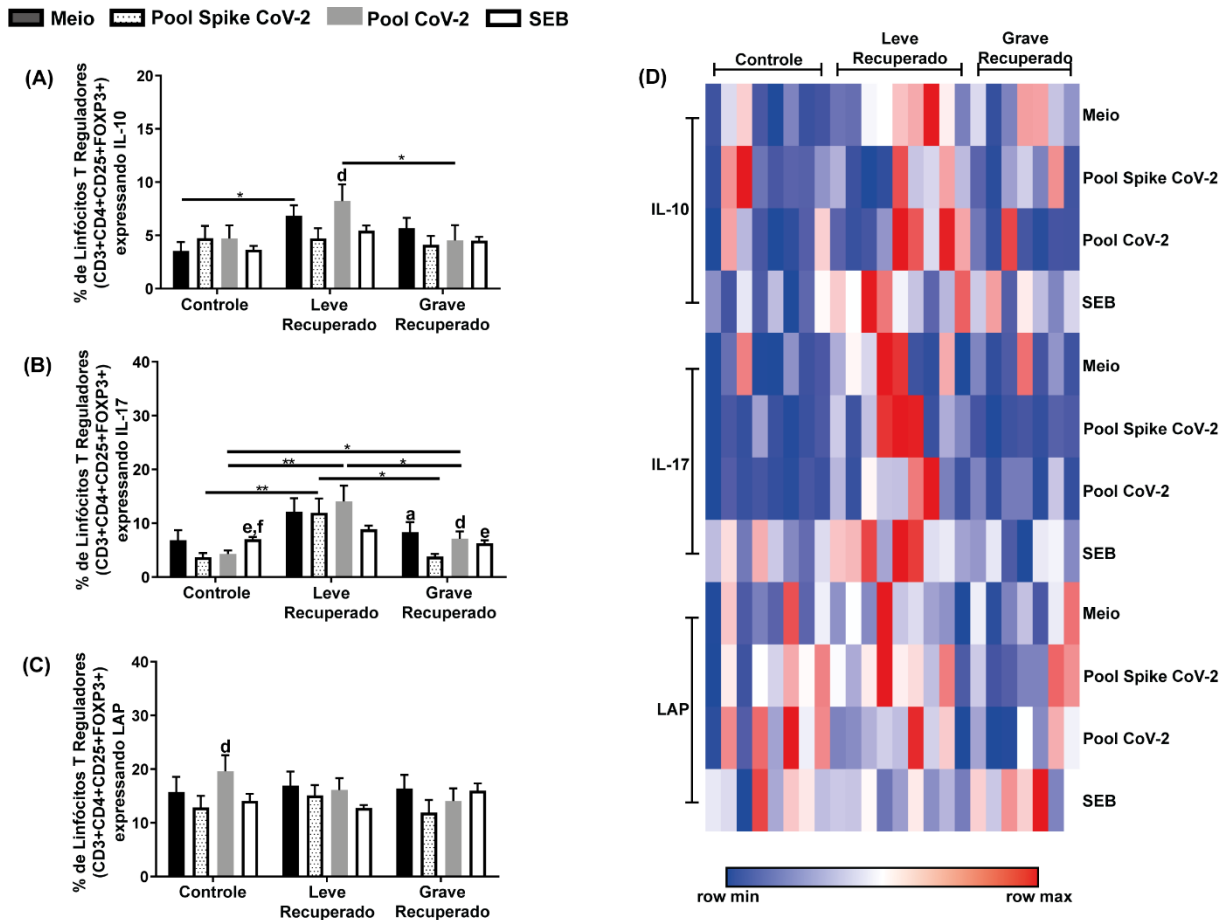
identificam diferenças significativas dos mesmos subgrupos entre grupos diferentes. * $p < 0,05$. SEB, Staphylococcal enterotoxin B. **Fonte:** de Sousa Palmeira et al., 2022.

5.3 Expressão de IL-10, IL-17 e LAP pelos linfócitos T Reguladores em PBMCs de voluntários inseridos nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado.

A expressão de citocinas pelos linfócitos T Reguladores também foi avaliada. Em amostras Leve Recuperado não estimuladas foram observados níveis mais elevados de células T Reguladoras produtoras de IL-10 em comparação ao CTL (Figura 10A). Além disso, em PBMCs estimuladas com Pool CoV-2, a frequência de $CD3^+CD4^+CD25^+FOXP3^+IL-10^+$ foi menor em Grave Recuperado comparado ao Leve Recuperado (Figura 10A). Neste, o estímulo Pool CoV-2 induziu a uma maior frequência de Treg IL-10⁺ em comparação com as amostras submetidas ao Pool Spike CoV-2 (Figura 10A).

Curiosamente, comparado com CTL e Grave Recuperado, os dados revelaram níveis elevados de Treg IL-17⁺ em PBMCs de Leve Recuperado estimuladas com peptídeos relacionados ao SARS-CoV-2 (Figura 10B). No entanto, em Grave Recuperado também houve maior expressão de IL-17 pelas Treg comparado ao CTL em amostras estimuladas com Pool CoV-2 (Figura 10B). Em conjunto, amostras CTL incubadas com SEB apresentaram maior frequência de Treg IL-17⁺ que PBMC incubadas com peptídeos relacionados ao SARS-CoV-2 (Figura 10B). Por outro lado, em Grave Recuperado, Pool Spike CoV-2 reduziu a expressão da IL-17 em Tregs (Figura 10B). Estatisticamente, a expressão de LAP pelas Treg não diferiu entre os grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado (Figura 10C). No entanto, com o estímulo Pool CoV-2, houveram níveis de Treg LAP⁺ mais acentuados em comparação com as amostras estimuladas com Pool Spike CoV-2 no grupo CTL (Figura 10C).

Figura 10. Frequência de linfócitos T Reguladores expressando IL-10, IL-17 e LAP em sangue periférico de voluntários.



Legenda: PBMCs foram coletadas de voluntários não infectados pelo SARS-CoV-2 (Controle - CTL, $n = 8$) e voluntários recuperados das formas leve (Leve Recuperado, $n = 9$) e grave (Grave Recuperado, $n = 7$) da COVID-19, formando os grupos do estudo. As amostras foram incubadas por 20 horas sob 4 condições (subgrupos): não estimuladas (meio) ou estimuladas com peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2 ou SEB. PBMC não estimuladas e estimuladas com SEB foram usadas como controles negativo e positivo, respectivamente. **(A)** Frequência de linfócitos T Reguladores que expressam IL-10 em CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado. **(B)** Frequência de linfócitos T Reguladores que expressam IL-17 em CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado. **(C)** Frequência de linfócitos T Reguladores que expressam LAP em CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado. **(D)** Heat Map da frequência de linfócitos T Reguladores expressando IL-10, IL-17 ou LAP nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado com base nas análises de citometria de fluxo. Cada linha indica a condição em que as PBMC foram submetidas (mostradas à direita). Cada coluna indica um voluntário inserido no estudo. Cada sequência de 4 linhas indica um parâmetro imunológico analisado (mostrados à esquerda).

Múltiplos grupos foram comparados mediante análises estatísticas *two-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) e *one-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn) onde apropriado. Os símbolos representados por letras minúsculas representam diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre as condições dentro de cada grupo: **a** (Meio x Pool Spike CoV-2), **d** (Pool Spike CoV-2 x Pool CoV-2), **e** (Pool Spike CoV-2 x SEB), **f** (Pool CoV-2 x SEB). As barras de erro mostram erro padrão da média (SEM) para cada subgrupo. As linhas horizontais acima das barras identificam diferenças

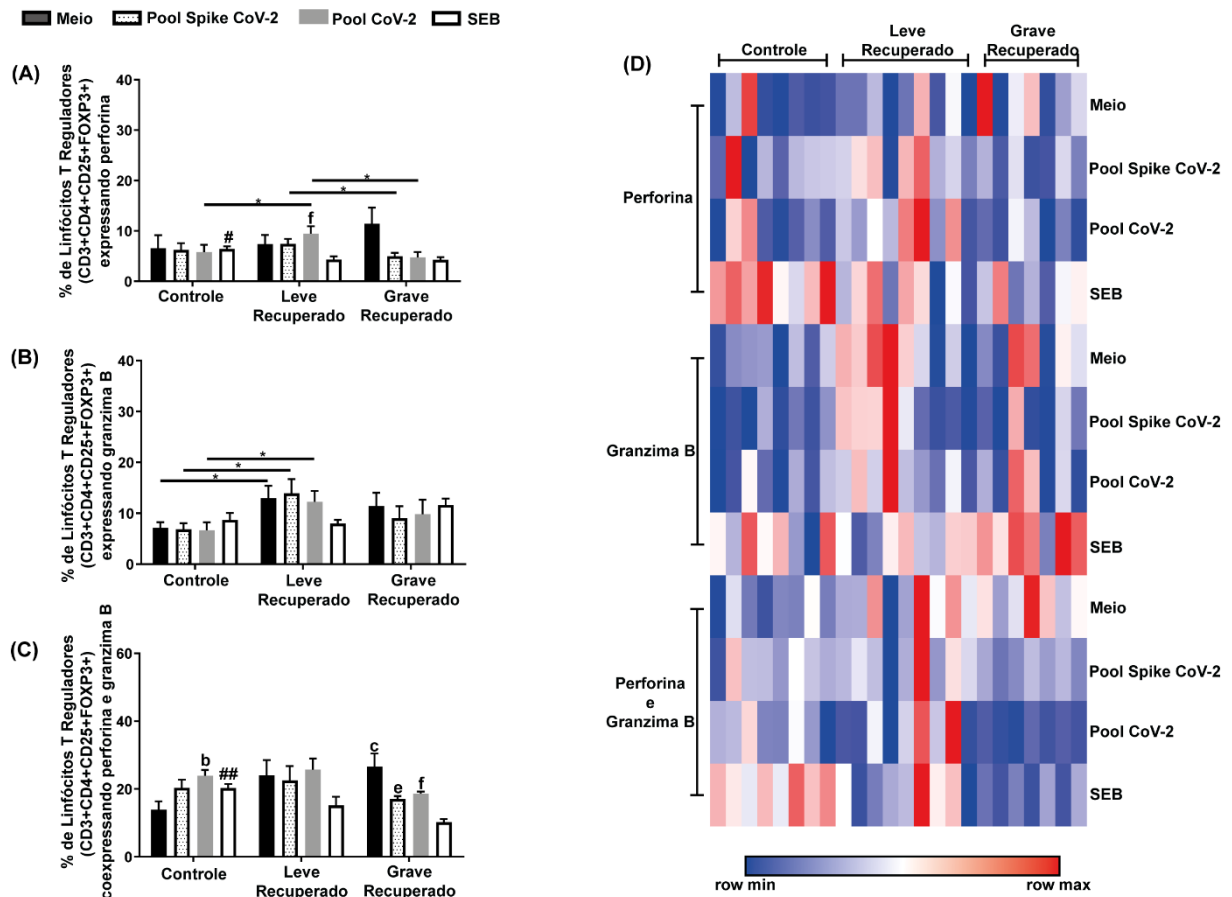
significativas dos mesmos subgrupos entre grupos diferentes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. SEB, Staphylococcal enterotoxin B. **Fonte:** de Sousa Palmeira et al., 2022.

5.4 Expressão de perforina e granzima B pelos linfócitos T Reguladores em PBMCs de voluntários inseridos nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado

A produção de grânulos citotóxicos pelas células T reguladoras também foi analisada no presente estudo. Acerca da perforina, Tregs de amostras estimuladas com Pool CoV-2 revelaram maior expressão em Leve Recuperado em comparação aos demais grupos (Figura 11A). Por outro lado, em estímulo Pool Spike CoV-2, Tregs do grupo Leve Recuperado produziram mais perforina em comparação com Grave Recuperado (Figura 11A). PBMCs do grupo CTL incubados com SEB apresentaram níveis mais elevados de Treg perforina⁺ que o Grave Recuperado (Figura 11A). Finalmente, em amostras Leve Recuperado estimuladas com Pool CoV-2, houve maior nível de células T reguladoras produtoras de perforina que em PBMCs estimuladas com SEB (Figura 11A).

Também foram encontrados níveis elevados de Tregs produtoras de granzima B no grupo Leve Recuperado comparado ao CTL em amostras não estimuladas ou estimuladas com peptídeos relacionados ao SARS-CoV-2 (Figura 11B). Ao analisarmos a coexpressão perforina⁺granzima B⁺ nas Tregs observou-se que, sob estímulo SEB, Tregs do grupo CTL apresentaram níveis superiores ao Grave Recuperado (Figura 11C). Ainda referente ao grupo CTL, peptídeos Pool CoV-2 induziram maior frequência de Tregs perforin⁺granzima B⁺ em comparação com amostras não estimuladas, enquanto em Grave Recuperado, amostras incubadas com SEB apresentaram menores níveis de Tregs perforin⁺granzima B⁺ do que as outras condições (Figura 11C).

Figura 11. Frequência de linfócitos T Reguladores expressando perforina e granzima B em sangue periférico de voluntários.



Legenda: PBMCs foram coletadas de voluntários não infectados pelo SARS-CoV-2 (Controle - CTL, n = 8) e voluntários recuperados das formas leve (Leve Recuperado, n = 9) e grave (Grave Recuperado, n = 7) da COVID-19, formando os grupos do estudo. As amostras foram incubadas por 20 horas sob 4 condições (subgrupos): não estimuladas (meio) ou estimuladas com peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2 ou SEB. PBMCs não estimuladas e estimuladas com SEB foram usadas como controles negativo e positivo, respectivamente. **(A)** Frequência de linfócitos T Reguladores que expressam perforina em CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado. **(B)** Frequência de linfócitos T Reguladores que expressam granzima B em CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado. **(C)** Frequência de linfócitos T Reguladores que coexpressam perforina e granzima B em CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado. **(D)** *Heat Map* da frequência de linfócitos T Reguladores expressando ou coexpressando perforina e granzima B nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado com base nas análises de citometria de fluxo. Cada linha indica a condição em que as PBMCs foram submetidas (mostradas à direita). Cada coluna indica um voluntário inserido no estudo. Cada sequência de 4 linhas indica um parâmetro imunológico analisado (mostrados à esquerda).

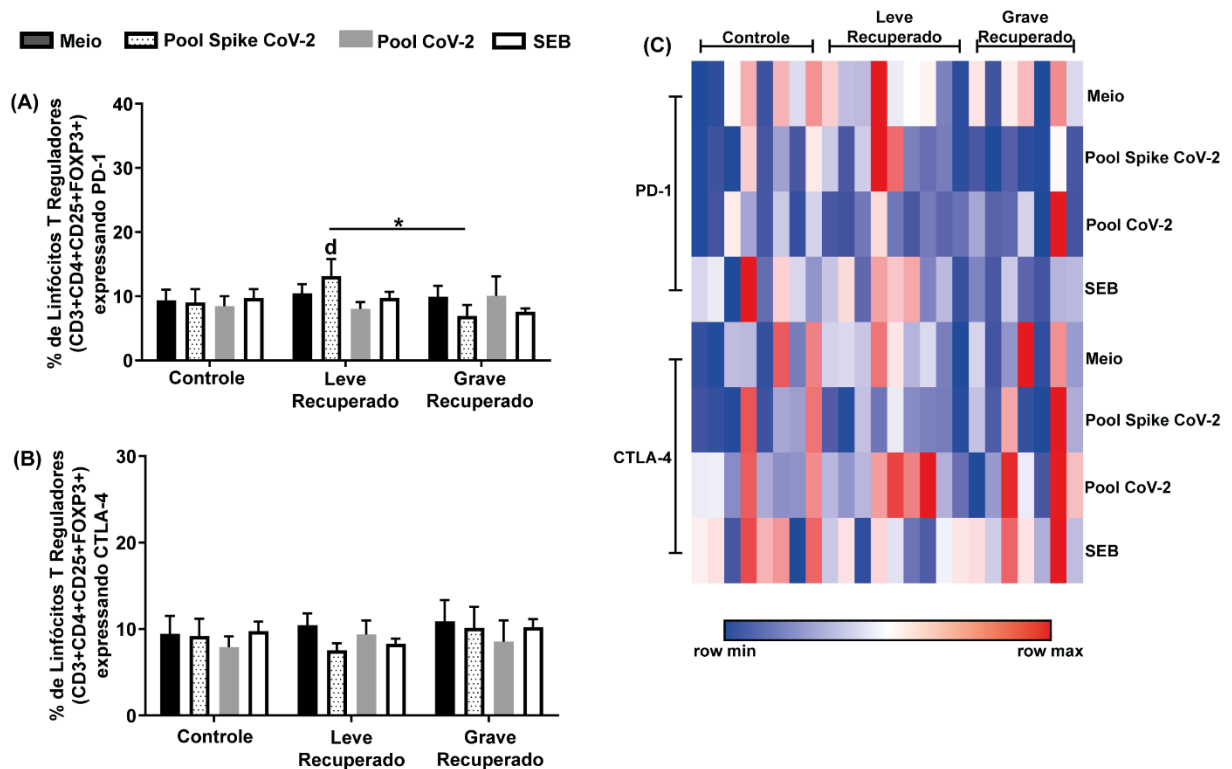
Múltiplos grupos foram comparados mediante análises estatísticas *two-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) e *one-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn) onde apropriado. Os símbolos representados por letras minúsculas indicam diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre as condições dentro de cada grupo: **b** (Meio x Pool CoV-2), **c** (Meio x SEB), **e** (Pool Spike CoV-2 x SEB), **f** (Pool CoV-2 x SEB). O símbolo # representa diferenças estatísticas significativas na condição SEB entre os grupos CTL e Grave Recuperado. As barras com # acima retratam a expressão superior do marcador analisado relacionado ao outro grupo. As barras de erro mostram erro padrão da

média (SEM) para cada subgrupo. As linhas horizontais acima das barras identificam diferenças significativas dos mesmos subgrupos entre grupos diferentes. * $p < 0.05$; # $p < 0,05$; ## $p < 0.01$. SEB, Staphylococcal enterotoxin B. **Fonte:** de Sousa Palmeira et al., 2022.

5.5 Expressão de PD-1 e CTLA-4 pelos linfócitos T Reguladores em PBMCs de voluntários inseridos nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado

Seguido da análise dos mecanismos supracitados, os níveis de Treg PD-1⁺ e Treg CTLA-4⁺ foram mensurados em sangue periférico dos voluntários inseridos nos grupos estudados. Embora a frequência de Treg CTLA-4⁺ não tenha sofrido alterações significativas entre os grupos inseridos no presente trabalho (Figura 12B), a frequência de células T reguladoras expressando PD-1 foi menor em Grave Recuperado quando comparado ao grupo Leve Recuperado em PBMCs estimuladas com o peptídeo Pool Spike CoV-2 (Figura 12A). Sob estímulo Pool Spike CoV-2, os níveis de Treg PD-1⁺ foram mais expressivos que aqueles presentes em amostras estimuladas com Pool CoV-2 em Leve Recuperado (Figura 12A).

Figura 12. Frequência de linfócitos T Reguladores expressando PD-1 e CTLA-4 em sangue periférico de voluntários.



Legenda: PBMCs foram coletadas de voluntários não infectados pelo SARS-CoV-2 (Controle - CTL, $n = 8$) e voluntários recuperados das formas leve (Leve Recuperado, $n = 9$) e grave (Grave Recuperado, $n = 7$) da COVID-19, formando os grupos do estudo. As amostras foram incubadas por 20 horas sob 4 condições (subgrupos): não estimuladas (meio) ou estimuladas com peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2 ou SEB. PBMCs não estimuladas e estimuladas com SEB foram usadas como controles negativo e positivo, respectivamente. **(A)**

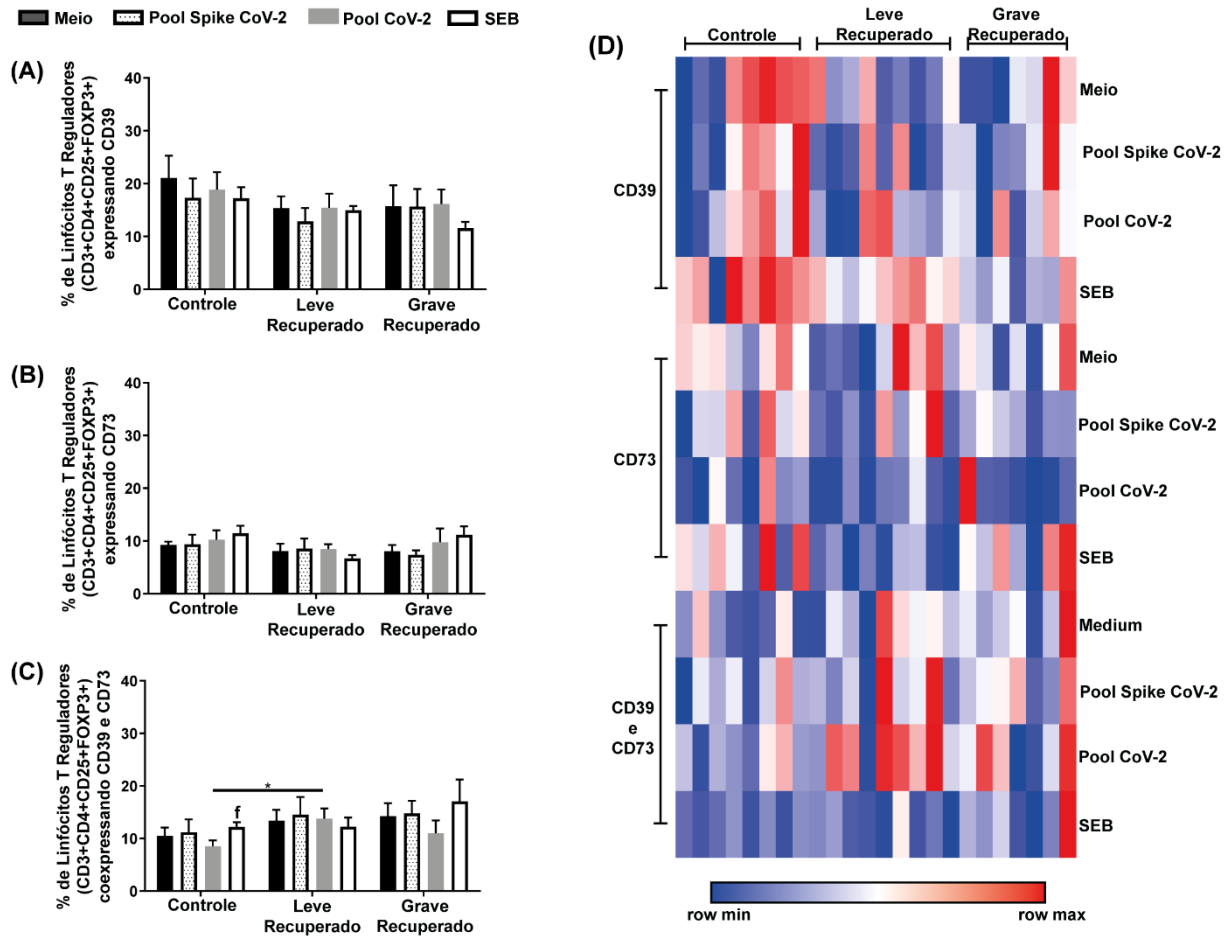
Frequência de linfócitos T Reguladores que expressam PD-1 em CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado. **(B)** Frequência de linfócitos T Reguladores que expressam CTLA-4 em CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado. **(C)** *Heat Map* da frequência de linfócitos T Reguladores expressando PD-1 e CTLA-4 nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado com base nas análises de citometria de fluxo. Cada linha indica a condição em que as PBMCs foram submetidas (mostradas à direita). Cada coluna indica um voluntário inserido no estudo. Cada sequência de 4 linhas indica um parâmetro imunológico analisado (mostrados à esquerda).

Múltiplos grupos foram comparados mediante análises estatísticas *two-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) e *one-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn) onde apropriado. O símbolo representado por letra minúscula indica diferença estatística ($p < 0.05$) entre as condições dentro de cada grupo: **d** (Pool Spike CoV-2 x Pool CoV-2). As barras de erro mostram erro padrão da média (SEM) para cada subgrupo. As linhas horizontais acima das barras identificam diferenças significativas dos mesmos subgrupos entre grupos diferentes. * $p < 0.05$. SEB, Staphylococcal enterotoxin B. **Fonte:** de Sousa Palmeira et al., 2022.

5.6 Expressão de CD39 e CD73 pelos linfócitos T Reguladores em PBMCs de voluntários inseridos nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado

Além disso, foram analisadas a expressão das enzimas CD39 e CD73 pelas Tregs. Como observado nas Figuras 13A e 13B, não foram identificadas, entre os grupos estudados, alterações significativas nos níveis de células T reguladoras expressando CD39 ou CD73. No entanto, ao avaliarmos a coexpressão $CD39^+CD73^+$ em Tregs, amostras do grupo Leve Recuperado incubadas com o peptídeo Pool CoV-2 apresentaram maior frequência que o grupo CTL (Figura 13C). Neste, observou-se também níveis mais altos de Treg coexpressando $CD39^+CD73^+$ em PBMCs estimuladas com SEB quando comparadas com o estímulo Pool CoV-2 (Figura 13C).

Figura 13. Frequência de linfócitos T Reguladores expressando CD39 e CD73 em sangue periférico de voluntários.



Legenda: PBMCs foram coletadas de voluntários não infectados pelo SARS-CoV-2 (Controle - CTL, n = 8) e voluntários recuperados das formas leve (Leve Recuperado, n = 9) e grave (Grave Recuperado, n = 7) da COVID-19, formando os grupos do estudo. As amostras foram incubadas por 20 horas sob 4 condições (subgrupos): não estimuladas (meio) ou estimuladas com peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2 ou SEB. PBMCs não estimuladas e estimuladas com SEB foram usadas como controles negativo e positivo, respectivamente. **(A)** Frequência de linfócitos T Reguladores que expressam CD39 em CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado. **(B)** Frequência de linfócitos T Reguladores que expressam CD73 em CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado. **(C)** Frequência de linfócitos T Reguladores que coexpressam CD39 e CD73 em CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado. **(D)** Heat Map da frequência de linfócitos T Reguladores expressando ou coexpressando CD39 e CD73 nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado com base nas análises de citometria de fluxo. Cada linha indica a condição em que as PBMC foram submetidas (mostradas à direita). Cada coluna indica um voluntário inserido no estudo. Cada sequência de 4 linhas indica um parâmetro imunológico analisado (mostrados à esquerda).

Múltiplos grupos foram comparados mediante análises estatísticas *two-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) e *one-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn) onde apropriado. Os símbolos representados por letras minúsculas indicam diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre as condições dentro de cada grupo: f (Pool CoV-2 x SEB). As barras de erro mostram erro padrão da média (SEM) para cada subgrupo. As linhas horizontais acima das barras identificam diferenças significativas

dos mesmos subgrupos entre grupos diferentes. * $p < 0.05$. SEB, Staphylococcal enterotoxin B. **Fonte:** de Sousa Palmeira et al., 2022.

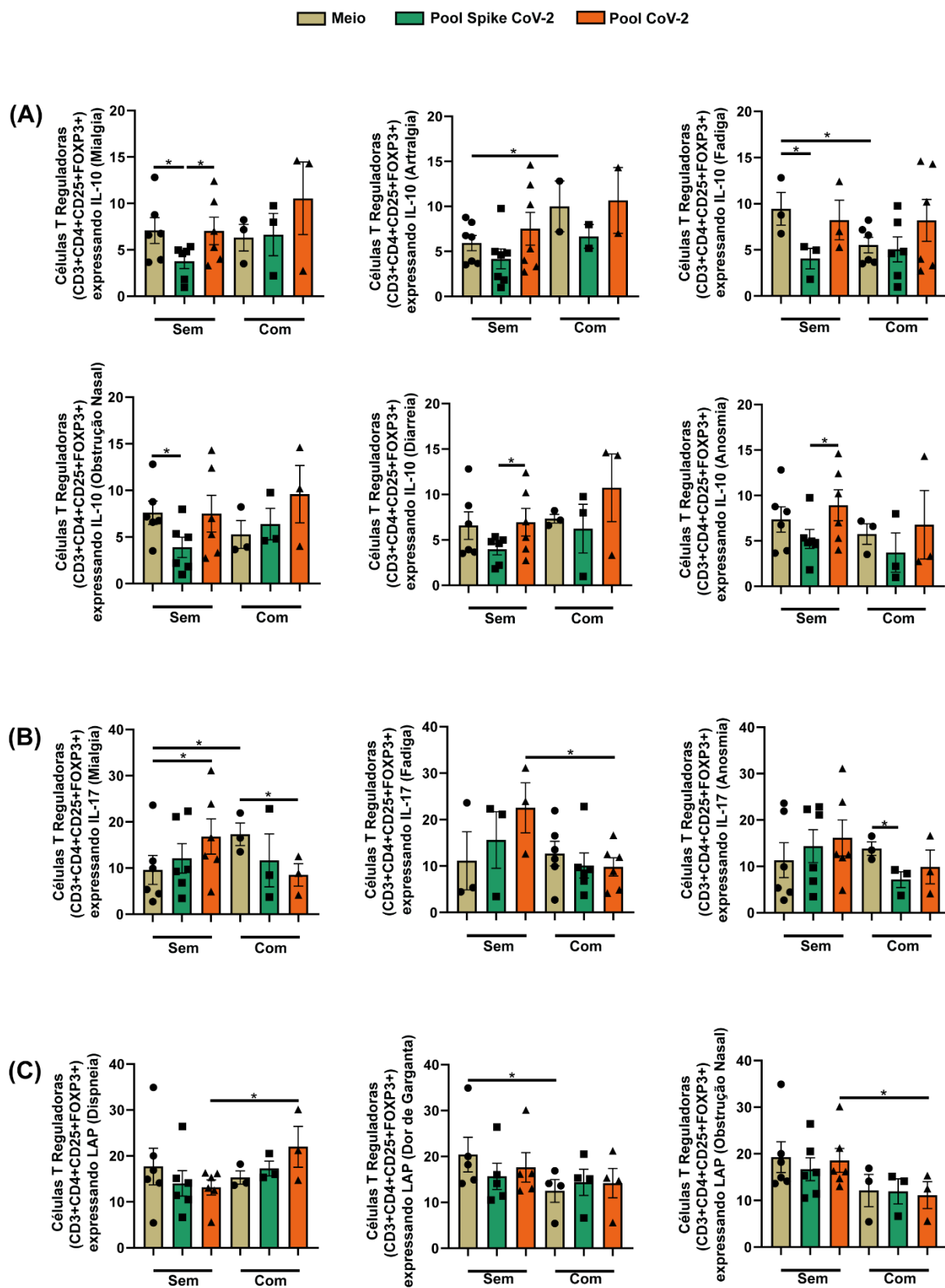
5.7. Comparação da expressão de citocinas pelas células T Reguladoras e sintomas desenvolvidos no grupo Leve Recuperado durante a COVID-19 aguda.

Também foram realizadas análises comparativas da expressão de citocinas pelas células T Reguladoras entre voluntários Leve Recuperado, que desenvolveram ou não certos sintomas durante a fase aguda da COVID-19. Para aqueles que não desenvolveram mialgia, fadiga e obstrução nasal, as amostras estimuladas com Pool Spike CoV-2 apresentaram menor frequência de Treg IL-10⁺ que PBMCs não estimuladas (Figura 14A). Níveis reduzidos de células T Reguladoras produtoras de IL-10 também foram observados sob estímulo Pool Spike CoV-2 comparado a amostras incubadas com Pool CoV-2 em voluntários que desenvolveram mialgia, diarreia e anosmia (Figura 14A). Em PBMCs não estimuladas, a expressão da IL-10 por células T Reguladoras foi maior e menor, respectivamente, em voluntários que experienciaram artralgia e fadiga em comparação com aqueles que não desenvolveram esses sintomas (Figura 14A).

Comparado a amostras não estimuladas em voluntários Leve Recuperado que não desenvolveram mialgia, o estímulo Pool CoV-2 provocou maior expressão de IL-17 em Tregs enquanto naqueles que desenvolveram esse sintoma, a frequência de Treg IL-17⁺ foi diminuída na mesma condição (Figura 14B). Em PBMCs não estimuladas de voluntários que não apresentaram mialgia, os níveis de células T reguladoras expressando IL-17 foram menores em comparação àqueles que desenvolveram esse sintoma (Figura 14B). Os dados também revelaram que em amostras estimuladas com Pool CoV-2, a expressão de IL-17 por Tregs foi menos prevalente naqueles com fadiga comparado àqueles sem (Figura 14B). Acerca dos voluntários que experimentaram anosmia, o estímulo com Pool Spike CoV-2 reduziu a frequência de IL-17⁺ em comparação com PBMCs não estimuladas (Figura 14B).

Também foi identificada maior expressão de LAP pelas Tregs, sob estímulo Pool CoV-2, de voluntários que desenvolveram dispneia, enquanto o oposto foi verificado para aqueles que experienciaram obstrução nasal, comparado aos voluntários que não desenvolveram esses sintomas (Figura 14C). Por outro lado, PBMCs não estimuladas de voluntários que não experimentaram dor de garganta revelaram maior frequência de Tregs LAP⁺ comparado aos indivíduos que se queixaram desse sinal clínico (Figura 14C). Análises comparativas relacionadas aos demais sintomas explicitados no presente trabalho foram realizadas, no entanto, não foram observados resultados estatísticos significativos (dados não mostrados).

Figura 14. Comparação da frequência de linfócitos T Reguladores expressando IL-10, IL-17 e LAP entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não certos sintomas.



Legenda: Foram coletadas amostras de PBMCs de 9 voluntários recuperados da forma leve (Leve Recuperado) da COVID-19. As amostras foram incubadas por 20 horas sob 4 condições: não estimuladas (meio) ou estimuladas com peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2 ou SEB (não inseridos nos gráficos de comparação). **(A)** Comparação da frequência de células T Reguladoras expressando IL-10 entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não os seguintes sintomas: mialgia, artralgia, fadiga, obstrução nasal, diarreia e anosmia durante a fase aguda da COVID-19. **(B)** Comparação da frequência de células T Reguladoras expressando IL-17 entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não os seguintes sintomas: mialgia, fadiga e anosmia durante a fase aguda da COVID-19. **(C)** Comparação da frequência de células T Reguladoras expressando LAP entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não os seguintes sintomas: dispneia, dor de garganta e obstrução nasal durante a fase aguda da COVID-19. Os símbolos ●, ■ e ▲ representam cada voluntário Leve Recuperado cuja amostra foi incubada nas condições meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2, respectivamente.

Múltiplos grupos foram comparados mediante análises estatísticas *two-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) e *one-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn) onde apropriado. As linhas horizontais acima das barras identificam diferenças significativas entre os grupos avaliados. * $p < 0.05$. **Fonte:** de Sousa Palmeira et al., 2022.

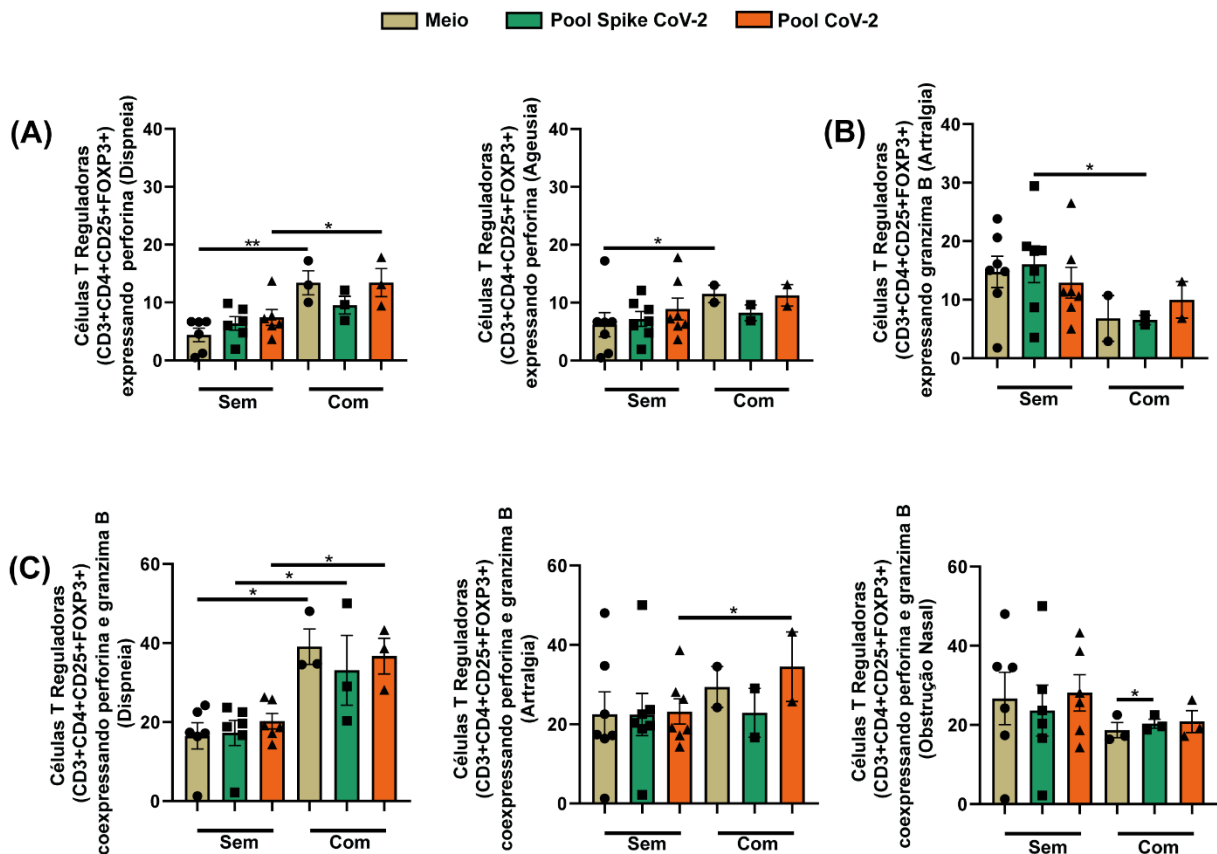
5.8. Comparação da expressão de grânulos citotóxicos pelas células T Reguladoras e sintomas desenvolvidos no grupo Leve Recuperado durante a COVID-19 aguda.

Ao serem realizadas análises comparativas entre a frequência de Treg perforina⁺ e voluntários Leve Recuperado que desenvolveram ou não certos sintomas durante a fase aguda, foram identificados maiores níveis em PBMCs não estimuladas e estimuladas com Pool CoV-2 de voluntários que experienciaram dispneia em comparação com aqueles que não a desenvolveram (Figura 15A). Em condição sem estímulo também foram encontrados níveis mais elevados de perforina em Tregs de voluntários que apresentaram ageusia comparado aqueles que não desenvolveram esse sintoma (Figura 15A). Ao analisarmos a síntese de granzima B pelas Tregs, observamos expressão elevada em amostras estimuladas com Pool Spike CoV-2 de voluntários que não desenvolvem artralgia durante a fase aguda da COVID-19 em comparação aqueles que a desenvolveram (Figura 15B).

Em amostras não estimuladas e estimuladas com peptídeos relacionados com o SARS-CoV-2, a coexpressão desses grânulos citotóxicos pelas Tregs foi maior em voluntários Leve Recuperado que experienciaram dispneia comparado aqueles que não a desenvolveram (Figura 15C). Para voluntários que foram acometidos por artralgia, houve maior frequência de Tregs perforina⁺granzima B⁺ apenas em PBMCs estimuladas com Pool CoV-2 comparado aqueles que não desenvolveram esse sintoma (Figura 15C). Curiosamente, em voluntários que desenvolveram obstrução nasal, o Pool Spike CoV-2 induziu levemente a coexpressão em Tregs quando comparado a amostras não estimuladas (Figura 15C). Análises comparativas

relacionadas aos demais sintomas explicitados no presente trabalho foram realizadas, no entanto, não foram observados resultados estatísticos significativos (dados não mostrados).

Figura 15. Comparação da frequência de linfócitos T Reguladores expressando perforina e granzima B entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não certos sintomas.



Legenda: Foram coletadas amostras de PBMC de 9 voluntários recuperados da forma leve (Leve Recuperado) da COVID-19. As amostras foram incubadas por 20 horas sob 4 condições: não estimuladas (meio) ou estimuladas com peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2 ou SEB (não inseridos nos gráficos de comparação). (A) Comparação da frequência de células T Reguladoras expressando perforina entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não os seguintes sintomas: dispneia e ageusia durante a fase aguda da COVID-19. (B) Comparação da frequência de células T Reguladoras expressando granzima B entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não artralgia durante a fase aguda da COVID-19. (C) Comparação da frequência de células T Reguladoras coexpressando perforina e granzima B entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não os seguintes sintomas: dispneia, artralgia e obstrução nasal durante a fase aguda da COVID-19. Os símbolos ●, ■ e ▲ representam cada voluntário Leve Recuperado cuja amostra foi incubada nas condições meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2, respectivamente.

Múltiplos grupos foram comparados mediante análises estatísticas *two-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) e *one-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn) onde apropriado. As linhas horizontais acima das barras identificam diferenças significativas entre os grupos avaliados. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

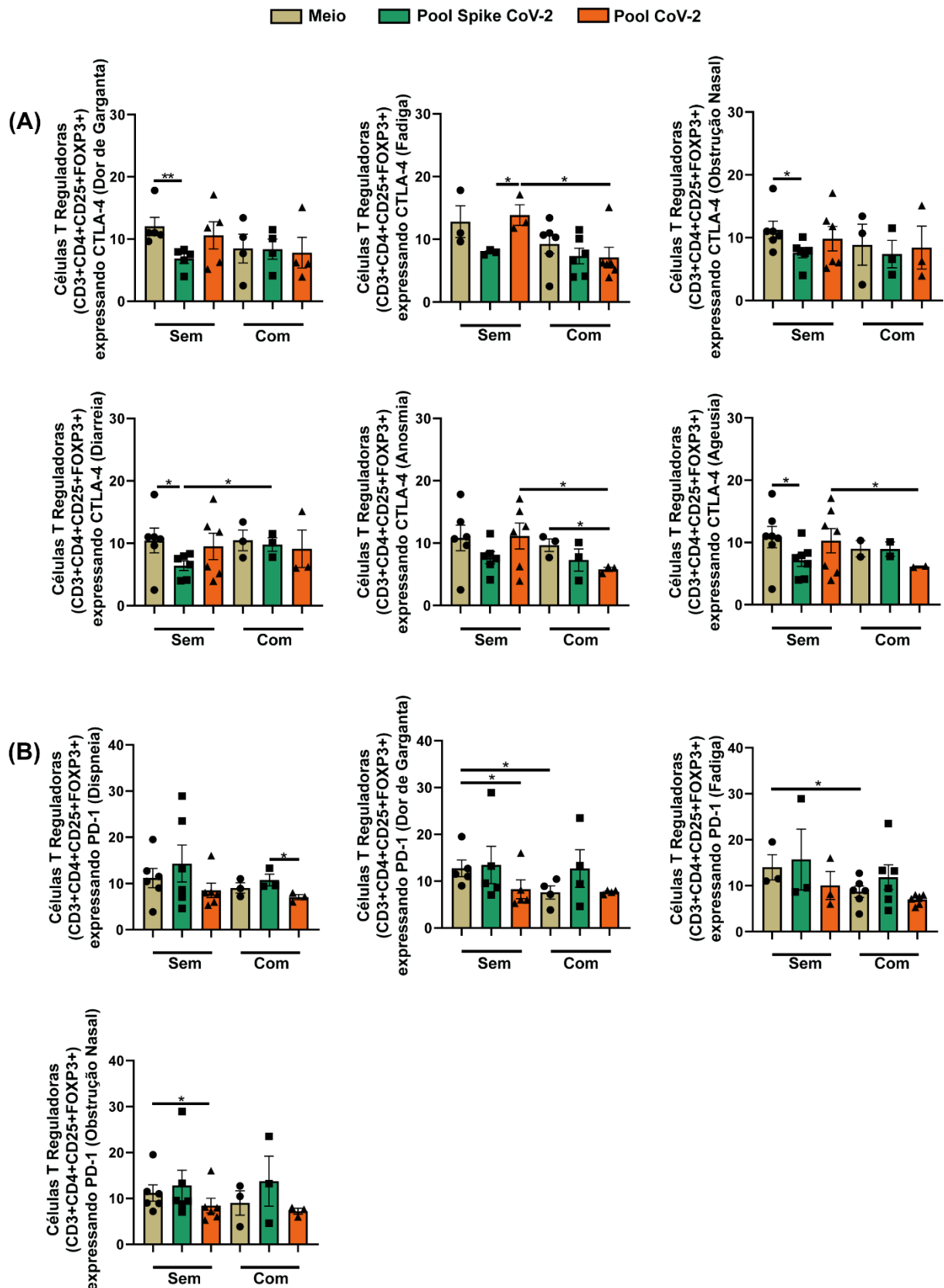
Fonte: de Sousa Palmeira et al., 2022.

5.9. Comparação da expressão de receptores inibitórios pelas células T Reguladoras e sintomas desenvolvidos no grupo Leve Recuperado durante a COVID-19 aguda.

Comparando a expressão de PD-1 em células T Reguladoras entre voluntários Leve Recuperado que desenvolveram ou não certos sintomas, aqueles que experimentaram dispneia apresentaram níveis mais baixos de Tregs PD-1⁺ sob estímulo Pool CoV-2 em comparação com PBMCs estimuladas com Pool Spike CoV-2 (Figura 16B). Além disso, em voluntários que não desenvolveram dor de garganta e obstrução nasal, a expressão de PD-1 pelas Tregs foi maior em amostras não estimuladas comparada com o estímulo Pool CoV-2 (Figura 16B). Finalmente, em PBMCs não estimuladas de voluntários que não experimentaram dor de garganta e fadiga, maior frequência de Tregs PD-1⁺ foi encontrada em comparação com aqueles que desenvolveram tais os sintomas (Figura 16B).

Quanto a frequência de Tregs CTLA-4⁺, observou-se que naqueles que não experimentaram dor de garganta, obstrução nasal, diarreia e ageusia o peptídeo Pool Spike CoV-2 induziu uma diminuição da expressão CTLA-4 pelas Tregs em comparação com a condição meio (Figura 16A). Em conjunto, também foram identificados níveis mais elevados de Tregs CTLA-4⁺ em estímulo Pool CoV-2 comparado a PBMCs estimuladas com o peptídeo Pool Spike CoV-2 em voluntários Leve Recuperado que não experimentaram fadiga (Figura 16A). Para aqueles que desenvolveram anosmia, o estímulo Pool CoV-2 induziu a uma diminuição de Tregs CTLA-4⁺ quando comparados com a condição meio (Figura 16A). Sob estímulo Pool CoV-2, observou-se menor frequência de Tregs CTLA-4⁺ em voluntários Leve Recuperado que desenvolveram fadiga, anosmia e ageusia comparado aqueles que não desenvolveram tais sintomas (Figura 16A). Por fim, os níveis de células T Reguladoras produtoras de CTLA-4, sob estímulo Pool Spike CoV-2, foram maiores em voluntários que desenvolveram diarreia comparado com os que não a experienciaram (Figura 16A). Análises comparativas relacionadas aos demais sintomas explicitados no presente trabalho foram realizadas, no entanto, não foram observados resultados estatísticos significativos (dados não mostrados).

Figura 16. Comparação da frequência de linfócitos T Reguladores expressando CTLA-4 e PD-1 entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não certos sintomas.



Legenda: Foram coletadas amostras de PBMCs de 9 voluntários recuperados da forma leve (Leve Recuperado) da COVID-19. As amostras foram incubadas por 20 horas sob 4 condições:

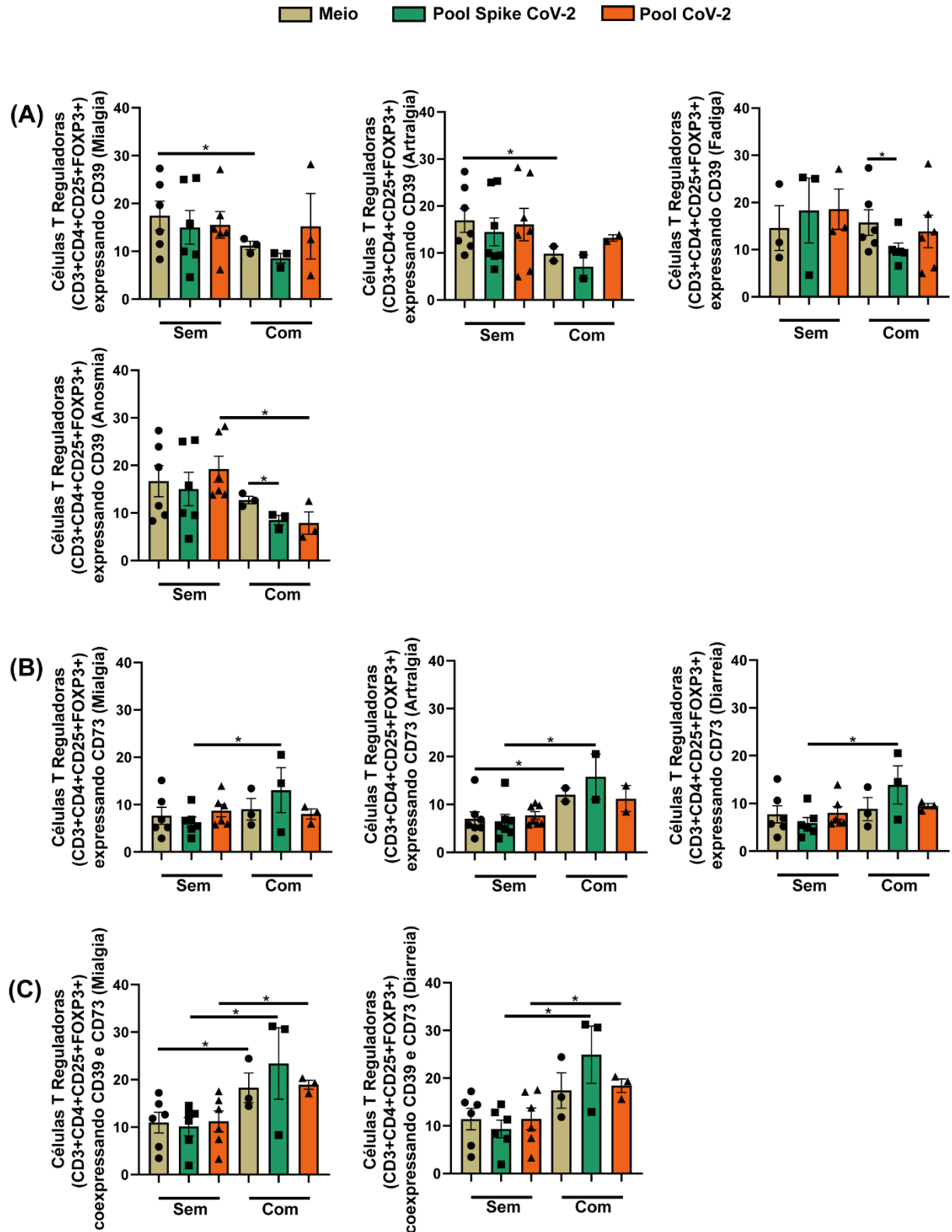
não estimuladas (meio) ou estimuladas com peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2 ou SEB (não inseridos nos gráficos de comparação). **(A)** Comparação da frequência de células T Reguladoras expressando CTLA-4 entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não os seguintes sintomas: dor de garganta, fadiga, obstrução nasal, diarreia, anosmia e ageusia durante a fase aguda da COVID-19. **(B)** Comparação da frequência de células T Reguladoras expressando PD-1 entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não os seguintes sintomas: dispneia, dor de garganta, fadiga e obstrução nasal durante a fase aguda da COVID-19. Os símbolos ●, ■ e ▲ representam cada voluntário Leve Recuperado cuja amostra foi incubada nas condições meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2, respectivamente. Múltiplos grupos foram comparados mediante análises estatísticas *two-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) e *one-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn) onde apropriado. As linhas horizontais acima das barras identificam diferenças significativas entre os grupos avaliados. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. **Fonte:** de Sousa Palmeira et al., 2022.

5.10. Comparação da expressão de ectonucleotidases pelas células T Reguladoras e sintomas desenvolvidos no grupo Leve Recuperado durante a COVID-19 aguda.

Por fim, os dados referentes a expressão de ectonucleotidases em Tregs revelaram maior frequência de Tregs CD39⁺ em PBMCs não estimuladas de voluntários Leve Recuperado que não desenvolveram mialgia e artralgia comparado aqueles que apresentaram tais sintomas (Figura 17A). Além disso, também foi demonstrado que em voluntários que experienciaram fadiga e anosmia, o estímulo com Pool Spike CoV-2 reduziu os níveis de expressão de CD39 em Tregs (Figura 17A). Voluntários positivos para o sintoma anosmia na fase aguda da COVID-19 também foram caracterizados por menor frequência de Tregs CD39⁺ sob estímulo Pool CoV-2 em comparação com aqueles que não experimentaram esse sinal (Figura 17A).

Em amostras incubadas com Pool Spike CoV-2 de voluntários que apresentaram mialgia, artralgia e diarreia, foi relatada maior frequência de Tregs CD73⁺ que aqueles que não apresentaram esses sintomas (Figura 17B). Voluntários Leve Recuperado que experimentaram artralgia também apresentaram maior produção de CD73 pelas Tregs em amostras não estimuladas, comparado aqueles que não desenvolveram tal sintoma (Figura 17B). Curiosamente, Tregs CD39⁺CD73⁺ foram mais prevalentes em todas as condições em voluntários que desenvolveram mialgia que aqueles que não a experimentaram durante a fase aguda da COVID-19 (Figura 17C). Resultado semelhante foi observado para o sintoma diarreia, porém, não foi constatada diferença significativa na condição meio (Figura 17C). Análises comparativas relacionadas aos demais sintomas explicitados no presente trabalho foram realizadas, no entanto, não foram observados resultados estatísticos significativos (dados não mostrados).

Figura 17. Comparação da frequência de linfócitos T Reguladores expressando CD39 e CD73 entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não certos sintomas.



Legenda: Foram coletadas amostras de PBMCs de 9 voluntários recuperados da forma leve (Leve Recuperado) da COVID-19. As amostras foram incubadas por 20 horas sob 4 condições: não estimuladas (meio) ou estimuladas com peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-

2 ou SEB (não inseridos nos gráficos de comparação). **(A)** Comparação da frequência de células T Reguladoras expressando CD39 entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não os seguintes sintomas: mialgia, artralgia, fadiga e anosmia durante a fase aguda da COVID-19. **(B)** Comparação da frequência de células T Reguladoras expressando CD73 entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não os seguintes sintomas: mialgia, artralgia e diarreia durante a fase aguda da COVID-19. **(C)** Comparação da frequência de células T Reguladoras coexpressando CD39 e CD73 entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não os seguintes sintomas: mialgia e diarreia durante a fase aguda da COVID-19. Os símbolos ●, ■ e ▲ representam cada voluntário Leve Recuperado cuja amostra foi incubada nas condições meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2, respectivamente.

Múltiplos grupos foram comparados mediante análises estatísticas *two-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) e *one-way* ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn) onde apropriado. As linhas horizontais acima das barras identificam diferenças significativas entre os grupos avaliados. * $p < 0.05$. **Fonte:** de Sousa Palmeira et al., 2022.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A pandemia da COVID-19 resultou em uma emergência global que conduziu esforços mais significativos da comunidade científica na compreensão da resposta imune do hospedeiro frente à infecção pelo SARS-CoV-2 (CALDRER et al., 2021). Embora a maioria dos indivíduos infectados desenvolva a forma leve, uma parcela é acometida por uma COVID-19 mais grave na qual a inflamação excessiva geralmente está associada (MERAD, SUBRAMANUAN; WANG, 2021; LI et al., 2022). Objetivando compreender os impactos a longo prazo que a infecção pelo SARS-CoV-2 pode provocar no sistema imune adaptativo após a resolução da infecção, o presente trabalho avaliou as Tregs periféricas em voluntários que se recuperaram das formas leve e grave da COVID-19. Com isso, em comparação com o grupo CTL, foram relatados níveis mais elevados de Tregs em amostras estimuladas com Pool CoV-2 dos grupos Leve Recuperado e Grave Recuperado. Além disso, PBMCs não estimuladas oriundas do grupo Leve Recuperado apresentaram maior frequência das células em estudo que o grupo CTL, sugerindo que a infecção pelo novo coronavírus pode conduzir a modificações de longa duração, como relatado por Liu e et al. (2021). No entanto, a ausência de diferenças estatísticas entre ambos os grupos recuperados sugere que apenas a análise da frequência de Tregs não se configuraria como um dado preditivo confiável para o direcionamento de distintos quadros clínicos da doença.

Por outro lado, é provável que com a resolução da COVID-19 os níveis celulares tenham sido atenuados, o que pode dificultar a compreensão de possíveis associações entre tais parâmetros com o seu real impacto nas distintas formas da doença. No entanto, os maiores níveis de Tregs em PBMCs de voluntários Leve Recuperado comparado ao CTL parecem indicar melhorada atividade dessas células durante a infecção. Nesse contexto, o presente trabalho também demonstra elevada frequência de Tregs em voluntários Leve Recuperado que não experienciaram obstrução nasal. Estudos mostram níveis elevados e diminuídos, respectivamente, da IL-17 sérica e da IL-10 nasal em pacientes com rinite alérgica, enquanto que a administração de células-tronco mesenquimais em modelos animais para a doença induziram ao aumento de células T reguladoras e a diminuição de células plasmáticas e da frequência de espirros nesses animais (ERKAN et al., 2020; RESTIMULIA et al., 2021). Diante do exposto, é possível a elevada frequência de Tregs na ausência da obstrução nasal indique a participação desses linfócitos no estabelecimento de uma COVID-19 mais atenuada. No entanto, compreende-se que apenas a análise do nível celular não fornece notáveis informações acerca das implicações que a infecção pelo SARS-CoV-2 pode provocar no sistema imune.

Sendo assim, foram analisadas a expressão de moléculas associadas à atividade das células T reguladoras em todos os grupos inseridos na pesquisa.

A IL-10 é uma citocina dotada de propriedades anti-inflamatórias sendo uma das ferramentas diretas de imunossupressão utilizada pelas Tregs (ROCAMORA-REVERTE et al., 2021). Os dados aqui explicitados mostram maior frequência de Tregs IL-10⁺ em PBMCs de voluntários Leve Recuperado não estimuladas ou estimuladas com Pool CoV-2 comparado ao grupo CTL e Grave Recuperado, respectivamente, fortalecendo a hipótese de alterações imunológicas persistentes após resolução de infecção, como já mostrado (SHUWA et al., 2021; SINGH et al., 2021). Embora alguns estudos correlacionem citocinas como IL-6 e IL-10 como preditores de gravidade da COVID-19, altos níveis de IL-10 poderiam indicar a tentativa de moderar uma inflamação excessiva não sendo, no entanto, capaz de controlá-la (HAN et al., 2020; ISLAM et al., 2021; DE-OLIVEIRA-PINTO et al., 2022).

Estudos conduzidos por Shuwa et al. (2021) demonstram que em PBMCs estimuladas com GcPC, pacientes convalescentes com anormalidades no raio-X eram dotados de menor frequência de células B IL10⁺ comparado aqueles sem tais anormalidades. Por outro lado, Meckiff et al. (2020) sugerem uma prejudicada resposta de Tregs em pacientes hospitalizados com COVID-19. Diante de um cenário em que voluntários recuperados do quadro leve apresentaram níveis de Tregs IL-10⁺ elevados ainda durante a infecção, os resultados poderiam indicar que, frente a uma atividade imunossupressora mais acentuada, as células em estudo poderiam atuar na modulação responsiva antiviral contribuindo para uma atenuada, porém equilibrada atividade anti-SARS-CoV-2 que auxiliaria na resolução de infecção com pouca lesão tecidual (KULINSKI; TARAKANOVA; VERBSKY, 2013; LIN et al., 2018). Além disso, o estudo pode apontar para um microambiente imunossupressor sustentado, com possibilidade de atenuar a resposta inflamatória frente a uma reinfecção. Considerando a significativa diferença de Tregs IL-10⁺ entre os estímulos Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2 no grupo Leve Recuperado, os resultados aqui explicitados também sustentam a presença de Tregs reativas ao SARS-CoV-2.

A expressão de IL-17 pelas células T reguladoras já foi observada e, curiosamente, o presente estudo revelou níveis de Tregs IL-17⁺ mais expressivos em voluntários Leve Recuperado (BERIOU et al., 2009; KRYCZEK et al., 2011; AFZALI et al., 2013; SEFIK et al., 2015; JUNG, KWAK; SHIN, 2017). Alguns estudos apontam para a contribuição dessa interleucina na gravidade da COVID-19, mostrando também que a ativação de vias de sinalização da IL-17, mediante interações da ORF8 do SARS-CoV-2, com o receptor da IL-17 poderia induzir a expressão de fatores pró-inflamatórios, podendo cooperar com a tempestade

de citocinas (DARIF et al., 2021; LIN et al., 2021). Entretanto, Ghazavi et al. (2021) encontraram níveis de IL-17 séricos mais elevados em pacientes com a forma leve da COVID-19, enquanto Shuwa et al. (2021) observaram que em PBMCs estimuladas, células T CD4⁺ eram dotadas de capacidade para expressar IL-17 durante a doença, sendo mantida na convalescência independentemente do perfil clínico. Sendo assim, é possível que a infecção pelo SARS-CoV-2 tenha induzido a uma maior expressão de IL-17 pelas Tregs de voluntários recuperados do quadro leve, durante o estágio agudo, sendo mantido após a resolução da doença, considerando que apenas no estímulo de peptídeos derivados do SARS-CoV-2 foram observadas significância estatística. Em conjunto, os níveis similares de Tregs IL-17⁺ em amostras não estimuladas e estimuladas com Pool Spike CoV-2 e o Pool CoV-2 suportam a hipótese acima mencionada.

A maior síntese de IL-17 pelas Tregs em voluntários Leve Recuperado pode apontar para uma considerável expressão do fator de transcrição (FT) ROR γ t em níveis mais altos. Não seria estranho considerar o desenvolvimento de Tregs ROR γ t⁺ exercendo um papel de inibidor da diferenciação de células Th17 atenuando, assim, a produção de mediadores inflamatórios. Diante disto, estudos sugerem que Tregs podem expressar FT características de outras subpopulações de células T CD4⁺ auxiliando as primeiras na imunossupressão de perfis inflamatórios distintos (CLAY et al., 2020; SEFIK et al., 2015; LEVINE et al., 2017; CHAUDHRY et al., 2009; KOCH et al., 2009). Por outro lado, considerando que estímulos peptídicos associados ao SARS-CoV-2 parecem direcionar principalmente a um perfil de resposta Th1 por células T (GRIFONI et al., 2020; NEIDLEMAN et al., 2020; WEISKOPF et al., 2020), a diminuição na expressão IL-17 por Tregs sob estímulo *Spike* pode apontar para uma responsividade imunológica mais apropriada frente a reinfecção em voluntários Grave Recuperado. Diante do exposto, ambas hipóteses acima sugerem um perfil de Tregs distintos entre voluntários Leve e Grave Recuperado, mas potencialmente capazes de combater a infecção pelo SARS-CoV-2 de forma mais adequada.

Cabe destacar a possibilidade da IL-17 derivada das células T reguladoras auxiliar no combate ao vírus causador da COVID-19, já que estudos realizados por Schnoeller et al. (2014) demonstraram um papel protetivo dessa citocina na infecção pelo vírus RSV após a vacinação com *Bordetella pertussis* atenuada, enquanto Wang et al. (2011) mostraram uma ação benéfica da IL-17 contra o vírus H5N1, possivelmente mediante modulação migratória de linfócitos B.

Por outro lado, sob certas condições, subpopulações de Tregs podem expressar IL-17, no qual ainda apresentam considerável atividade imunossupressora podendo, esta atividade, ser até mais expressiva (VOO et al., 2009; LI et al., 2012; AFZALI et al., 2013). Curiosamente, em

estudos *in vitro*, Li et al. (2012) demonstraram que Tregs produtoras de IL-17, na qual foram nomeadas como Tr17, expressaram maior quantidade de perforina, granzima B e CD107a, sugerindo uma maior capacidade de degranulação em comparação com Tregs IL-17⁻. Com isso, os dados divulgados neste trabalho também podem indicar uma subpopulação de Tregs com um perfil imunomodulador mais acentuado em voluntários que se recuperaram da forma leve da COVID-19.

Em consonância com Li et al. (2012), é possível que as Tregs IL-17⁺ sejam, parcialmente, responsáveis pela maior expressão de perforina e granzima B encontrada no grupo Leve Recuperado. Com isso, seria válido considerar a contribuição dessa subpopulação no desenvolvimento da forma leve enfrentada pelos voluntários do grupo citado. Curiosamente, nossos dados de comparação mostraram maior expressão de perforina ou coexpressão de perforina⁺granzima B⁺ em Tregs de voluntários Leve Recuperado acometidos por alguns sintomas, especialmente dispneia. Embora a expressão dos grânulos citotóxicos possa se correlacionar com a gravidade da COVID-19, tem de se considerar que a produção de perforina e granzima em Tregs é fundamental para suas propriedades imunossupressoras (CAO et al., 2007; LOEBBERMANN et al., 2012; KANG et al., 2020; GROVER; GOEL; GREENE, 2021). Nesse aspecto, levando-se em conta os papéis imunomoduladores das células em estudo, a expressão diferencial dos grânulos entre voluntários Leve Recuperado afetados, principalmente, por dispneia sugerem uma contribuição parcial das Treg no controle da inflamação através de mecanismos citotóxicos, o que levaria à manutenção de uma COVID-19 leve. Em concordância com esta hipótese, Loebbermann et al. (2012) demonstram um papel essencial das Treg produtoras de Granzima B no controle da inflamação pulmonar durante a infecção viral aguda. Possivelmente, as Tregs produtoras de grânulos citotóxicos agiriam mediante a morte de células do sistema imune, evitando uma resposta inflamatória exacerbada. Nesse sentido, estudos sugerem a importância desses grânulos, em Tregs, na indução da morte de células dendríticas (DC), NK e células T CD8⁺, levantando a possibilidade de imunomodulação a nível de imunidade inata e adaptativa (CAO et al., 2007; BOISSONNAS et al., 2010).

Curiosamente, o presente trabalho também mostrou um aumento significativo de células T reguladoras expressando Peptídeo Associado à Latência (*Latency Associated Peptide* - LAP) e coexpressando perforina e granzima B em PBMCs estimuladas com Pool CoV-2 de voluntários do grupo CTL. Estudos anteriores já haviam observado que amostras de pacientes não expostos ao vírus hospedavam células T reativas ao SARS-CoV-2, provavelmente devido à exposição a outros coronavírus endêmicos (ANFT et al., 2021). Com isso, os achados aqui

explicitados podem apontar para uma reatividade cruzada causada por infecções anteriores por outros patógenos.

A modulação de receptores coestimuladores (como CD28 e ICOS) ou inibitórios (como CTLA-4 e PD-1) consiste em um valioso mecanismo de controle responsivo dos linfócitos T (CHIKUMA, 2017; ROWSHANRAVAN et al., 2018). Com isso, as células T reguladoras podem expressar alguns receptores inibitórios, desenvolvendo um importante mecanismo de contato célula-célula na modulação da resposta imune (GROVER; GOEL; GREENE, 2021; KOYAMA; NISHIKAWA, 2021). Apesar da similar expressão de CTLA-4 entre os grupos avaliados, os dados comparativos aqui revelados demonstraram um padrão de redução de Tregs IL-10⁺ e Tregs CTLA-4⁺ diante de amostras estimuladas com pool Spike CoV-2 em voluntários componentes do grupo Leve Recuperado, que não experimentaram determinados sintomas. Tais resultados se mostram interessantes pois sugerem modificações distintas nas ferramentas de imunossupressão utilizadas pelas Tregs, entre voluntários Leve Recuperado que desenvolveram ou não certos sinais clínicos durante a fase aguda da COVID-19. Alguns estudos indicam que peptídeos relacionados ao SARS-CoV-2 induzem, principalmente, uma resposta Th1 (GRIFONI et al., 2020; NEIDLEMAN et al., 2020; WEISKOPF et al., 2020). Considerando os dados diferenciais no grupo Leve Recuperado acima explicitados, é possível que estes, em uma reinfecção, possam experimentar uma resposta imune bem coordenada, parcialmente mediante atenuação de mecanismos imunossupressores das Treg, ao mesmo tempo em que montam uma rápida responsividade antiviral. Considerando uma capacidade de resposta altamente funcional e equilibrada das células T em indivíduos assintomáticos (LE BERT et al., 2021), nossos dados também podem levantar algumas possibilidades de atuação, a nível de Treg, que poderiam contribuir com uma melhor resolução da infecção.

Também foi demonstrado que o estímulo Pool Spike CoV-2 induziu a uma maior frequência Treg PD-1⁺ comparado ao Pool CoV-2 em voluntários Leve Recuperado, de modo semelhante ao observado naqueles que desenvolveram dispneia durante a fase aguda da COVID-19, no mesmo grupo. Uma pesquisa conduzida por Kamada et al. (2019) demonstrou uma melhora na capacidade de imunossupressão após o bloqueio do PD-1 nas células T Reguladoras. Analisando que, sob estímulo Pool Spike CoV-2, as Treg expressando PD-1 têm sido mais acentuadas em amostras de voluntários Leve Recuperado comparado ao Grave Recuperado, esses resultados podem indicar uma atividade imunossupressora mais atenuada favorecendo uma responsividade antiviral.

Por fim, também foram avaliadas a expressão das ectonucleotidases CD39 (NTPDase1) e CD73 (5'-ribonucleotideo fosfohidrolase) como mais um mecanismo imunossupressor adotado pelas células T reguladoras, através da hidrólise de ATP extracelular (pró-inflamatório) e geração de adenosina (imunossupressora) (ANTONIOLI et al., 2013; ALLARD et al., 2017; BATTASTINI et al., 2021; GROVER; GOEL; GREENE, 2021). Mesmo sem diferenças significativas na expressão da CD39 ou CD73 entre os grupos recuperados, PBMCs estimuladas com Pool CoV-2 de voluntários Leve Recuperado apresentaram níveis mais elevados de Tregs CD39⁺CD73⁺ que o CTL, sugerindo maior capacidade de síntese de adenosina na reinfecção.

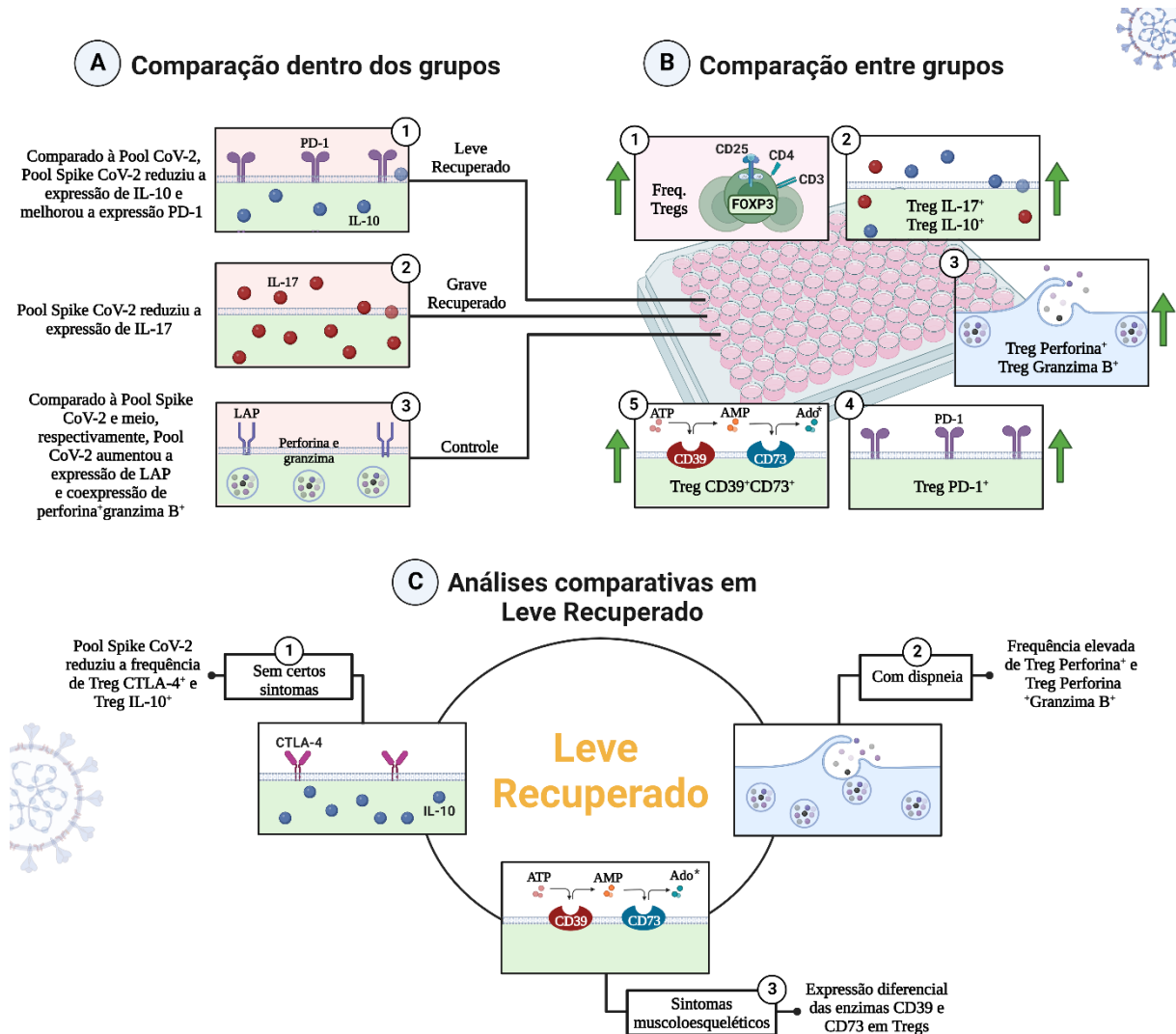
De modo interessante, voluntários Leve Recuperado que não desenvolveram sintomas musculoesqueléticos (artralgia e mialgia), durante a fase ativa da infecção, apresentaram maior frequência de células T CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CD39⁺ em amostras não estimuladas. Estudos têm mostrado uma correlação entre a expressão de CD39 em alguns linfócitos, com uma boa responsividade aos tratamentos associados à Artrite Reumatoide (AR) ou mesmo à redução da atividade da AR e dos níveis de Fator Reumatoide (FR) (PERES et al., 2015; GUPTA et al., 2018; ZACCA et al., 2021). Por outro lado, Gu et al. (2017) demonstraram que Tregs CD39^{high} podem apresentar mais estabilidade e papel protetor em comparação às Tregs CD39^{low}. Tais pesquisas poderiam, parcialmente, justificar a maior frequência de Tregs CD39⁺ em voluntários Leve Recuperado que não experienciaram dores musculoesqueléticas durante a fase aguda da COVID-19. Diante das pesquisas realizadas por Gu et al. (2017), seria interessante avaliar se as Tregs CD39⁺ de voluntários que não desenvolveram artralgia e mialgia seriam dotadas de maior capacidade imunossupressora que aqueles que desenvolveram esses sintomas. Isso seria possível considerando que em voluntários Leve Recuperado que se queixaram de anosmia e fadiga, o estímulo Pool Spike CoV-2 provocou redução nos níveis de Tregs CD39⁺. Além disso, menor frequência dessa subpopulação foi encontrada em amostras submetidas ao estímulo Pool CoV-2 de voluntários Leve Recuperado que experimentaram anosmia em comparação com aqueles sem este sintoma.

Ao contrário dos dados relacionados à CD39, a frequência de Tregs CD73⁺ foi maior em voluntários Leve Recuperado, que desenvolveram mialgia e artralgia na fase aguda da doença, sugerindo uma modulação diferencial entre as ectonucleotidases diante de sintomas musculoesqueléticos. Alguns estudos demonstraram não apenas uma correlação entre a baixa expressão de CD73 com a gravidade da artrite idiopática juvenil (*juvenile idiopathic arthritis* - JIA), mas também revelaram um papel protetor dessa enzima na artrite induzida por colágeno (*collagen-induced arthritis* - CIA), um modelo de camundongo para o estudo da AR (BOTTA GORDON-SMITH et al., 2015; CHROBAK et al., 2015). Assim, é possível que uma maior

síntese de adenosina em voluntários recuperados de um quadro leve da COVID-19 que experimentaram sintomas musculoesqueléticos possa ocorrer mediante as Tregs, hipótese corroborada pela maior frequência de Tregs CD39⁺CD73⁺ em pacientes que desenvolveram mialgia.

Sem a realização de estudos longitudinais, infelizmente não seria possível afirmar que os altos níveis de Tregs CD39⁺ e baixa frequência de Tregs CD73⁺ e Tregs CD39⁺CD73⁺ em voluntários Leve Recuperado que experienciaram sinais musculoesqueléticos ocorreram antes, durante ou após a primeira infecção. Observando níveis semelhantes de Tregs CD39⁺ em PBMCs não estimuladas ou estimuladas com peptídeos associados ao SARS-CoV-2, é provável que voluntários Leve Recuperado sem sintomas musculoesqueléticos já possuíssem uma frequência maior dessa subpopulação levando à ausência desses sinais clínicos. Assim, esses dados levantam a possibilidade da relação entre a expressão de CD39 pelas Tregs e o estabelecimento de distintos perfis da COVID-19. Por outro lado, é sugerido que voluntários Leve Recuperado que desenvolveram ou não determinados sintomas sejam dotados de Tregs com diferentes propriedades imunossupressoras que poderiam convergir para a proteção do hospedeiro em caso de reinfecção. Devido à baixa frequência de Tregs CD39⁺ e alta frequência de Tregs CD73⁺ em voluntários Leve Recuperado que se queixaram de alguns sinais clínicos, é provável que a infecção pelo SARS-CoV-2 conduza à expressão oposta de ambas as enzimas no citado grupo, podendo persistir por longos períodos após a resolução da doença. Um resumo dos principais resultados pode ser encontrado na figura 18A-18C.

Figura 18. Resumo dos principais resultados encontrados no estudo.



Legenda: (A.1) Comparado ao estímulo Pool CoV-2, Pool Spike CoV-2 reduziu os níveis de Treg IL-10⁺ e melhorou a frequência de PD-1⁺ em voluntários Leve Recuperado. (A.2) Pool Spike CoV-2 provocou uma diminuição na frequência Tregs IL-17⁺ no grupo Grave Recuperado. (A.3) Já no grupo CTL, Treg LAP⁺ e Treg perforina⁺granzima B⁺ foram maiores em amostras estimuladas do Pool CoV-2. (B.1-5) Em determinadas condições, o grupo Leve Recuperado apresentou níveis elevados de Tregs além de Tregs expressando IL-10, IL-17, perforina, granzima B, PD-1 e coexpressão CD39⁺CD73⁺ comparado aos grupos Grave Recuperado e/ou CTL. (C.1) Os principais dados revelam que o estímulo Pool Spike CoV-2 provocou um padrão de redução na frequência de Tregs IL-10⁺ e Tregs CTLA-4⁺ em PBMCs de voluntários que não experimentaram alguns sintomas. (C.2) Níveis elevados de Treg perforina⁺ e Treg perforina⁺granzima B⁺ foram encontrados em voluntários Leve Recuperado que desenvolveram dispneia. (C.3) Foi observada expressão diferencial das ectonucleotidases CD39 e CD73 em Tregs de voluntários Leve Recuperado que se queixaram de dores

musculoesqueléticas durante a COVID-19 aguda. *Ado, Adenosina. **Fonte:** de Sousa Palmeira et al., 2022. Criado com BioRender.com

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foi demonstrada maior frequência de Tregs bem como maior expressão de IL-10, IL-17, perforina, granzima B, PD-1 e coexpressão de CD39⁺CD73⁺ em Tregs oriundas de voluntários Leve Recuperado em comparação com os grupos CTL e/ou Grave Recuperado, em certas condições. Também foi relatado nível diferencial de Tregs expressando marcadores imunológicos entre voluntários Leve Recuperado que experienciaram ou não alguns sintomas durante a fase aguda da COVID-19, destacando-se os seguintes resultados: em voluntários Leve Recuperado que não desenvolveram alguns sinais clínicos, os estímulos Pool Spike CoV-2 provocaram uma redução na frequência de Tregs CTLA-4⁺ e Tregs IL-10⁺, apontando para a atenuação de mecanismos imunossupressores específicos que possivelmente contribuíram com uma resposta antiviral mais eficaz; também foi observada uma expressão diferencial entre as enzimas CD39 e CD73 pelas Tregs; a dispneia foi associada a altos níveis de perforina bem como a elevada coexpressão de grânulos citotóxicos pelos linfócitos estudados. Finalmente, foi mostrado que os peptídeos relacionados ao SARS-CoV-2 (Pool Spike CoV-2 e/ou Pool CoV-2) induziram alterações na expressão de IL-10 e PD-1 (Leve Recuperado), IL-17 (Grave Recuperado), LAP e coexpressão de grânulos citotóxicos (CTL).

Este trabalho possui algumas limitações, incluindo um pequeno número de voluntários, principalmente no grupo Grave Recuperado. Com isso, entende-se que esta pesquisa não abrange a heterogeneidade da população brasileira considerando que fatores genéticos e de idade, por exemplo, podem afetar a resposta imune diante de infecções (BARTLESON et al., 2021; SECOLIN et al., 2021). Sendo assim, estudos futuros abrangendo o perfil dos linfócitos T reguladores em diferentes grupos populacionais tornam-se interessantes. Em conjunto, avaliar a atividade imunossupressora pelas células em estudo também poderia expandir os horizontes acerca do impacto que a infecção pelo SARS-CoV-2 causaria em indivíduos recuperados dos distintos perfis clínicos. Diante dos resultados comparativos no grupo Leve Recuperado, há a possibilidade de, mesmo diante de uma similaridade na capacidade de imunomodulação, esta ocorrer mediante mecanismos díspares. Por fim, o presente estudo revela dados importantes sobre a participação das Tregs na COVID-19, sugerindo que a modulação de marcadores imunossupressores poderia conduzir, parcialmente, a uma doença leve podendo, tais modificações, persistirem após a resolução da patologia. Assim, os dados aqui explicitados se mostram interessantes e ampliam o nosso conhecimento acerca de como mudanças a nível de células T reguladoras podem estar envolvidas com os distintos perfis clínicos da COVID-19.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 8ª edição, 2015.

ADAMOSKI D. et al. SARS-CoV-2 Delta and Omicron Variants Surge in Curitiba, Southern Brazil, and Its Impact on Overall COVID-19 Lethality. **Viruses**. v. 14, n. 4, p. 1-8, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/14/4/809>>. Acesso em: 08 out. 2022.

AFZALI, B. et al. CD 161 expression characterizes a subpopulation of human regulatory T cells that produces IL-17 in a STAT 3-dependent manner. **European journal of immunology**. v. 43, n. 8, p. 2043-2054, 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201243296>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

AGRATI, C. et al. Expansion of myeloid-derived suppressor cells in patients with severe coronavirus disease (COVID-19). **Cell Death & Differentiation**. v. 27, n. 11, p. 3196-3207, 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41418-020-0572-6>>. Acesso em: 21 jul. 2021.

ALLARD, B. et al. The ectonucleotidases CD 39 and CD 73: novel checkpoint inhibitor targets. **Immunological reviews**. v. 276, n. 1, p. 121-144, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/imr.12528>>. Acesso em: 07 jul. 2022.

ANFT, M. et al. Detection of pre-existing SARS-CoV-2-reactive T cells in unexposed renal transplant patients. **Journal of Nephrology**. v. 34, n. 4, p. 1025-1037, 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-021-01092-0>>. Acesso em: 05 ago. 2022.

ANTONIOLI, L. et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in molecular medicine**. v. 19, n. 6, p. 355-367, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1471491413000543>>. Acesso em: 01 ago. 2022.

BARTLESON, J. M. et al. SARS-CoV-2, COVID-19 and the aging immune system. **Nature aging**. v. 1, n. 9, p. 769-782, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s43587-021-00114-7>>. Acesso em: 01 ago. 2022.

BATTASTINI, A. M. O. et al. CD39 and CD73 as promising therapeutic targets: what could be the limitations?. **Frontiers in Pharmacology**. v. 12, n. 633603, p. 1-5, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.633603/full>>. Acesso em: 30 jul. 2022.

BERIOU, G. et al. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**. v. 113, n. 18, p. 4240-4249, 2009. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/113/18/4240/25773/IL-17-producing-human-peripheral-regulatory-T>>. Acesso em: 01 jul. 2022.

BHAT, E. A. et al. SARS-CoV-2: insight in genome structure, pathogenesis and viral receptor binding analysis—an updated review. **International immunopharmacology**. v. 95, p. 1-9, 2021. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576921001296>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

BOISSONNAS, A. et al. Foxp3⁺ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. **Immunity** v. 32, n. 2, p. 266-278, 2010. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761310000397>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

BOTTA GORDON-SMITH, S. et al. Correlation of low CD73 expression on synovial lymphocytes with reduced adenosine generation and higher disease severity in juvenile idiopathic arthritis. **Arthritis & rheumatology**. v. 67, n. 2, p. 545-554, 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.38959>>. Acesso em: 27 jun. 2022.

BRANT, A. C. et al. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. **Cell & bioscience**. v. 11, n. 1, p. 1-17, 2021. Disponível em: <<https://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13578-021-00643-z>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Como é transmitido?, 2021a. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/como-e-transmitido>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Diagnóstico, 2021b. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/diagnostico>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Informe Semanal nº 37 de Evidências sobre Variantes de Atenção de SARS-CoV-2, 2021d. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/publicacoes-tecnicas/informes-de-variantes/informe_s37.pdf/view>. Acesso em: 08 out. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Painel Coronavírus, 2022. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Sintomas, 2021c. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/sintomas>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

CALDRER, S. et al. Regulatory T Cells as Predictors of Clinical Course in Hospitalised COVID-19 Patients. **Frontiers in immunology**. v. 12, n. 789735, p. 1-11, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.789735/full>>. Acesso em: 14 jul. 2022.

CAO, X. et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. **Immunity**. v. 27, n. 4, p. 635-646, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S107476130700444X>>. Acesso em: 01 jul. 2022.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. et al. Neutrophils and COVID-19: The road so far. **International immunopharmacology**. v. 90, p. 107233, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576920337000>>. Acesso em: 12 set. 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. How COVID-19 Spreads, 2022a. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/how-covid-spreads.html>> Acesso em: 09 mar. 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Symptoms of COVID-19, 2022b. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>> Acesso em: 09 mar. 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Self-Testing At Home or Anywhere, 2022c. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/testing/self-testing.html>> Acesso em: 20 ago. 2022.

CHARONIS, Spyros A.; JAMES, Lisa M.; GEORGOPOULOS, Apostolos P. SARS-CoV-2 in silico binding affinity to human leukocyte antigen (HLA) Class II molecules predicts vaccine effectiveness across variants of concern (VOC). **Scientific reports**. v. 12, n. 1, p. 1-10, 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-022-11956-5>>. Acesso em: 22 ago 2022.

CHAUDHRY, A. et al. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. **Science**. v. 326, n. 5955, p. 986-991, 2009. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1172702>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

CHEN, X. et al. Characteristics of immune cells and cytokines in patients with coronavirus disease 2019 in Guangzhou, China. **Human immunology**. v. 81, n. 12, p. 702-708, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0198885920303906>>. Acesso em: 22 jul. 2021.

CHEN, Z. et al. SARS-CoV-2 cell entry and targeted antiviral development. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v. 11, n. 12, p. 3879-3888, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211383521001726>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

CHIKUMA, S. CTLA-4, an essential immune-checkpoint for T-cell activation. **Emerging Concepts Targeting Immune Checkpoints in Cancer and Autoimmunity**. v. 410, p. 99-126, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/82_2017_61>. Acesso em: 29 jul. 2022.

CHROBAK, P. et al. CD73 plays a protective role in collagen-induced arthritis. **The Journal of Immunology**. v. 194, n. 6, p. 2487-2492, 2015. Disponível em: <<https://www.jimmunol.org/content/194/6/2487.short>>. Acesso em: 01 jun. 2022.

CLAY, S. L. et al. Regulatory T cells control the dynamic and site-specific polarization of total CD4 T cells following Salmonella infection. **Mucosal immunology**. v. 13, n. 6, p. 946-957, 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41385-020-0299-1>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

CODO, A. C. et al. Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1a/ Glycolysis-Dependent Axis. **Cell metabolism**. v. 32, n. 3, p. 437-446. e5, 2020. Disponível em: <[https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131\(20\)30365-X](https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131(20)30365-X)>. Acesso em: 22 jul. 2021.

CSORDAS, B. et al. Is IFN expression by NK cells a hallmark of severe COVID-19?. **Cytokine**. v. 157, n. p. 1-11, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466622001806>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

DE-OLIVEIRA-PINTO, L. M. et al. Comparative Analysis of Circulating Levels of SARS-CoV-2 Antibodies and Inflammatory Mediators in Healthcare Workers and COVID-19 Patients. **Viruses**. v. 14, n. 3, p. 1-19, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/14/3/455>>. Acesso em: 05 ago. 2022.

DARIF, D. et al. The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong?. **Microbial Pathogenesis**. v. 153, n. 104799, p. 1-10, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401021000711>>. Acesso em: 01 ago. 2022.

DU, Z. et al. Shorter serial intervals and incubation periods in SARS-CoV-2 variants than the SARS-CoV-2 ancestral strain. **Journal of travel medicine**. p. 1-3, 2022. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jtm/advance-article/doi/10.1093/jtm/taac052/6571349>>. Acesso em: 10 ago. 2022.

EKŞIOĞLU-DEMIRALP, E. et al. Peripheral innate and adaptive immune cells during COVID-19: Functional neutrophils, pro-inflammatory monocytes, and half-dead lymphocytes. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**. v. 102, n. 2, p. 153-167, 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cyto.b.22042>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

ERKAN, K. et al. The role of regulatory T cells in allergic rhinitis and their correlation with IL-10, IL-17 and neopterin levels in serum and nasal lavage fluid. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**. v. 277, n. 4, p. 1109-1114, 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00405-020-05811-4>>. Acesso em: 05 set. 2022.

FENOGLIO, D. et al. Characterization of T lymphocytes in severe COVID-19 patients. **Journal of medical virology**. v. 93, n. 9, p. 5608-5613, 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.27037>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

GATTI, A. et al. Decrease of non-classical and intermediate monocyte subsets in severe acute SARS-CoV-2 infection. **Cytometry Part A**. v. 97, n. 9, p. 887-890, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cyto.a.24188>>. Acesso em: 08 out. 2022.

GENG, Y.; WANG, Y. Stability and transmissibility of SARS-CoV-2 in the environment. **Journal of Medical Virology**. p. 1-11, 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.28103>>. Acesso em: 10 de ago. 2022.

GHAZAVI, A. et al. Cytokine profile and disease severity in patients with COVID-19. **Cytokine**. v. 137, n. 155323, p. 1-5, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466620303392>>. Acesso em: 02 ago, 2022.

GIL-ETAYO, F. J. et al. T-helper cell subset response is a determining factor in COVID-19 progression. **Frontiers in cellular and infection microbiology**. v. 11, n. 624483, p. 1-11, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.624483/full>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

GRIFONI, A. et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. **Cell**, v. 181, n. 7, p. 1489-1501. e15, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420306103>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

GROVER, P.; GOEL, P. N.; GREENE, M. I. Regulatory T cells: regulation of identity and function. **Frontiers in Immunology**. v. 12, n. 750542, p. 1-10, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.750542/full>>. Acesso em: 31 mai. 2022.

GU, J. et al. Human CD39^{hi} regulatory T cells present stronger stability and function under inflammatory conditions. **Cellular & molecular immunology**. v. 14, n. 6, p. 521-528, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/cmi201630>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

GUERRA-GOMES, I. C. et al. Phenotypical characterization of regulatory T cells in acute Zika infection. **Cytokine**. v. 146, p. 1-7, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043466621002374>>. Acesso em: 15 mar 2022.

GUPTA, V. et al. CD39 positive regulatory T cell frequency as a biomarker of treatment response to methotrexate in rheumatoid arthritis. **International Journal of Rheumatic Diseases**. v. 21, n. 8, p. 1548-1556, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1756-185X.13333>>. Acesso em: 29 mai. 2022.

HAN, H. et al. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. **Emerging microbes & infections** v. 9, n. 1, p. 1123-1130, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1770129>>. Acesso em: 12 jul. 2022.

HELMY, Y. A. et al. The COVID-19 pandemic: a comprehensive review of taxonomy, genetics, epidemiology, diagnosis, treatment, and control. **Journal of clinical medicine**. v. 9, n. 4, p. 1-29, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2077-0383/9/4/1225>>. Acesso em 09 mar. 2022.

HU, B. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**. v. 19, n. 3, p. 141-154, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7>>. Acesso em 09 mar. 2022.

ISLAM, H. et al. Elevated interleukin-10 levels in COVID-19: potentiation of pro-inflammatory responses or impaired anti-inflammatory action?. **Frontiers in Immunology**. v.12, p. 1-5, n. 677008, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.677008/full>>. Acesso em: 01 ago. 2022.

ISLAS-VAZQUEZ, L. et al. LAP TGF-Beta Subset of CD4+ CD25+ CD127- Treg Cells is Increased and Overexpresses LAP TGF-Beta in Lung Adenocarcinoma Patients. **BioMed research international**. v. 2015, p. 1-12, 2015. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/430943/>>. Acesso em: 01 jun. 2022.

JACKSON, C. B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature reviews Molecular cell biology**. v. 23, n. 1, p. 3-20, 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41580-021-00418-x>>. Acesso em 09 mar. 2022.

JUNG, M. K.; KWAK, J.; SHIN, E. IL-17A-producing Foxp3+ regulatory T cells and human diseases. **Immune network**. v. 17, n. 5, p. 276-286, 2017. Disponível em: <>. Acesso em: 01 jul. 2022. Disponível em: <<https://synapse.koreamed.org/articles/1108081>>. Acesso em: 09 jun. 2022.

KALFAOGLU, B. et al. T-cell hyperactivation and paralysis in severe COVID-19 infection revealed by single-cell analysis. **Frontiers in immunology**. v. 11, n. 589380, p. 1-13, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.589380/full>>. Acesso em: 09 mar. 2021.

KAMADA, T. et al. PD-1+ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 116, n. 20, p. 9999-10008, 2019. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1822001116>>. Acesso em: 03 ago. 2022.

KANEKO, N. et al. Loss of Bcl-6-expressing T follicular helper cells and germinal centers in COVID-19. **Cell**. v. 183, n. 1, p. 143-157. e13, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420310679>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

KANG, C. K. et al. Aberrant hyperactivation of cytotoxic T-cell as a potential determinant of COVID-19 severity. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 97, p. 313-321, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971220304136>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

KIM, Y.; SHIN, E. Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection. **Experimental & Molecular Medicine**. v. 53, n. 5, p. 750-760, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s12276-021-00592-0>>. Acesso em: 22 jul. 2021.

KOBLISCHKE, M. et al. Dynamics of CD4 T cell and antibody responses in COVID-19 patients with different disease severity. **Frontiers in medicine**. v. 7, n. 592629, p. 1-10, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2020.592629/full>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

KOCH, M. A. et al. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. **Nature immunology**. v. 10, n. 6, p. 595-602, 2009. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ni.1731>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

KOAY, H. et al. Are NKT cells a useful predictor of COVID-19 severity?. **Immunity**, v. 55, n. 2, p. 185-187, 2022. Disponível em: <[https://www.cell.com/immunity/pdfExtended/S1074-7613\(22\)00034-6](https://www.cell.com/immunity/pdfExtended/S1074-7613(22)00034-6)>. Acesso em: 22 ago. 2022.

KOYAMA, S.; NISHIKAWA, H. Mechanisms of regulatory T cell infiltration in tumors: implications for innovative immune precision therapies. **Journal for immunotherapy of cancer**. v. 9, n. 7, p. 1-13, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8327843/>>. Acesso em: 20 jun. 2022.

KRYCZEK, I. et al. IL-17+ regulatory T cells in the microenvironments of chronic inflammation and cancer. **The Journal of Immunology**. v. 186, n. 7, p. 4388-4395, 2011. Disponível em: <<https://www.jimmunol.org/content/186/7/4388.short>>. Acesso em: 05 ago. 2022.

KULINSKI, J. M.; TARAKANOVA, V. L.; VERBSKY, J. Regulation of antiviral CD8 T-cell responses. **Critical Reviews™ in Immunology**. v. 33, n. 6, p. 477-488, 2013. Disponível em: <<https://www.dl.begellhouse.com/journals/2ff21abf44b19838,7e31f36147bef9fb,434e88b1552ae68f.html>>. Acesso em: 05 out, 2022.

LE BERT, N. et al. Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection. **Journal of Experimental Medicine**. v. 218, n. 5, p. 1-17, 2021. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/218/5/e20202617/211835/Highly-functional-virus-specific-cellular-immune>>. Acesso em: 02 ago. 2022.

LEI, X. et al. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. **Nature communications**. v. 11, n. 1, p. 1-12, 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-020-17665-9>>. Acesso em: 20 jul. 2021.

LEVINE, A. G. et al. Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. **Nature**. v. 546, n. 7658, p. 421-425, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature22360>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

LI, L. et al. Runx1 and Runx3 are involved in the generation and function of highly suppressive IL-17-producing T regulatory cells. v. 7, n. 9, p. 1-17, 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0045115>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

LI, Q. et al. Immune response in COVID-19: what is next?. **Cell Death & Differentiation**. v. 29, n. 6, p. 1107-1122, 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41418-022-01015-x>>. Acesso em: 02 jul. 2022.

LIAO, M. et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. **Nature medicine**. v. 26, n. 6, p. 842-844, 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41591-020-0901-9>>. Acesso em: 19 jul. 2021.

LIN, P. H. et al. Vaccine-induced antigen-specific regulatory T cells attenuate the antiviral immunity against acute influenza virus infection. **Mucosal Immunology**. v. 11, n. 4, p. 1239-1253, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41385-018-0004-9>>. Acesso em: 05 out. 2022.

LIN, X. et al. ORF8 contributes to cytokine storm during SARS-CoV-2 infection by activating IL-17 pathway. **Isience**. v. 2, n. 4, p. 1-24, 2021. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589004221002613>>. Acesso em: 07 jul. 2022.

LIU, J. et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts critical illness patients with 2019 coronavirus disease in the early stage. **Journal of Translational Medicine**. v. 18, n. 1, p. 1-12, 2020. Disponível em: <<https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-020-02374-0>>. Acesso em: 22 jul. 2021.

LIU, J. et al. Analysis of the long-term impact on cellular immunity in COVID-19-recovered individuals reveals a profound NKT cell impairment. **Mbio**. v. 12, n. 2, p. 1-14, 2021. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mBio.00085-21>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

LOEBBERMANN, J. et al. Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. **Mucosal immunology**. v. 5, n. 2, p. 161-172, 2012. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/mi201162>>. Acesso em: 17 mai. 2022.

LONG, Q. et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. **Nature medicine**. v. 26, n. 8, p. 1200-1204, 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41591-020-0965-6?MvBriefArticleId=34327>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

MARTELLUCCI, C. A. et al. SARS-CoV-2 pandemic: an overview. **Advances in Biological Regulation**. v. 77, p. 1-11, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212492620300476>>. Acesso em: 21 jul. 2021.

MAZZONI, A. et al. Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent. **The Journal of clinical investigation**. v. 130, n. 9, p. 4694-4703, 2020. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/138554>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

MECKIFF, B. J. et al. Imbalance of regulatory and cytotoxic SARS-CoV-2-reactive CD4⁺ T cells in COVID-19. **Cell**, v. 183, n. 5, p. 1340-1353. e16, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420313076>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

MERAD, M.; SUBRAMANIAN, A.; WANG, T. T. An aberrant inflammatory response in severe COVID-19. **Cell host & microbe**. v. 29, n. 7, p. 1043-1047, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312821003000>>. Acesso em: 18 mai. 2022.

MITTAL, A. et al. COVID-19 pandemic: Insights into structure, function, and hACE2 receptor recognition by SARS-CoV-2. **PLoS pathogens**. v. 16, n. 8, p. 1-19, 2020. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1008762>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

MODABBER, Z. et al. TIM-3 as a potential exhaustion marker in CD4⁺ T cells of COVID-19 patients. **Immunity, Inflammation and Disease**. v. 9, n. 4, p. 1707-1715, 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/iid3.526>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

MOHEBBI, S. R. et al. Significant changes of CD4, FOXP3, CD25, and IL6 expression level in Iranian COVID-19 patients. **Gastroenterology and hepatology from bed to bench**. v. 13, n. 4, p. 388-392, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7682958/>>. Acesso em: 22 jul. 2021.

MORPHEUS. <https://software.broadinstitute.org/morpheus/> (2022). Acesso em: 15 jul. 2022.

NARASIMHAN, P. B. et al. Nonclassical monocytes in health and disease. **Annual review of immunology**. v. 37, p. 439-456, 2019. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-immunol-042617-053119>>. Acesso em: 08 out. 2022.

NEIDLEMAN, J. et al. SARS-CoV-2-specific T cells exhibit phenotypic features of helper function, lack of terminal differentiation, and high proliferation potential. **Cell Reports Medicine**. v. 1, n. 6, p. 1-12.e4, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666379120301026>>. Acesso: 23 jul. 2021.

NEUMANN, J. et al. Increased IL-10-producing regulatory T cells are characteristic of severe cases of COVID-19. **Clinical & translational immunology**. v. 9, n. 11, p. 1-13, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cti2.1204>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

PATEL, R. et al. A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, moderna & Johnson & Johnson. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**. v. 18, n. 1, p. e2002083-1-e2002083-12, 2022. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2021.2002083>>. Acesso em: 08 set. 2022.

PENG, R. et al. Cell entry by SARS-CoV-2. **Trends in biochemical sciences**. v. 46, n. 10, p. 848-860, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968000421001183>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

PERES, R. S. et al. Low expression of CD39 on regulatory T cells as a biomarker for resistance to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 112, n. 8, p. 2509-2514, 2015. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.1424792112>>. Acesso em: 10 jun. 2022.

PEYNEAU, M. et al. Innate immune deficiencies are associated with severity and poor prognosis in patients with COVID-19. **Scientific reports**. v. 12, n. 1, p. 1-11, 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-021-04705-7>>. Acesso em: 09 mar.2022.

QIN, C. et al. Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. **Clinical infectious diseases**. v. 71, n. 15, p. 762-768, 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article/71/15/762/5803306>>. Acesso em: 05 ago. 2022.

RAHIMZADEH, M.; NADERI, N. Toward an understanding of regulatory T cells in COVID-19: A systematic review. **Journal of Medical Virology**. v. 93, n. 7, p. 4167-4181, 2021.

Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.26891>>. Acesso em: 15 jul. 2022.

RESTIMULIA, L. et al. The CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Regulatory T Cells Regulated by MSCs Suppress Plasma Cells in a Mouse Model of Allergic Rhinitis. **Medical Archives**. v. 75, n. 4, p. 256-261, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8563054/>>. Acesso em: 05 set. 2022.

REUSCH, N. et al. Neutrophils in COVID-19. **Frontiers in Immunology**. v. 12, n. 652470, p. 1-9, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.652470/full>>. Acesso em: 21 jul. 2021.

ROBLES-ROMERO, J. et al. Behaviour of aerosols and their role in the transmission of SARS-CoV-2; a scoping review. **Reviews in Medical Virology**. v. 32, n. 3, p. 1-10, 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/rmv.2297>>. Acesso em: 10 set. 2022.

ROCAMORA-REVERTE, L. et al. The complex role of regulatory T cells in immunity and aging. **Frontiers in Immunology**. v. 11, n. 616949, p. 1-12, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.616949/full>>. Acesso em: 10 jun. 2022.

ROWSHANRAVAN, B.; HALLIDAY, N.; SANSOM, D. M. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**. v. 131, n. 1, p. 58-67, 2018. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/131/1/58/107717/CTLA-4-a-moving-target-in-immunotherapy>>. Acesso em: 21 jun. 2022.

SADEGHI, A. et al. Th17 and Treg cells function in SARS-CoV2 patients compared with healthy controls. **Journal of cellular physiology**. v. 236, n. 4, p. 2829-2839, 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.30047>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

SCHNOELLER, C. et al. Attenuated *Bordetella pertussis* vaccine protects against respiratory syncytial virus disease via an IL-17–dependent mechanism. **American journal of respiratory and critical care medicine**. v. 189, n. 2, p. 194-202, 2014. Disponível em: <<https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1164/rccm.201307-1227OC>>. Acesso em: 14 jun. 2022.

SECOLIN, R. et al. Genetic variability in COVID-19-related genes in the Brazilian population. **Human genome variation**. v. 8, n. 1, p. 1-9, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41439-021-00146-w>>. Acesso em: 23 mar. 2022.

SEFIK, E. et al. Individual intestinal symbionts induce a distinct population of ROR γ ⁺ regulatory T cells. **Science**. v. 349, n. 6251, p. 993-997, 2015. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.aaa9420>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

SETHI, J. K.; HOTAMISLIGIL, G. S. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. **Nature metabolism**. v. 3, n. 10, p. 1302-1312, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s42255-021-00470-z>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

SHUWA, H. A. et al. Alterations in T and B cell function persist in convalescent COVID-19 patients. **Med.** v. 2, n. 6, p. 720-735. e4, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S266663402100115X>>. Acesso em: 01 mai. 2022.

SIMSEK, A. et al. Assessment of CD39 expression in regulatory T-cell subsets by disease severity in adult and juvenile COVID-19 cases. **Journal of Medical Virology.** v. 94, n. 5, p. 2089-2101, 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.27593>>. Acesso em: 02 mai. 2022.

SINGH, R. et al. Sustained expression of inflammatory monocytes and activated T cells in COVID-19 patients and recovered convalescent plasma donors. **Immunity, inflammation and disease.** v. 9, n. 4, p. 1279-1290, 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/iid3.476>>. Acesso em: 06 mai. 2022.

STEINHAGEN, K.; MESSING, C.; LATTWEIN, E.; STIBA, K.; LINDHORST, F.; NEUGEBAUER, E.; MÜLLER, M.; CORMAN, V. Applicants: Eurimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Charité - Universitätsmedizin Berlin. A method and reagents for the diagnosis of SARS-COV-2. N. EP20158626A. Data do arquivamento: 20 Fev. 2020. Data de publicação: 25 Ago. 2021.

TAN, A. T. et al. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. **Cell reports.** v. 34, n. 6, p. 1-9. e3, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124721000413>>. Acesso em: 19 Jul. 2021.

TAN, M. et al. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. **Immunology.** v. 160, n. 3, p. 261-268, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imm.13223>>. Acesso em: 10 out. 2022.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. **Nature Reviews Immunology.** v. 18, n. 5, p. 309-324, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nri.2017.142>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

VICK, S. C. et al. A regulatory T cell signature distinguishes the immune landscape of COVID-19 patients from those with other respiratory infections. **Science advances.** v. 7, n. 46, p. 1-18, 2021. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/full/10.1126/sciadv.abj0274>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

VIGÓN, L. et al. Impaired Cytotoxic Response in PBMCs From Patients With COVID-19 Admitted to the ICU: Biomarkers to Predict Disease Severity. **Frontiers in immunology.** v. 12, n. 665329, p. 1-14, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.665329/full>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

VITTE, J. et al. A granulocytic signature identifies COVID-19 and its severity. **The Journal of infectious diseases.** v. 222, n. 12, p. 1985-1996, 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article/222/12/1985/5907982>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

VOO, K. S. et al. Identification of IL-17-producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 106, n. 12, p. 4793-4798, 2009. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0900408106>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

WANG, H. et al. Regulatory T cells in COVID-19. **Aging and disease**. v. 12, n. 7, p. 1545-1553, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8460308/>>. Acesso em: 25 jun. 2022.

WANG, P. et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody responses are more robust in patients with severe disease. **Emerging microbes & infections**. v. 9, n. 1, p. 2091-2093, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1823890>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

WANG, X. et al. A critical role of IL-17 in modulating the B-cell response during H5N1 influenza virus infection. **Cellular & molecular immunology**. v. 8, n. 6, p. 462-468, 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/cmi201138>>. Acesso em: 22 jun. 2022.

WANG, Y. et al. The role of CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells in the immunopathogenesis of COVID-19: implications for treatment. **International Journal of Biological Sciences**. v. 17, n. 6, p. 1507-1520, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8071774/>>. Acesso em: 28 mai. 2022.

WEISKOPF, D. et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. **Science immunology**. v. 5, n. 48, p. 1-10, 2020. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/full/10.1126/sciimmunol.abd2071>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Coronavirus disease (COVID-19), 2021a. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Coronavirus disease (COVID-19): How is it transmitted?, 2021b. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-covid-19-how-is-it-transmitted>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Timeline: WHO's COVID-19 response, 2022a. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/interactive-timeline>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, 2022b. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

WU, Y. et al. Incubation period of COVID-19 caused by unique SARS-CoV-2 strains: a systematic review and meta-analysis. **JAMA Network Open**. v. 5, n. 8, p. 1-19, 2022. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/article-abstract/2795489>>. Acesso em: 10 set. 2022.

WU, Z.; MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the

Chinese Center for Disease Control and Prevention. **Jama**. v. 323, n. 13, p. 1239-1242, 2020. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/2762130>>. Acesso em: 12 mar. 2022.

YAN, X. et al. Neutrophil to lymphocyte ratio as prognostic and predictive factor in patients with coronavirus disease 2019: a retrospective cross-sectional study. **Journal of medical virology**. v. 92, n. 11, p. 2573-2581, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmv.26061>>. Acesso em: 19 jul. 2021.

YAO, H. et al. Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. **Cell**. v. 183, n. 3, p. 730-738.e13, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867420311594>> Acesso em: 20 jul. 2021.

YU, K. et al. Dysregulated adaptive immune response contributes to severe COVID-19. **Cell research**. v. 30, n. 9, p. 814-816, 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41422-020-0391-9>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

ZACCA, E. R. et al. B cells from patients with rheumatoid arthritis show conserved CD39-mediated regulatory function and increased CD39 expression after positive response to therapy. **Journal of Molecular Biology**. v. 433, n. 1, p. 1-11, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283620305969>>. Acesso em: 16 mai. 2022.

ZHANG, B. et al. Immune phenotyping based on the neutrophil-to-lymphocyte ratio and IgG level predicts disease severity and outcome for patients with COVID-19. **Frontiers in molecular biosciences**. v. 7, n. 157, p. 1-7, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.00157/full>>. Acesso em: 09 mar. 2022.

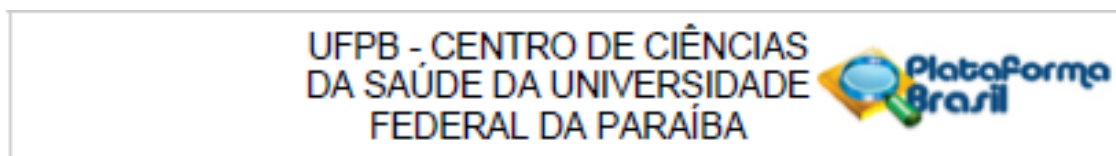
ZHANG, C.; YANG, M. Newly Emerged Antiviral Strategies for SARS-CoV-2: From Deciphering Viral Protein Structural Function to the Development of Vaccines, Antibodies, and Small Molecules. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 23, n. 11, p. 1-22, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/23/11/6083>>. Acesso em: 20 ago. 2022.

ZHANG, D. et al. Frontline Science: COVID-19 infection induces readily detectable morphologic and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes. **Journal of leukocyte biology**. v. 109, n. 1, p. 13-22, 2021. Disponível em: <<https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/JLB.4HI0720-470R>>. Acesso em: 22 jul. 2021.

APÊNDICES

9. APÊNDICES

APÊNDICE 1. Parecer consubstanciado emitido pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley - UFPB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE NO PADRÃO DE RESPOSTAS PATOGÊNICAS OU SUPRESSORAS DESENCADEADA POR ANTÍGENOS PEPTÍDICOS EM PACIENTES COM COVID-19

Pesquisador: Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 31354720.0.0000.5188

Instituição Proponente: PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.101.879

Apresentação do Projeto:

Bem apresentado

Objetivo da Pesquisa:

Bem definido

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Realizada

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Fativo

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados

Recomendações:

vide conclusões

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa encontra-se dentro das normas, podendo ser iniciada

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOÃO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

APÊNDICE 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TÍTULO DO PROJETO: PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE NO PADRÃO DE RESPOSTAS PATOGENICAS OU SUPRESSORAS DESENCADEADA POR ANTÍGENOS PEPTÍDICOS EM PACIENTES COM COVID-19

PESQUISADORA: Tatjana Keesen De Souza Lima

Estamos convidando você para participar como voluntário de uma pesquisa sobre coronavírus (SARS-Cov-2), responsável pela doença COVID-19, que é uma doença causada por um microorganismo (vírus) transmitido para o ser humano através de outro ser humano. Nosso objetivo com essa pesquisa é avaliar porque existem pessoas que ficam mais doentes que as outras, quando estão com a COVID-19 e comparar a diferença entre elas; por exemplo, algumas podem ter febre, tosse seca e fadiga podendo, alguns indivíduos, desenvolverem outras manifestações clínicas a exemplo de congestão nasal, coriza, vômito, diarreia, perda do paladar (não sentir gosto) e perda do olfato (não sentir cheiro), além de dificuldades respiratórias. Embora cerca da maior parte (80%) das pessoas com sintomas se recuperem sem a necessidade de tratamentos especiais, uma parcela de pacientes apresenta um quadro respiratório grave necessitando, portanto, de internação hospitalar. Para isto, vamos realizar um estudo do seu sistema de defesa (imunológico), no qual serão analisadas as células que são capazes de defender o organismo contra o coronavírus (SARS-Cov-2). Iremos observar um grupo determinado de células que regulam o sistema de defesa humano e se a presença dessas células está relacionada a capacidade de a pessoa desenvolver formas mais graves da doença.

Caso aceite participar do estudo você deverá permitir a realização da coleta do seu sangue. Além disto, você deverá autorizar o nosso acesso à sua ficha médica, quando você teve a doença COVID-19, para que possamos coletar informações da sua doença e os resultados dos exames realizados. Você também deverá responder um questionário a respeito da sua saúde. Quando você estiver respondendo esse questionário se alguma pergunta lhe causar constrangimento você poderá deixar de respondê-la.

Vamos a seguir, explicar a você para que utilizaremos o material coletado e os riscos e desconforto que poderão existir.

Coleta de sangue - Serão coletados, por uma pessoa devidamente treinada, aproximadamente 20 mL do seu sangue; utilizando material estéril e descartável. Esse sangue só será coletado após 30-45 dias dos sinais clínicos relacionados a COVID-19 desaparecerem. Esse projeto possui um caráter de acompanhamento dos pacientes durante 48 meses (4 anos). É importante explicar que, após a primeira coleta do seu sangue, precisaremos coletar novamente depois de 90 dias, 180 dias, 12 meses (1 ano), 24 meses (2 anos) e 36 meses (3 anos), após o desaparecimento dos sintomas da COVID-19. Chamamos isso de acompanhamento ao longo do tempo (longitudinal), e ele é importante para que a equipe de pesquisa tenha conhecimento sobre possíveis

alterações que o seu sistema de defesa (sistema imune), possa apresentar ao longo do tempo. Os riscos e desconfortos que você correrá nessa coleta são mínimos e poderão ser desmaio, sangramentos, manchas arroxeadas ou infecção no local da coleta. Entretanto minimizaremos estes riscos com cuidados na realização deste procedimento, que são a limpeza no local da coleta através da utilização de álcool e pressionando a região do braço onde foi feita a coleta com algodão por alguns minutos, após a retirada da agulha. Com o sangue coletado iremos realizar um exame laboratorial das células do seu sangue (hemograma e medidas de marcadores de doença), para determinar o seu estado atual. Destas células do sangue iremos realizar o estudo determinando características específicas importantes da doença, para estudar seu sistema de defesa (sistema imunológico), como também faremos uma análise para confirmar se você teve a COVID-19. Todos os procedimentos estarão de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS 441/11, Art. 1º, itens 2.II e 6; Portaria MS 2.201/11, Capítulo II, Artigos 5º e Capítulo III, Artigo 8º).

O material biológico utilizado neste trabalho (sangue periférico) será utilizado somente para pesquisa e em seguida devidamente descartado.

Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade.

Os benefícios da sua participação nesta pesquisa é que você será informado do resultado que iremos realizar com a amostra do sangue coletado.

Você também irá contribuir com a busca pela melhoria dos estudos na pesquisa dessa doença com informações que poderão beneficiar o tratamento da doença e/ou da cura.

Garantimos que todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Objetivando o caráter confidencial, todos os voluntários dessa pesquisa serão identificados por códigos, que serão inseridos no questionário. Assim, o(a) Sr(a) não será identificado em qualquer publicação que este estudo poderá resultar. Caso você tenha interesse nos resultados da pesquisa basta solicitar ao pesquisador responsável.

Apesar de existir o risco de vazamento de dados presentes nos prontuários dos pacientes para fora da equipe de pesquisa, os dados dos prontuários e questionários aplicados serão guardados em local seguro, conhecido apenas pela equipe envolvida na pesquisa, no tempo de execução deste projeto. Garantimos que seus dados e suas amostras serão utilizados apenas para este estudo e, em seguida, descartados.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária, você não será pago por participar do estudo. No entanto, caso você tenha algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, e se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito à indenização.

O(a) Sr(a) ficará com uma cópia deste documento e em caso de interesse na obtenção dos resultados (exames) referentes a sua amostra sanguínea ou de dúvidas a respeito deste estudo basta contatar a pesquisadora responsável, Drª Tatjana Keesen de Souza Lima, no Centro de Biotecnologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária- João Pessoa - PB - Brasil - CEP: 58051-900 Fone: (83) 3216-7173 ou outro membro da equipe cujo contato será fornecido no local da coleta.

Para esclarecimentos referentes a questões éticas desta pesquisa o (a) voluntário(a) poderá entrar em contato com a Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) localizada no Centro de Ciências da Saúde (1º

andar / Campus I / Cidade Universitária CEP: 58.051-900 - João Pessoa-PB Tel. (83) 3216 7791 email: comitedeetica@ccs.ufpb.br e/ou Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), endereçada na Esplanada dos Ministérios, em Brasília – DF (CEP: 70058-900; Tel: (61) 33155877; e-mail: conep@saude.gov.br) responsável por elaborar e atualizar normas acerca dos aspectos éticos das pesquisas que envolvem seres humanos no Brasil além de coordenar os CEPs das instituições.

Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será desenvolvida, os riscos e benefícios envolvidos, bem como os meus direitos, e concordo em participar voluntariamente do estudo **“PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE NO PADRÃO DE RESPOSTAS PATOGENICAS OU SUPRESSORAS DESENCADEADA POR ANTÍGENOS PEPTÍDICOS EM PACIENTES COM COVID-19”** autorizando o uso do meu sangue para a realização deste estudo.

Voluntário: _____ Data: ____/____/____
____/____

Voluntário: _____ Data: ____/____/____
____/____

APÊNDICE 3. Questionário clínico epidemiológico.

QUESTIONÁRIO

DADOS GERAIS	
NOME:	TELEFONE:
DATA DE NASCIMENTO: / /	ETNIA: () INDÍGENA () BRANCO () PARDO
SEXO: () MASCULINO () FEMININO	() AMARELO () PRETO
MUNICÍPIO:	ZONA: () RURAL () URBANA
ENDEREÇO:	
PROFISSÃO:	

DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS	
INÍCIO DOS SINTOMAS: / /	FINAL DOS SINTOMAS: / /
PROVÁVEL LOCAL DE CONTÁGIO:	
PACIENTE TEM CONHECIMENTO DE QUEM CONTRAIU A INFECÇÃO? () SIM () NÃO	
() FAMILIARES (NÍVEL DE PARENTESCO:)	
() COMPANHEIRO(A)	
() AMIGO(A)	
() COLEGA DE TRABALHO	
() DESCONHECIDO	
PACIENTE FOI HOSPITALIZADO? () SIM () NÃO	
LOCAL DA INTERNAÇÃO:	
INÍCIO DA INTERNAÇÃO: / /	FIM DA INTERNAÇÃO: / /
SOROLOGIA (IgM) CORONAVÍRUS:	SOROLOGIA (IgG) CORONAVÍRUS
() POSITIVO () NEGATIVO	() POSITIVO () NEGATIVO
RT-PCR (DATA DA REALIZAÇÃO): / /	RT-PCR
	() POSITIVO () NEGATIVO
Tomou algum medicamento durante a infecção: () SIM () NÃO	Se sim, qual (quais) medicamento (s):
Atualmente toma algum medicamento? () SIM () NÃO	Se sim, qual (quais) medicamento (s):

COMORBIDADES		
COMORBIDADE	SIM	NÃO
DIABETES MELLITUS		
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA		
HIPERTENSÃO		
INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA CRÔNICA		
INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA		
IMUNODEFICIÊNCIA		
ASMA		
OBESIDADE		
OUTROS:		

SINAIS E SINTOMAS	INTENSIDADE		OBSERVAÇÃO
FEBRE			
CEFALEIA			
CORIZA			
DOR DE GARGANTA			
TOSSE SECA			
TOSSE COM CATARRO ESPESSO			
TOSSE COM SANGUE			
DIFICULDADE RESPIRATÓRIA			
OBSTRUÇÃO NASAL			
TAQUIPNEIA			
ARTRALGIA			
MIALGIA			
NAUSEA			
VÔMITO			
DIARREIA			
ARREPIOS			
FADIGA			
INCHAÇO OCULAR			
OUTROS			

DATA DE PREENCHIMENTO: ____/____/____

CÓDIGO DO PACIENTE: _____

(ASSINATURA DO PESQUISADOR)

APÊNDICE 4. Comprovante de depósito do pedido de patente de invenção intitulado "Processo de polipeptídeo antigênico de coronavírus da síndrome respiratória aguda grave e sua aplicação".



23/03/2022 870220025047
18:05

29409161947982248

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2022 005518 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24098477000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58059-900

País: Brasil

Telefone: (83) 32167558

Fax:

Email: inova@reitoria.ufpb.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 23/03/2022 às 18:05, Petição 870220025047

APÊNDICE 5. Artigo publicado em revista internacional intitulado "Phenotypical characterization of regulatory T cells in acute Zika infection".

Cytokine 146 (2021) 155651



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytokine

Phenotypical characterization of regulatory T cells in acute Zika infection

Isabel Cristina Guerra-Gomes^{a,1}, Bruna Macêdo Gois^{a,1}, Rephany Fonseca Peixoto^a,
Pedro Henrique de Sousa Palmeira^a, Cíntia Nóbrega de Sousa Dias^a,
Bárbara Guimarães Csordas^a, Josélio Maria Galvão Araújo^b, Robson Cavalcante Veras^c,
Isac Almeida de Medeiros^c, Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo^c,
Rosemary Jane Boyton^d, Daniel Martin Altmann^e, Tatjana Souza Lima Keesen^{a,*}

^a Immunology of Infectious Diseases Laboratory of Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil

^b Molecular Biology of Cancer and Infectious Diseases Laboratory of Post-Graduation Program on Parasite Biology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte 58076-970, Brazil

^c Research Institute for Drugs and Medicines, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil

^d Department of Infectious Disease, Faculty of Medicine, Hammersmith Hospital Campus, Imperial College London, London W12 0NN, United Kingdom

^e Department of Immunology and Inflammation, Faculty of Medicine, Hammersmith Hospital Campus, Imperial College London, London W12 0NN, United Kingdom

ARTICLE INFO

Keywords:
T cells
Infection
Viral
Human
Blood

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV), alongside Dengue virus (DENV), Chikungunya virus (CHIKV), and Yellow Fever Virus (YFV) are prevalent arboviruses in the Americas. Each of these infections is associated with the development of associated disease immunopathology. Immunopathological processes are an outcome of counter-balancing impacts between effector and regulatory immune mechanisms. In this context, regulatory T cells (Tregs) are key in modulating the immune response and, therefore, in tissue damage control. However, to date, Treg phenotypes and mechanisms during acute infection of the ZIKV in humans have not been fully investigated. The main aim of this work was to characterize Tregs and their immunological profile related to cytokine production and molecules that are capable of controlling the exacerbated inflammatory profile in acute Zika infected patients. Using whole blood analyses of infected patients, an *ex vivo* phenotypical characterization of Tregs, circulating during acute Zika virus infection, was conducted by flow cytometry. We found that though there are no differences in absolute Treg frequency between infected and healthy control groups. However, pro-inflammatory cytokine up-regulation such as IFN- γ and LAP was observed in the acute disease. Furthermore, acute ZIKV patients expressed increased levels of CD39/CD73, perforin/granzyme B, PD-1, and CTLA-4, all markers involved in mechanisms used by Tregs to attempt to control strong inflammatory responses. Thus, the data indicates a potential contribution of Tregs during the inflammatory ZIKV infection response.

1. Introduction

Arboviruses cause a range of serious infections in humans and constitute a major public health concern in tropical and subtropical areas [1]. The Zika virus (ZIKV) belongs to the Flaviviridae family and *Flavivirus* genus. This virus was first isolated in 1947 from a monkey (*Macaca mulatta*), captured in the Zika forest in Uganda, and then, from humans in 1968, in Nigeria. Mosquitoes of the *Aedes* genus are responsible for ZIKV transmission. During the 2016 pandemic, ZIKV was one of

the most prevalent arboviruses in the Americas, along with Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), and Yellow Fever (YFV) [2,3]. Zika is predominantly an asymptomatic disease, only 20% develop a mild illness characterized by an array of symptoms, such as fever, skin rash, conjunctivitis, muscle and joint pain, and other sporadic symptoms [1]. Although Zika often only causes mild symptoms, our group recently reported that arbovirus cases, including ZIKV cases, may be associated with induction of neuropathology [4]. It has been demonstrated that type I and II interferon responses play an essential role in the initial

Abbreviations: WB, Whole blood; HC, Healthy controls; ICS, Intracellular Cytokine Staining.

* Corresponding author.

E-mail address: tat.keesen@cbiotec.ufpb.br (T.S.L. Keesen).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.cyt.2021.155651>

Received 12 April 2021; Received in revised form 14 July 2021; Accepted 15 July 2021

Available online 26 July 2021

1043-4666/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

APÊNDICE 6. Artigo publicado em revista internacional intitulado "Downregulation of CD73 on CD4+ T cells from patients with chronic Chikungunya infection".



Research article

Downregulation of CD73 on CD4+ T cells from patients with chronic Chikungunya infection

Pedro Henrique de Sousa Palmeira^a, Bruna Macêdo Gois^a, Isabel Cristina Guerra-Gomes^a,
 Rephany Fonseca Peixoto^a, Cíntia Nóbrega de Sousa Dias^a, Josélio Maria Galvão Araújo^b, Ian P.G. Amaral^a,
 Tatjana Souza Lima Keesen^{a,*}

^a Immunology of Infectious Diseases Laboratory, Federal University of Paraíba, Department of Cellular and Molecular Biology, João Pessoa 58051-900, Brazil

^b Molecular Biology of Cancer and Infectious Diseases Laboratory of Post-Graduation Program on Parasite Biology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal 59078-970, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 16 September 2021
 Revised 16 December 2021
 Accepted 8 January 2022
 Available online xxxx

Keywords:
 Purinergic response
 Coinhibitory receptor
 Arbovirus
 Arthritogenic alphavirus
 Cytokines

ABSTRACT

Chikungunya is an important mosquito-borne disease caused by the arthritogenic chikungunya virus, characterized by sporadic outbreaks all around the world. Although CD4+ T cells seem to have an important role in the pathogenesis of chikungunya, the mechanisms involved in this process are not yet fully elucidated. The ectoenzymes CD39 and CD73, also expressed by CD4 T lymphocytes, are involved in the hydrolysis of pro-inflammatory extracellular ATP and generation of immunosuppressive adenosine and seem to be modulated in some arthritogenic pathologies. However, their involvement in Chikungunya disease is unclear. Thus, using flow cytometry, we investigated peripheral CD4+ T cells from patients with acute and chronic chikungunya to assess the expression of ectonucleotidases CD39 and CD73 and coinhibitory receptors and production of cytokine and cytolytic granules. Patients in the acute phase displayed increased levels of PD-1, CTLA-4, IL-10, and IFN- γ compared to healthy individuals and patients in the chronic phase. Moreover, during chronic Chikungunya, analyses of Mean Fluorescent Intensity (MFI) demonstrated a reduced density of LAP, Perforin and Granzyme B compared to the healthy control. Finally, reduced levels of the ectoenzymes CD39 and CD73 expression was found during the chronic phase suggesting a possible modulation of extracellular ATP and adenosine by CD4+ T cells that may be involved in the persistence of arthritogenic symptoms.

© 2022 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Chikungunya is an important mosquito-borne disease caused by the Chikungunya virus (CHIKV). Belonging to the genus Alpha-virus of family *Togaviridae*, this virus is transmitted to humans by arthropod vectors, primarily by *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes within an urban cycle [1]. CHIKV was first isolated from a Tanzanian patient in 1952, and since then CHIKV infections have been reported in all continents [2]. Chikungunya disease is an acute febrile illness characterized by a hallmark polyarthralgia, along with other manifestations such as maculopapular rash and myalgia [1,2]. Symptoms usually manifest after an incubation period of four to seven days and may progress to a chronic condition with debilitating arthritis, which may persist for months or years in some patients [1,2]. Arthralgia is considered the classic symp-

tom of chronic chikungunya disease, but a range of other symptoms may follow chikungunya infection, including musculoskeletal stiffness [3].

CHIKV infection can promote immune cell activation inducing production of pro-inflammatory and immunosuppressive mediators [4]. CD8+ T cells do not seem to be pivotal to Chikungunya development; however, evidence for the functional competence of CD8+ T cells in patients infected with CHIKV was previously reported [5,6]. Conversely, regulatory T lymphocytes, a subpopulation of CD4+ T cells that control pro-inflammatory responses, are related to the prevention of joint swelling [7]. However, during the acute and chronic phases of Chikungunya, these cells are diminished [8]. Moreover, IgM and IgG production as well as anti-CHIKV antibodies against E₂ glycoprotein epitopes seem to be dependent on these CD4+ T cells, as shown in a study conducted in an animal model [9].

It is well established that purinergic mechanisms play a pivotal role in modulating the inflammatory process [10]. In an extracellu-

* Corresponding author.
 E-mail address: tat.keesen@cbiotec.ufpb.br (T.S.L. Keesen).

<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2022.01.006>

0198-8859/© 2022 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

APÊNDICE 7. Artigo publicado em revista internacional intitulado "Regulatory T cells in acute and chronic human Chikungunya infection".

Microbes and Infection 24 (2022) 104927



Contents lists available at ScienceDirect

Microbes and Infection

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micinf



Short communication

Regulatory T cells in acute and chronic human Chikungunya infection

Bruna Macêdo Gois ^{a,1}, Rephany Fonseca Peixoto ^{a,1}, Isabel Cristina Guerra-Gomes ^b, Pedro Henrique de Sousa Palmeira ^a, Cíntia Nóbrega de Sousa Dias ^a, Josélio Maria Galvão Araújo ^c, Robson Cavalcante Veras ^d, Isac Araújo Medeiros ^d, Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo ^d, Rosemary Jane Boyton ^e, Daniel Martin Altmann ^f, Tatjana Souza Lima Keesen ^{a,b,*}

^a Immunology of Infectious Diseases Laboratory of Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 58051-900, Brazil

^b Post-graduation Program in Biotechnology, Center of Biotechnology of Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 58051-900, Brazil

^c Molecular Biology of Cancer and Infectious Diseases Laboratory of Post-Graduation Program on Parasite Biology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 58078-970, Brazil

^d Research Institute for Drugs and Medicines, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 58051-900, Brazil

^e Department of Infectious Disease, Faculty of Medicine, Hammersmith Hospital Campus, Imperial College London, London, W12 0NN, United Kingdom

^f Department of Immunology and Inflammation, Faculty of Medicine, Hammersmith Hospital Campus, Imperial College London, London, W12 0NN, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 September 2021

Accepted 13 December 2021

Available online 16 December 2021

Keywords:

Arboviruses

Chikungunya virus

Treg cells

Regulatory mechanisms

ABSTRACT

Chikungunya virus (CHIKV) infection generates strong immune responses that are associated with the disease pathophysiology. Regulatory T cells (Treg-cluster of differentiation (CD)-4⁺CD25^{high}forkhead box P3 (FOXP3⁺)) are essential for the induction and maintenance of peripheral tolerance. Thus, they play key roles in determining the patient prognosis by preventing excessive immune responses via different suppression immune mechanisms. However, the regulatory mechanisms involved in human CHIKV infection are still poorly understood. Here, we characterize for the first time the Treg cell molecule-associated-mechanism during acute and chronic human Chikungunya disease. Here, we assessed the Treg cell population and molecule-associated mechanism in the peripheral blood samples of acute and chronic patients with Chikungunya. Our results indicate that CHIKV infection is associated with reduced frequency of Tregs, along with the impaired expression and production of Treg functional markers, including CD39, CD73, perforin, granzyme, programmed death 1 (PD-1), cytotoxic T lymphocyte antigen (CTLA)-4, and transforming growth factor (TGF)- β . This observation suggests that Treg cells possess the poor regulatory capacity in both acute and chronic phases of the disease. Taken together, these data provide significant evidence that the imbalanced response of Treg cells plays an essential role in establishing the pathogenesis of Chikungunya.

© 2021 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus member of the *Togaviridae* family that is transmitted to humans mainly by mosquitoes of the genus *Aedes* sp. Infection further leads to a serious and debilitating disease, mainly due to its intense pain joint [1]. Although polyarthralgia is a hallmark symptom of CHIKV

infection, it also comprises a spectrum of other symptoms. Disease onset may last up to 21 d with other manifestations, such as high fever, myalgia, edema, headache, nausea, photophobia, and rash [1–3]. The chronic phase of Chikungunya might be related to several factors, such as viral persistence, severe clinical status in the acute phase, pre-existing joint comorbidities, and age. After 3 months of infection, approximately 80% of infected individuals still exhibit the persistence of polyarthralgia and polyarthritis [1,2].

Acute Chikungunya generates a strong immune proinflammatory response to stop the viral replication [4]. The chronic stages are characterized by intense cell influx and inflammatory

* Corresponding author. Immunology of Infectious Diseases Laboratory of Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 58051-900, Brazil.

E-mail address: tat.keesen@cbiotec.ufpb.br (T.S.L. Keesen).

¹ These authors contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2021.104927>

1286-4579/© 2021 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

APÊNDICE 8. Artigo publicado em revista internacional intitulado "Immunological imbalance in microcephalic children with congenital Zika virus syndrome".

Medical Microbiology and Immunology
https://doi.org/10.1007/s00430-022-00746-5

ORIGINAL INVESTIGATION



Immunological imbalance in microcephalic children with congenital Zika virus syndrome

Amanda Costa Ayres Salmeron¹ · Wallace Pitanga Bezerra² · Rafaela Lúcia Lopes de Souza³ · Luanderson Cardoso Pereira² · Lícia Maria do Nascimento² · Anna Cláudia Calvielli Castelo Branco^{4,9} · Luiza Emilia Cavalcanti Simas⁵ · Valéria Azevedo de Almeida¹ · Pedro Henrique de Souza Palmeira⁸ · Christiane Medeiros Bezerra² · Paulo Marcos Matta Guedes² · Maria Notomi Sato⁴ · Valéria Soraya de Farias Sales⁶ · Reginaldo Antônio de Oliveira Freitas Júnior^{1,5,7} · Tatjana de Souza Lima Keesen⁸ · Manuela Sales Lima Nascimento²

Received: 16 December 2021 / Accepted: 30 June 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Microcephalic children due congenital Zika virus syndrome (CZS) present neurological symptoms already well described. However, several other alterations can also be observed. Here, we aimed to evaluate the immune system of microcephaly CZS children. We showed that these patients have enlarged thymus, spleen and cervical lymph nodes, analysed by ultrasound and compared to the reference values for healthy children. In the periphery, they have an increase in eosinophil count and morphological alterations as hypersegmented neutrophils and atypical lymphocytes, even in the absence of urinary tract infections, parasitological infections or other current symptomatic infections. Microcephalic children due CZS also have high levels of IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 and type I IFNs, compared to healthy controls. In addition, this population showed a deficient cellular immune memory as demonstrated by the low reactivity to the tuberculin skin test even though they had been vaccinated with BCG less than 2 years before the challenge with the PPD. Together, our data demonstrate for the first time that CZS can cause alterations in primary and secondary lymphoid organs and also alters the morphology and functionality of the immune system cells, which broadens the spectrum of CZS symptoms. This knowledge may assist the development of specific therapeutic and more efficient vaccination schemes for this population of patients.

Keywords Congenital Zika syndrome · Microcephaly · Immune system · Lymphoid organ · Cytokines · Immune memory

Introduction

Zika Virus (ZIKV) is an emergent flavivirus that was first isolated in 1947 in Uganda [1] and in 2015 its arrival was confirmed in Brazil [2, 3]. The classic symptoms of the disease are mild, such as low fever, non-purulent conjunctivitis, retro-ocular pain, maculopapular rash, headache, myalgia, gastrointestinal disorders and arthralgia. However, the ZIKV epidemic was also associated with malformations in the

central nervous system (CNS) of fetuses after the detection of the virus in the blood, amniotic fluid and nervous tissue of embryos after congenital ZIKV infection [4, 5].

Children with congenital zika virus syndrome (CZS) may have symptoms as microcephaly, occipital bone protuberance, excess and/or skin folds in the scalp, umbilical hernia, severe global hypertonia, irritability, hyperexcitability, impaired auditory and visual responses, epileptic spasms, arthrogryposis, retinal and optic nerve changes, etc. [6]. Among the whole range of symptoms, microcephaly, which is generally severe, draws attention due to the craniofacial disproportion and the serious consequences on the child's neurodevelopment. Microcephaly is characterized by a malformation in the CNS in which head circumference is at least 2 standard deviations (SD) below the average for gestational age and gender. It usually causes delays in neurological, mental and motor development [7–9] and has no cure.

Edited by Christian Bogdan.

Amanda Costa Ayres Salmeron and Wallace Pitanga Bezerra contributed equally to this work.

✉ Manuela Sales Lima Nascimento
nascimentoms1@gmail.com

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 20 July 2022

Springer

APÊNDICE 9. Artigo publicado em revista internacional intitulado "Is IFN expression by NK cells a hallmark of severe COVID-19?"

Cytokine 157 (2022) 155971



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytokine

Is IFN expression by NK cells a hallmark of severe COVID-19?

Bárbara Guimarães Csordas^a, Pedro Henrique de Sousa Palmeira^c, Rephany Fonseca Peixoto^c, Fernando Cézar Queiroz Davis dos Santos Comberlang^b, Isac Almeida de Medeiros^d, Fátimade Lourdes Assunção Araújo de Azevedo^d, Robson Cavalcante Veras^d, Daniele Idalino Janebro^d, Ian P.G. Amaral^b, José Maria Barbosa-Filho^e, Tatjana Souza Lima Keesen^{f,*}

^a Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Immunology Laboratory of Infectious Diseases, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil

^b Biotechnology Graduation Program, Immunology Laboratory of Infectious Diseases, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil

^c Postgraduate Program in Physiology Science, Immunology Laboratory of Infectious Diseases, Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil

^d Research Institute for Drugs and Medicines, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil

^e Pharmaceutical Sciences Department, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil

^f Immunology Laboratory of Infectious Diseases, Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Natural killers
Interferons
COVID-19
SARS-CoV-2
Cytotoxic granules
Innate immunity

ABSTRACT

Natural Killer cells (NK) are crucial in host defense against viruses. There are many unanswered questions about the immune system in COVID-19, especially the mechanisms that contribute to the development of mild or severe forms of the disease. Although NK cells may have an essential role in the pathogenesis of COVID-19, the mechanisms involved in this process are not yet fully elucidated. Here, we demonstrate that CD3⁺CD56⁺ NK cells frequency in the volunteers who recovered from mild COVID-19 (Mild CoV) presented a significant increase compared to the healthy control (HC) and individuals recovering from severe COVID-19 (Severe CoV) groups. Furthermore, distinct IFN profiles in recovered COVID-19 patients with mild or severe clinical forms of the disease were observed in the total NK cells (CD3⁺CD56⁺). In the first group, NK cells express increased levels of IFN- α compared to the severe CoV, while higher production of IFN- γ in severe CoV was found. Moreover, NK cells in mild CoV express more cytolytic granules depicted by granzyme B and perforin. Compared to HC, PBMCs from mild CoV presented higher Ki-67 and TIM-3 production after Pool CoV-2 and Pool Spike CoV-2 peptides stimulus. In addition, non-stimulated PBMCs in the mild CoV group had higher NK TIM-3⁺ frequency than severe CoV. In the mild CoV group, Pool Spike CoV-2 and Pool CoV-2 peptides stimuli elicited higher granzyme B and perforin coexpression and IFN- α production by PBMCs. However, in severe CoV, Pool Spike CoV-2 reduced the coexpression of granzyme B, perforin, and CD107a suggesting a decrease in the cytotoxic activity of NK cells. Therefore, our study shows that NK cells may have a crucial role in COVID-19 with the involvement of IFN- α and cytotoxic properties that aid in developing qualified immune responses. Furthermore, the data suggest that higher amounts of IFN- γ may be linked to the severity of this disease.

1. Introduction

In late 2019, an outbreak of pneumonia from an unknown infectious agent was reported in Wuhan, China. After a month, the World Health Organization (WHO) named the condition "Coronavirus Disease 2019"

(COVID-19). At the same time, the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) named the virus "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2" (SARS-CoV-2). Shortly after that, COVID-19 was recognized as a "Public Health Emergency of International Concern" (PHEIC) and announced as a pandemic situation [1,2].

Abbreviations: ¹ Mild CoV, volunteers recovered from mild COVID-19; HC, healthy control; Severe CoV, individuals recovered from severe COVID-19; WHO, World Health Organization; ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses; PHEIC, Public Health Emergency of International Concern; SEB, Staphylococcal enterotoxin B from *Staphylococcus aureus*; SSC-A, Side Scatter; FSC-A, Forward Scatter.

* Corresponding author.

E-mail address: tat.keesen@cbiotec.ufpb.br (T.S.L. Keesen).

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155971>

Received 4 May 2022; Received in revised form 11 July 2022; Accepted 18 July 2022

Available online 22 July 2022

1043-4666/© 2022 Published by Elsevier Ltd.

APÊNDICE 10. Artigo publicado em revista internacional intitulado " Immune hallmarks of rheumatoid arthritis management: A brief review".

Cytokine 158 (2022) 156007



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytokine



Immune hallmarks of rheumatoid arthritis management: A brief review

Rephany Fonseca Peixoto^a, Carlos Ewerton Maia Rodrigues^{b,c,*}, Pedro Henrique de Sousa Palmeira^a, Fernando César Comberlang Queiroz Davis dos Santos^a, Tatjana Keesen de Souza Lima^a, Alessandra de Sousa Braz^d

^a Laboratory of Immunology of Infectious Diseases, Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil

^b Post-Graduate Program in Medical Sciences, Medical School, University of Fortaleza (Unifor), Fortaleza, Brazil

^c Department of Internal Medicine, Federal University of Ceará, Brazil

^d Medical Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keyword:

Autoimmunity
Rheumatoid arthritis
Autoantibodies
Inflammation
Therapeutic drugs
Immunomodulation

ABSTRACT

The purpose of this review was to examine current evidence on immunomodulation mediated by conventional drugs and the use of novel biological agents for the treatment of rheumatoid arthritis (RA). Currently, treatment is focused on maximizing quality of life through sustained clinical remission and/or attenuating disease activity. To do so, disease-modifying antirheumatic drugs, especially methotrexate, are used alone or in combination with other drugs, including leflunomide, biological disease-modifying antirheumatic drugs (bDMARDs) and targeted synthetic disease-modifying antirheumatic drugs (tsDMARDs). The most recent strategies modulate the immune response of the individual RA patient using tsDMARDs such as JAK inhibitors and bDMARDs such as ig-CTLA-4, anti-IL6R, anti-TNF- α and anti-CD20. To better understand current immunopharmacological interventions, we also looked at documented mechanisms of RA-mediated immunomodulation, highlighting perspectives potentially boosting RA treatment.

1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a progressive chronic inflammatory joint disease characterized by synovial inflammation, joint and bone cartilage degradation, and the presence of autoantibodies to IgG Fc bound by rheumatoid factor (RF) and anti-citrullinated protein antibodies (ACPAs) [1].

RA affects approximately 1 % of the world population, with preference for the elderly and women of childbearing age. The pathophysiology is heterogeneous but involves the infiltration of activated leukocytes, angiogenesis, inflammatory cytokine production in synovial tissues, and differentiation and activation of synovocytes and osteoclasts in multiple joint regions which, if left untreated, leads to significant functional disability [2,3,4,5]. In addition, systemic clinical manifestations involving cardiopulmonary, neurological and cutaneous tissues in RA patients may result in increased morbidity and mortality [6,7,8,9]. The etiology of RA remains unclear, but factors like genetic predisposition marked by the presence of human leukocyte antigen (HLA) alleles, such as HLA-DRB1 with shared epitope, epigenetics, family history of RA, female sex, ethnicity, viral infections, smoking,

inflammation of the mucosa and changes in the microbiota contribute to inducing the autoreactive immune responses preceding the establishment of the disease [10,11].

Early diagnosis and immediate treatment help control disease activity and prevent loss of functional capacity [2]. Treatment strategies seek to maximize quality of life through sustained clinical remission or lowering of disease activity, especially by employing disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs), glucocorticoids (GCs) and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). As the first treatment strategy, conventional synthetic (cs) DMARDs like hydroxychloroquine, methotrexate, sulfasalazine and leflunomide should be used. However, If a patient shows nonresponse for csDMARDs, biological (b) DMARDs (i.e., tumor necrosis factor inhibitors, interleukin 6 receptor inhibitors, Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen (CTLA)4-immunoglobulin (Ig) and anti-CD20) or targeted synthetic (ts) DMARDs (i.e. janus kinases (JAK) should be added. Based on new insights into the immune factors involved in the pathophysiology of RA, patients may now also be managed with immunomodulating drugs [12,13,14,15] (see Table 1).

In this review, we describe the state of the art in RA therapy with both conventional and novel immunomodulating drugs.

* Corresponding author at: Post-Graduate Program in Medical Sciences, Medical School, University of Fortaleza (Unifor), Fortaleza, Brazil.
E-mail address: carloswerton@unifor.br (C. Ewerton Maia Rodrigues).

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.156007>

Received 14 May 2022; Received in revised form 31 July 2022; Accepted 8 August 2022
1043-4666/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

APÊNDICE 11. Capítulo de livro intitulado "ARTRITE REUMATOIDE: UMA REVISÃO".

ARTRITE REUMATOIDE: UMA REVISÃO

CAPÍTULO 3

ARTRITE REUMATOIDE: UMA REVISÃO

Rephany Fonseca Peixoto ¹
 Pedro Henrique de Sousa Palmeira ²
Izannery Izabaux Leôncio da Silva ²
 Francisco Sandro Aureliano ³
 Tatjana Keesen de Souza Lima ⁴

¹ Doutoranda do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, UFPB; ² Graduandos do Curso de Biotecnologia, UFPB; ³ Professor da Faculdade Internacional da Paraíba; ⁴ Orientadora/Professora do CBiotec/UFPB.
 fanyfonseca01@gmail.com

RESUMO: A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica progressiva, de natureza autoimune, que afeta regiões articulares resultando, quando não tratada, em danos articulares e incapacidade irreversível. Embora apresente características semelhantes em estágio inicial, a doença pode apresentar diferentes causas e mecanismos variados entre os acometidos. A formação de autoanticorpos para imunoglobulina G, como o fator reumatoide (FR) e as anti-proteínas citrulinadas (ACPAs), são importantes para o desencadeamento da doença, assim como para o seu diagnóstico. O principal fator de risco relacionado ao desenvolvimento da AR é a predisposição genética, entretanto parâmetros epigenéticos, sexo, etnia, hábitos alimentares, microbiota e tabagismo também estão correlacionados. Dessa forma, a presença do alelo do antígeno humano leucocitário (HLA)-DRB1 no DNA e demais fatores supracitados associam-se a seleção inadequada de linfócitos T e a apresentação antigênica observada nas respostas imunes autoreativas. Diversos subtipos celulares estão envolvidos no estabelecimento e regulação da resposta imunológica pró-

APÊNDICE 12. Capítulo de livro intitulado "ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA CHIKUNGUNYA".

ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA
CHIKUNGUNYA

CAPÍTULO 5

**ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS
E IMUNOLÓGICOS DA CHIKUNGUNYA**

Pedro Henrique de Sousa PALMEIRA ¹

Wilias Greison Silva SANTOS ¹

Izannery Izabaux Leôncio da SILVA ¹

Leonardo Lima CARDOSO ¹

Tatjana Keesen de Souza Lima CLEMENTE ²

¹ Graduandos do curso de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba;; ² Professora do Departamento de Biologia Molecular e Celular da UFPB.
phspalmeiramail@gmail.com.br

RESUMO: Isolado pela primeira vez em 1952, o vírus da Chikungunya (CHIKV) se tornou um dos maiores responsáveis por crescentes surtos, principalmente em regiões tropicais e subtropicais do globo. Transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* é capaz de causar fortes dores articulares acompanhada de febre alta e abrupta, mialgia e exantema além de outros sinais não específicos tais como vômitos e diarreia. Objetivou-se neste trabalho compilar informações gerais que caracterizam a arbovirose Chikungunya, com ênfase na atuação de células da imunidade adaptativa, especificamente linfócitos T CD4+, CD8+ e células T reguladoras e suas respostas a infecção pelo CHIKV. Após a sua infecção, o hospedeiro desenvolve uma forte resposta imunológica a fim de desenvolver o mecanismo de *clearance* viral. Estes, no entanto, podem ser insuficientes para a completa eliminação de antígenos relacionados a CHIKV facilitando, consequentemente, o estabelecimento da cronicidade da doença. Com isso exposto é possível destacar o papel dos linfócitos T por sua capacidade de infiltração em regiões articulares e criação de microambiente pró-inflamatório importantes nos mecanismos imunopatogênicos. Com isso, este capítulo irá abordar informações gerais que caracterizam

APÊNDICE 13. Capítulo de livro intitulado "CARACTERÍSTICAS DA COVID-19 E A MODULAÇÃO DA IMUNIDADE INATA".

CARACTERÍSTICAS DA COVID-19 E A MODULAÇÃO DA IMUNIDADE
INATA

CAPÍTULO 13

**CARACTERÍSTICAS DA COVID-19 E A
MODULAÇÃO DA IMUNIDADE INATA**

Pedro Henrique de Sousa PALMEIRA ¹

Fernanda Silva ALMEIDA ²

Fernando César Comberlang Queiroz Davis dos SANTOS ³

Bárbara Guimarães CSORDAS ⁴

Tatjana Souza Lima KEESEN ⁵

¹ Mestrando do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, UFPB; ² Doutoranda do Programa Renorbio de Biotecnologia, UFPB; ³ Graduando do curso de Biotecnologia, UFPB; ⁴ Pós Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - PgPNBS - UFPB; ⁵ Orientadora/Professora do CBIOTEC/UFPB.
phspalmeira@gmail.com

RESUMO: A atual pandemia desencadeada pelo SARS-CoV-2 vem gerando diversos transtornos em todo o mundo. Batizada de COVID-19, a infecção provocada pelo novo coronavírus, mobilizou diversos pesquisadores na busca pela sua compreensão e por um tratamento adequado. Com elevada capacidade de disseminação, o vírus afetou um grande número de pessoas conduzindo, até o momento, a mais de um milhão óbitos. Com um amplo espectro sintomatológico, uma densa maioria de infectados apresentam sintomas leves enquanto que uma pequena parcela é acometida por sinais clínicos mais graves necessitando, muitas vezes, de hospitalização. O sistema imune inato caracteriza-se como primeira linha de defesa sendo de extrema importância no combate a diversos patógenos. No entanto, embora desempenhe papel protetivo, células inatas parecem contribuir de modo significativo com sintomas mais graves associadas a doença. Nesse contexto, o presente trabalho compilou informações associadas as

APÊNDICE 14. Capítulo de livro intitulado "CORRELAÇÃO DA IMUNIDADE ADAPTATIVA COM A COVID-19".

CORRELAÇÃO DA IMUNIDADE ADAPTATIVA COM A COVID-19

CAPÍTULO 14

**CORRELAÇÃO DA IMUNIDADE
ADAPTATIVA COM A COVID-19**

Fernando Cézar Comberlang Queiroz Davis dos SANTOS¹

Pedro Henrique de Sousa PALMEIRA²

Leonardo Lima CARDOSO³

Bárbara Guimarães CSORDAS⁴

Tatjana Souza Lima KEESEN⁵

¹ Graduando do curso de Biotecnologia, UFPB; ² Mestrando do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, UFPB; ³ Graduando do curso de Biotecnologia, UFPB; ⁴ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos-PgPNBS-UFPB ⁵ Orientadora/Professora do CBIOTEC/UFPB. fcezar14@gmail.com

RESUMO: O surgimento do novo coronavírus denominado de SARS-CoV-2, agente causador da COVID-19, instaurou uma pandemia mundial. Descoberto no final de dezembro de 2019 a partir de supostos casos de pneumonia em Wuhan, China, até o presente momento já infectou mais de 35 milhões de pessoas no mundo. Pela sua recém-descoberta, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos da doença e sua correlação com a imunidade adaptativa ainda são obscuros. No entanto, com o avançar das pesquisas se observou que essa desempenha importante papel frente à infecção, diante disso o trabalho objetivou compilar informações e estudos associados ao papel da imunidade adaptativa na COVID-19, por meio da revisão da literatura encontrada até o presente momento acerca do SARS-CoV-2. A imunidade adquirida é caracterizada por ser a linha de defesa específica (do corpo), abarcando ambas respostas humorais e celulares. A imunidade celular é o principal mecanismo de combate aos microrganismos intracelulares, como os vírus a exemplo do SARS-CoV-2. No entanto, diante à infecção causadora da COVID-19, diversos aspectos associados aos habituais mecanismos de ação dos linfócitos T