



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



REPHANY FONSECA PEIXOTO

**Estudo do perfil imunológico de subpopulações de células T
naive e de memória em pacientes convalescentes da COVID-19**

JOÃO PESSOA - PB

2023

REPHANY FONSECA PEIXOTO

**Estudo do perfil imunológico de subpopulações de células T
naive e de memória em pacientes convalescentes da COVID-19**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multicêntrico de
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade
Federal da Paraíba como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor (a).

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

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Sousa Braz Caldas de Andrade

JOÃO PESSOA – PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catálogo e Classificação

P377e Peixoto, Rephany Fonseca.

Estudo do perfil imunológico de subpopulações de células T naïve e de memória em pacientes convalescentes da covid-19 / Rephany Fonseca Peixoto. - João Pessoa, 2023.

170 f. : il.

Orientação: Tatjana Keesen de Souza Lima.

Coorientação: Alessandra Sousa Braz Caldas de Andrade.

Tese (Doutorado) - UFPB/CEBICT.

1. Pandemia - Covid-19. 2. Resposta imune. 3. Subtipos de linfócitos T. 4. Infecção por sars-CoV-2. 5. Memória imunológica. I. Lima, Tatjana Keesen de Souza. II. Andrade, Alessandra Sousa Braz Caldas de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616-036.21(043)

REPHANY FONSECA PEIXOTO

**Estudo do perfil imunológico de subpopulações de células T
naive e de memória em pacientes convalescentes da COVID-19**

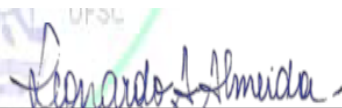
Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor (a).

Data da Aprovação: 04 de abril de 2023.

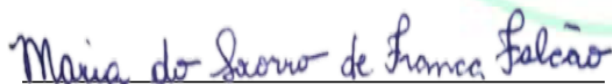
BANCA EXAMINADORA:



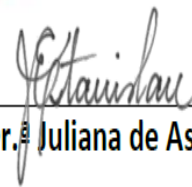
Prof.^a Dr.^a Tatjana Keesen de S. L. Clemente



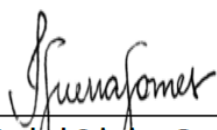
Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida



Prof.^a Dr.^a Maria do Socorro de França Falcão



Prof.^a Dr.^a Juliana de Assis Silva Gomes



Prof.^a Dr.^a Isabel Cristina Guerra Gomes

AGRADECIMENTOS Ao meu lar, **mi**

A **Deus**, pelo dom da vida e por ser o meu refúgio! Sou grata por ele me capacitar a construir diariamente a vontade dele na minha vida.

Aos meus pais, **Edizio e Yaponira**, por serem minhas grandes paixões e que se sacrificam todos os dias por mim! Por serem meus maiores exemplos de dignidade e luta! Meu amor por vocês é imenso! OBRIGADA POR TUDO!

Ao meu irmão **Erick**, por ser o meu companheiro inseparável e uma eterna criança no meu coração! Amo você.

Ao meu esposo, **João Victor**, por me incentivar tanto a conquistar os meus sonhos, por compartilhar os seus sonhos comigo e por ser aquele que escolhi para constituir uma família. Te amo.

Aos meus **avós**, tão amados e presentes na minha vida, que estão ao meu lado apoiando as minhas decisões! Celebrando minhas conquistas.

Aos meus queridos **amigos**, por compartilharem comigo suas vidas e tornarem a minha muito mais leve. Em especial, **Pedro Henrique Palmeira, Fernanda Almeida, Fernando César, Bruna Macêdo, Isabel Cristina, Juliana Rocha, Cinthia Nóbrega, Deyse Cristina e Éssia Almeida**, por todo cuidado, carinho, amizade e por acompanharem diariamente o desenvolvimento desse trabalho.

A minha orientadora, Professora **Tatjana Keesen**, por me ensinar tanto e por ser responsável pela imensa paixão que tenho pela imunologia de doenças infecciosas, uma vez que me transferiu através de suas experiências tal sentimento. Obrigada por confiar no meu trabalho e por ter nos apresentado com a pequena **Helena**.

A toda **família LABIDIC**, por tornarem o laboratório um ambiente de trabalho um lugar suave e amável para se trabalhar! Por toda a disponibilidade para ajudar aos outros e principalmente, pelas gargalhadas diárias, **MUITO OBRIGADA!**

A **todos os professores** do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, que com seus conhecimentos me formaram como profissional.

Aos **voluntários** por se disponibilizarem a participar da pesquisa, contribuindo de maneira essencial para desenvolvimento desse trabalho.

A equipe do **Laboratório de Farmacologia Cardiovascular**, por apoio estrutural. Em especial, a **Fátima Azevedo** por ser tão amável e amiga, por ser alguém que posso contar sempre.

A equipe do **Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular**, por todo auxílio estrutural. Em especial, a **Teresa Cristina Grisi** por toda disponibilidade, doação e carinho.

Aos membros da Banca Examinadora, **Maria do Socorro, Leonardo Augusto, Isabel Cristina e Juliana Estanislau**, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento desse trabalho! Obrigada!

Nada te perturbe, nada te assuste, tudo passa.

Deus nunca muda. A paci

Quem a Deus tem, nada lhe f

RES

A COVID-19 é uma infecção respiratória a; capaz de desencadear diferentes quadros clínicos que variam de assintomático a grave, nos quais a resposta imune do hospedeiro é determinante para o seu estabelecimento. As células T de memória CD4⁺ e CD8⁺ específicas para SARS-CoV-2 de vida longa são essenciais para a proteção imunológica de longo prazo para a COVID-19, pois têm uma capacidade aumentada de restringir a replicação viral em uma infecção secundária. Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo investigar os mecanismos imunomoduladores mediados pelos subtipos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em pacientes que se recuperaram de formas leve e grave de COVID-19. Para tal, amostras de sangue periférico foram coletadas de voluntários recrutados entre o período de novembro de 2020 a junho de 2021, antes de serem vacinados, e distribuídos nos grupos controle (CTL - n = 9), leve (n = 9) e grave (n = 6). Amostras de PBMCs foram obtidas e incubadas sob 3 diferentes condições: não estimuladas (meio), e estimuladas com peptídeos SARS-CoV-2 (Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2). As células T CD4⁺/CD8⁺ foram analisadas e classificadas quanto a expressão de CCR7⁺ e CD45RA⁺ em T CD4⁺/CD8⁺ naïve (TN), células T CD4⁺/CD8⁺ de memória central (TCM), células T CD4⁺/CD8⁺ de memória efetora (TME) e células T CD4⁺/CD8⁺ de memória efetora que reexpressam CD45RA (TMERA). Assim, nas diferentes subpopulações mencionadas acima, a expressão de citocinas (IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL-17) e marcadores de ativação (CD69, CD137 e Ki67) foi analisada por citometria de fluxo. Os estímulos Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2 provocaram uma frequência mais alta de células CD8⁺ TCM e células CD4⁺ TEMRA no grupo leve recuperado. Células TCM e TEM CD4⁺ e CD8⁺ mostraram heterogeneidade na expressão de marcadores de ativação CD137 e CD69 entre grupos recuperados leves e graves. Além disso, observamos uma predominância na expressão de CD137 por células CD4⁺ e CD8⁺ virgens, TCM e TEM do grupo leve recuperado quando estimulado com pools antigênicos. Além disso, uma maior expressão de CD69 do grupo recuperado grave por células TEMRA CD4⁺ e CD8⁺ foi observada em pools de epítomos SARS-CoV-2. Os subconjuntos de células CD4⁺ e CD8⁺ virgens, TCM e TEM de voluntários leves recuperados apresentaram maior expressão de TNF- α , enquanto a expressão de IFN- γ , IL-10 e IL-17 aponta para uma assinatura antiviral por células TEMRA CD8⁺. Nossas descobertas contribuem para a elucidação acerca das capacidades funcionais de cada subpopulação de células T de memória durante a reexposição antigênica SARS CoV-2, bem como sua atuação no desfecho da doença em indivíduos recuperados da COVID-19.

Palavras-chave: Memória Imunológica. Resposta Imune. Subtipos de Linfócitos T. Infecção por SARS-CoV-2. COVID-19.

ABSTRACT

COVID-19 is a severe acute respiratory infection caused by the SARS-CoV-2 virus capable of suffering from different clinical conditions ranging from asymptomatic to severe, in which the host's immune response is crucial for its establishment. Long-lived SARS-CoV-2-specific CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells are essential for long-term immune protection against COVID-19 as they have an increased ability to restrict viral replication in a secondary infection. Thus, the present study aims to investigate immunomodulatory mechanisms mediated by CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte subtypes in patients who recovered from mild and severe forms of COVID-19 before vaccination by flow cytometry. Thus, peripheral blood samples were obtained from recruited volunteers and distributed into control (CTL - n = 9), mild (n = 9), and severe (n = 6) groups. Samples of PBMCs were obtained and incubated under 3 different conditions: unstimulated (medium), and stimulated with SARS-CoV-2 peptides (Pool Spike CoV-2 and Pool CoV-2). CD4⁺ and CD8⁺ T cells were analyzed and classified for CCR7⁺ and CD45RA⁺ expression in naive CD4⁺/CD8⁺ T cells (TN), CD4⁺/CD8⁺ central memory T cells (TMC), CD4⁺/CD8⁺ effector memory T cells (TME), and CD4⁺/CD8⁺ effector memory T cells that reexpress CD45RA (TMERA). Thus, in the different subpopulations mentioned above, cytokines (IL-10, IFN- γ , TNF- α , and IL-17) and activation markers (CD69, CD137, and Ki67) were expressed analyzed by flow cytometry. Pool Spthe ike CoV-2 and Pool CoV-2 stimulus elicited a higher frequency of CD8⁺ TCM cells and CD4⁺ TEMRA cells in recovered mild group. CD4⁺ and CD8⁺ TCM and TEM cells showed heterogeneity in CD137 and CD69 activation marker expressions between mild and severe recovered groups. Also, we observed a predominance in CD137 expression by naive CD4⁺ and CD8⁺ cells, TCM, and TEM from the mild recovered group when stimulated with antigenic pools. Additionally, a higher CD69 expression from the severe recovered group by CD4⁺ and CD8⁺ TEMRA cells was observed under SARS-CoV-2 Epitope Pools. CD4⁺ and CD8⁺ naïve, TCM and TEM cells subsets from recovered mild volunteers had higher expression of TNF- α while the expression partner of IFN- γ , IL-10, and IL-17 point to an antiviral signature by TEMRA CD8⁺ cells. Our findings contribute to the elucidation of the functional capabilities of each subpopulation of memory T cells during SARS CoV-2 antigenic reexposure, as well as their role in disease outcome in individuals recovered from COVID-19.

Keywords: Immunological Memory. Immune response. T Lymphocytes subsets. SARS-CoV-2 infection. COVID-19.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Dot plots representativos de estratégia de análise utilizada para identificar as subpopulações de linfócitos T CD8+ e CD4+ Naive, TMC, TME e TMERA em amostras de PBMC.....	49
Figura 2. Frequência de células TN, TMERA, TME e TMC CD8+ no sangue periférico de voluntários.....	55
Figura 3. Distribuição das subpopulações de células TN, TMERA, TME e TMC CD8+ no sangue periférico de voluntários representada pelo algoritmo T-distribuído <i>Stochastic Neighbor Embedding</i> (tSNE)	56
Figura 4A – D. Perfil de expressão de CD69 em células TN, TMERA, TME e TMC CD8+ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado.....	57
Figura 5. Subpopulações de células T CD8+ expressando CD69 no sangue periférico de voluntários	58
Figura 6A – D. Perfil de expressão de CD137 em células TN, TMERA, TME e TMC CD8+ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado.....	59
Figura 7. Subpopulações de células T CD8+ expressando CD137 no sangue periférico de voluntários.....	61
Figura 8A – D. Perfil de expressão de TNF- α em células TN, TMERA, TME e TMC CD8+ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado.....	62
Figura 9. Subpopulações de células T CD8+ expressando TNF- α no sangue periférico de voluntários.....	63
Figura 10A – D. Perfil de expressão de IFN- γ em células TN, TMERA, TME e TMC CD8+ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado.....	64
Figura 11. Subpopulações de células T CD8+ expressando IFN- γ no sangue periférico de voluntários.....	65
Figura 12A – D. Perfil de expressão de IL-10 em células TN, TMERA, TME e TMC CD8+ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado.....	66

Figura 13. Subpopulações de células T CD8 ⁺ expressando IL-10 no sangue periférico de voluntários.....	67
Figura 14A – D. Perfil de expressão de IL-17 em células TN, TMERA, TME e TMC CD8 ⁺ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado.....	68
Figura 15. Subpopulações de células T CD8 ⁺ expressando IL-17 no sangue periférico de voluntários	69
Figura 16 A-D. Frequência de células TN, TMERA, TME e TMC CD4 ⁺ no sangue periférico de voluntários	71
Figura 17. Distribuição das subpopulações de células TN, TMERA, TME e TMC CD4 ⁺ no sangue periférico de voluntários representada pelo algoritmo T-distribuído <i>Stochastic Neighbor Embedding</i> (tSNE)	72
Figura 18A – D. Perfil de expressão de CD69 em células TN, TMERA, TME e TMC CD4 ⁺ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado.....	73
Figura 19. Subpopulações de células T CD4 ⁺ expressando CD69 no sangue periférico de voluntários.....	74
Figura 20A – D. Perfil de expressão de CD137 em células TN, TMERA, TME e TMC CD4 ⁺ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado.....	75
Figura 21. Subpopulações de células T CD4 ⁺ expressando CD137 no sangue periférico de voluntários	76
Figura 22A – D. Perfil de expressão de TNF- α em células TN, TMERA, TME e TMC CD4 ⁺ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado.....	78
Figura 23. Subpopulações de células T CD4 ⁺ expressando TNF- α no sangue periférico de voluntários	79
Figura 24A – D. Perfil de expressão de IFN- γ em células TN, TMERA, TME e TMC CD4 ⁺ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado	80
Figura 25. Subpopulações de células T CD4 ⁺ expressando IFN- γ no sangue periférico de voluntários.....	81
Figura 26A – D. Perfil de expressão de IL-10 em células TN, TMERA, TME e TMC CD4 ⁺ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado	82
Figura 27. Subpopulações de células T CD4 ⁺ expressando IL-10 no sangue periférico de voluntários	83
Figura 28A – D. Perfil de expressão de IL-17 em células TN, TMERA, TME e TMC CD4 ⁺ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado	84

Figura 29. Subpopulações de células T CD4⁺ expressando IL-17 no sangue periférico de voluntários85

Figura 30. Caracterização Fenotípica das subpopulações de células T CD8⁺ e CD4⁺ naive, de memória central, de memória efetora e de memória efetora que reexpressam o CD45RA.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peptídeos desenhados e sintetizados para o presente Estudo45

Tabela 2 – Pannel de marcação com anticorpos monoclonais para análise de subpopulações de células T CD4⁺/CD8⁺ + naive e de memória e seus distintos fenótipos de expressão.....47

Tabela 3. Gênero, Idade e Auto-classificação étnico-racial dos voluntários do Grupo Controle (CTL)..... 52

Tabela 4. Gênero, Idade, Auto-classificação étnico-racial, comorbidades e sintomas de voluntários recuperados leves (Recuperados Leves)53

Tabela 5. Gênero, Idade, Auto-classificação étnico-racial, comorbidades e sintomas de voluntários recuperados graves (recuperados graves)54

Tabela 6. Frequência de Ki67 em células TN, TME, TMC e TMERA CD8⁺, incubadas sem estímulo (Meio) e estimuladas (Peptídeos Pool-CoV2 e Spike Pool)61

Tabela 7. Frequência de Ki67 em células TN, TME, TMC e TMERA CD4⁺, incubadas sem estímulo (Meio) e estimuladas (Peptídeos Pool-CoV2 e Spike Pool) 77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2019-nCoV Novo Coronavírus 2019

nAbs Anticorpos neutralizantes

BSA Albumina Sérica Bovina (*Bovine Serum Albumin*)

CD4 – CTL Células T CD4 citotóxicas

CDC Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CEP Comitê de Ética em Pesquisa

COVID-19 Doença do Coronavírus 2019

CTD Domínio C Terminal

CTL Grupo controle

CTLA-4 *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*

E Proteína do Envelope

ECA2 Enzima Conversora de Angiotensina 2

EROS Espécies Reativas de Oxigênio

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 Heptad repeat 1

HR2 Heptad repeat 2

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

Leve Recuperado Voluntários Recuperados da forma leve

M Proteína de Membrana

MERS CoV Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio

MIP Proteína Macrofágica Inflamatória

N Proteína do Nucleocapsídeo

NET Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos

NF-κB Fator Nuclear-κB

NK Natural Killers

NKT Natural Killer T

NLR Taxa de neutrófilos/linfócitos

NSPs Proteínas não estruturais

NTD Domínio N Terminal

OMS Organização Mundial de Saúde

Orf Janelas De Leitura Aberta

PAMPs Padrões Moleculares Associados à Patógenos

PB Permeabilization Buffer

PBMC Células Mononucleares do Sangue Periférico

PBS Solução Fosfato Salina

PD-1 Proteína de Morte Celular Programada 1

RBD Região Domínio de Ligação com o Receptor

RE Retículo Endoplasmático

RPMI *Roswell Park Memorial Institute*

RT-qPCR Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real

S Proteína Spike

SARS CoV Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave

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

SEM Erro padrão da média

SFB Soro Fetal Bovino

sgRNA RNA subgenômico

+sgRNA RNA subgenômico de sentido positivo

-sgRNA RNA subgenômicos de sentido negativo

SIM Síndrome Inflamatória Multissistêmica

STAT Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TME Linfócitos T de memória efetora (TME)

TMERA Linfócitos T de memória que reexpressam o CD45RA

Tfh Linfócitos T foliculares

TMC Linfócitos T de memória Central

Th T helper

TIM3 *T-cell immunoglobulin and mucin-domain-3*

TM Taxa de Mortalidade

TMPRSS2 Serina Protease Transmembranar 2

TN Células T naïve

TNF Fator de Necrose Tumoral

utiUH Upstream helix

UTR Regiões Não Traduzidas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
2.1 COVID-19	24
2.1.1 Breve Histórico e Contexto Epidemiológico	24
2.1.2 Filogenia e Estrutura Viral do SARS-CoV-2	26
2.1.3 Ciclo Viral e suas Formas de Transmissão	28
2.1.4 Manifestações Clínicas e Diagnóstico	30
2.1.5 Imunologia da Infecção pelo SARS-CoV-2	32
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Considerações Éticas	43
4.2 Delimitação dos Grupos de Estudo.....	43
4.3 Ensaio de RT qPCR.....	44
4.4 Desenho e Preparo do Pool de Peptídeos Antigênicos do SARS-COV-2.....	44
4.5 Obtenção do Soro	45
4.6 Sorologia para Diagnóstico de Anticorpos IgA e IgG.....	46
4.7 Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs).....	46
4.8 Ensaio de Citometria de Fluxo.....	47
4.9 Anticorpos Monoclonais (MABs).....	47
4.10 Aquisição e Análise dos dados por Citometria de Fluxo.....	48
4.11 Análise estatística.....	50

5	RESULTADOS I.....	52
5.1	Caracterização clínico-epidemiológica dos grupos de indivíduos saudáveis (CTL) e de pacientes recuperados da COVID-19 em relação a gênero, média de idade, sintomatologia e comorbidades apresentadas	52
5.2	Avaliação da frequência de subpopulações de células T CD8+ naive e c no grupo CTL e nos distintos grupos de pacientes recuperados da COVI	
5.3	Expressão dos marcadores de ativação CD69, CD137 e Ki67 em subpopulações de células T CD8+ de memória e naive em pacientes recuperados da COVID-19	57
5.4	Perfil de expressão das citocinas TNF- α , IFN γ , IL-10 e IL-17 e em subpopulações de células T CD8+ naive e de memória em pacientes recuperados da COVID-19.....	61
6	RESULTADOS II.....	71
6.1	Avaliação da frequência de subpopulações de células T CD4+ naive e de memória no grupo CTL e nos distintos grupos de pacientes recuperados da COVID-19	71
6.2	Expressão dos marcadores de ativação CD69, CD137 e Ki67 em subpopulações de células T CD4+ de memória e naive em pacientes recuperados da COVID-19.....	72
6.3	Perfil de expressão das citocinas TNF- α , IFN γ , IL-10 e IL-17 e em subpopulações de células T CD4+ naive e de memória em pacientes recuperados da COVID-19.....	77
7	DISCUSSÃO.....	87
8	CONCLUSÃO.....	95
9	REFERÊNCIAS	98
10	ANEXOS	112
11	APÊNDICES.....	125

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Em 2002, infecções pelo Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV) foram relatadas no sudeste da China e em 2012 casos da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) foram descritos, sendo esses últimos causados pelo Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV). A pandemia da Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19) declarada em março de 2020 pela Organização Mundial de Saúde (OMS), tornou o Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2) o terceiro dentre os coronavírus relacionados a epidemias desde os anos 2000 devido a capacidade em comum de causar infecções respiratórias potencialmente graves (DROSTEN et al., 2003; ZAKI et al., 2012; OMS, 2020).

O SARS-CoV-2 é, portanto, o agente etiológico da COVID-19, a qual consiste em uma infecção respiratória aguda grave que foi relatada pela primeira vez em dezembro de 2019 na cidade de Wuhan na china. Estruturalmente, consiste em um vírus envelopado composto por RNA de fita simples de sentido positivo pertencente à família Coronaviridae, gênero Betacoronavírus, subgênero Sarbecovírus (LU et al., 2020; YAN et al., 2020; IZDA; JEFFRIES; SAWALHA, 2021). Seu genoma é composto por 11 genes, que codificam as proteínas estruturais como a glicoproteína Spike (S), proteína do envelope (E), proteína de membrana (M) e proteína nucleocapsídica (N) assim como as proteínas não estruturais como a RNA polimerase, helicase e a endoribonuclease, as quais se associam com o mecanismo de replicação e transcrição viral (CHENG et al., 2020; MOUSAVIZADEH; GHASEMI, 2021). A glicoproteína S, presente na superfície viral, é essencial para a passagem do SARS-COV- 2 para o meio intracelular através da sua interação com a enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2). Esta é expressa em células humanas e funciona como um receptor também para o SARS-CoV-1 (HOFFMANN et al., 2020; RAHMAN et al., 2020).

Diante desse contexto, atualmente o número de casos de COVID-19 no mundo é de aproximadamente 761 milhões, e 6,9 milhões de mortes, de acordo com dados oficiais da OMS. No Brasil, ao longo do período pandêmico atingiu-se 37 milhões de casos confirmados e a expressiva marca de 699.634 mil mortes (OMS, 2023). A transmissão do SARS-CoV-2 se dá sobretudo por meio da exposição a gotículas respiratórias expelidas por uma pessoa infectada ao tossir ou espirrar, em uma distância inferior a um metro da outra. Entretanto, cabe ressaltar que a transmissão por contato ou por aerossol também pode ocorrer (BOUROUIBA, 2020; LEWIS, 2020; RODRIGUEZ-MORALES, 2020). O período de incubação viral é de 1 a 14 dias, com uma média de 5-6 dias desde o momento da infecção até o surgimento dos primeiros sinais e sintomas (LAUER et al., 2020; HEAD; ANDREKJO; REMAIS, 2021).

As manifestações clínicas podem variar desde um quadro assintomático até sintomas inespecíficos leves como febre, tosse, mialgia, cefaleia, coriza, dor de garganta, fadiga, dispneia, diarreia, anosmia e ageusia, podendo evoluir para presença de pneumonia sem sinais ou sintomas de gravidades (WU et al., 2020; BRASIL, 2021b). A forma grave da COVID-19, por sua vez, se caracteriza como uma síndrome gripal na qual o paciente apresenta significativo desconforto respiratório associada à saturação de O₂ menor que 95% em ar ambiente e cianose. Este último, portanto, pode ainda evoluir para estado crítico quando na presença de sepse, insuficiência respiratória grave, disfunção de múltiplos órgãos, e internações em unidades de terapia intensiva (WU et al., 2020; BRASIL, 2021b).

Em linhas gerais, a presença de lesões pulmonares agudas e um prognóstico desfavorável na COVID-19 estão associados a uma tempestade de citocinas no epitélio respiratório, manifestando níveis séricos elevados de IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-17, GM-CSF, IFN γ , TNF α , IP10, MCP1, MIP1A e MIP1B. Comparados com pacientes que apresentam a forma leve da doença, os pacientes graves apresentam níveis ainda mais altos de IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, IP10, MCP1, MIP1A e TNF α (HUANG et al., 2020). Torna-se válido comentar que tal resposta imunológica comumente associada a casos graves da doença podem causar danos a órgãos como fígado, rins, coração e pulmões, assim como ao desencadeamento de complicações posteriores à infecção pelo SARS-CoV-2. Adicionalmente, linfocitopenia, neutrofilia, elevados níveis de proteína C reativa (PCR), D-dímero, lactato desidrogenase, IL-2, IL-6, IL-10 e níveis reduzidos de células T CD4⁺/CD8⁺ e *natural killers* (NK) são achados laboratoriais comumente relatados em casos de COVID-19 (ROKNI; GHASEMI; TAVAKOLI, 2020; ZHOU et al., 2020; IWAMURA et al., 2021).

A tempestade de citocinas está intimamente ligada à atuação dos mecanismos de reconhecimento e resposta ao padrão molecular exposto pelo SARS-CoV-2 da imunidade inata. Este vírus se caracteriza citopático, ou seja, capaz de induzir processos de piroptose celular que acabam exacerbando a inflamação no epitélio respiratório através da liberação de citocinas e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). O processo inflamatório desencadeado pelo vírus no sítio de infecção promove o recrutamento de células mononucleares favorecendo assim uma infiltração de fagócitos no microambiente pulmonar, o que se associa a elevação dos níveis de citocinas inflamatórias como IL-6, TNF- α e IL-1 β (GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2020; HUANG et al., 2020; PARK et al., 2020; ZHANG et al., 2020). Adicionalmente, sobretudo em pacientes graves, uma redução na capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) e um aumento na formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) é observada em neutrófilos, assim como uma atenuação na atividade citotóxica de células NK e NKTs em comparação aos indivíduos com quadro leve da doença (REUSH et al., 2021; VIGÓN et al., 2021).

Em relação à imunidade adaptativa celular, em linhas gerais, durante o curso da infecção por SARS-CoV-2, os linfócitos totais, CD3⁺ e as contagens de células T CD4⁺ são baixas, especialmente em casos graves da doença, enquanto as células T CD8⁺ são ligeiramente mais variáveis sugerindo variados perfis de respostas desencadeadas por estes linfócitos, as quais oscilam entre um fenótipo de exaustão, um fenótipo citotóxico efetor, além de subpopulações de memória que são geradas sobretudo em pacientes recuperados da COVID-19 (IWAMURA et al., 2021). Na fase aguda da doença, em específico, prevalece o perfil de células T CD8⁺ específicas para SARS-CoV-2 que expressam altos níveis de moléculas associadas a potentes funções efetoras citotóxicas, como IFN γ , granzima B, perforina e CD107a (JAJOUR; MASOPUST; JAMESON., 2021). As células T CD4⁺, por sua vez, apresentam um aumento na expressão de marcadores de ativação e/ou exaustão semelhante ao observado nas células T CD8⁺, além de terem a capacidade de se diferenciar em uma variedade de células auxiliares e células efetoras, com capacidade de instruir células B, auxiliam as células T CD8⁺, recrutam células inatas, têm atividades antivirais diretas, facilitam o reparo tecidual e geram memória imunológica (SETTE; CROTTY., 2021). Assim, sugere-se uma correlação entre as respostas específicas das células T CD4⁺ e CD8⁺ e os respectivos estágios da infecção, sugerindo o papel primordial desses subtipos celulares na vigilância antiviral (GANGAEV, 2020).

Dessa forma, apesar das respostas de células T CD8⁺/CD4⁺ estarem presentes durante a infecção pelas distintas variantes atuais do SARS-COV-2, a compreensão do desenvolvimento de memória imunológica nos subtipos de linfócitos T CD8⁺/CD4⁺ *Naive*, TMERA, TME e TMC, sua geração em casos graves e leves da doença, assim como sua duração são alvos relevantes de estudo no presente momento, sobretudo no que diz respeito aos protocolos associados à vacinação e sua periodicidade. Evidências sugerem que células T de memória foram detectadas para múltiplas proteínas do SARS-COV-2, como a proteína Spike, Nucleoproteína e a proteína de Membrana presentes na estrutura viral. Células T CD8⁺ foram detectadas em 70% dos pacientes que se recuperaram (GRIFONI et al., 2020). Nesse sentido, os dados oriundos de pacientes convalescentes são relevantes por serem um indicativo de que tal memória é induzida nas distintas subpopulações celulares conforme supracitado.

A hipótese que norteou este trabalho foi a de que marcadores de susceptibilidade ao agravamento ou controle da doença fossem reconhecidos a partir da avaliação de aspectos moleculares e celulares presentes na resposta imunológica desencadeada por indivíduos recuperados de quadros graves e leves da COVID-19, assim como em indivíduos saudáveis a partir de estímulos por peptídeos antigênicos do SARS-COV-2. Além disso, a de que o perfil de manifestações clínicas desencadeadas por esses indivíduos influenciaram o perfil de memória imune desencadeada nas distintas subpopulações de linfócitos T de memória. Neste sentido, o presente estudo teve por objetivo investigar os mecanismos imunomoduladores mediados pelas subpopulações de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ *naive* e de memória, correlacionando as características clínicas de pacientes recuperados das formas leve e grave da COVID-19.

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 COVID-19

2.1.1 Breve Histórico e Contexto Epidemiológico

Nos últimos 20 anos, os coronavírus que eram até então considerados patógenos relativamente inofensivos aos humanos tornaram-se motivo de atenção global por protagonizarem três grandes surtos de doenças respiratórias graves, sendo estes causados respectivamente pelo SARS-CoV, MERS-CoV e o recém descrito SARS CoV-2 (KAHN; McINTOSH, 2005; ARORA et al., 2020). No total, sete coronavírus já tiveram sua patogenicidade reconhecida, sendo o coronavírus humano 229E (HCoV 229E), o coronavírus humano OC43 (HCoVOC43), o coronavírus humano NL63 (HCoVNL63) e o coronavírus humano HKU1A (HCoVHKU1A) causadores de resfriados comuns em humanos e infecções clinicamente categorizadas como leves. No entanto, tais vírus apresentam como propriedade elevadas taxas de mutação por serem constituídos de RNA, assim comumente evoluem, gerando novas cepas. Sendo assim, acredita-se que dessa forma surgiram as infecções respiratórias graves decorrentes de infecções por coronavírus, causadas pelo SARS-CoV, MERS-CoV e o SARS-CoV2 conforme supracitado (MARRA et al., 2003; ARORA et al., 2020).

Historicamente, as doenças zoonóticas moldaram a vida humana ao longo dos séculos (MORENS et al., 2020). Cabe ressaltar que os distintos coronavírus humanos constituem parte de uma grande família viral de origem zoonótica encontradas em diferentes espécies de animais como bovinos, aves, morcegos, roedores e humanos. Especificamente, o SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV2, HCoV 229E e HCoVNL63 são originários de

morcegos, enquanto HCoV OC43 e HCoVHKU1 são originários de roedores (ARORA et al., 2020; DE SOUZA et al., 2021). A transmissão de patógenos de um animal vertebrado para os humanos denomina-se transbordamento zoonótico, no qual animais domésticos ou selvagens atuam como hospedeiros intermediários o que permite a transmissão do vírus de tais hospedeiros naturais para os humanos. Sendo fatores intrínsecos a cada população como parâmetros ecológicos, econômicos, comportamentais, nutricionais e culturais associados ao grau de suscetibilidade à infecção pelos distintos coronavírus em cada localidade (RODRIGUEZ-MORALES et al., 2020).

Em 2002, infecções causadas pelo SARS-COV-1 relatadas no sudeste da China geraram uma epidemia com cerca de 8000 casos registrados em mais de 25 países e 774 mortes decorrentes de uma pneumonia atípica. O coronavírus MERS (MERS-COV), por sua vez, no ano de 2012 causou casos da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) descritos inicialmente na região da Arábia Saudita e expandiu-se para outros continentes, acometendo inclusive o continente americano. Cerca de 2500 casos de infecções por MERS-COV e 858 óbitos foram relatados até o ano de 2019 (DROSTEN et al., 2003; ZAKI et al., 2012). Em ambos os casos, os morcegos foram apontados como hospedeiros naturais desses vírus, que também se espalharam para o homem nesse contexto de transbordamento zoonótico, possuindo como hospedeiros intermediários, civetas e camelos (CUI; LI; SHI, 2019; RODRIGUEZ-MORALES et al., 2020). Os morcegos são também sugeridos como a fonte original mais provável do SARS-COV-2, o agente etiológico da COVID-19, que se destaca por ter se estabilizado entre os humanos, acometendo significativamente a população mundial e causando a pandemia vivenciada atualmente (NOVELLI et al., 2020; TANG et al., 2020; YANG et al., 2020). Evidências sugerem que a disseminação do SARS-CoV-2 tenha se iniciado em um mercado úmido de Wuhan na China no fim de 2019, sendo inicialmente associada a 27 casos de hospitalização por pneumonia, se espalhando para outras cidades e províncias chinesas de onde cruzou fronteiras alcançando assim os demais continentes (CHAN et al., 2020; HUANG et al., 2020; ZHU et al., 2020).

Em 31 de Dezembro de 2019, a Comissão Municipal de Saúde de Wuhan notificou a Organização Mundial de Saúde acerca do surto que ocorria naquela região (MORENS et al., 2020; HU et al., 2021). Nos primeiros dias de janeiro de 2020 a identificação viral foi realizada pelo Centro Chinês de Controle e Prevenção de Doenças a partir do sequenciamento do RNA do patógeno a partir de isolados oriundos de amostras advindas de pacientes com pneumonia grave. Dessa maneira, foi possível reconhecer que o agente

etiológico do presente surto se tratava de um novo coronavírus pertencente ao gênero *Betacoronavírus*, denominado inicialmente de 2019 novo coronavírus (2019-nCoV) pela OMS (OMS, 2020f; HU *et al.*, 2021; JACKSON *et al.*, 2022).

No dia 13 de janeiro de 2020, a OMS relatou os primeiros casos fora da China - na Tailândia. Assim, até o fim do mês de janeiro de 2020, foram notificadas e confirmadas 11.791 novas ocorrências, e 213 mortes relatadas, estando o vírus já distribuído em 19 países incluindo Estados Unidos da América (EUA), França e Emirados Árabes (MACHI *et al.*, 2020; SRIVASTAVA *et al.*, 2020; OMS, 2022). Diante das circunstâncias de disseminação viral e evidência de transmissão entre humanos na época, em fevereiro de 2020 a OMS classificou o até então surto provocado pelo novo coronavírus como uma Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional, denominou a patologia causada por ele de COVID-19 e o vírus foi renomeado como SARS-CoV-2 pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) (CALLAWAY; CYRANOSKI, 2020; MACHI *et al.*, 2020; SRIVASTAVA *et al.*, 2020; OMS, 2022).

A partir de então, os relatos internacionais de infecções por SARS-CoV-2 seguiram acontecendo, até que no início de março mais de 82.000 pessoas estavam infectadas e mais de 2.800 pacientes tinham ido a óbito em todo o mundo. No dia 11 de março de 2020 a pandemia da COVID-19 foi oficialmente declarada pela Organização Mundial de Saúde (MACHI *et al.*, 2020; ZU, Z.Y. *et al.* 2020). Viagens internacionais e a elevada capacidade de transmissão viral foram fatores determinantes para que o vírus rapidamente se disseminasse ao redor do mundo. Dessa forma, a marca de 1.000.000 de infectados foi atingida no dia 1º de abril de 2020, somada ao registro de mais de 55.000 mortes confirmadas na mesma data (CALLAWAY, E.; CYRANOSKI, D. 2020; MACHI *et al.*, 2020; OMS, 2020f). A partir daí, O SARS-CoV-2 se disseminou pelo mundo até que em 2022 países como os EUA, o Brasil e a Índia foram responsáveis por 37% das infecções e 35% das mortes em todo o mundo (OMS, 2022).

Numericamente, no presente momento o mundo já alcançou a marca de mais de 761.071 milhões de casos e 6,879 milhões de óbitos confirmados pela COVID-19, sendo os EUA o país que ocupa o 1º no *ranking* de maiores índices. O Brasil, por sua vez, ocupa o 5º lugar no ranking supracitado com 37,07 milhões de casos confirmados da doença e 699 mil óbitos ocorridos ao longo de todo o período pandêmico (CSSE, 2023). O Sudeste e o Nordeste do Brasil se destacam como as principais regiões acometidas, liderando em número de casos e mortes por COVID-19. Entretanto, cabe ressaltar que todas as regiões brasileiras

apresentam taxa de mortalidade (TM) acima da TM mundial de 1,4%, visto que a TM nacional se mantém em 2,4% (BRASIL, 2022a).

2.1.2 Filogenia e Estrutura Viral do SARS-CoV-2

A Família Coronaviridae, pertencente à ordem Nidovirales, trata-se da família taxonômica a qual pertencem os distintos subtipos de coronavírus, assim denominados devido a uma organização estrutural de uma coroa em torno do envelope viral. Os vírus, pertencentes à família supracitada, são esféricos, medem aproximadamente 120-220 nm de diâmetro e encontram-se subdivididos nas subfamílias Coronavirinae e Torovirinae. Os Coronavirinae se comportam como vírus zoonóticos e se classificam em quatro gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*. O SARS-CoV-2, por sua vez, pertence ao gênero *Betacoronavirus* e ao subgênero *Sarbecovirus* (HELMY et al., 2020; KLEIN et al., 2020; KASMI et al., 2021).

Do ponto de vista estrutural, o agente etiológico da COVID-19 consiste em um vírus de RNA de fita simples com sentido positivo, envelopado e não segmentado. Seu genoma apresenta um tamanho de ~30 kb o qual compartilha 80% de semelhança com a sequência do SARS-CoV (ARYA et al., 2020). Adicionalmente, o genoma do SARS-CoV-2 consiste em duas regiões não traduzidas (terminais 5' UTR e 3' UTR) e compreende 14 janelas de leitura aberta (ORFs). A regulação da tradução viral, a síntese de subgenomas, assim como o empacotamento do RNA viral e estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) ocorre devido a UTR da porção de 5'. Enquanto que a 3' UTR contém sítios de ligação associados ao complexo de replicação e transcrição associadas ao RNA de sentido negativo intermediário (-RNA) (BRANT et al., 2021).

As ORF1A e ORF1B, localizadas na região 5', são as principais codificantes para proteínas não estruturais (NSPs) sobretudo Nsp1 a Nsp16 as quais irão atuar na formação e regulação do complexo de transcrição-replicação (RTCs) responsável pela replicação e transcrição do RNA viral no hospedeiro. As demais ORFs, localizadas na porção 3' do genoma, encontram-se sobrepostas codificando as proteínas estruturais *spike* (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N), que atuam sobretudo sob a interação do vírus com o receptor celular, sua montagem, morfologia e liberação da célula. Além das proteínas acessórias incluindo ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9 e ORF10 envolvidas

com parâmetros como patogenicidade e interação vírus-hospedeiro (ARYA et al., 2020; MOUSAVIZADEH; GHASEMI, 2020).

A glicoproteína N é altamente expressa durante o processo de infecção uma vez que é responsável pelo endereçamento e empacotamento do RNA viral em um ribonucleocapsídeo helicoidal. A glicoproteína M se caracteriza como transmembranar e interage com outras proteínas estruturais auxiliando no processo de montagem viral. A proteína E atua no início do processo de infecção e montagem viral, contribuindo sobretudo para sua patogenicidade, além de apresentar duas conformações estruturais: monomérica ou homopentamérica (ARYA et al., 2020; BHAT et al., 2021; BRANT et al., 2021).

No envelope viral encontram-se trímeros de proteína S, a qual se caracteriza como uma proteína cuja organização estrutural e transição conformacional promove a fusão viral com a membrana da célula hospedeira. Cada monômero desta proteína é formado por duas subunidades ligadas, a S1 e S2, o domínio transmembranar e a porção citoplasmática. A subunidade S1 na fase pré-fusão se dobra em quatro domínios: o domínio amino-terminal (N-terminal) (NTD), o domínio de ligação ao receptor (RBD) e dois domínios carboxi-terminal (C-terminal); (CTD1 e CTD2). Já na subunidade S2 é possível identificar a região *upstream helix* (UH), o peptídeo de fusão (FP), o *heptad repeat 1* (HR1), o domínio central (CD), o *heptad repeat 2* (HR2 - e que protege o FP), o domínio transmembranar (TM) e a cauda citoplasmática (CP) (PENG et al., 2021). Na pré-fusão a S2, por sua vez, forma um feixe helicoidal central com repetição heptada 1 (HR1) dobrando-se de volta para a membrana viral. Além disso, os três RBDs do trímero S podem apresentar duas conformações distintas: aberta, ou seja, um estado acessível ao receptor, e fechada para um estado inacessível ao receptor. No estado pós-fusão, as mudanças conformacionais levam ao desligamento da subunidade S1 de S2 e provavelmente sua dissociação de S2, enquanto S2 sofre uma cascata de eventos de redobramento para formar um trímero estável e alongado (KE et al., 2020; WANG et al., 2020; WRAPP et al., 2020; JACKSON et al., 2022).

2.1.3 Ciclo Viral e suas Formas de Transmissão

O ciclo biológico do SARS-CoV-2 tem como base inicial a injeção do genoma viral na célula hospedeira por via endossomal ou por fusão do envelope viral com a membrana celular, processo no qual a glicoproteína S supracitada é protagonista pois proporciona a passagem do SARS CoV-2 para o meio intracelular através da sua interação com a

enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2) a qual funciona como um receptor para os coronavírus SARS-CoV-1 e SARS-CoV-2 (HOFFMANN et al., 2020). Dois eventos de clivagem da proteína S são normalmente necessários para o processo de entrada do coronavírus: um na junção das subunidades S1 e S2, e outro no local S2', interno à subunidade S2. O contato entre a RBD presente na subunidade S1 da proteína Spike e o ECA2 inicia o processo de infecção viral, uma vez que, induz a dissociação das subunidades S1 e S2 através da clivagem na região de fronteira S1/S2 decorrendo em alterações conformacionais na subunidade S1 e na exposição do sítio de clivagem S2' na subunidade S2. A partir disso, se a célula-alvo não expressar a serina protease transmembranar 2 (TMPRSS2), a clivagem de S2' ocorre pela ação de proteases denominadas catepsinas e assim o complexo vírus-ACE2 é internalizado via endocitose mediada por clatrina nos endolisossomos. Já na presença da serina protease transmembranar 2 (TMPRSS2), a clivagem S2' ocorre na superfície da célula. A clivagem do sítio S2', portanto, expõe o peptídeo de fusão (FP) e mudanças conformacionais na subunidade S2 iniciam a fusão de membranas. Tal fusão ocorre entre a membrana viral e a da célula formando um poro de fusão pelo qual o RNA viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira para desnudamento e replicação (ARYA et al., 2020; HOFFMAN et al., 2020; JACKSON et al., 2022).

Após a entrada na célula hospedeira, o RNA genômico (gRNA) viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira, desempacotado das proteínas N e traduzido pelos ribossomos da célula hospedeira. Os produtos da tradução são as poliproteínas pp1a e pp1ab as quais são clivadas em Nsp1 a Nsp16. As Nsp2-16, por sua vez, se unem formando o complexo RTC dentro na célula infectada, no qual ocorre a replicação e transcrição do genoma viral. Inicialmente, a replicação ocorre na fita de RNA (+) gerando a fita de RNA (-) e, em seguida, a fita negativa é usada para replicação na fita de RNA (+) para nova montagem de vírions ou transcrição de mRNAs subgenômicos. Esses mRNAs subgenômicos são traduzidos nas proteínas estruturais – S, M, E, N e nas proteínas acessórias. As proteínas S, M e E entram no retículo endoplasmático (RE), e a proteína N se liga à fita de RNA genômico (+) para produzir o complexo nucleoproteico. O complexo nucleoproteico e as proteínas estruturais se movem para o compartimento intermediário ERGolgi (ERGIC) onde os vírions se reúnem, amadurecem e brotam do Golgi na forma de pequenas vesículas. Essas vesículas viajam para a membrana da célula hospedeira, onde são liberadas na região extracelular por meio de exocitose. Dessa forma, os vírions liberados infectam um novo

conjunto de células promovendo o estabelecimento e a progressão da doença (ARYA et al., 2020; ROMANO et al., 2020).

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre sobretudo por gotículas, entretanto a transmissão por contato ou por aerossol também podem ocorrer. A transmissão por contato consiste na transmissão da infecção por meio do contato direto com uma pessoa infectada ou fômites. Já a transmissão por gotículas se dá por meio da exposição a gotículas respiratórias expelidas por uma pessoa infectada ao tossir ou espirrar, em uma distância inferior a 1 metro da outra. Por fim, a transmissão por aerossol ocorre por meio do contato com gotículas respiratórias menores contendo vírus e que podem permanecer suspensas no ar por horas (CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS - CDC, 2022; BOUROUBA, 2020; LEWIS, 2020). Adicionalmente, cabe ressaltar que o risco de contaminação aumenta em ambientes com elevado número de pessoas, assim como em ambientes fechados e/ou pouco arejados, uma vez que tais condições possibilitam o acúmulo de partículas respiratórias associado a uma maior permanência dos aerossóis no ar. Sendo assim, justifica-se o emprego das medidas preventivas recomendadas para a COVID-19 como o uso de máscaras, distanciamento social, higienização constante das mãos por meio da lavagem ou utilização do álcool e vacinação (KOKS et al., 2020; BRASIL, 2021).

2.1.4 Manifestações Clínicas e Diagnóstico

Do ponto de vista clínico, a COVID-19 consiste prioritariamente como uma doença respiratória, uma vez que as principais manifestações clínicas da doença são pulmonares. Entretanto, a infecção por SARS-CoV-2 não acomete apenas o sistema respiratório, estudos relatam o acometimento de outros órgãos e sistemas durante e, até mesmo, após a fase aguda da doença (BEHZAD et al., 2020; OCHANI et al., 2021). Inicialmente, Sudre et al. (2020), ao analisarem dados de 1.600 voluntários adultos no Reino Unido, agruparam os quadros clínicos possíveis durante a infecção de acordo com os sintomas emergentes em: 1) Gripe sem febre; 2) Gripe com febre; 3) Gastrointestinal; 4) Nível grave um - fadiga; 5) Nível grave dois - confusão; 6) Nível grave três - dor abdominal e dificuldade respiratória (SUDRE et al., 2020).

Atualmente, estima-se que a transmissão do SARS CoV-2 ocorra por volta de 48 horas antecedentes ao início dos sintomas, com período médio de incubação de 6,4 dias (OCHANI et al., 2021). As manifestações clínicas da COVID-19 podem variar desde

quadros leves, moderados e graves até mesmo a casos assintomáticos, apesar do indivíduo possuir um teste positivo indicando a presença do vírus. Os quadros leves e moderados, por sua vez, se manifestam inicialmente através de sintomas inespecíficos como febre, tosse, cefaleia, dispneia, mialgia ou fadiga. Entretanto, sintomas como náuseas e vômitos, dor abdominal, diarreia, anosmia, ageusia, congestão nasal, coriza e calafrios também são comumente relatados. Adicionalmente, quadros de prostração, adinamia, hiporexia, pneumonia sem sinal de gravidade, tosse e febre persistentes caracterizam os quadros moderados (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2021; OMS, 2022).

Outra forma clínica da COVID-19 é a forma grave; caracterizada pela presença da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), uma síndrome gripal na qual o paciente apresenta dispneia/desconforto respiratório, pressão persistente no tórax ou saturação de O₂ menor que 95% em ar ambiente ou coloração azulada de lábios ou rosto - cianose. A SARS pode evoluir para um estado crítico, no qual os principais sintomas são pneumonia grave, sepse, insuficiência respiratória grave, disfunção de múltiplos órgãos, necessitando de suporte ventilatório e unidades de terapia intensiva (WU et al., 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2021). No geral, cerca de 95% dos infectados tende a desenvolver uma doença leve, enquanto 5% dos pacientes acometidos desenvolvem a forma grave da doença (OCHANI et al., 2021).

Disfunção renal, complicações gastrointestinais, disfunção hepática, achados mediastinais, anormalidades neurológicas e manifestações hematológicas estão entre as manifestações extrapulmonares descritas (BEHZAD et al., 2020). Manifestações cutâneas também são relatadas, sobretudo por volta do 10º dia após o início dos sintomas sistêmicos, como lesões eritematosas e urticariformes (ZHAO et al., 2020). Em crianças podem ocorrer desde casos assintomáticos até a síndrome inflamatória multissistêmica (SIM) considerada uma condição rara, porém grave (YASUHARA et al., 2020). Dentre os sobreviventes à COVID-19, manifestações clínicas após a fase aguda da doença comumente descritas incluem fadiga persistente, alopecia, comprometimento da memória recente, além de manifestações mais críticas como acidente vascular encefálico (AVE), insuficiência renal, hipertensão, miocardite e fibrose pulmonar, entre outras. Desta forma, a COVID-19, inicialmente descrita como uma doença respiratória, passou a ser considerada uma patologia inflamatória multissistêmica (KAMAL et al., 2021; KUNNUMAKKARA et al., 2021).

Em relação ao diagnóstico da COVID-19, a infecção aguda ou prévia pelo SARS-CoV-2 é confirmada por meio de distintas metodologias, dentre as quais se destaca o

diagnóstico molecular, considerado padrão ouro para a COVID-19, por permitir a detecção do RNA viral em pacientes sintomáticos e assintomáticos. Tal detecção é realizada por meio da técnica de RT-qPCR a qual permite a amplificação desse material genético viral, caso o mesmo esteja presente nas amostras de esfregaço nasofaríngeo e/ou orofaríngeo obtidas a partir de coleta com SWAB entre o 3º e 7º dia de infecção potencial (DRAMÉ et al., 2020; SULE; OLUWAYELU., 2020; RAI et al., 2021). Além disso, sobretudo em casos sintomáticos, o diagnóstico clínico deve ser considerado, mediante uma avaliação profissional minuciosa acerca do estado de saúde do indivíduo baseado nos seus sinais e sintomas (MORELO-GARCÍA et al., 2021; YUCE; FILIZTEKIN; OZKAYA., 2021). O diagnóstico por imagem é também altamente aplicável no contexto da COVID-19, no qual uma tomografia computadorizada de alta resolução é realizada com a finalidade de avaliar potenciais alterações tomográficas que sejam compatíveis com o comprometimento pulmonar provocado pela COVID-19, especialmente em casos moderados e graves (ALSHARIF; QURASHI, 2020; LONG et al., 2020; YE et al., 2020). Por fim, a presença de anticorpos IgM, IgA e IgG sintetizados a partir da ativação do sistema imune mediada pela infecção pelo SARS CoV-2 pode ser identificada no sangue, plasma ou soro a partir de testes sorológicos, utilizando a técnica de ELISA ou Imunocromatografia, sendo esta última também utilizada para detectar antígenos virais em secreções de nasofaringe e/ou orofaringe (RAI et al., 2021; SIDIQ et al., 2021; YAMAYOSHI et al., 2021). Cabe ressaltar que a realização de tais testes para detecção desses anticorpos é indicada, em média, após o 14º dia do surgimento de sintomas ou de contato com pessoas infectadas. Em contrapartida, a detecção de antígenos virais pode ser realizada até o 10º dia de sintomatologia ativa e/ou da infecção potencial (YUCE; FILIZTEKIN; OZKAYA., 2021; BRASIL, 2021a).

2.1.5 Imunologia da Infecção pelo SARS-CoV-2

A atuação do sistema imunológico em infecções virais é essencial para a detecção e eliminação do vírus. Entretanto, as respostas imunológicas inatas e adaptativas desencadeadas pelo SARS CoV-2 revelam uma linha tênue entre efeitos protetores e reações patológicas prejudiciais ao hospedeiro, o que explicaria o amplo espectro de formas clínicas que os acometidos pela COVID-19 apresentam (HOSSEINI et al., 2020). Sendo assim, torna-se evidente que a compreensão da interação entre o SARS CoV-2 e os componentes da imunidade inata e adaptativa viabiliza o desenvolvimento de robustas estratégias de

prevenção, além de intervenções terapêuticas cada vez mais focadas na atenuação de quadros graves e no manejo do prognóstico da doença (PROMPETCHARA; KETLOY; PALAGA, 2020; DIAMOND; KANNEGANTI, 2022).

A imunidade inata atua desde o início da infecção através da detecção do vírus por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, ativando assim vias inflamatórias, limitando, portanto, a entrada, a tradução, replicação e montagem viral na célula infectada. Adicionalmente, auxilia na remoção dessas células infectadas por distintos mecanismos e coordena o desenvolvimento acelerado da imunidade adaptativa. Por outro lado, a sua ativação excessiva pode desencadear uma tempestade de citocinas que acarreta um quadro de inflamação sistêmica e doença grave (DIAMOND; KANNEGANTI, 2022). Os receptores de lectina do tipo C, receptores do tipo NOD (NLRs), receptores do tipo RIG I (RLRs) e receptores do tipo Toll (TLRs) são os PRRs expressos pelas células imunes inatas para detectar padrões moleculares associados a patógenos (PAMP). Assim, na infecção pelo SARS CoV-2 tais receptores atuam como sensores do RNA viral citosólico e endossomal, sobretudo o RIG-I, MAD-5, STING, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6 e TLR7. Tal reconhecimento do vírus pelos receptores supracitados resulta na ativação dos fatores de transcrição, fator nuclear kappa-cadeia-potenciador de células B ativadas (NF- κ B), quinases reguladas por sinal extracelular $\frac{1}{2}$ (ERK $\frac{1}{2}$) e fator regulador de interferon 3 (IRF3), os quais são translocados para o núcleo e induzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e Interferons do tipo I e do tipo III (IFN I e III) (HOSSEINI et al., 2020; LOWERY; SARIOL; PERLMAN., 2021; DIAMOND; KANNEGANTI, 2022).

A produção de IFN do tipo 1 consiste na primeira linha defensiva antiviral. O IFNs tipo I via receptor IFN α/β (IFNAR), por exemplo, ativa a janus quinase (JAK), transdutor de sinal e ativador de sinalização de transcrição (STAT). Após a sinalização IFNAR, JAK1 e TYK2 fosforilam as moléculas STAT1 e STAT2, que formam um complexo com o fator regulador de interferon (FRI). Esses complexos foram inseridos no núcleo para estimular a transcrição de genes estimulados por IFN (ISGs) e posteriormente a expressão de proteínas antivirais que restringem a infecção mediada pelo SARS-CoV-2 (SCHULTZE et al., 2021; DIAMOND; KANNEGANTI, 2022). Porém, as proteínas não estruturais do SARS-COV-2, como a ORF3b, comprometem a produção dessas citocinas o que é corroborado por HADJAD et al. (2020) que descrevem que pacientes com quadro grave da COVID-19 apresentam menor expressão de IFN I/III quando comparado aos pacientes recuperados de

quadros leves e/ou moderados (HADJAD et al., 2020; SCAGNOLARI et al., 2020; TRIGGLE et al., 2021).

O NLRP3 consiste em um dos sensores de inflamassomas mais bem caracterizados, acionada em resposta a PAMPs e a padrões moleculares associados a danos (DAMPs), o qual forma poros na membrana plasmática causando um desequilíbrio osmótico na célula que decorre em lise celular, ou seja, morte celular por piroptose. Tal lise celular promove a liberação de citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-18, além da clivagem da gasdermina D (GSDM). Níveis aumentados de IL-1 β e IL-18 no plasma correlacionam-se com a gravidade e mortalidade da doença em pacientes com COVID-19 (HOSSEINI et al., 2020; JORDAN et al., 2020; LOWERY; SARIOL; PERLMAN., 2021). Em suma, o mecanismo supracitado associado à expressão e à secreção de citocinas como interferons tipo I/III (IFNs), Fator de necrose tumoral (TNF α), Interleucina-1 beta (IL-1 β) e Interleucina-6 (IL-6) desencadeia a resposta antiviral nas células hospedeiras como macrófagos e neutrófilos recrutados para o sítio de infecção (TRIGGLE et al., 2021).

Em suma, as vias de sinalização mediadas por PRRs mediante a infecção pelo SARS-CoV-2 induz a liberação simultânea de IFNs e outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-12, IFN- β , IFN- γ , IL-17, que ao serem liberadas de forma controlada auxiliam no controle da infecção e na eliminação do patógeno. Entretanto, a liberação excessiva dessas citocinas pró-inflamatórias contribuem para o estabelecimento da “tempestade de citocinas”, condição presente em pacientes com a síndrome respiratória aguda, danos pulmonares e complicações tromboembólicas em casos graves da doença (LEE; CHANNAPPANAVAR; KANNEGANTI., 2020; DANLADI; SABIR., 2021; LOWERY; SARIOL; PERLMAN., 2021). Recentemente, também foi caracterizada como uma condição potencialmente fatal causada pela produção excessiva de citocinas inflamatórias que contribui para a patogênese da doença por induzir um tipo de morte celular denominada morte celular inflamatória (PANoptose). A PANoptose, portanto, é uma via de morte celular programada inflamatória imune inata dependente de PANoptossomas, definidos como complexos contendo caspases com ou sem componentes do inflamassoma e proteínas, induzido pelo sinergismo de TNF α e IFN- γ sobretudo em macrófagos inflamatórios que ativa a via da caspase-8 e induz a morte da célula, sendo capaz de atuar em um sistema de *feedback* positivo, podendo acarretar em sobrecarga inflamatória tecidual e na falência múltipla de órgãos no acometidos severamente pela COVID-19 (DIAMOND; KANNEGANTI, 2022).

As células NKs também apresentam atividade antiviral, pois expressam vários receptores para o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I, que regulam a produção de citocinas ou citotoxicidade mediada por células. Entretanto, a expressão de receptores inibidores NKG2A (grupo natural-killer 2, membro A) foi descrita em infectados pelo SARS-CoV-2 sugerindo que o vírus modula de maneira inicial o processo de *clearance* viral. Além disso, pacientes com as formas leve, moderada e grave da COVID-19 apresentam NKs mais ativadas, porém apresentando um fenótipo exausto pela expressão de PD-1 (DEMARIA et al., 2020; VITTE et al., 2020). Basófilos e eosinófilos, por sua vez, apresentam frequência e atividade reduzida na COVID-19, sobretudo em pacientes que desenvolvem formas graves da doença. Por fim, uma redução na capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) e a indução da formação de NETs é observada em neutrófilos, assim como uma redução da frequência dessas células (VITTE et al., 2020; VIGÓN et al., 2021).

A imunidade adaptativa, por sua vez, apresenta papel fundamental na proteção contra infecções virais, dessa forma tem-se que a imunidade mediada por células T e B tornam-se relevantes alvos de estudo na fase aguda da doença e na fase pós-covid no intuito de acompanhar o padrão de resposta imunológica adaptativa estabelecida temporalmente. Os linfócitos B apresentam a capacidade de gerar anticorpos neutralizantes específicos contra o SARS-COV-2 em pacientes infectados, sobretudo direcionados à proteína S e a proteína do Nucleocapsídeo, os quais contribuem para o bloqueio da entrada do vírus nas células hospedeiras demonstrando um papel crítico desses anticorpos para a eliminação viral (MA et al., 2020; WANG et al., 2020; XIE et al., 2020). Guo et al. (2020) demonstraram que 22% dos pacientes RT-qPCR positivos eram IgM negativos, enquanto que em outros pacientes IgM e IgG foram detectados ao mesmo tempo. Em outro contexto, após 15 dias de doença sintomática, 94,3% dos pacientes apresentavam IgM e 79,8% destes eram IgG positivos (GUO et al., 2020; ZHAO et al., 2020). Por outro lado, na fase aguda da doença a resposta de IgA se demonstra significativa em relação a resposta mediada por IgM (PACES et al., 2020). Além de mediar a produção de anticorpos, os linfócitos B também podem modular a resposta imune por atuarem como células apresentadoras de antígenos, produzirem citocinas e fornecerem sinais coestimuladores, sobretudo, em contato com a célula T (PENG et al., 2017). Após a fase de intensa produção e secreção de anticorpos, células B de memória são geradas, as quais são capazes de serem reativadas e se diferenciar em células secretoras de

anticorpos contra o SARS-COV-2 de maneira precoce em casos de reinfecção (QUAST; TARLINTON, 2021).

Em indivíduos acometidos pela COVID-19, uma redução no número total de células B, células T e células NK foi descrita em todos os grupos analisados, quando comparado aos não infectados, entretanto no grupo grave tal diminuição encontrava-se acentuada (QINC et al., 2020). Por outro lado, indivíduos recuperados da COVID-19 analisados por citometria de fluxo observou-se uma inalteração da frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ quando comparados ao grupo de indivíduos não expostos ao vírus (GRIFONI et al., 2020). Em linhas gerais, a atuação coordenada de células B e T encontra-se ligada à patogênese da COVID-19 e ao processo de eliminação viral, entretanto o fornecimento de imunidade duradoura e proteção à reinfecção ainda não estão totalmente elucidados (TRIGGLE et al., 2021).

As respostas imunológicas mediadas pelas células T CD4⁺ e CD8⁺ estão presentes em praticamente todas as infecções por SARS-CoV-2, sendo tais células direcionadas contra uma variedade de antígenos, incluindo proteínas estruturais e não estruturais (MERAD et al., 2022). As células T CD4⁺ apresentam um aumento na expressão de marcadores de ativação e/ou exaustão de forma semelhante ao observado nas células T CD8⁺, além de apresentarem a capacidade de se diferenciar em uma variedade de células auxiliares e células efectoras, com capacidade de instruir as células B, auxiliar células T CD8⁺, recrutar células inatas, ter atividades antivirais diretas e facilitar o reparo tecidual (SETTE; CROTY., 2021). Há evidências de que as respostas imunológicas mediadas pelas células T CD4⁺ induzidas pelo SARS-CoV-2 foram associadas ao controle da infecção primária por SARS-CoV-2, as quais possuem como alvo as proteínas S, M e N do vírus, assim como as proteínas acessórias e/ou não estruturais, ORF3 e NSP3 para tal subpopulação, na fase aguda da doença (MERAD et al., 2022; MOSS et al., 2022).

O surgimento rápido de células T CD4⁺ específicas para SARS-CoV-2 na fase sintomática da COVID-19 foi associado à doença leve e eliminação viral acelerada. Por outro lado, quando tais células surgem apenas após cerca de 20 dias de sintomatologia associa-se tal fato com quadros graves e até mesmo fatais da COVID-19, evidenciando a relevância desse subtipo celular na modulação da resposta imune da doença (BRAUN et al., 2020; TAN et al., 2021). Adicionalmente, sabe-se que pacientes que apresentaram células CD4⁺ com um perfil de resposta Th1 produtor de IFN γ proeminente comumente desenvolvem doença leve/moderada e capacidade de eliminação viral acelerada, assim como um fenótipo Th17

também citado como contribuinte da resposta imunológica estabelecida pelas T CD4+ nos acometidos pela COVID-19. Além disso, estas também podem se diferenciar em um fenótipo de T CD4+ folicular (Tfh), que apresenta a função de auxiliar no desenvolvimento de uma imunidade humoral de longo prazo. Adicionalmente, é válido ressaltar que células T CD4+ de memória específica contra o vírus foram observadas nos pacientes convalescentes (CROTTY et al., 2019; POONIA; KOTTILIL, 2020; CHEN; WHERRY, 2021; SETTE, CROTTY; 2021).

As células T CD8+ são essenciais para a eliminação do SARS-CoV-2 devido a sua capacidade intrínseca de matar células infectadas, nesse contexto, a presença dessas células desde os momentos iniciais da infecção está correlacionada a um prognóstico favorável do indivíduo acometido (PENG et al., 2020). De modo semelhante as células T CD4+, as T CD8+ específicas contra o SARS-CoV-2 reconhecem e atuam contra à proteína S, N, M e ORF3a viral (GRIFONI et al., 2020; SETTE, CROTTY., 2021). Em relação aos padrões de resposta imunológica apresentados pelas células T CD8+ tem-se sugerido uma heterogeneidade de respostas desencadeadas por esse subtipo celular. Um fenótipo T CD8+ em exaustão é um dos padrões observados, no qual uma resposta mediada pela expressão de PD1, CD69, CTLA-4, NKG2A, TIM3, LAG3 é relatada em casos graves da doença. Um fenótipo celular ativado por HLA-DR+ expressando CD38+ e/ou Ki67+ presentes na fase aguda da doença que interagem com células epiteliais no trato respiratório superior na maioria dos pacientes acometidos também é descrito. Nesse padrão, em específico, uma prevalência de expressão significativas de moléculas associadas à citotoxicidade, como granzima B, perforina, CD107a e a citocina IFN γ , é relatado (BRUSSOW, 2020; SETTE, CROTTY; 2021). Adicionalmente, há a geração de células T CD8+ de memória, o que foi evidenciado através da observação de indivíduos convalescentes que tiveram a proteção contra a re-exposição ao vírus parcialmente anulada na ausência de células T CD8+ (PACES et al., 2020; CHEN; WHERRY, 2021; GOPLIN; CHEON; SUN, 2021; SASIKALA et al., 2021).

As células T de memória supracitadas são geradas mediante uma ativação inicial destes linfócitos frente ao SARS-COV-2 por infecção natural ou vacinação, essas células podem sobreviver por um longo tempo após a infecção e atuam agilmente no combate a tal infecção viral, uma vez que representam um conjunto expandido de linfócitos antígeno-específico com baixo limiar de ativação e menos dependentes de coestimuladores (PENNOCK et al., 2013; ABBAS, 2015). As formas de atuação dessas células diferem das

células T *naive*, uma vez que atuam a partir de um aumento do pool de células T de memória reativas ao patógeno através do reconhecimento antigênico específico do patógeno pelo Receptor de células T (TCR), apresentam uma resposta mais rápida e poderosa à infecção, possuem uma pré-programação para gerar subtipos celulares efetores otimizados para combater o patógeno e pela presença dessas células T de memória residentes (TRM) em tecidos não linfoides, como o pulmão, possibilitando a detecção rápida e consequentemente controle de infecção (JARJOUR; MASOPUST; JAMESON, 2021). Nesse contexto, a geração de células de memória é o principal objetivo das vacinas em geral, sobretudo diante do surgimento de novas variantes do SARS-COV-2 na atualidade, como por exemplo, Delta, Ômicron, P.2, P.1, P.3, CAL20C/L45 2R, VUI-21 JUL-1, VOC20212/01 e VOC20212/02, o que torna essas células relevantes alvos de investigação e de estudos (LAITON-DONATO et al., 2021; ZHOU, WANG, 2021; LOPEZ et al., 2021; ARAF et al., 2022).

Em concordância com as características supracitadas, os linfócitos T de memória se caracterizam como uma população antígeno-específica de vida longa que apresenta uma capacidade aumentada de restringir a replicação viral em uma infecção secundária (SAMJI; KHANNA, 2017). A partir do perfil de expressão dos marcadores de superfície, distintos subgrupos de linfócitos T de memória já foram descritos, uma vez que divergem das células efectoras e *naive* desse subconjunto celular. Em Sallusto et al. (2004) foram classificados os subtipos de células T baseados na expressão do CD45RA e da expressão de CCR7, um receptor de quimiocina que regula o endereçamento de células T para os órgãos linfoides secundários. Nesse contexto, as subpopulações foram classificadas em T *naive* sendo CD45RA⁺CCR7⁺, as células T de memória efetora que re-expressam o CD45RA (TMERA) sendo CD45RA⁺CCR7⁻, T de memória central (TCM) sendo CD45RA⁻CCR7⁺ e células T de memória efetora (TME) sendo CD45RA⁻CCR7⁻ (SALLUSTO et al., 2004; SAMJI; KHANNA, 2017; PITOISET et al., 2018).

Em linhas gerais, as subpopulações de células T de memória efetora e de memória central podem ser distinguidas também pelas suas funções efectoras, capacidade proliferativa e migratória. As TMC, além de expressarem CCR7⁺ expressam também o CD62L (L-selectina), CD127⁺ e CD44^{high}, são produtoras de IL-2 e se proliferam extensivamente, encontra-se nos linfonodos, baço, sangue e medula óssea e apresentam um perfil semelhante ao de células Th2. As TME e TMERA, por sua vez, são menos proliferativas, produtoras de citocinas efectoras como IFN- γ , apresentam elevado perfil de citotoxicidade, não expressam

o CD62L e podem ser encontradas, além dos tecidos supracitados, no pulmão, no fígado, no intestino, no trato reprodutivo, no rim, no tecido adiposo e no coração. Adicionalmente, a expressão de um conjunto diferente de receptores de quimiocinas como, por exemplo, CXCR3 permite que TME e TMERA tenham acesso a tecidos periféricos inflamados (WILLINGER et al., 2005; MUELER et al., 2012). As células TN, por sua vez, se caracterizam como linfócitos maduros que recirculam entre órgãos linfóides secundários e sangue por meio dos vasos linfáticos, que nunca foram expostas ao antígeno cujo repertório diminui ao longo da vida. Além do CD45RA e CCR7, essas células expressam CD62L, CD31, CD27 e CD28, sendo todos esses marcadores importantes para a posterior interação dessa célula com uma célula apresentadora de antígeno (APC). Após contato com antígenos, esse subtipo celular se prolifera extensivamente e se diferencia em células efetoras e de memória (VAN DEN BROEK; BORGANHS; WIJK, 2018; GALLERANI et al., 2021). Estudos pontuais descrevem a importância dos subconjuntos de células CD8⁺ TCM, TMERA, TN e TEM em específico na modulação imunológica presente na COVID-19. A partir disso, torna-se notória a necessidade de que estudos objetivando a compreensão dos distintos perfis de resposta imunológica estabelecidos pelos subtipos de células T CD8⁺ e CD4⁺ de memória supracitados na infecção pelo SARS-CoV-2 sejam desenvolvidos.

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos imunomoduladores mediados por linfócitos T CD8+ e CD4+ naive e de memória em pacientes recuperados das formas leve e grave da COVID-19.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar características clínico-epidemiológicas dos grupos controle e indivíduos recuperados das distintas formas clínicas da COVID-19 envolvidos no presente estudo;
- ✓ Realizar diagnóstico molecular nos voluntários inseridos nos grupos de estudo, através da detecção de RNA Viral do SARS-CoV-2 pela técnica de RT-qPCR;
- ✓ Realizar diagnóstico sorológico através da detecção de anticorpos específicos ao SARS-COV-2 IgM/IgG;
- ✓ Reconhecer mecanismos celulares relevantes e identificar marcadores de gravidade na COVID-19 a partir da utilização de estímulos por peptídeos antigênicos do SARS-COV-2 através da:
 - Caracterização fenotípica das subpopulações de células T CD8+ naive, de memória central, de memória efetora e de memória efetora que reexpressa o CD45RA através da análise da expressão das proteínas CD4, CCR7 e CD45RA.

- Avaliação do perfil de ativação das distintas subpopulações supracitadas pela expressão do CD137, Ki67 e CD69.
- Avaliação da produção de citocinas de caráter pró-inflamatórias (IL-17, IFN- γ e TNF- α) e regulatória (IL-10) pelas subpopulações supracitadas.

MATERIAL E MÉTODOS

4 Material e Métodos

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) (ANEXO I).

4.2 Delimitação dos Grupos de Estudo

Amostras de sangue periférico de vinte e três pacientes não vacinados que apresentaram sintomas de COVID-19 entre maio de 2020 e maio de 2021 e posteriormente se recuperaram foram obtidas para a execução deste estudo. O diagnóstico de SARS-CoV-2 foi baseado em RT qPCR para COVID-19 durante a fase aguda e testes sorológicos de IgG (ensaio Euroimmun Anti-SARS-CoV-2, Perkin Elmer Company) realizados após a recuperação. Os voluntários recuperados da COVID-19 foram distribuídos em 2 grupos distintos de acordo com as manifestações clínicas apresentadas: o grupo de Leve Recuperado (LR, n = 8) composto por indivíduos que manifestaram sinais e sintomas leves compatíveis com a infecção, não necessitando de internação e o grupo de Grave Recuperado (GR, n = 6) formado pelos indivíduos que acometidos pela infecção causada pelo SARS-CoV-2 desenvolveram sinais e sintomas mais graves, necessitando, portanto, de internação. Para fins epidemiológicos, dispneia grave, frequência respiratória de 30 ou mais respirações por minuto, saturação de oxigênio no sangue de 93% ou menos e infiltrados em mais de 50% do

pulmão foram considerados sintomas graves de COVID-19 (WU; McGOOGAN, 2020). Além disso, um grupo controle saudável (CTL, n = 9) foi incluído. Os voluntários do grupo controle foram relatados como assintomáticos nas últimas 10 semanas, foram negativos pelo teste certificado de anticorpos SARS-CoV-2 (Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 assay Perkin Elmer Company) e tiveram um teste RT qPCR negativo para SARS -CoV-2.

Todos os voluntários apresentaram idade igual ou superior a 18 anos, sendo não gestantes, que não fizessem uso contínuo de medicamentos e não acometidos por doenças autoimunes (Como, Doença Celíaca, Diabetes do tipo 1, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Artrite Reumatoide e Esclerose Múltipla). Os participantes da pesquisa foram orientados sobre a importância da mesma, assim como sobre os riscos de sua participação e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO II). 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 (ANEXO III).

4.3 Ensaio de RT qPCR

A técnica de RT qPCR foi realizada como descrito anteriormente por GUERRA-GOMES *et al.*, 2021. Durante a coleta de amostras de sangue periférico, amostras da nasofaringe ou orofaringe também foram coletadas com o uso de swab para a extração e isolamento do RNA (QIAprep& Viral RNA UM Kit QIAGEN, USA). Tal amostra foi, portanto, amplificada 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 infecção nos voluntários pertencentes ao grupo CTL e de reinfecção em voluntários inseridos nos grupos LR e GR.

4.4 Desenho e Preparo do Pool de Peptídeos Antigênicos do SARS-COV-2

Para a determinação dos peptídeos, identificamos os alelos HLA-classe I/II mais frequentes na população brasileira, onde foram analisados alguns estudos sobre os alelos mais representativos em nossa população. Os alelos HLA-classe I/II mais frequentes entre a população mundial já estavam na ferramenta, portanto os alelos de populações isoladas foram excluídos, isso foi feito visando a alta capacidade dos peptídeos de funcionar de forma mais abrangente. Em seguida, realizamos previsões de afinidade de ligação e antigenicidade de MHC-I e II e analisamos a dinâmica molecular peptídica dos complexos MHC-I e

II/proteína de SARS-CoV-2 mais bem ajustados. Os peptídeos CD4 e CD8 específicos do vírus SARS-CoV-2 (número da patente: BR 10 2022 005518 1 – ANEXO IV) foram sintetizados (GenOne Biotechnologies, Rio de Janeiro, Brasil), liofilizados e armazenados a -20 °C para posterior análise. Posteriormente, os peptídeos foram ressuspensos em H₂O (MiliQ) e agrupados em grupos (Pool CoV-2 continha peptídeos da proteína spike e proteínas não spike, enquanto Pool Spike CoV-2 continha peptídeos apenas da proteína spike, Tabela 1).

Tabela 1 - Peptídeos desenhados e sintetizados para o presente Estudo.

	Nome	Peptídeo	Posição a.a.	Fonte
Pool CoV- 2	ORF1a	ILASFSASTSAFVET	476-490	Este estudo
	ORF1b	FVDGVPFVVSTGYHFR	4726-4741	Este estudo
	SPIKE_NTD	NIDGYFKIYSKHTPINLV	196-210	STEINHAGEN <i>et al.</i> , 2021
	SPIKE_RBD	ATRFASVYAWNRRKRI	344-358	STEINHAGEN <i>et al.</i> , 2021
	SPIKE_S2	ALQIPFAMQMAYRFN	893-907	STEINHAGEN <i>et al.</i> , 2021
	ORF3	KKRWQLALSKGVHVFV	66-80	Este estudo
	E	FYVYSRVKNLNSSRV	56-70	Este estudo
	M	KEITVATSRTLSSYYK	166-180	Este estudo
	ORF8	FYSKWYIRVGARKSA	41-55	Este estudo

Fonte: Adaptado de CSORDAS *et al.*, 2021.

Para a 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 (IEDB), conforme descrito anteriormente (CSORDAS *et al.*, 2018). A predição do epítopo 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 frequentes nessas populações, além das populações HLA mais frequentes do mundo. A previsão de epítopo 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).

4.5 Obtenção do Soro

Para a aquisição do soro, as amostras foram coletadas em tubos de coleta à vácuo sem aditivos e mantidas a temperatura ambiente em estante para tubos de ensaio por, no mínimo, 1 hora para que ocorresse a retração do coágulo. Em seguida, os tubos foram levados para câmara de fluxo laminar e o soro transferido para eppendorfs secos e estéreis devidamente identificados com o código do paciente, tipo de amostra e data do processamento. Por fim, o soro foi mantido por 24h em temperatura de -20°C e posteriormente transferidos para um freezer -80°C, onde foram mantidos até a utilização para o teste sorológico.

4.6 Sorologia para Diagnóstico de Anticorpos IgA e IgG

O teste sorológico foi realizado utilizando o Kit Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgA ou IgG (EUROIMMUN a PerkinElmer company – REF. El 2606-9601 G) em amostras sanguíneas de pacientes leves e graves recuperados pela infecção com o SARS-CoV-2, além do grupo controle. O teste foi realizado seguindo todas as orientações do fabricante, visando confirmar ou descartar a presença dos anticorpos contra o COVID-19 nas amostras coletadas.

4.7 Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs)

Aproximadamente 25 mL de sangue periférico dos voluntários recrutados aqui foram coletadas em tubos heparinizados para obtenção de PBMCs, mediante separação por gradiente de densidade (Ficoll PaqueTMPlus - GE Healthcare, Life Sciences, Pittsburgh, PA, EUA). Inicialmente, uma diluição 1:1 do volume de sangue coletado com Solução Fosfato Salina (PBS) foi realizada em tubos Falcon 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. As células foram mantidas em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com antibióticos (penicilina, 200 U/mL; estreptomicina, 0,1 mg/mL), 1 mM de L-glutamina (1 mM) e 10% de Soro Bovino Fetal (Sigma-Aldrich). As culturas foram

estabelecidas em uma concentração de $2,5 \times 10^5$ células/poço em placas de 96 poços em 3 condições: células não estimuladas (meio), estimuladas com Pool Spike CoV-2 (1 μ g/poço), Pool CoV-2 (1 μ g/poço) por 16 horas em estufa 5% CO₂ à 37°C. Em seguida, foi adicionada brefeldina-A (1 mg/mL, Sigma-Aldrich) e as amostras foram incubadas sob 5% de CO₂ em incubadora a 37 °C por 4 h.

4.8 Ensaio de Citometria de Fluxo

Após as 20h totais de incubação das PBMCs isoladas recentemente conforme supracitado, 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 marcadores de superfície, já diluídos, conforme titulação padronizada na fase de padronização dos reagentes, num volume final de 40 μ L foram adicionados. 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 μ L 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, 100 μ L de PBS e 100 μ L de solução de formaldeído 4% foram adicionados em cada poço de marcação extracelular por 20 min à temperatura ambiente 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 150 μ L de PBS, a permeabilização celular foi, portanto, realizada, incubando as células por 10 minutos com *Permeabilization Buffer* (PB) (0,5% BSA, w/v e 0,5% saponina em PBS) à temperatura ambiente. Após o processo a placa foi centrifugada durante 8 minutos (1300rpm, 4°C), o sobrenadante desprezado e as células ressuspendidas. Em seguida, 40 μ L da solução de anticorpos intracelulares adequadamente diluídos em solução de PB foi adicionada aos poços, sendo então as amostras incubadas por 45 minutos à temperatura ambiente. 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 preparações celulares previamente marcadas com os anticorpos monoclonais foi transferido para tubos próprios para citômetro de fluxo sendo mantidas a 4°C, ao abrigo da luz para que as fluorescências

não fossem perdidas até o momento da aquisição de dados no citômetro de fluxo modelo FACS CANTO II (BD Biosciences).

4.9 Anticorpos Monoclonais (MABs)

Para a marcação extracelular, foram utilizados os seguintes anticorpos da BD Biosciences: anticorpos de controle de isotipos IgG3-FITC (clone J606, camundongo BALB/c IgG3, κ , cat. 555578) e IgG1-PE-Cy-7 (clone O4-46, IgG1 de camundongo, κ , cat. 561316), anti-CD3 conjugado com APC extracelular (clone UCHT1, BALB/c IgG1 de camundongo, κ , cat. 555335), anti-CD8 conjugado com PERCP (clone SK1, BALB/c IgG1 de camundongo, κ , cat. 557871), anti-CD8 conjugado com APC (clone HIT8 α , Mouse IgG1, κ , cat. 566852), anti-CD45RA conjugado com FITC (clone: HI100, Mouse IgG2b, κ , cat. 555488), anti-CD45RA conjugado com PECy5 (clone: HI100, Mouse IgG2b, κ , cat. 555490), anti-CCR7 conjugado com PE (Clone: 150503, Mouse IgG2a, cat. 560765), PECy7 conjugado anti-CCR7 (Clone: 3D12, Rat IgG2a, κ , cat.: 557648), FITC conjugado anti-CD69 (clone: FN50, Mouse IgG1, κ , cat. 555530), APCCy7 conjugado anti-CD-4 (clone RPA-T4, Mouse IgG1, κ , cat. 347314) e APC conjugado anti-CD-137 (Clone: 4B4-1, mouse BALB/c IgG1, κ , cat. 550890).

Para a marcação intracelular, por sua vez, os seguintes anticorpos da Thermo Fisher Scientific e BD Bioscience foram utilizados: FITC conjugado anti-ki67 (clone: 7b11, Mouse / IgG1, κ , Cat. 33-4711), anti-IL-10 conjugado com PE (Clone: JES3-9D7, Rat IgG1, cat. 559337), anti-IL-17 conjugado com PE (Clone: SCPL1362, IgG1 de camundongo, κ , cat. 560436), anti-TNF- α conjugado com PE (Clone: MAb11, IgG1 de camundongo, κ , cat. 554513) e anti-IFN- γ conjugado com PECy7 (Clone: B27, IgG1 de camundongo, κ , cat. 557643) (Tabela 2).

Tabela 2 – Pannel de marcação com anticorpos monoclonais para análise de subpopulações de células T CD4+/CD8 + naive e de memória e seus distintos fenótipos de expressão.

FITC	PE	PECY5/PERCP	PECY7	APC	APCCy7
CD45RA	CCR7	CD8	IFN- γ	CD137	CD4
CD45RA	IL-10	CD8	CCR7	CD3	CD4

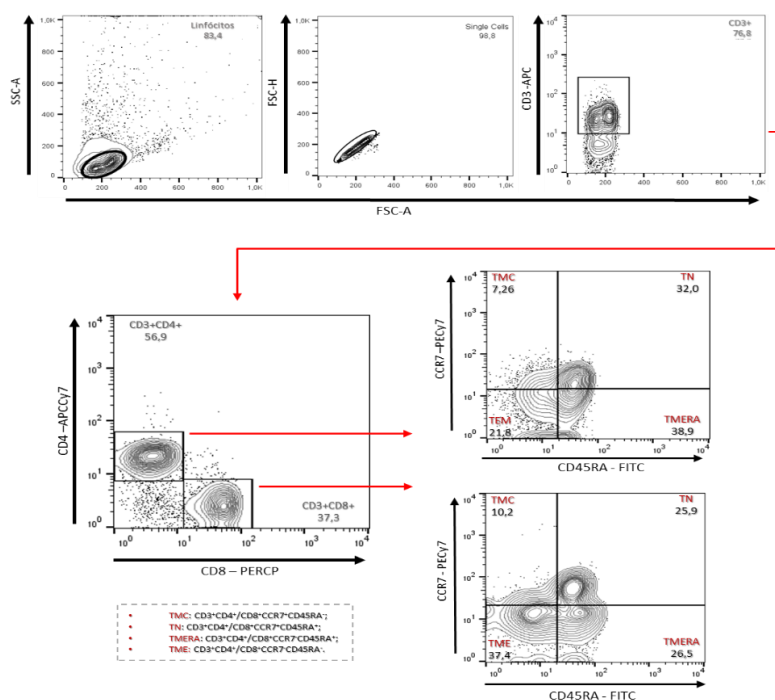
CD69	IL-17	CD45RA	CCR7	CD8	CD4
Ki67	TNF- α	CD45RA	CCR7	CD8	CD4

Fonte: Autoria Própria, 2023.

4.10 Aquisição e Análise dos dados por Citometria de Fluxo

Durante a aquisição dos dados foram coletados 30.000 eventos (células) sendo os mesmos analisados usando o software FlowJo v.10.8 (BD, Ashland - EUA). Os limites para os marcadores do quadrante foram definidos com base em populações negativas (células) e controles de isotipo. A estratégia de análise usada no software acima foi a seguinte: Inicialmente, para todas as populações estudadas, a identificação da população celular de linfócitos foi realizada através do gráfico de tamanho *versus* granulosidade devido ao conhecimento prévio sobre a localização dessas células. As subpopulações de memória e células T CD4+ e CD8+ naive foram analisadas quanto à expressão de marcadores de superfície e citocinas intracelulares. A estratégia de análise usada para identificar esses subtipos de células T CD8+ e CD4+ começou com a seleção de linfócitos totais, seguido pela identificação da subpopulação CD8+ e CD4+ através do gráfico de tamanho *versus* CD8 ou CD4. A partir disso, subpopulações de células T CD8+ e CD4+ naive (TN), células T de memória central CD8+ e CD4+ (TMC), células T de memória efetora CD8+ e CD4+ (TME) e células T CD8+ e CD4+ efetoras que reexpressam CD45Ra (TMERA) foram então identificados, usando o gráfico CCR7 *versus* CD45RA. Finalmente, a análise dos respectivos marcadores de superfície e citocinas foi realizada dentro das subpopulações de TN (CD8+/CD4+CCR7+CD45RA+), TCM (CD8+/CD4+CCR7+CD45Ra-), TEM (CD8+/CD4+CCR7-CD45Ra-) e TEMRA (CD8+/CD4+CCR7-CD45RA+) (Figura 1).

Figura 1. Dot plots representativos de estratégia de análise utilizada para identificar as subpopulações de linfócitos T CD8+ e CD4+ Naive, TMC, TME e TMERA em amostras de PBMC



Fonte: Autoria Própria, 2023. (A) Estratégia de análise usada para identificar subpopulações de linfócitos CD4+ e CD8+ Naïve, TEMRA, TEM e TCM em amostras de PBMC.

4.11 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas com auxílio do software GraphPad Prism versão 8.4.3. 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 utilizada onde apropriado. Para análises comparativas entre dois grupos, teste T Student ou Mann-Whitney foram usados onde apropriado. Os resultados foram mostrados como média $\pm$ erro padrão de media (SEM). O intervalo de confiança foi de 95% e os valores foram considerados significativos quando $p < 0.05$.

RESULTADOS - I

Os resultados dessa tese serão apresentados em duas partes, sendo o capítulo de resultados I utilizado para discorrer sobre as células T CD8+ naive e de memória e os resultados II para as subpopulações de células T CD4+.

5.1 Caracterização clínico-epidemiológica dos grupos de indivíduos saudáveis (CTL) e de pacientes recuperados da COVID-19 em relação a gênero, média de idade, sintomatologia e comorbidades apresentadas

Para este estudo, recrutamos 23 voluntários e os distribuímos em três grupos. No grupo CTL, 9 voluntários (4 homens e 5 mulheres) com idade média de 37,22 ($\pm$ 9,17) foram inseridos. O grupo leve recuperado incluiu 8 voluntários (3 homens e 5 mulheres) com idade média de 34,75 ($\pm$ 8,29). Finalmente, 6 voluntários foram incluídos no grupo grave recuperado (4 homens e 2 mulheres) com idade média de 38,83 ($\pm$ 7,02) (Tabelas 3–5). Não foram encontradas diferenças significativas na idade entre os grupos. A maioria dos voluntários que manifestaram a COVID-19 leve relataram dor de cabeça, coriza e fadiga (Tabela 4). Todos os voluntários do grupo recuperado grave sofreram infiltração pulmonar, baixa saturação de oxigênio e dor de cabeça, enquanto quase todos tiveram febre alta,

taquipnéia e fadiga (Tabela 5). Em relação às comorbidades, a obesidade foi uma doença crônica significativa observada entre 50% dos casos de COVID-19 recuperados.

Finalmente, os voluntários foram convidados a se identificarem entre as seguintes classificações étnicas-raciais: branco, pardo, preto, amarelo (asiático) e indígena (nativo americano). Os voluntários que se autodenominaram como pardo e branco compreendiam 47,82% e 43,48%, respectivamente, enquanto os da autoclassificação preto e indígenas compreendiam 4,34% cada. Assim, a demografia do grupo CTL foi classificada como branco (66,66%), pardo (22,22%) e indígena (11,11%); O grupo leve recuperado foi classificado como pardo (75%) e branco (25%), enquanto o do grupo recuperado grave foi classificado como pardo (50%), branco (33,33%) e negro (16,66%). Os detalhes demográficos e clínicos dos voluntários são mostrados nas Tabelas 3–5.

Tabela 3. Gênero, Idade e Auto-classificação étnico-racial dos voluntários do Grupo Controle (CTL)

#ID	Gênero	Idade	Auto-classificação étnico-racial
CTL 1	Feminino	47	Branco
CTL 2	Feminino	48	Branco
CLT 3	Masculino	47	Branco
CLT 4	Feminino	28	Branco
CLT 5	Masculino	36	Branco
CLT 6	Masculino	22	Pardo
CLT 7	Feminino	36	Indígena
CLT 8	Masculino	40	Branco
CLT 9	Feminino	31	Pardo
MEDIA	5F:4M	37.22(±9.12)	

Fonte: Autoria própria, 2023. *F = Feminino; M = Masculino.

Tabela 4. Gênero, Idade, Auto-classificação étnico-racial, comorbidades e sintomas e sintomas de voluntários recuperados leves (Recuperados Leves)

#ID	Gênero	Idade	Auto-classificação étnico-racial	Comorbidades	Sintomas
COV3	Masculino	22	Pardo	Guillain-Barré	Dor de cabeça, coriza, tosse com fleuma, obstrução nasal, calafrios e fadiga
COV5	Feminino	34	Pardo	Obesidade	Febre (37,5 ° C), dor de cabeça, tosse seca, mialgia, calafrios, fadiga e anosmia

COV6	Masculino	25	Pardo		Febre (37,5 ° C), dor de cabeça, coriza, dor de garganta, dispnéia, diarreia, fadiga, anosmia e ageusia
COV9	Masculino	40	Pardo		Cefaléia, Coriza e Dispnéia
COV10	Feminino	36	Branco	Obesidade	Artralgia e inchaço ocular
COV11	Feminino	39	Pardo		Febre (38 °C), Dor de cabeça, Coriza, dor de garganta, Tosse seca, Dispnéia, Taquipnéia, Artralgia, Mialgia, Náusea, Vômito, Diarreia, Calafrios, Fadiga, Anosmia e Ageusia
COV13	Feminino	48	Branco	Hipertensão	Cefaleia, Tosse seca, Dispneia, Obstrução nasal, Artralgia, Mialgia, Náusea, Vômitos, Diarreia, Arrepios, Fadiga, Inchaço ocular, Anosmia e Ageusia
COV15	Feminino	35	Pardo	Obesidade	Dor de cabeça, corrimento nasal, dor de garganta, tosse seca, tosse produtiva, obstrução nasal e fadiga
MEDIA	5F:3M		34,75 (±8.29)		

Fonte: Autoria própria, 2023. *C=Celsius; **F = Feminino; M = Masculino.

Tabela 5. Gênero, Idade, Auto-classificação étnico-racial, comorbidades e sintomas de voluntários recuperados graves (recuperados graves)

#ID	Gênero	Idade	Auto-classificação étnico-racial	Comorbidades	Sintomas
COV2	Masculino	43	Pardo	Hipertensão e Obesidade	Febre, Baixa saturação de oxigênio no sangue, Dor de cabeça, Artralgia, Mialgia, Infiltração pulmonar, Náusea, Diarréia, Fadiga, Taquipnéia, Inchaço ocular, Anosmia e Ageusia
COV4	Feminino	38	Branco	Hipertensão e Obesidade	Febre, Baixa saturação de oxigênio no sangue, Dor de cabeça, Tosse seca, Tosse com catarro, Dispneia, Taquipnéia, Mialgia, Vômito, Infiltração pulmonar, Calafrios e Fadiga
COV14	Masculino	25	Preto	Obesidade	Baixa saturação de oxigênio no sangue, Febre, Dor de cabeça, infiltrados pulmonares, Coriza, Dor de garganta, Tosse seca, Dispneia, Náusea, Fadiga, Inchaço ocular e Anosmia
COV16	Masculino	43	Pardo	Asma e Obesidade	Baixa saturação de oxigênio no sangue, febre, dor de cabeça, dor de garganta, tosse com sangue, infiltrados pulmonares, dispnéia e taquipneia
COV17	Feminino	40	Pardo		Febre, Dor de cabeça, Dor de garganta, Baixa saturação de oxigênio no sangue, Artralgia, Mialgia, Infiltração pulmonar, Calafrios, Fadiga, Anosmia, Ageusia e Taquipnéia
COV18	Masculino	42	Branco	Obesidade (IMC 38.5)	Baixa saturação de oxigênio no sangue, Febre, Dor de cabeça, Coriza, Dor de garganta, Infiltrados pulmonares, Tosse seca, Dispneia, Obstrução nasal, Taquipneia, Mialgia, Diarreia, Calafrios, Fadiga, Anosmia e Ageusia.
MEAN	2F:4M	38.83 (± 7.02)			

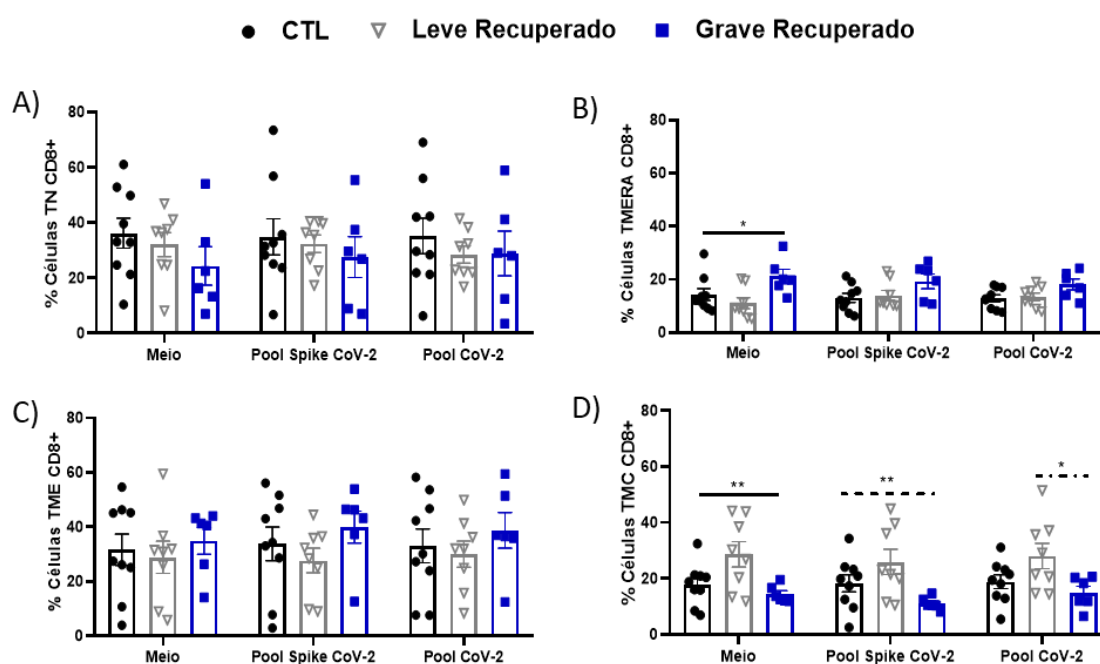
Fonte: Autoria própria, 2023. *C=Celsius; **F = Feminino; M = Masculino.

5.2 Avaliação da frequência de subpopulações de células T CD8+ naive e de memória no grupo CTL e nos distintos grupos de pacientes recuperados da COVID-19

A frequência das subpopulações de células T CD8+, TN, TMERA, TME e TMC na cultura de PBMCs oriundas de voluntários não vacinados recuperados da COVID-19 na ausência e presença de peptídeos antigênicos do SARS-CoV-2 foi analisada (Figura 2 A-D e 3). As células TMERA CD8+ no grupo leve recuperado tiveram uma frequência menor do

que os grupos CTL e grave recuperado em amostras não estimuladas (Figura 2B). Por outro lado, as células T CD8+ de memória central do grupo leve recuperado na presença de Pool Spike CoV-2 e não estimuladas apresentaram uma frequência elevada quando comparadas aos outros grupos clínicos avaliados (Figura 2D). O grupo leve recuperado também mostrou uma alta frequência de células CD8+ TMC quando estimulado pelo Pool CoV-2 em comparação com o grupo grave recuperado (Figura 2D). As células T CD8+ naíve e células TME CD8+, por sua vez, não apresentaram variações de frequência em todas as condições clínicas avaliadas em comparação com as demais subpopulações consideradas (Figuras 2A e 2C). A distribuição por similaridade das subpopulações de células TN, TMERA, TME e TMC CD4+ no sangue periférico de voluntários encontra-se representada na figura 03.

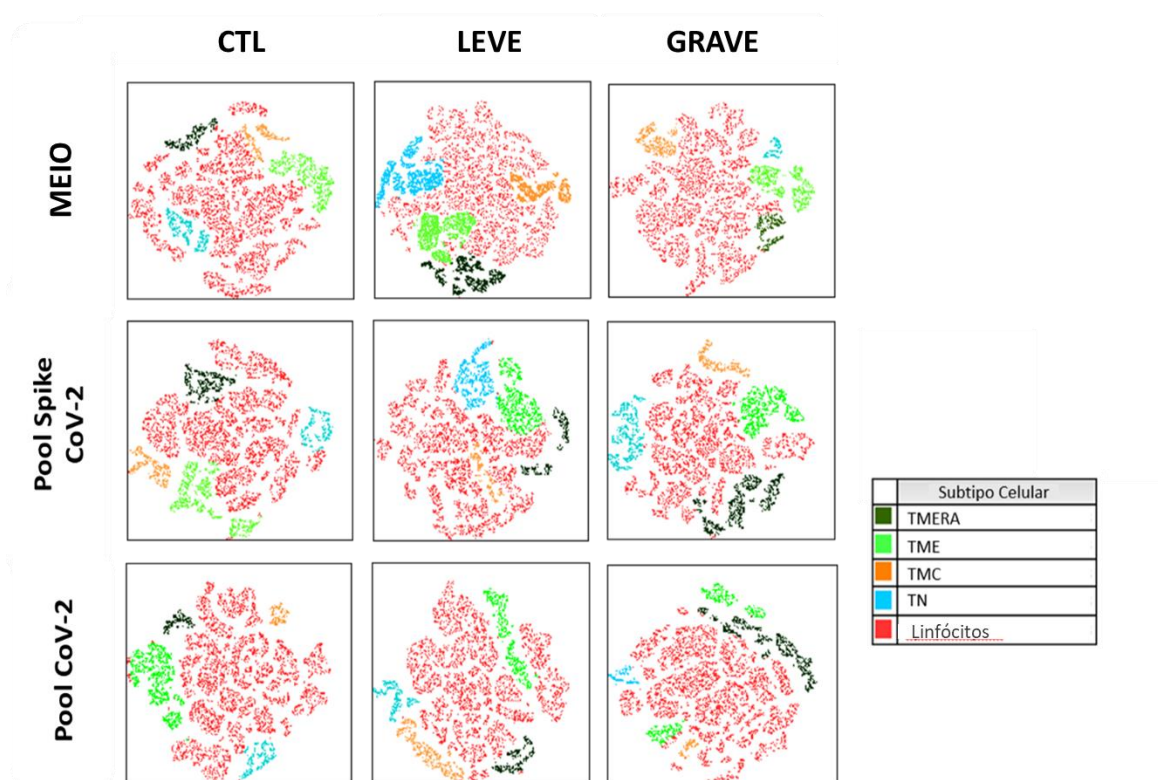
Figura 2. Frequência de células TN, TMERA, TME e TMC CD8+ no sangue periférico de voluntários



Fonte: Autoria própria, 2022. **(A)** Frequência de células TN CD8+. **(B)** Frequência de células TMERA CD8+. **(C)** Frequência de células TME CD8+. **(D)** Frequência de células TMC CD8+. PBMCs foram coletadas de indivíduos inseridos nos grupos controle (n = 9), Leve Recuperado (n=8) e Grave Recuperado (n = 6). As amostras foram incubadas por 16 horas em 4 condições (subgrupos): meio (não estimuladas), peptídeos Pool Spike CoV-2 ou peptídeos Pool CoV-2. Os dados são apresentados como média $\pm$ epm. Múltiplos grupos foram comparados através das 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. Barras de erro mostram a variabilidade dos dados de cada subgrupo. As barras de erro mostram a variabilidade dos dados para cada subgrupo. As linhas horizontais contínuas (—) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e Leve Recuperado, as linhas horizontais tracejadas (---) indicam diferenças significativas entre o grupo Leve Recuperado e Grave Recuperado e as linhas horizontais tracejadas com pontos (-.-) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e o Grave Recuperado (*p<0,05; **p<0,01). Os símbolos ●, ▽ e ■ representam cada voluntário inscrito nos grupos saudável, leve e grave,

respectivamente, cujas amostras foram inseridas nas condições Meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2. TN, células T naíve (CD8+CCR7+CD45RA+); TMERA, células T de memória efetora reexpressando CD45RA (CD8+CCR7-CD45RA+); TME, células T de memória efetora (CD8+CCR7-CD45RA-); TMC, células T de memória central (CD8+CCR7+CD45RA-).

Figura 3. Distribuição das subpopulações de células TN, TMERA, TME e TMC CD8+ no sangue periférico de voluntários representada pelo algoritmo T-distribuído *Stochastic Neighbor Embedding* (tSNE)



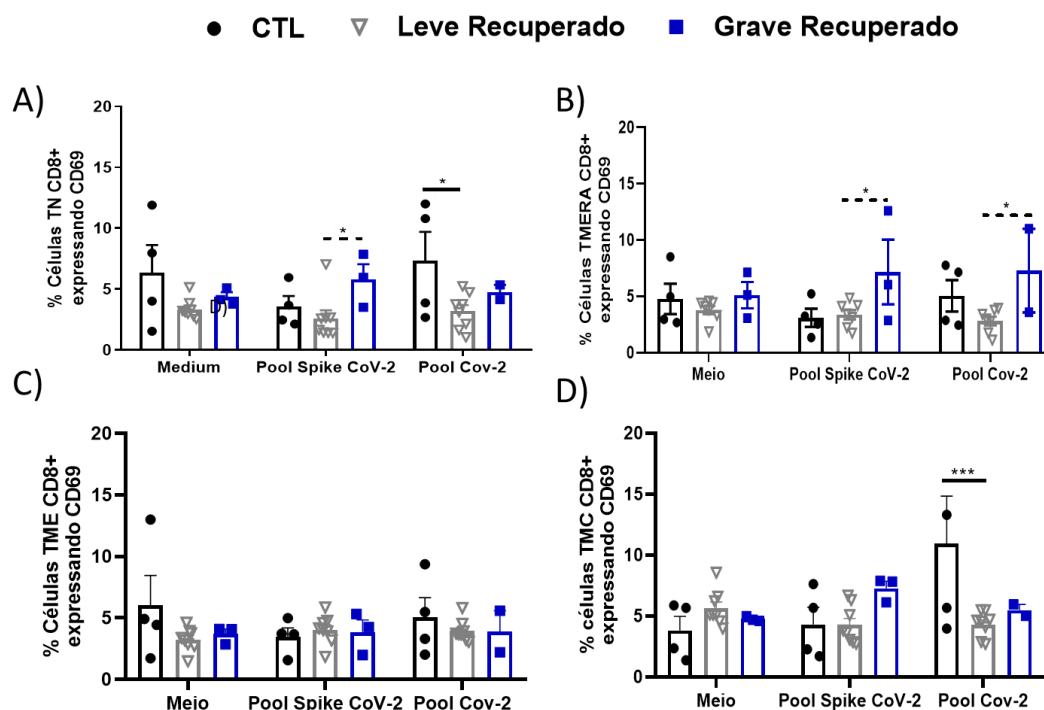
Fonte: Autoria própria, 2022. Visualização Global do tSNE de células T CD8+ naíve e de memória. Gráficos bidimensionais de tSNE (x, y) baseados no agrupamento de linfócitos por frequência e similaridade fenotípica a partir da expressão de CCR7 e CD45RA entre as subpopulações TN (azul), TMERA (verde escuro), TME (verde claro) e TMC (laranja) foram elaborados. A concatenação de dados inter-sujeitos foi realizada. Sendo, portanto, o arquivo FCS resultante analisado no módulo FlowJo tSNE para reconstituir tal gráfico bidimensional único que reuniram as semelhanças fenotípicas dessas células imunes entre os indivíduos dos grupos CTL (n = 9), Leve Recuperado (n=8) e Grave Recuperado (n = 6).

5.3 Expressão dos marcadores de ativação CD69, CD137 e Ki67 em subpopulações de células T CD8+ de memória e naíve em pacientes recuperados da COVID-19

Investigamos aqui o perfil de produção dos marcadores de ativação, CD69, CD137 e Ki67 em células T CD8+ TN, TMERA, TME e TMC na presença e ausência do Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2 (Figuras 4A-D). Em relação à expressão do marcador CD69, o grupo grave

recuperado demonstrou uma expressão elevada deste marcador por células T CD8+ naive em contato com Pool Spike CoV-2 em comparação com o grupo leve recuperado (Figura 4A). No entanto, na presença de Pool CoV-2, o grupo CTL apresentou maior frequência de CD69 em comparação ao grupo leve recuperado, padrão também observado em células TMC CD8+ do mesmo grupo (Figura 4A e 4D). As amostras estimuladas por Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2 no grupo grave recuperado apresentaram maior frequência de células TMERA CD8+CD69+ quando comparadas ao grupo recuperado leve (Figura 4B). Diferenças significativas na expressão do CD69 por células TME CD8+ não foram observadas (Figura 4C) (Figura 5).

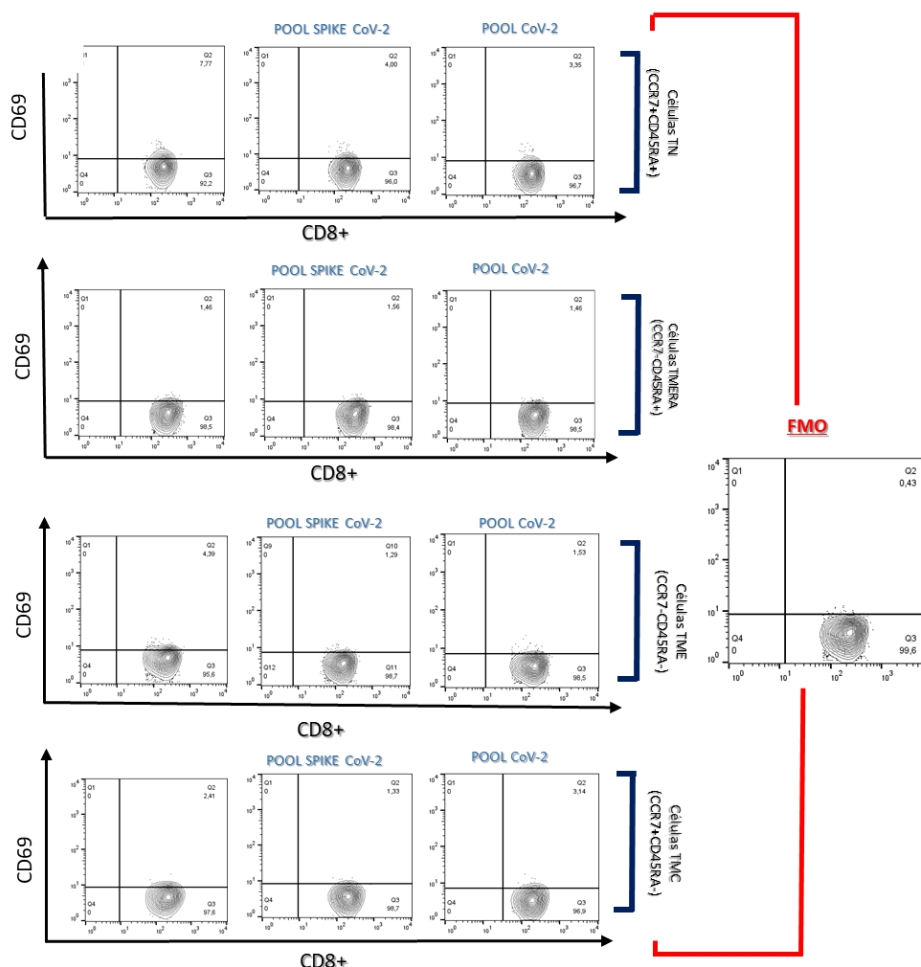
Figura 4A – D. Perfil de expressão de CD69 em células TN, TMERA, TME e TMC CD8+ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado



Fonte: Peixoto et al., 2022. **(A)** Frequência de CD69 em células TN CD8+. **(B)** Frequência de CD69 em células TMERA CD8+. **(C)** Frequência de CD69 em células TME CD8+. **(D)** Frequência de CD69 em células TMC CD8+. PBMCs foram coletados de indivíduos nos grupos CTL (n = 4), Leve Recuperado (n = 8) e Grave Recuperado (n = 4). As amostras foram incubadas por 16 horas sob 3 condições (subgrupos): meio (não estimulado), peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2. PBMCs não estimulados foram usados como controle negativo. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. Grupos múltiplos foram comparados usando análise estatística Two-Way ANOVA (seguida pelo pós-teste de Tukey) e ANOVA de uma via (seguida pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn), quando apropriado. As barras de erro mostram a variabilidade dos dados para cada subgrupo. As linhas horizontais contínuas (—) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e Leve Recuperado, as linhas horizontais tracejadas (---) indicam diferenças significativas entre o grupo Leve Recuperado e Grave Recuperado e as linhas horizontais tracejadas com pontos (-.-) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e o Grave Recuperado (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os símbolos ●, ▽ e ■ representam cada voluntário inscrito nos grupos saudável, leve e grave,

respectivamente, cujas amostras foram inseridas nas condições Meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2. TN, células T naive (CD8+CCR7+CD45RA+); TMERA, células T de memória efetora reexpressando CD45RA (CD8+CCR7-CD45RA+); TME, células T de memória efetora (CD8+CCR7-CD45RA-); TMC, células T de memória central (CD8+CCR7+CD45RA-).

Figura 5. Subpopulações de células T CD8+ expressando CD69 no sangue periférico de voluntários

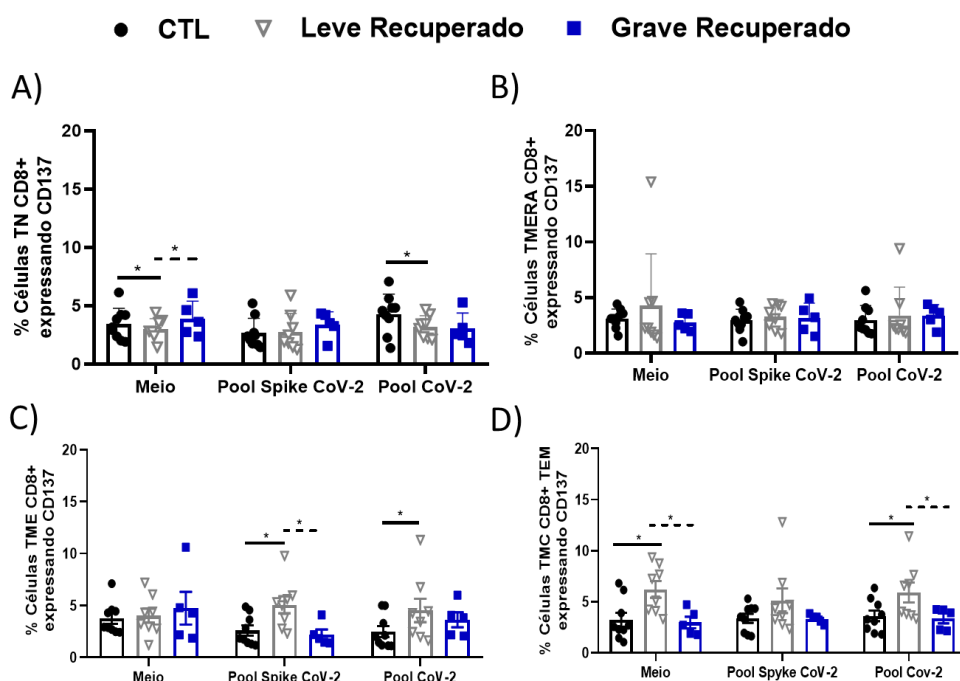


Fonte: Autoria Própria, 2023. Gráficos representativos de citometria de fluxo mostrando a expressão de CD69 entre células T CD8+ naive e de memória em pacientes recuperados de COVID-19. Os números indicam porcentagens nos portões sorteados. Todas as condições de estímulo avaliadas são mostradas em colunas.

Em relação à expressão de CD137, as células T CD8+ naive do grupo leve recuperado apresentaram expressão reduzida de CD137 na ausência de estímulo em relação aos demais grupos clínicos avaliados e na presença de Pool CoV-2 em relação ao grupo CTL (Figura 6A). Nas células T CD8+ de memória efetora, as amostras estimuladas por Pool Spike CoV-2 no grupo leve recuperado apresentaram uma frequência maior de CD137 do que as dos

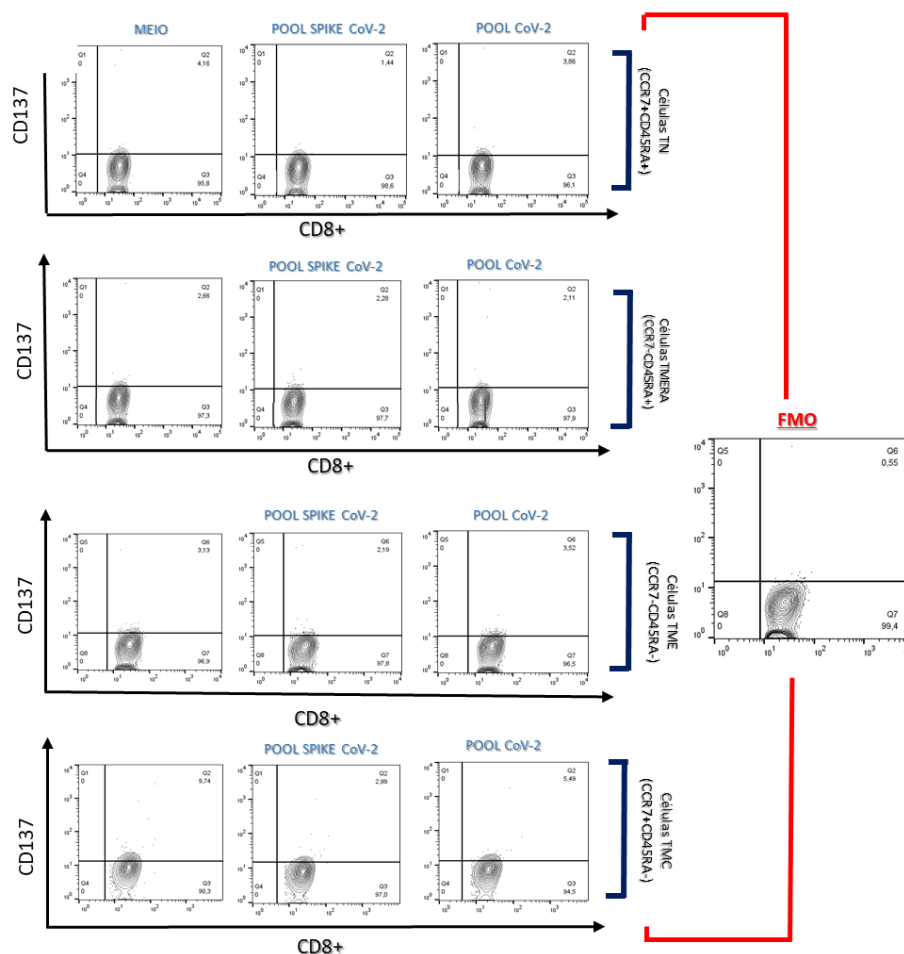
grupos CTL e grave recuperado (Figura 6C). Enquanto que nas amostras estimuladas pelo Pool CoV-2, uma frequência maior de CD137 foi apresentada pelo grupo leve recuperado em comparação apenas ao grupo CTL (Figura 6C). A expressão de CD137 por células TMC CD8+ no grupo leve recuperado, por sua vez, foi maior em comparação com o grupo CTL e grave recuperado em amostras não estimuladas e estimuladas por Pool CoV-2 (Figura 6D) (Figura 7).

Figura 6A – D. Perfil de expressão de CD137 em células TN, TMERA, TME e TMC CD8+ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado



Fonte: Autoria própria, 2023. **(A)** Frequência de CD137 em células TN CD8+. **(B)** Frequência de CD137 em células TMERA CD8+. **(C)** Frequência de CD137 em células TME CD8+. **(D)** Frequência de CD137 em células TMC CD8+. PBMCs foram coletados de indivíduos nos grupos CTL (n = 9), Leve Recuperado (n = 8) e Grave Recuperado (n = 5). As amostras foram incubadas por 16 horas sob 3 condições (subgrupos): meio (não estimulado), peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2. PBMCs não estimulados foram usados como controle negativo. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. Grupos múltiplos foram comparados usando análise estatística Two-Way ANOVA (seguida pelo pós-teste de Tukey) e ANOVA de uma via (seguida pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn), quando apropriado. As barras de erro mostram a variabilidade dos dados para cada subgrupo. As linhas horizontais contínuas (—) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e Leve Recuperado, as linhas horizontais tracejadas (----) indicam diferenças significativas entre o grupo Leve Recuperado e Grave Recuperado e as linhas horizontais tracejadas com pontos (-.-) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e o Grave Recuperado (*p<0,05; **p<0,01). Os símbolos ●, ▽ e ■ representam cada voluntário inscrito nos grupos saudável, leve e grave, respectivamente, cujas amostras foram inseridas nas condições Meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2. TN, células T naive (CD8+CCR7+CD45RA+); TMERA, células T de memória efetora reexpressando CD45RA (CD8+CCR7-CD45RA+); TME, células T de memória efetora (CD8+CCR7-CD45RA-); TMC, células T de memória central (CD8+CCR7+CD45RA-).

Figura 7. Subpopulações de células T CD8⁺ expressando CD137 no sangue periférico de voluntários



Fonte: Autoria Própria, 2023. Gráficos representativos de citometria de fluxo mostrando a expressão de CD137 entre células T CD8⁺ naíve e de memória em pacientes recuperados de COVID-19. Os números indicam porcentagens nos portões sorteados. Todas as condições de estímulo avaliadas são mostradas em colunas.

Em linhas gerais, diferenças significativas não foram encontradas na frequência de expressão do Ki67 nas células T CD8⁺, TN, TMERA, TME e TMC nas distintas condições clínicas. Apenas as células T CD8⁺ de Memória Efetora no grupo Leve Recuperado demonstraram uma redução na frequência de Ki67 na presença do Pool Cov-2 em relação as demais condições avaliadas (Tabela 6).

Tabela 6. Frequência de Ki67 em células TN, TME, TMC e TMERA CD8+, incubadas sem estímulo (Meio) e estimuladas (Peptídeos Pool-CoV2 e Spike Pool)

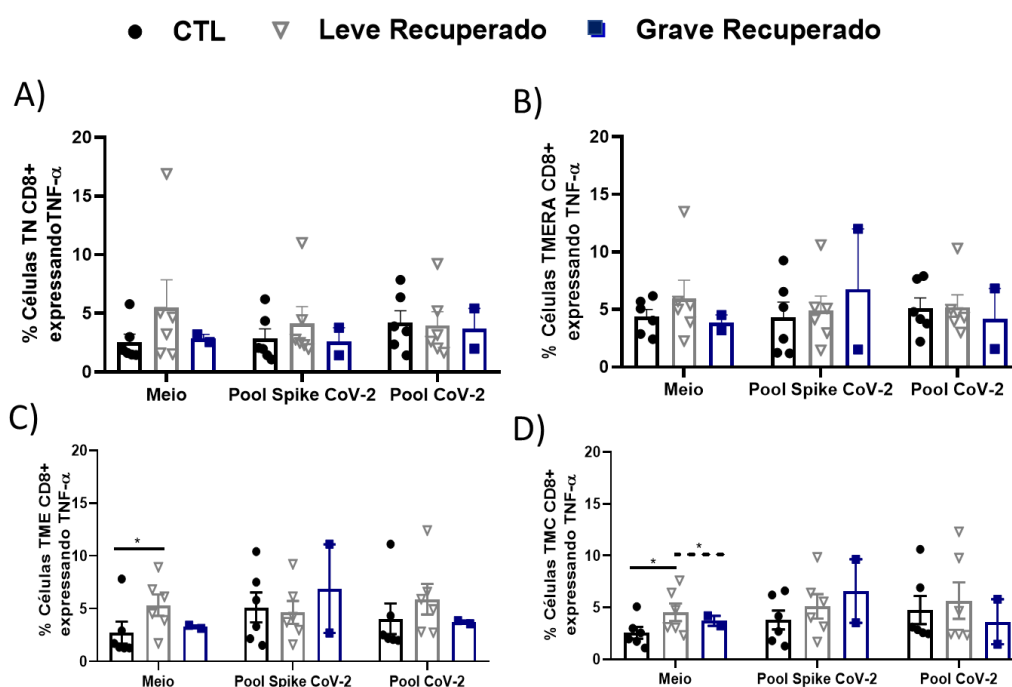
% KI67			
TN	CTL	Leve Recuperado	Grave Recuperado
MEIO	24,21±29,64	11,45 ± 14,97	21,46 ± 21,82
POOL SPIKE CoV-2	7,12±6,92	10,90 ± 13,56	5,99 ± 5,50
POOL CoV-2	24,32 ± 25,97	8,90 ± 20,25	15,93 ± 16,92
TMERA	CTL	Leve Recuperado	Grave Recuperado
MEIO	18,81 ± 18,09	11,62 ± 11,68	19,31 ± 17,93
POOL SPIKE CoV-2	11,2 ± 8,60	9,18 ± 12,45	10,3 ± 9,47
POOL CoV-2	22,64 ± 23,46	11,55 ± 15,22	18,61 ± 20,90
TME	CTL	Leve Recuperado	Grave Recuperado
MEIO	27,53 ± 20,81	18,37 ± 29,64	38 ± 39,31
POOL SPIKE CoV-2	13,08 ± 8,29	17,09 ± 24,63	10,99 ± 8,91
POOL CoV-2	28,00 ± 22,22	12,97 ± 0,82 ^a	28,81 ± 32,37
TMC	CTL	Leve Recuperado	Grave Recuperado
MEIO	33,07 ± 30,72	13,37 ± 25,91	41,3 ± 33,94
POOL SPIKE CoV-2	9,74 ± 9,42	15,08 ± 19,72	8,8 ± 5,23
POOL CoV-2	32,8 ± 24,74	20,87 ± 28,64	23,98 ± 22,22

Fonte: Autoria própria, 2023. ^a Diferenças estatísticas foram observadas no grupo Leve Recuperado entre o Meio, Pool Spike CoV-2 e o Pool CoV-2 ($p < 0.05$) no marcador de ativação Ki-67 em células T CD8+ de memória efetora. PBMCs foram coletadas de indivíduos inseridos nos grupos controle ($n = 3$), Leve Recuperado ($n = 6$) e Grave Recuperado ($n = 2$). As amostras foram incubadas por 16 horas em 3 condições (subgrupos): meio (não estimuladas), peptídeos Pool Spike CoV-2 ou peptídeos Pool CoV-2. Os dados são apresentados como média ± SEM.

5.4 Perfil de expressão das citocinas TNF- α , IFN γ , IL-10 e IL-17 e em subpopulações de células T CD8+ naive e de memória em pacientes recuperados da COVID-19

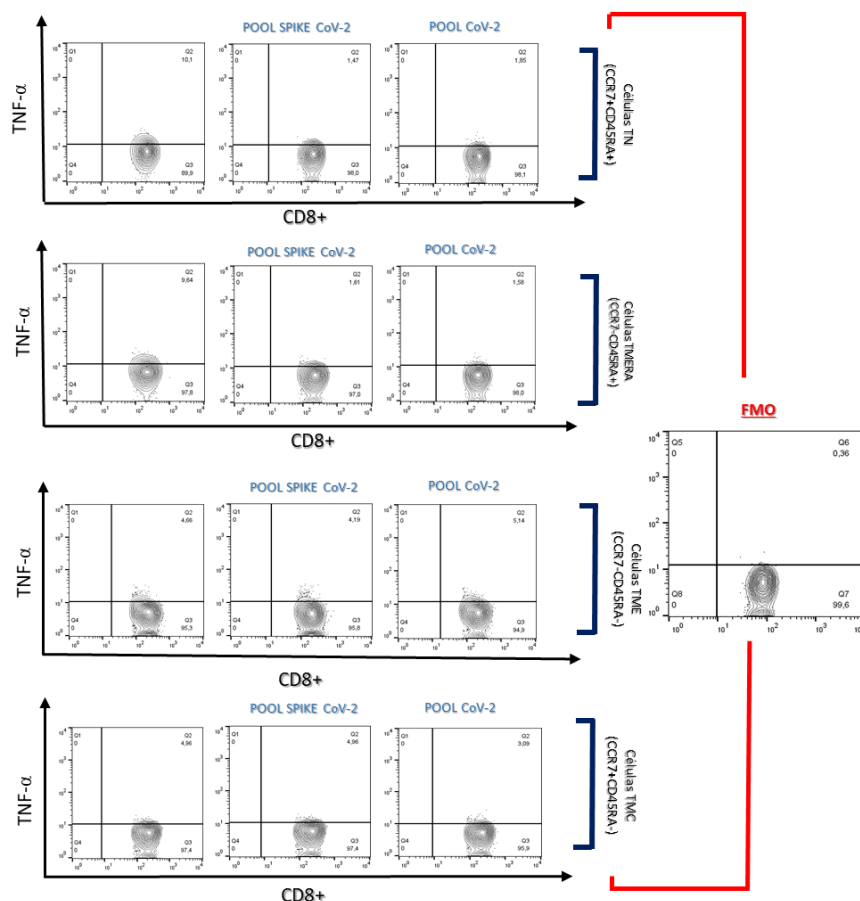
Para investigar como a cultura de células TN, TME, TMC e TMERA CD8+ foram estimuladas a produzirem citocinas quando cultivadas com Pool Spike, Pool CoV-2, foram utilizados os marcadores TNF- α , IFN γ , IL-10 e IL-17. Em relação a expressão do TNF- α , as células CD8+ TME do grupo leve recuperado na ausência de estimulação mostraram produção aumentada de TNF- α em comparação com o grupo CTL (Figura 8C). Uma frequência elevada de TNF- α também foi observada no mesmo grupo não estimulado em comparação com o grupo CTL e voluntários recuperados graves em células CD8+ TMC (Figura 8D). Por fim, mudanças significativas na expressão desta citocina não foram demonstradas por células T CD8+ naive e TMERA CD8+ nas condições avaliadas (Figura 8 A e 8B) (Figura 9).

Figura 8A – D. Perfil de expressão de TNF- α em células TN, TMERA, TME e TMC CD8+ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado



Fonte: Autoria própria, 2023. **(A)** Frequência de TNF- α em células TN CD8+. **(B)** Frequência de TNF- α em células TMERA CD8+. **(C)** Frequência de TNF- α em células TME CD8+. **(D)** Frequência de TNF- α em células TMC CD8+. PBMCs foram coletados de indivíduos nos grupos CTL (n = 6), Leve Recuperado (n = 7) e Grave Recuperado (n = 4). As amostras foram incubadas por 16 horas sob 3 condições (subgrupos): meio (não estimulado), peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2. PBMCs não estimulados foram usados como controle negativo. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. Grupos múltiplos foram comparados usando análise estatística Two-Way ANOVA (seguida pelo pós-teste de Tukey) e ANOVA de uma via (seguida pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn), quando apropriado. As barras de erro mostram a variabilidade dos dados para cada subgrupo. As linhas horizontais contínuas (—) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e Leve Recuperado, as linhas horizontais tracejadas (----) indicam diferenças significativas entre o grupo Leve Recuperado e Grave Recuperado e as linhas horizontais tracejadas com pontos (-.-) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e o Grave Recuperado (*p<0,05; **p<0,01). Os símbolos ●, ▼ e ■ representam cada voluntário inscrito nos grupos saudável, leve e grave, respectivamente, cujas amostras foram inseridas nas condições Meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2. TN, células T naive (CD8+CCR7+CD45RA+); TMERA, células T de memória efetora reexpressando CD45RA (CD8+CCR7-CD45RA+); TME, células T de memória efetora (CD8+CCR7-CD45RA-); TMC, células T de memória central (CD8+CCR7+CD45RA-).

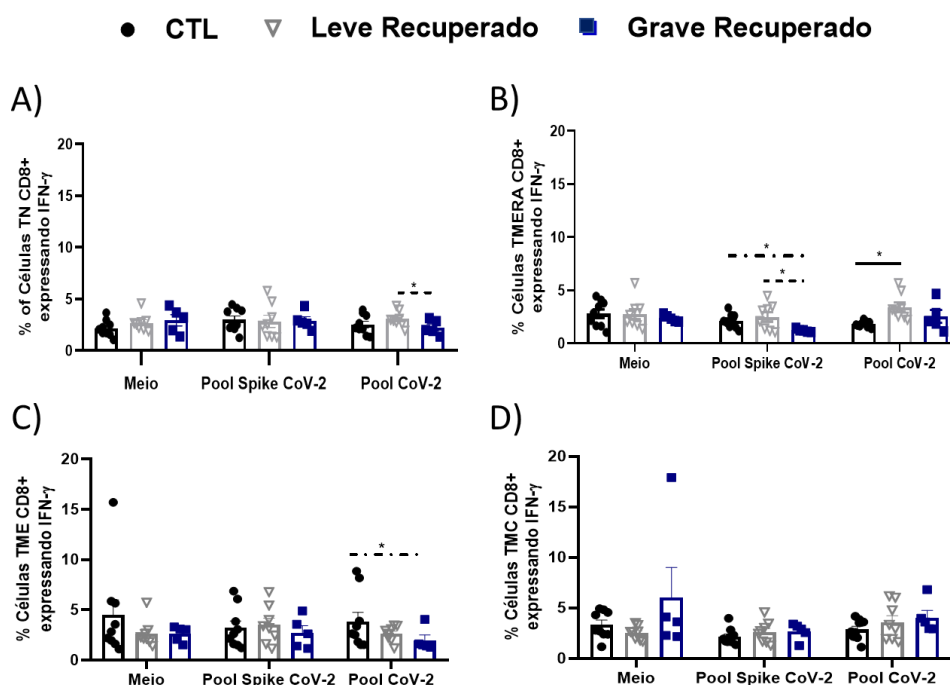
Figura 9. Subpopulações de células T CD8+ expressando TNF- α no sangue periférico de voluntários



Fonte: Autoria Própria, 2023. Gráficos representativos de citometria de fluxo mostrando a expressão de TNF- α entre células T CD8+ naiva e de memória em pacientes recuperados de COVID-19. Os números indicam porcentagens nos portões sorteados. Todas as condições de estímulo avaliadas são mostradas em colunas.

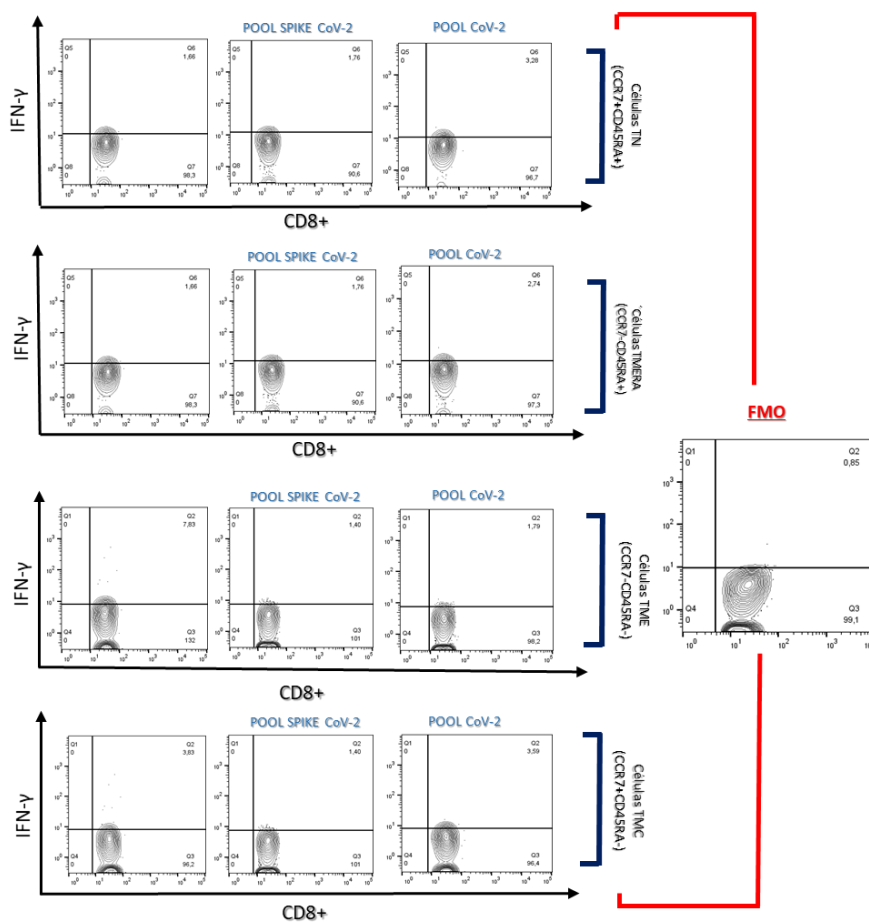
Uma maior frequência de IFN- γ em células T CD8+ naiva estimuladas por Pool CoV-2 foi observada no grupo de leve recuperado em comparação ao grupo grave recuperado (Figura 10A). Amostras do grupo grave recuperado estimuladas por Pool Spike CoV-2 tinham níveis mais baixos de células TMERA CD8+ produtoras de IFN- γ do que o grupo leve recuperado e CTL (Figura 10B). Adicionalmente, em células estimuladas por Pool CoV-2, a expressão de IFN- γ foi maior no grupo leve recuperado do que no grupo CTL (Figura 10B). As células TME CD8+ estimuladas pelo Pool CoV-2 possuem menor produção de IFN- γ no grupo grave recuperado em comparação com o grupo CTL (Figura 10C). As células TMC CD8+, por sua vez, não apresentaram variações de frequência em todas as condições clínicas avaliadas em relação às demais populações consideradas (Figura 10D) (Figura 11).

Figura 10A – D. Perfil de expressão de IFN- γ em células TN, TMERA, TME e TMC CD8+ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado



Fonte: Autoria própria, 2023. **(A)** Frequência de IFN- γ em células TN CD8+. **(B)** Frequência de IFN- γ em células TMERA CD8+. **(C)** Frequência de IFN- γ em células TME CD8+. **(D)** Frequência de IFN- γ em células TMC CD8+. PBMCs foram coletados de indivíduos nos grupos CTL (n = 6), Leve Recuperado (n = 7) e Grave Recuperado (n = 4). As amostras foram incubadas por 16 horas sob 3 condições (subgrupos): meio (não estimulado), peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2. PBMCs não estimulados foram usados como controle negativo. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. Grupos múltiplos foram comparados usando análise estatística Two-Way ANOVA (seguida pelo pós-teste de Tukey) e ANOVA de uma via (seguida pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn), quando apropriado. As barras de erro mostram a variabilidade dos dados para cada subgrupo. As linhas horizontais contínuas (—) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e Leve Recuperado, as linhas horizontais tracejadas (---) indicam diferenças significativas entre o grupo Leve Recuperado e Grave Recuperado e as linhas horizontais tracejadas com pontos (-.-) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e o Grave Recuperado (*p<0,05; **p<0,01). Os símbolos ●, ▽ e ■ representam cada voluntário inscrito nos grupos saudável, leve e grave, respectivamente, cujas amostras foram inseridas nas condições Meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2. TN, células T naive (CD8+CCR7+CD45RA+); TMERA, células T de memória efetora reexpressando CD45RA (CD8+CCR7-CD45RA+); TME, células T de memória efetora (CD8+CCR7-CD45RA-); TMC, células T de memória central (CD8+CCR7+CD45RA-).

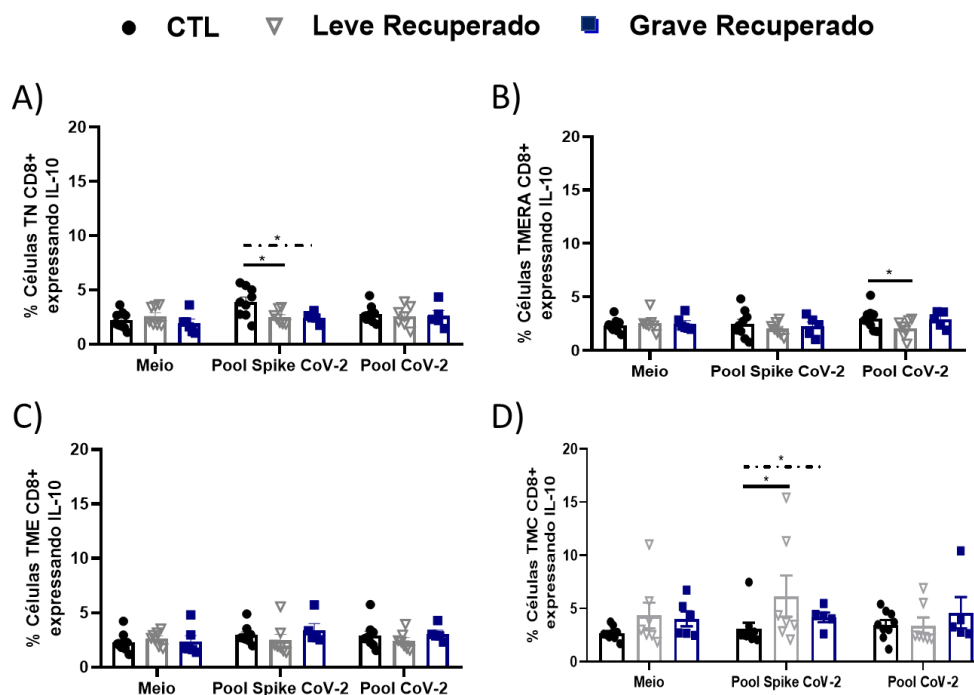
Figura 11. Subpopulações de células T CD8+ expressando IFN- γ no sangue periférico de voluntários



Fonte: Autoria Própria, 2023. Gráficos representativos de citometria de fluxo mostrando a expressão de IFN- γ entre células T CD8+ naiva e de memória em pacientes recuperados de COVID-19. Os números indicam porcentagens nos portões sorteados. Todas as condições de estímulo avaliadas são mostradas em columnas.

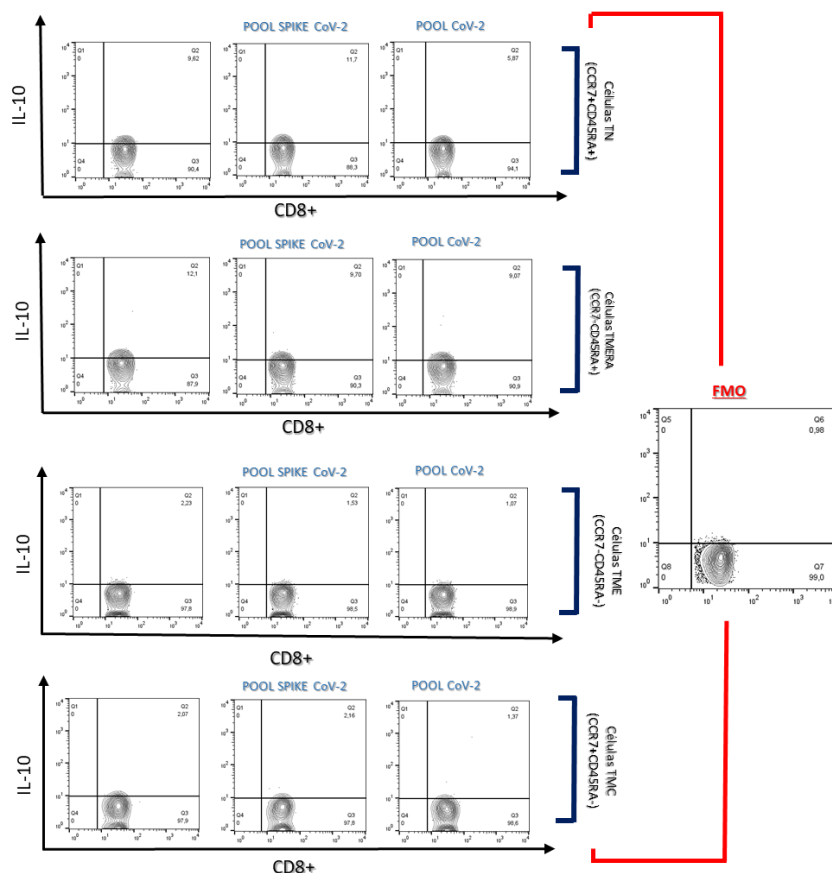
Em relação à produção de IL-10, encontramos frequência reduzida de IL-10 em células T CD8+ naiva dos grupos leve e grave recuperado estimulado com Pool Spike-CoV-2 em comparação com o grupo CTL (Figura 12A). O grupo leve recuperado também apresentou produção reduzida de IL-10 em células CD8+ TMERA, quando estimuladas com Pool CoV-2 (Figura 12B). Uma maior expressão de IL-10 por células TMC CD8+ nos grupos leve e grave recuperado foi observada quando comparada com o grupo CTL na presença do Pool Spike CoV-2 (Figura 12D). Células TME CD8+ não apresentaram variações na frequência desse marcador nas distintas condições avaliadas (Figura 12C) (Figura 13).

Figura 12A – D. Perfil de expressão de IL-10 em células TN, TMERA, TME e TMC CD8+ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado



Fonte: Autoria própria, 2023. **(A)** Frequência de IL-10 em células TN CD8+. **(B)** Frequência de IL-10 em células TMERA CD8+. **(C)** Frequência de IL-10 em células TME CD8+. **(D)** Frequência de IL-10 em células TMC CD8+. PBMCs foram coletados de indivíduos nos grupos CTL (n = 9), Leve Recuperado (n = 7) e Grave Recuperado (n = 6). As amostras foram incubadas por 16 horas sob 3 condições (subgrupos): meio (não estimulado), peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2. PBMCs não estimulados foram usados como controle negativo. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. Grupos múltiplos foram comparados usando análise estatística Two-Way ANOVA (seguida pelo pós-teste de Tukey) e ANOVA de uma via (seguida pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn), quando apropriado. As barras de erro mostram a variabilidade dos dados para cada subgrupo. As linhas horizontais contínuas (—) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e Leve Recuperado, as linhas horizontais tracejadas (---) indicam diferenças significativas entre o grupo Leve Recuperado e Grave Recuperado e as linhas horizontais tracejadas com pontos (-.-) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e o Grave Recuperado (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os símbolos ●, ▼ e ■ representam cada voluntário inscrito nos grupos saudável, leve e grave, respectivamente, cujas amostras foram inseridas nas condições Meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2. TN, células T naive (CD8+CCR7+CD45RA+); TMERA, células T de memória efetora reexpressando CD45RA (CD8+CCR7-CD45RA+); TME, células T de memória efetora (CD8+CCR7-CD45RA-); TMC, células T de memória central (CD8+CCR7+CD45RA-).

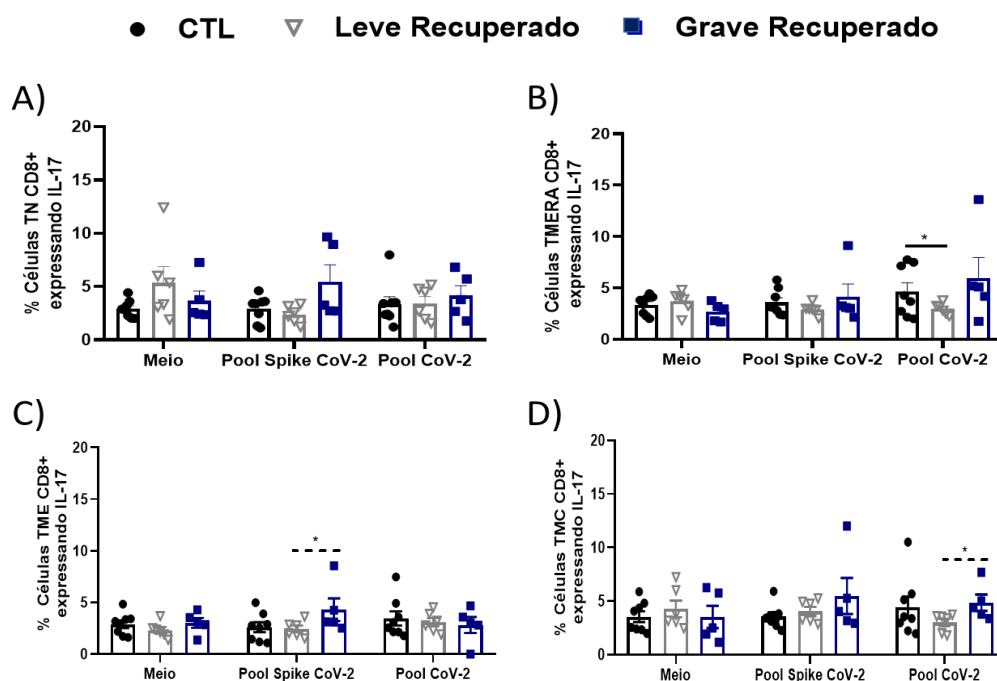
Figura 13. Subpopulações de células T CD8⁺ expressando IL-10 no sangue periférico de voluntários



Fonte: Autoria Própria, 2023. Gráficos representativos de citometria de fluxo mostrando a expressão de IL-10 entre células T CD8⁺ naíve e de memória em pacientes recuperados de COVID-19. Os números indicam porcentagens nos portões sorteados. Todas as condições de estímulo avaliadas são mostradas em colunas.

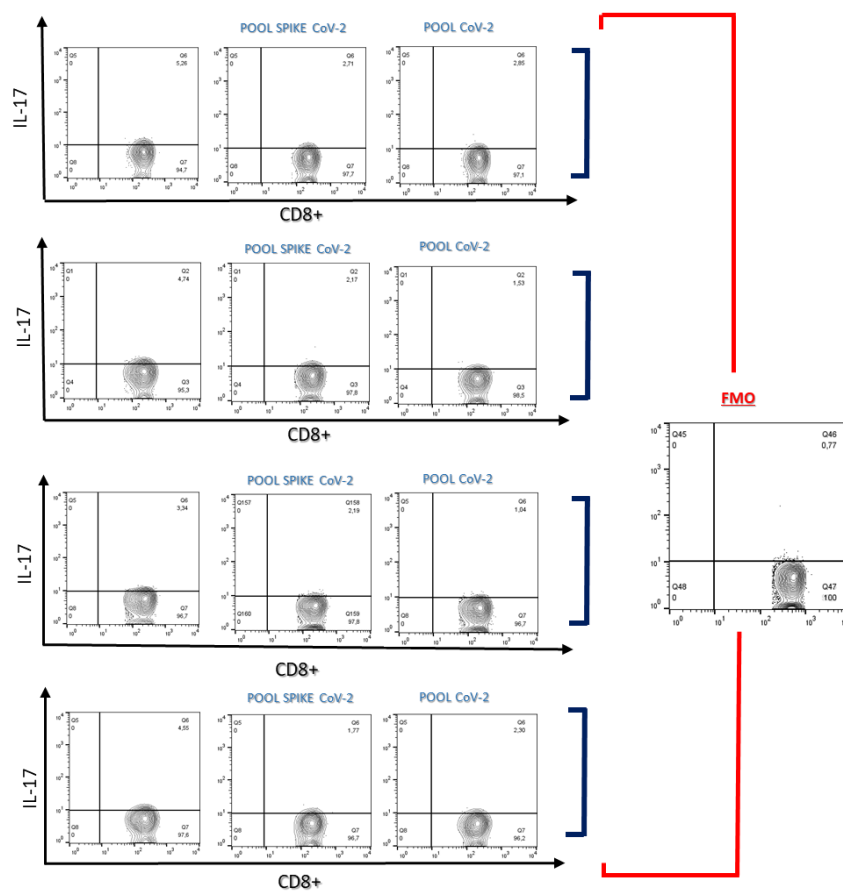
O perfil de produção de IL-17 também foi investigado aqui. As células TMERA do grupo leve recuperado em contato com o Pool CoV-2 mostraram uma redução na produção de IL-17 em comparação com o grupo CTL (Figura 14A). Uma frequência elevada de IL-17 em células TME CD8⁺ de voluntários do grupo grave recuperado estimulado com Pool Spike-CoV-2 foi observada em comparação com voluntários recuperados da forma leve da doença (Figura 14C). O mesmo padrão foi observado em células TMC CD8⁺ na presença de Pool CoV-2 (Figura 14D). Enquanto que as T CD8⁺ naíve não apresentaram alterações significativas na expressão dessa citocina nas condições avaliadas (Figura 14A) (Figura 15).

Figura 14A – D. Perfil de expressão de IL-17 em células TN, TMERA, TME e TMC CD8+ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado



Fonte: Autoria própria, 2023. **(A)** Frequência de IL-17 em células TN CD8+. **(B)** Frequência de IL-17 em células TMERA CD8+. **(C)** Frequência de IL-17 em células TME CD8+. **(D)** Frequência de IL-17 em células TMC CD8+. PBMCs foram coletados de indivíduos nos grupos CTL (n = 8), Leve Recuperado (n = 7) e Grave Recuperado (n = 6). As amostras foram incubadas por 16 horas sob 3 condições (subgrupos): meio (não estimulado), peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2. PBMCs não estimulados foram usados como controle negativo. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. Grupos múltiplos foram comparados usando análise estatística Two-Way ANOVA (seguida pelo pós-teste de Tukey) e ANOVA de uma via (seguida pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn), quando apropriado. As barras de erro mostram a variabilidade dos dados para cada subgrupo. As linhas horizontais contínuas (—) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e Leve Recuperado, as linhas horizontais tracejadas (----) indicam diferenças significativas entre o grupo Leve Recuperado e Grave Recuperado e as linhas horizontais tracejadas com pontos (-.-) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e o Grave Recuperado (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os símbolos ●, ▼ e ■ representam cada voluntário inscrito nos grupos saudável, leve e grave, respectivamente, cujas amostras foram inseridas nas condições Meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2. TN, células T naive (CD8+CCR7+CD45RA+); TMERA, células T de memória efetora reexpressando CD45RA (CD8+CCR7-CD45RA+); TME, células T de memória efetora (CD8+CCR7-CD45RA-); TMC, células T de memória central (CD8+CCR7+CD45RA-).

Figura 15. Subpopulações de células T CD8⁺ expressando IL-17 no sangue periférico de voluntários



Fonte: Autoria Própria, 2023. Gráficos representativos de citometria de fluxo mostrando a expressão de IL-17 entre células T CD8⁺ naive e de memória em pacientes recuperados de COVID-19. Os números indicam porcentagens nos portões sorteados. Todas as condições de estímulo avaliadas são mostradas em colunas.

RESULTADOS - II

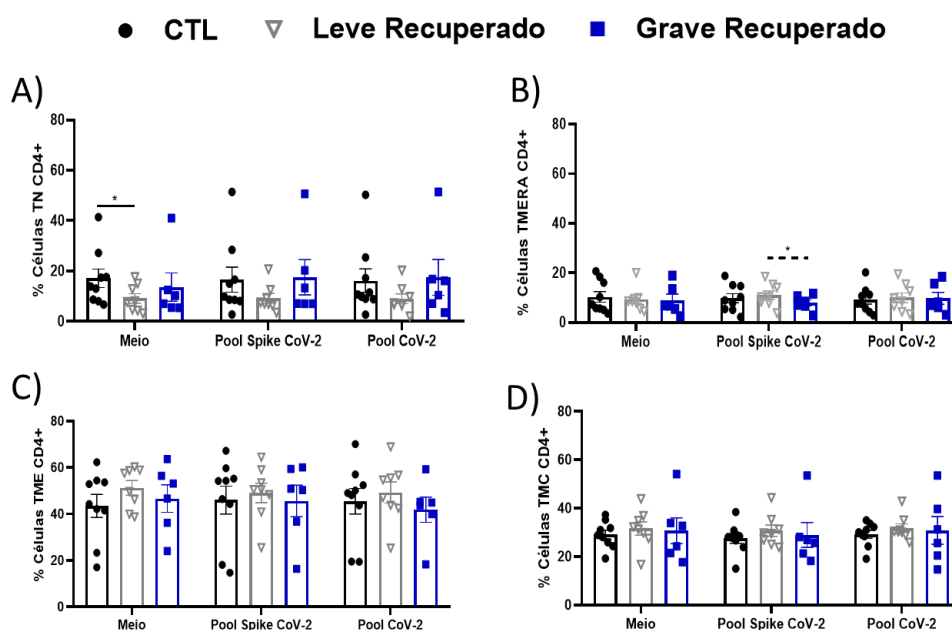
6. RESULTADOS II

Os resultados apresentados neste apresentam os resultados referente as subpopulações de células T CD4+ naive e de memória.

6.1 Avaliação da frequência de subpopulações de células T CD4+ naive e de memória no grupo CTL e nos distintos grupos de pacientes recuperados da COVID-19

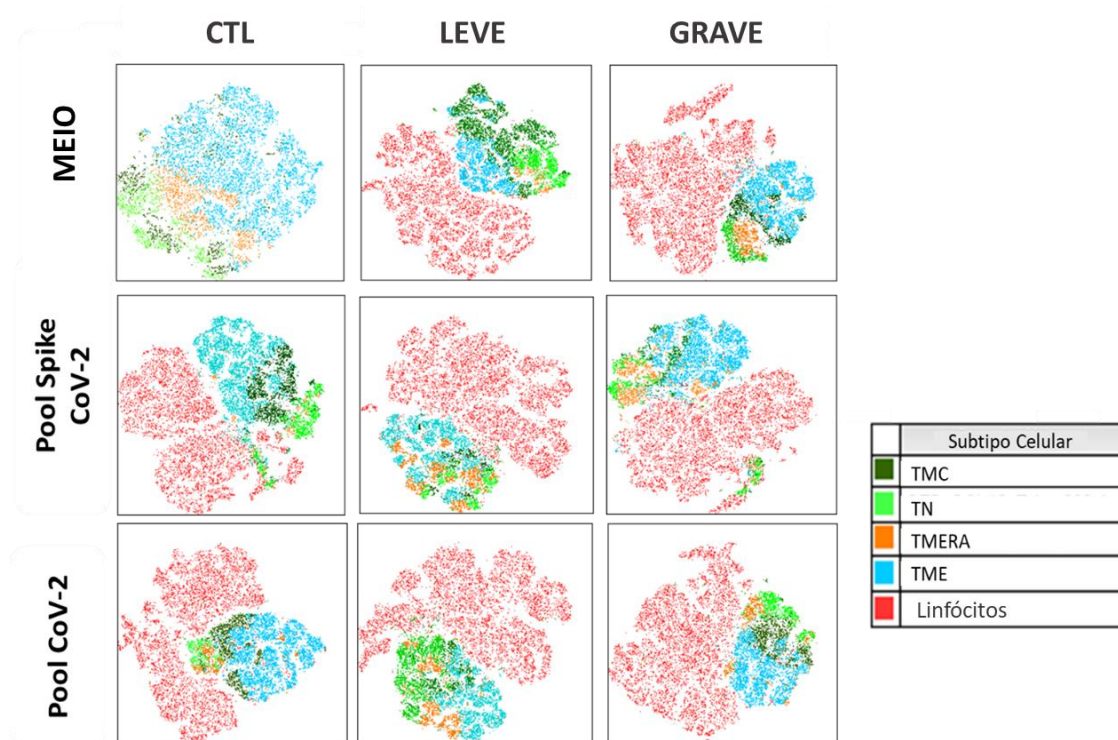
A frequência das subpopulações de células T CD4+, TN, TMERA, TME e TMC na cultura de PBMCs oriundas de voluntários não vacinados recuperados da COVID-19 estimulados por peptídeos antigênicos do SARS-CoV-2 também foi analisada no presente estudo (Figura 16 A-D e 17). Células T CD4+ naive não estimuladas no grupo leve recuperado apresentaram frequência reduzida em relação ao grupo CTL (Figura 16A). Além disso, uma frequência reduzida de células CD4+ TMERA nas amostras estimuladas pelo Pool Spike CoV-2 do grupo grave recuperado foi observada em comparação com o grupo leve recuperado (Figura 16B). Células TMC CD4+ e células TME CD4+, por sua vez, não apresentaram variações de frequência em todas as condições clínicas avaliadas em comparação com as demais subpopulações consideradas (Figura 16C e 16D). A distribuição por similaridade das subpopulações de células TN, TMERA, TME e TMC CD4+ no sangue periférico de voluntários encontra-se representada na figura 17.

Figura 16 A-D. Frequência de células TN, TMERA, TME e TMC CD4+ no sangue periférico de voluntários



Fonte: Autoria própria, 2022. **(A)** Frequência de células TN CD4+. **(B)** Frequência de células TMERA CD4+. **(C)** Frequência de células TME CD4+. **(D)** Frequência de células TMC CD4+. PBMCs foram coletadas de indivíduos inseridos nos grupos controle (n = 9), Leve Recuperado (n=8) e Grave Recuperado (n = 6). As amostras foram incubadas por 16 horas em 4 condições (subgrupos): meio (não estimuladas), peptídeos Pool Spike CoV-2 ou peptídeos Pool CoV-2. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. Múltiplos grupos foram comparados através das 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. Barras de erro mostram a variabilidade dos dados de cada subgrupo. As barras de erro mostram a variabilidade dos dados para cada subgrupo. As linhas horizontais contínuas (—) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e Leve Recuperado, as linhas horizontais tracejadas (----) indicam diferenças significativas entre o grupo Leve Recuperado e Grave Recuperado e as linhas horizontais tracejadas com pontos (-.-) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e o Grave Recuperado (*p<0,05; **p<0,01). Os símbolos ●, ▼ e ■ representam cada voluntário inscrito nos grupos saudável, leve e grave, respectivamente, cujas amostras foram inseridas nas condições Meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2. TN, células T naíve; TMERA, células T de memória efetora reexpressando CD45RA; TME, células T de memória efetora; TMC, células T de memória central.

Figura 17. Distribuição das subpopulações de células TN, TMERA, TME e TMC CD4+ no sangue periférico de voluntários representada pelo algoritmo T-distribuído *Stochastic Neighbor Embedding* (tSNE)



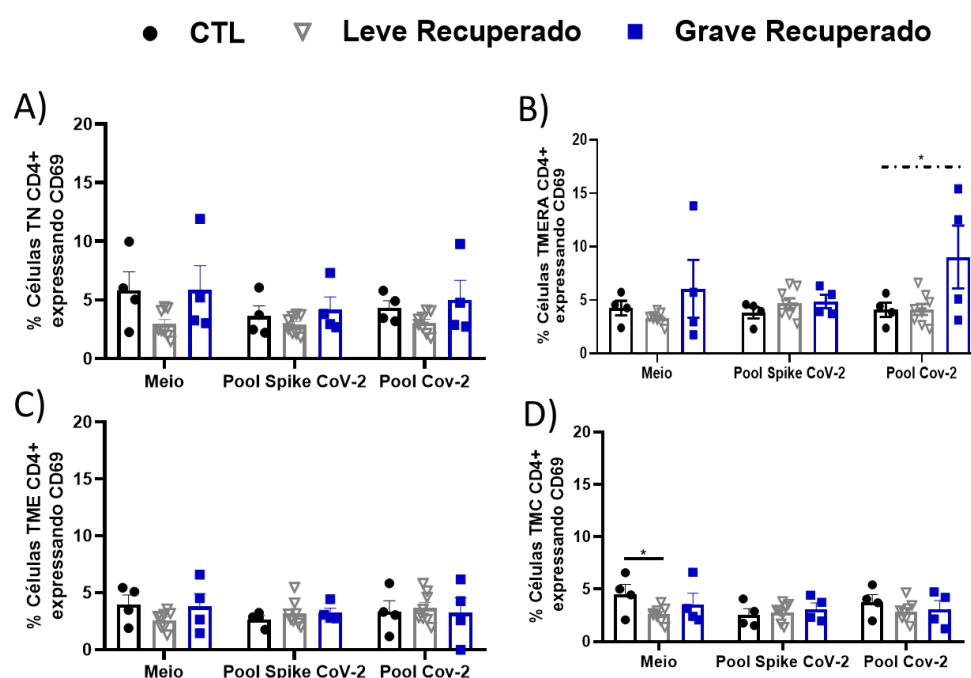
Fonte: Autoria própria, 2022. Visualização Global do tSNE de células T CD4+ naíve e de memória. Gráficos bidimensionais de tSNE (x, y) baseados no agrupamento de linfócitos por frequência e similaridade fenotípica a partir da expressão de CCR7 e CD45RA entre as subpopulações TN (azul), TMERA (verde escuro), TME (verde claro) e TMC (laranja) foram elaborados. A concatenação de dados inter-sujeitos foi realizada. Sendo, portanto, o arquivo FCS resultante analisado no módulo FlowJo tSNE para reconstituir tal gráfico bidimensional único que reuniram as semelhanças fenotípicas dessas células imunes entre os indivíduos dos grupos CTL (n = 9), Leve Recuperado (n=8) e Grave Recuperado (n = 6).

6.2 Expressão dos marcadores de ativação CD69, CD137 e Ki67 em subpopulações de

células T CD4⁺ de memória e naíve em pacientes recuperados da COVID-19

Este estudo avaliou a expressão do marcador de ativação CD69 por subpopulações de células T CD4⁺ em todos os grupos (Figuras 18A-D e 19). Amostras estimuladas pelo Pool CoV-2 no grupo grave recuperado apresentaram maior frequência de células TMERA CD4⁺ quando comparadas ao grupo CTL (Figura 18B). As células TMC CD4⁺ do grupo leve recuperado, por sua vez, demonstraram uma redução da frequência de CD69 em relação ao grupo CTL (Figura 18D). Por fim, diferenças significativas não foram observadas na expressão do presente marcador por células T CD4⁺ naíve e TME CD4⁺ em todas as condições avaliadas (Figuras 18 A e 18C).

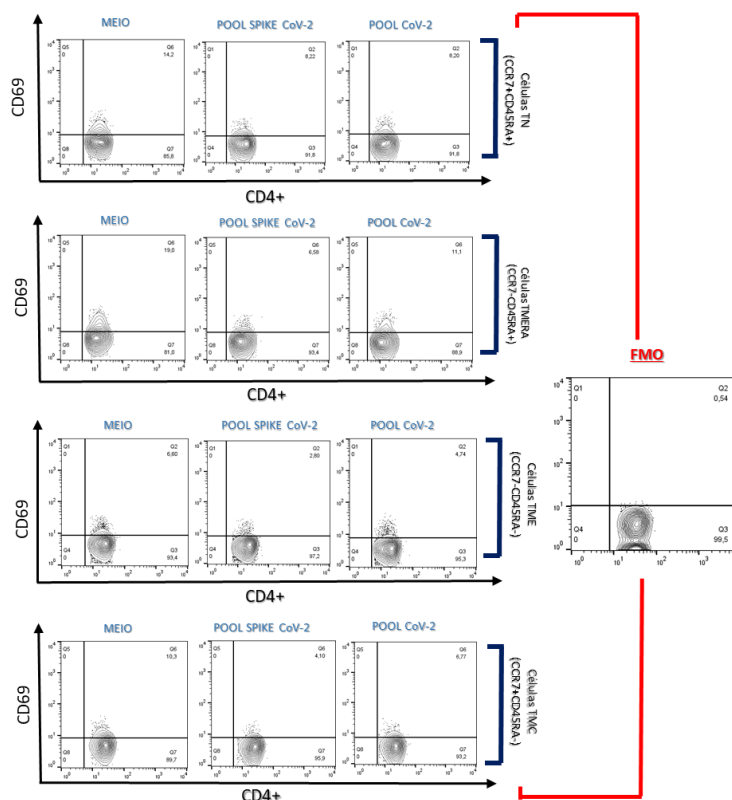
Figura 18A – D. Perfil de expressão de CD69 em células TN, TMERA, TME e TMC CD4⁺ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado



Fonte: Autoria própria, 2023. **(A)** Frequência de CD69 em células TN CD4⁺. **(B)** Frequência de CD69 em células TMERA CD4⁺. **(C)** Frequência de CD69 em células TME CD4⁺. **(D)** Frequência de CD69 em células TMC CD4⁺. PBMCs foram coletados de indivíduos nos grupos CTL (n = 4), Leve Recuperado (n = 8) e Grave Recuperado (n = 4). As amostras foram incubadas por 16 horas sob 3 condições (subgrupos): meio (não estimulado), peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2. PBMCs não estimulados foram usados como controle negativo. Os dados são apresentados como média ± SEM. Grupos múltiplos foram comparados usando análise estatística Two-Way ANOVA (seguida pelo pós-teste de Tukey) e ANOVA de uma via (seguida pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn), quando apropriado. As barras de erro mostram a variabilidade dos dados para cada subgrupo. As linhas horizontais contínuas (—) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e Leve Recuperado, as linhas horizontais tracejadas (----) indicam diferenças significativas entre o grupo Leve Recuperado e Grave Recuperado e as linhas horizontais tracejadas

com pontos (-.-) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e o Grave Recuperado (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os símbolos ●, ▼ e ■ representam cada voluntário inscrito nos grupos saudável, leve e grave, respectivamente, cujas amostras foram inseridas nas condições Meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2. TN, células T naive (CD4+CCR7+CD45RA+); TMERA, células T de memória efetora reexpressando CD45RA (CD4+CCR7-CD45RA+); TME, células T de memória efetora (CD4+CCR7-CD45RA-); TMC, células T de memória central (CD4+CCR7+CD45RA-).

Figura 19. Subpopulações de células T CD4⁺ expressando CD69 no sangue periférico de voluntários

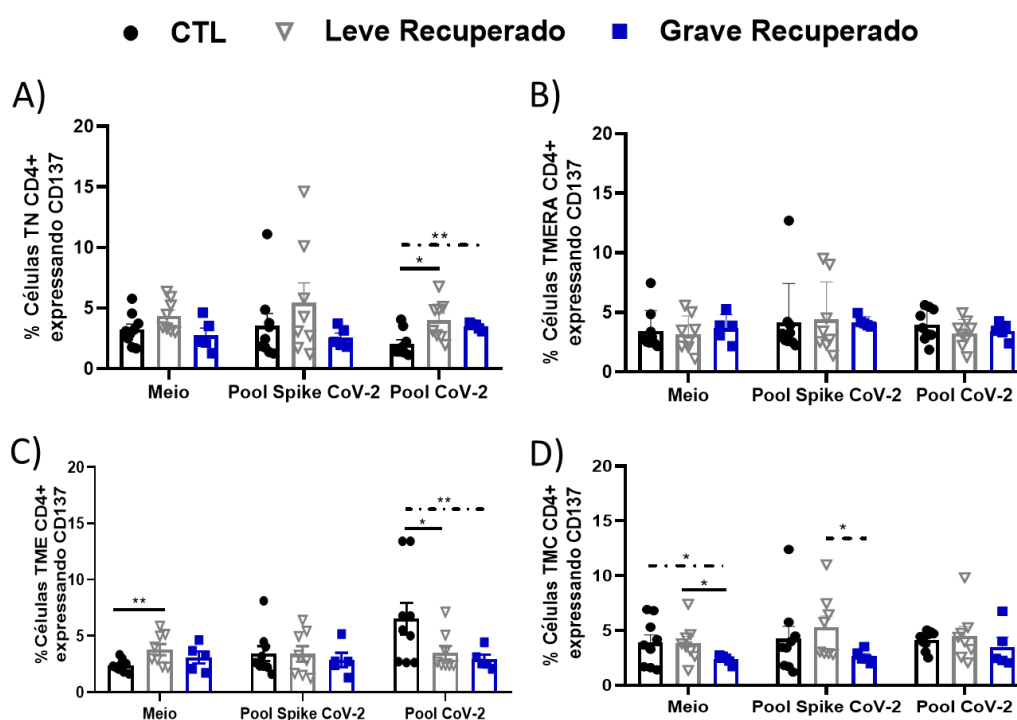


Fonte: Autoria Própria, 2023. Gráficos representativos de citometria de fluxo mostrando a expressão de CD69 entre células T CD4⁺ naive e de memória em pacientes recuperados de COVID-19. Os números indicam porcentagens nos portões sorteados. Todas as condições de estímulo avaliadas são mostradas em colunas.

Outro marcador de ativação investigado aqui foi o CD137⁺ (Figura 20 A-D e Figura 21). Células T CD4⁺ naive dos grupos leve e grave recuperado apresentaram uma expressão elevada de CD137 na presença de Pool CoV-2 em comparação com o grupo CTL (Figura 20A). Uma frequência maior de CD137 também foi observada no grupo leve recuperado em comparação com o grupo saudável por células CD4⁺ TME em amostras não estimuladas (Figura 20C). No entanto, na presença do Pool CoV-2, os grupos leve e grave recuperado apresentaram uma expressão de CD137 reduzida em comparação com o grupo CTL (Figura

20C). As células TMC CD4⁺ do grupo grave recuperado, por sua vez, apresentaram uma frequência reduzida de CD137⁺ na ausência de estimulação quando comparadas aos outros grupos avaliados (Figura 20D). Enquanto que, uma maior expressão de CD137 é observada no grupo leve recuperado em comparação com o grupo grave em amostras estimuladas por Pool Spike CoV-2 (Figura 20D). Variações na expressão desse marcador não foram observadas apenas em células TMERA CD4⁺ em todas as condições clínicas avaliadas (Figura 20B).

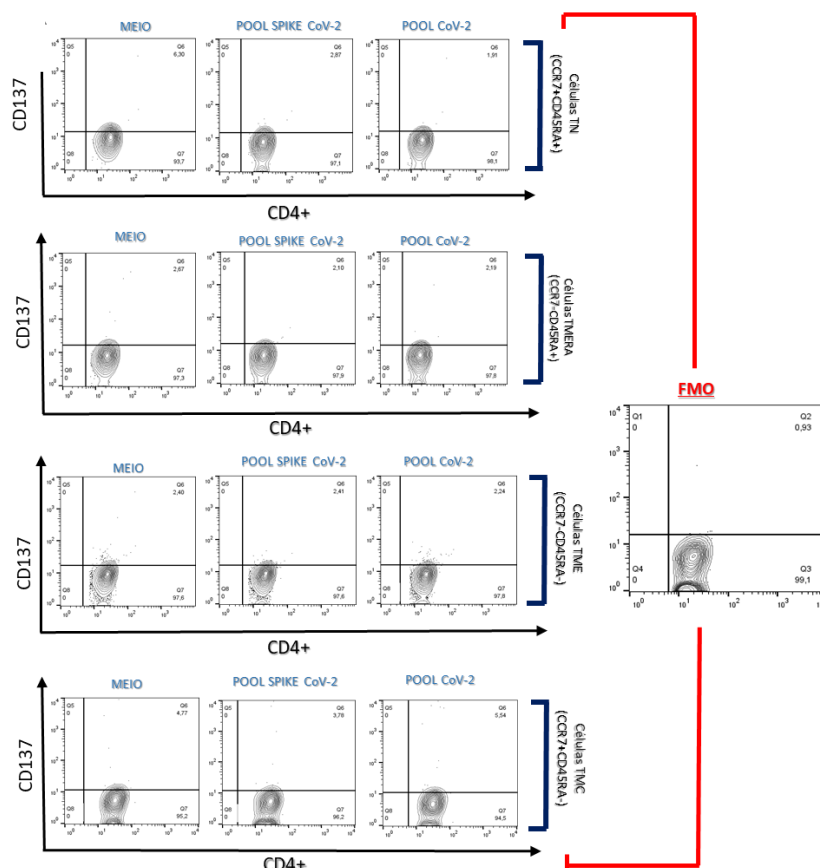
Figura 20A – D. Perfil de expressão de CD137 em células TN, TMERA, TME e TMC CD4⁺ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado



Fonte: Autoria própria, 2023. **(A)** Frequência de CD137 em células TN CD4⁺. **(B)** Frequência de CD137 em células TMERA CD4⁺. **(C)** Frequência de CD137 em células TME CD4⁺. **(D)** Frequência de CD137 em células TMC CD4⁺. PBMCs foram coletados de indivíduos nos grupos CTL (n = 9), Leve Recuperado (n = 8) e Grave Recuperado (n = 5). As amostras foram incubadas por 16 horas sob 3 condições (subgrupos): meio (não estimulado), peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2. PBMCs não estimulados foram usados como controle negativo. Os dados são apresentados como média ± SEM. Grupos múltiplos foram comparados usando análise estatística Two-Way ANOVA (seguida pelo pós-teste de Tukey) e ANOVA de uma via (seguida pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn), quando apropriado. As barras de erro mostram a variabilidade dos dados para cada subgrupo. As linhas horizontais contínuas (—) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e Leve Recuperado, as linhas horizontais tracejadas (---) indicam diferenças significativas entre o grupo Leve Recuperado e Grave Recuperado e as linhas horizontais tracejadas com pontos (-.-) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e o Grave Recuperado (*p<0,05; **p<0,01). Os símbolos ●, ▽ e ■ representam cada voluntário inscrito nos grupos saudável, leve e grave, respectivamente, cujas amostras foram inseridas nas condições Meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2.

TN, células T naive (CD4+CCR7+CD45RA+); TMERA, células T de memória efetora reexpressando CD45RA (CD4+CCR7-CD45RA+); TME, células T de memória efetora (CD4+CCR7-CD45RA-); TMC, células T de memória central (CD4+CCR7+CD45RA-).

Figura 21. Subpopulações de células T CD4+ expressando CD137 no sangue periférico de voluntários



Fonte: Autoria Própria, 2023. Gráficos representativos de citometria de fluxo mostrando a expressão de CD137 entre células T CD4+ naive e de memória em pacientes recuperados de COVID-19. Os números indicam porcentagens nos portões sorteados. Todas as condições de estímulo avaliadas são mostradas em colunas.

Em linhas gerais, diferenças significativas não foram encontradas na frequência de expressão do Ki67 nas células TN, TMERA, TME e TMC CD4+ nas distintas condições clínicas (Tabela 7).

Tabela 7. Frequência de Ki67 em células TN, TME, TMC e TMERA CD4+, incubadas sem estímulo (Meio) e estimuladas (Peptídeos Pool-CoV2 e Spike Pool)

% Ki67			
TN	CTL	Leve Recuperado	Grave Recuperado
MEIO	19,97±20,35	11,46 ± 5,56	15,6 ± 18,06
POOL SPIKE CoV-2	9,86±7,53	12,32 ± 7,61	4,77 ± 3,48
POOL CoV-2	21,06 ± 21,57	14,79 ± 10,36	13,39 ± 13,48
TMERA	CTL	Leve Recuperado	Grave Recuperado
MEIO	13,65 ± 16,14	11,49 ± 7,36	15,79 ± 14,29
POOL SPIKE CoV-2	8,90 ± 7,22	8,78 ± 5,77	6,70 ± 8,40
POOL CoV-2	16,72 ± 18,06	13,26 ± 7,78	15,88 ± 15,01
TME	CTL	Leve Recuperado	Grave Recuperado
MEIO	22,80 ± 22,77	14,68 ± 13,65	17,27 ± 20,83
POOL SPIKE CoV-2	10,40 ± 12,60	13,10 ± 14,74	5,45 ± 5,95
POOL CoV-2	21,86 ± 22,57	16,27 ± 13,96	12,82 ± 15,16
TMC	CTL	Leve Recuperado	Grave Recuperado
MEIO	28,82 ± 22,97	17,23 ± 15,12	15,94 ± 19,47
POOL SPIKE CoV-2	12,63 ± 12,84	16,32 ± 14,94	4,18 ± 3,15
POOL CoV-2	28,76 ± 26,87	19,54 ± 17,19	12,91 ± 15,67

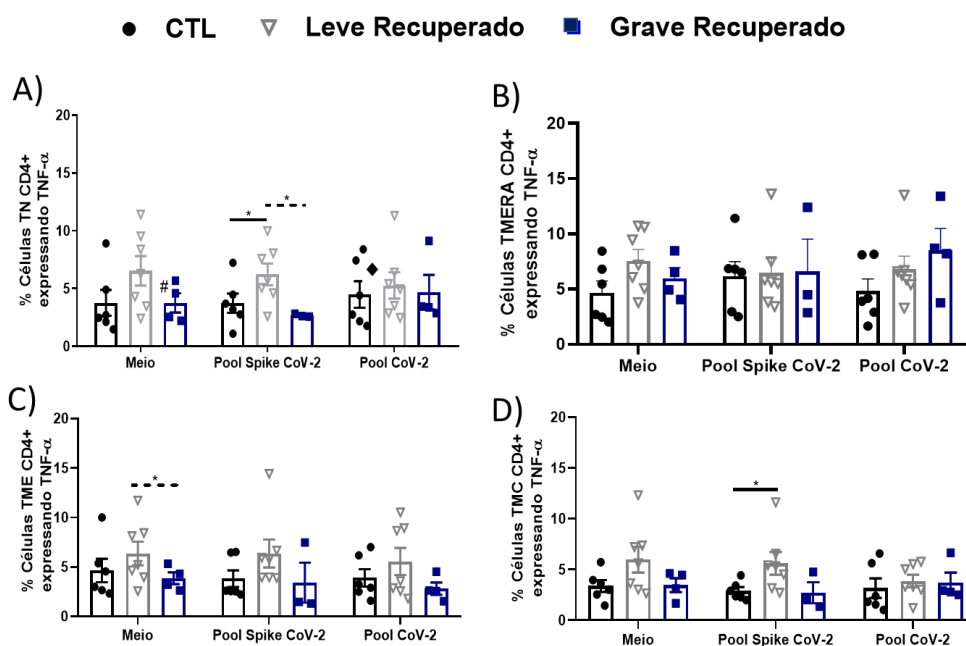
Fonte: Autoria própria, 2023. PBMCs foram coletadas de indivíduos inseridos nos grupos controle (n = 4), Leve Recuperado (n = 8) e Grave Recuperado (n = 4). As amostras foram incubadas por 16 horas em 3 condições (subgrupos): meio (não estimuladas), peptídeos Pool Spike CoV-2 ou peptídeos Pool CoV-2. Os dados são apresentados como média ± SEM.

6.3 Perfil de expressão das citocinas TNF- α , IFN γ , IL-10 e IL-17 e em subpopulações de células T CD4+ naive e de memória em pacientes recuperados da COVID-19

A expressão de TNF- α por subpopulações de células T CD4+ também foi um dos parâmetros avaliados aqui (Figura 22 A-D e Figura 23). Amostras oriundas do grupo leve recuperado, na presença de Pool Spike CoV-2, apresentaram níveis mais altos de células T CD4+ naive produtoras de TNF- α do que o grupo CTL e grave recuperado (Figura 22A). Células TME CD4+ do grupo leve recuperado sem estimulação apresentaram produção aumentada de TNF- α em comparação com o grupo CTL e grave recuperado (Figura 22C). As células TMC CD4+ do grupo leve recuperado na presença de Pool Spike CoV-2, por sua vez, apresentam maior expressão de TNF- α em comparação ao grupo CTL (Figura 22D).

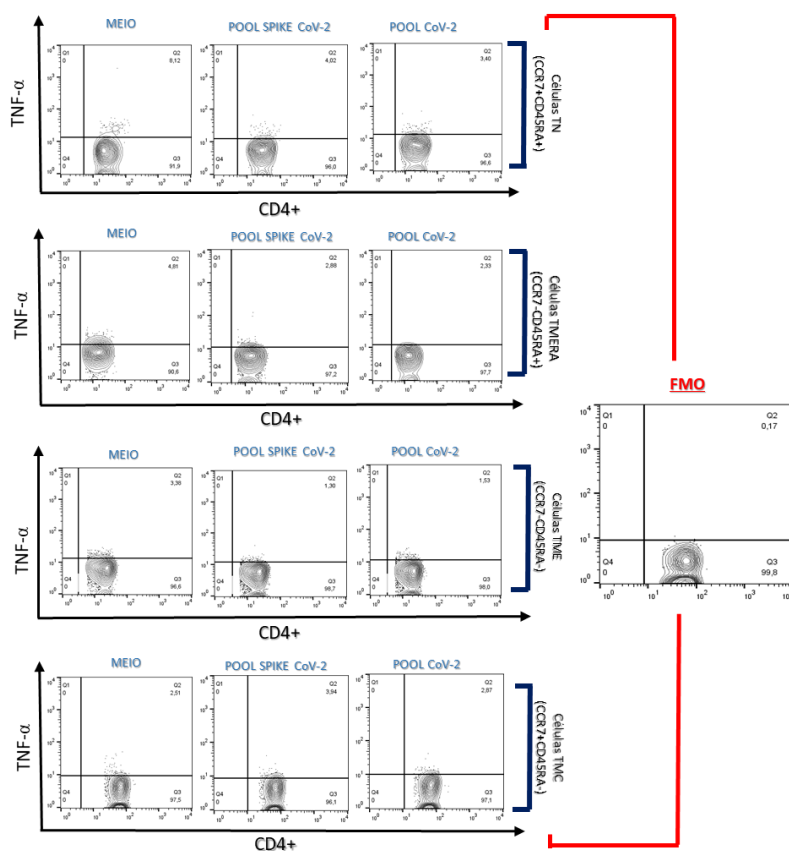
Por fim, não foram demonstradas alterações significativas na expressão dessa citocina por células TMERA CD4⁺ nas condições avaliadas (Figura 22B).

Figura 22A – D. Perfil de expressão de TNF- α em células TN, TMERA, TME e TMC CD4⁺ + nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado



Fonte: Autoria própria, 2023. **(A)** Frequência de TNF- α em células TN CD4⁺. **(B)** Frequência de TNF- α em células TMERA CD4⁺. **(C)** Frequência de TNF- α em células TME CD4⁺. **(D)** Frequência de TNF- α em células TMC CD4⁺. PBMCs foram coletados de indivíduos nos grupos CTL (n = 6), Leve Recuperado (n = 7) e Grave Recuperado (n = 4). As amostras foram incubadas por 16 horas sob 3 condições (subgrupos): meio (não estimulado), peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2. PBMCs não estimulados foram usados como controle negativo. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. Grupos múltiplos foram comparados usando análise estatística Two-Way ANOVA (seguida pelo pós-teste de Tukey) e ANOVA de uma via (seguida pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn), quando apropriado. As barras de erro mostram a variabilidade dos dados para cada subgrupo. As linhas horizontais contínuas (—) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e Leve Recuperado, as linhas horizontais tracejadas (---) indicam diferenças significativas entre o grupo Leve Recuperado e Grave Recuperado e as linhas horizontais tracejadas com pontos (-.-) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e o Grave Recuperado (*p<0,05; **p<0,01). Os símbolos ●, ▽ e ■ representam cada voluntário inscrito nos grupos saudável, leve e grave, respectivamente, cujas amostras foram inseridas nas condições Meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2. TN, células T naive (CD4+CCR7+CD45RA+); TMERA, células T de memória efetora reexpressando CD45RA (CD4+CCR7-CD45RA+); TME, células T de memória efetora (CD4+CCR7-CD45RA-); TMC, células T de memória central (CD4+CCR7+CD45RA-).

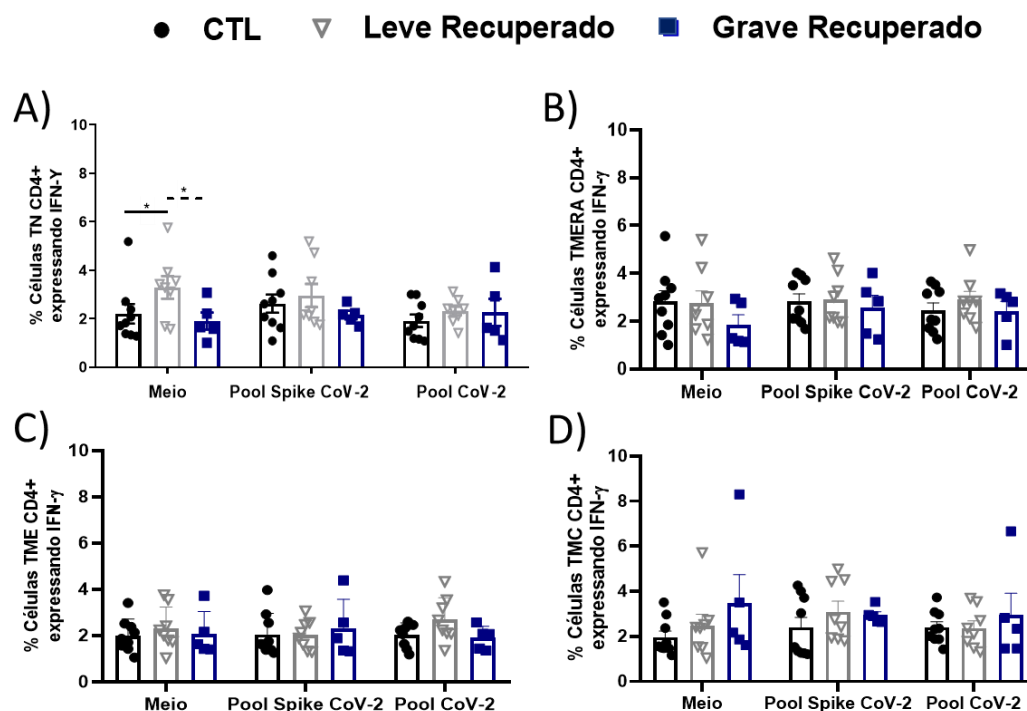
Figura 23. Subpopulações de células T CD4⁺ expressando TNF- α no sangue periférico de voluntários



Fonte: Autoria Própria, 2023. Gráficos representativos de citometria de fluxo mostrando a expressão de TNF- α entre células T CD4⁺ naíve e de memória em pacientes recuperados de COVID-19. Os números indicam porcentagens nos portões sorteados. Todas as condições de estímulo avaliadas são mostradas em colunas.

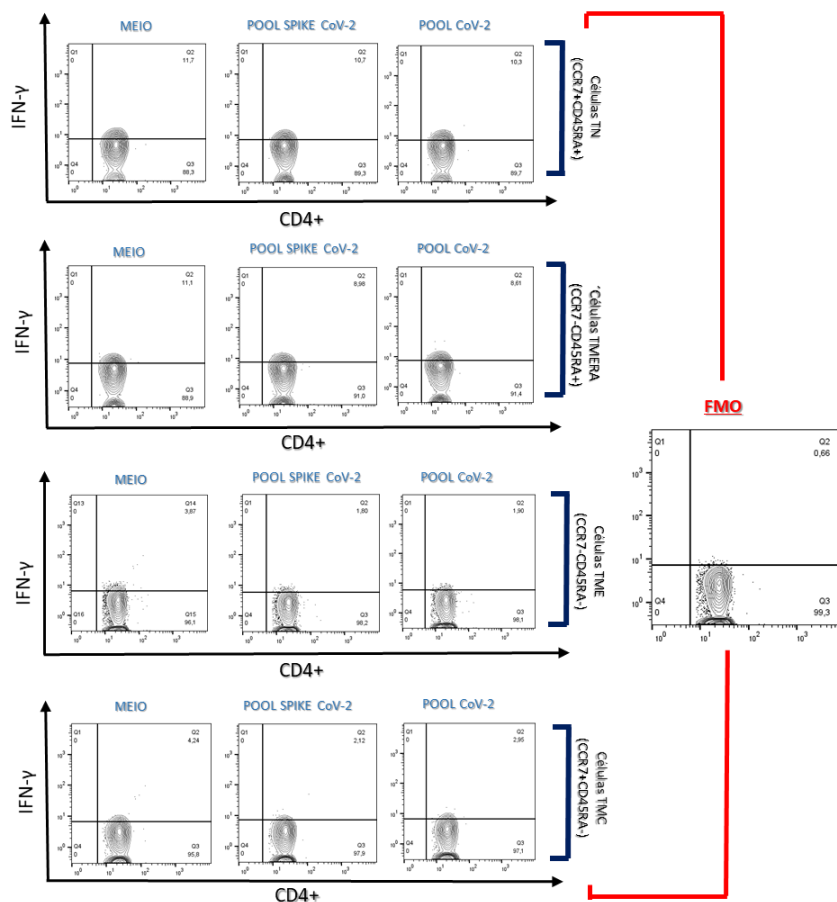
Células T CD4⁺ naíve produtoras de IFN- γ foram observadas em amostras não estimuladas do grupo leve recuperado em comparação aos demais grupos avaliados (Figura 24A). Entretanto, nas células TMERA, TME e TMC CD4⁺ não foram demonstradas alterações significativas na expressão dessa citocina em todas as condições avaliadas (Figura 24B-D) (Figura 25).

Figura 24A – D. Perfil de expressão de IFN- γ em células TN, TMERA, TME e TMC CD4+ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado



Fonte: Autoria própria, 2023. **(A)** Frequência de IFN- γ em células TN CD4+. **(B)** Frequência de IFN- γ em células TMERA CD4+. **(C)** Frequência de IFN- γ em células TME CD4+. **(D)** Frequência de IFN- γ em células TMC CD4+. PBMCs foram coletados de indivíduos nos grupos CTL (n = 6), Leve Recuperado (n = 7) e Grave Recuperado (n = 4). As amostras foram incubadas por 16 horas sob 3 condições (subgrupos): meio (não estimulado), peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2. PBMCs não estimulados foram usados como controle negativo. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. Grupos múltiplos foram comparados usando análise estatística Two-Way ANOVA (seguida pelo pós-teste de Tukey) e ANOVA de uma via (seguida pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn), quando apropriado. As barras de erro mostram a variabilidade dos dados para cada subgrupo. As linhas horizontais contínuas (—) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e Leve Recuperado, as linhas horizontais tracejadas (---) indicam diferenças significativas entre o grupo Leve Recuperado e Grave Recuperado e as linhas horizontais tracejadas com pontos (-.-) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e o Grave Recuperado (*p<0,05; **p<0,01). Os símbolos ●, ▽ e ■ representam cada voluntário inscrito nos grupos saudável, leve e grave, respectivamente, cujas amostras foram inseridas nas condições Meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2. TN, células T naïve (CD4+CCR7+CD45RA+); TMERA, células T de memória efetora reexpressando CD45RA (CD4+CCR7-CD45RA+); TME, células T de memória efetora (CD4+CCR7-CD45RA-); TMC, células T de memória central (CD4+CCR7+CD45RA-).

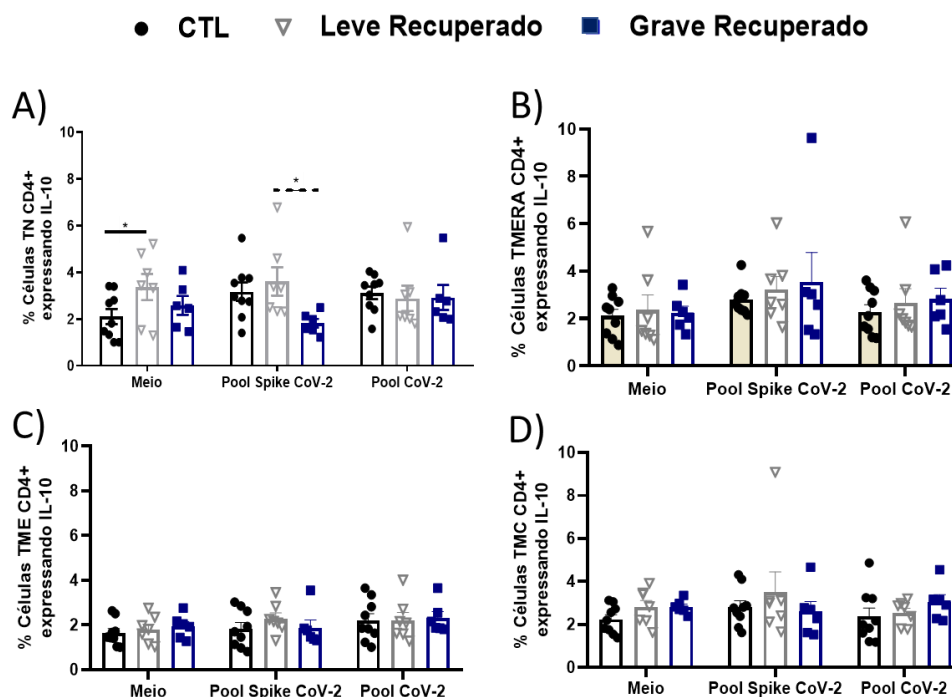
Figura 25. Subpopulações de células T CD4⁺ expressando IFN- γ no sangue periférico de voluntários



Fonte: Autoria Própria, 2023. Gráficos representativos de citometria de fluxo mostrando a expressão de IFN- γ entre células T CD4⁺ naíve e de memória em pacientes recuperados de COVID-19. Os números indicam porcentagens nos portões sorteados. Todas as condições de estímulo avaliadas são mostradas em columnas.

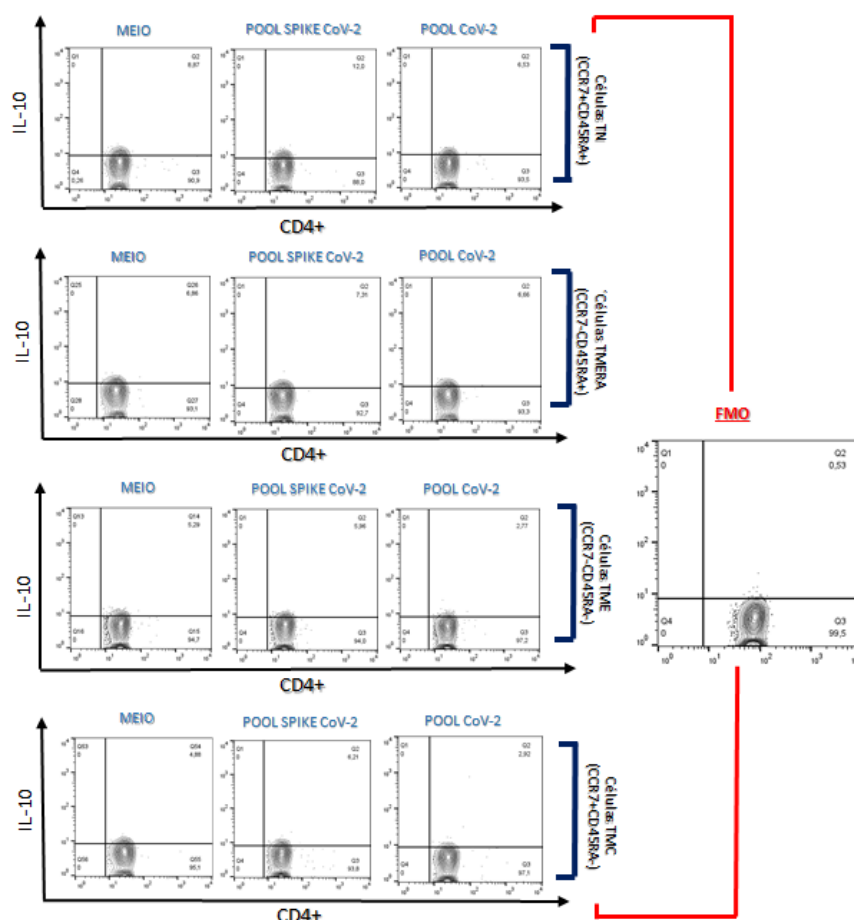
Em relação a produção da citocina regulatória IL-10, amostras do grupo leve recuperado não estimuladas apresentaram níveis mais altos desta citocina em células T CD4⁺ naíve do que o grupo CTL (Figura 26A). Adicionalmente, níveis mais elevados de IL-10 por células T CD4⁺ naíve também foram observados neste mesmo grupo com estímulo Pool Spike CoV-2 em relação ao grupo grave recuperado (Figura 26A). Por fim, não foram demonstradas alterações significativas na expressão dessa citocina pelas células TMERA, TME, TMC CD4⁺ nas condições avaliadas (Figura 26B, 26C e 26D) (Figura 27).

Figura 26A – D. Perfil de expressão de IL-10 em células TN, TMERA, TME e TMC CD4+ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado



Fonte: Autoria própria, 2023. **(A)** Frequência de IL-10 em células TN CD4+. **(B)** Frequência de IL-10 em células TMERA CD4+. **(C)** Frequência de IL-10 em células TME CD4+. **(D)** Frequência de IL-10 em células TMC CD4+. PBMCs foram coletados de indivíduos nos grupos CTL (n = 9), Leve Recuperado (n = 7) e Grave Recuperado (n = 6). As amostras foram incubadas por 16 horas sob 3 condições (subgrupos): meio (não estimulado), peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2. PBMCs não estimulados foram usados como controle negativo. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. Grupos múltiplos foram comparados usando análise estatística Two-Way ANOVA (seguida pelo pós-teste de Tukey) e ANOVA de uma via (seguida pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn), quando apropriado. As barras de erro mostram a variabilidade dos dados para cada subgrupo. As linhas horizontais contínuas (—) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e Leve Recuperado, as linhas horizontais tracejadas (---) indicam diferenças significativas entre o grupo Leve Recuperado e Grave Recuperado e as linhas horizontais tracejadas com pontos (-.-) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e o Grave Recuperado (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os símbolos ●, ▽ e ■ representam cada voluntário inscrito nos grupos saudável, leve e grave, respectivamente, cujas amostras foram inseridas nas condições Meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2. TN, células T naive (CD4+CCR7+CD45RA+); TMERA, células T de memória efetora reexpressando CD45RA (CD4+CCR7-CD45RA+); TME, células T de memória efetora (CD4+CCR7-CD45RA-); TMC, células T de memória central (CD4+CCR7+CD45RA-).

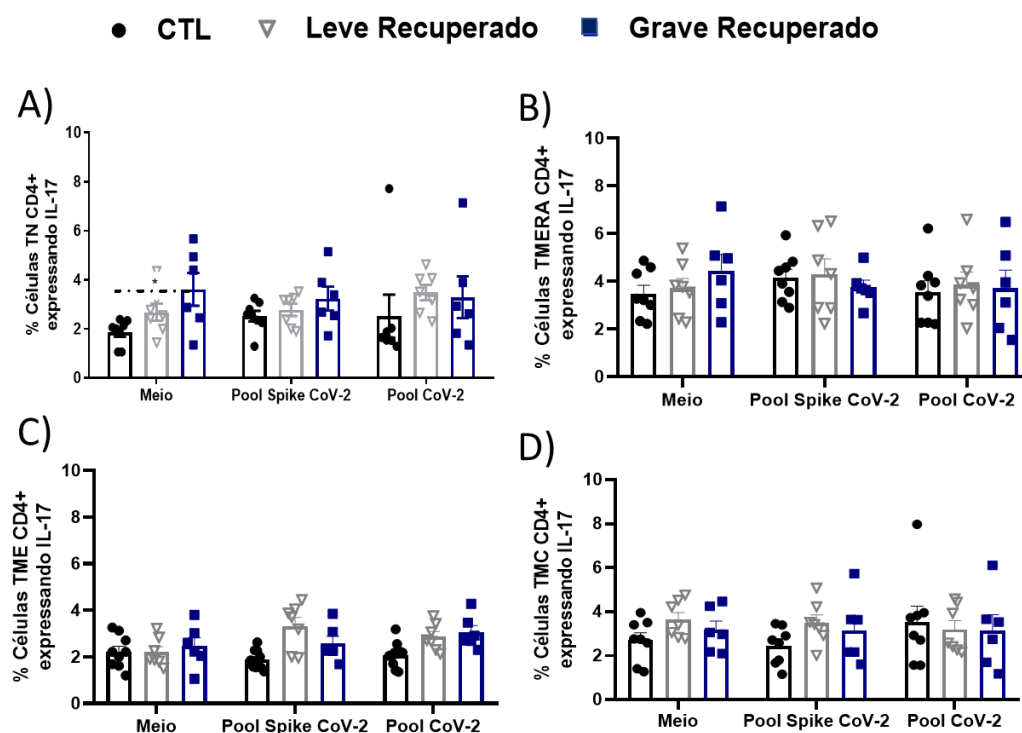
Figura 27. Subpopulações de células T CD4⁺ expressando IL-10 no sangue periférico de voluntários



Fonte: Autoria Própria, 2023. Gráficos representativos de citometria de fluxo mostrando a expressão de IL-10 entre células T CD4⁺ naive e de memória em pacientes recuperados de COVID-19. Os números indicam porcentagens nos portões sorteados. Todas as condições de estímulo avaliadas são mostradas em colunas.

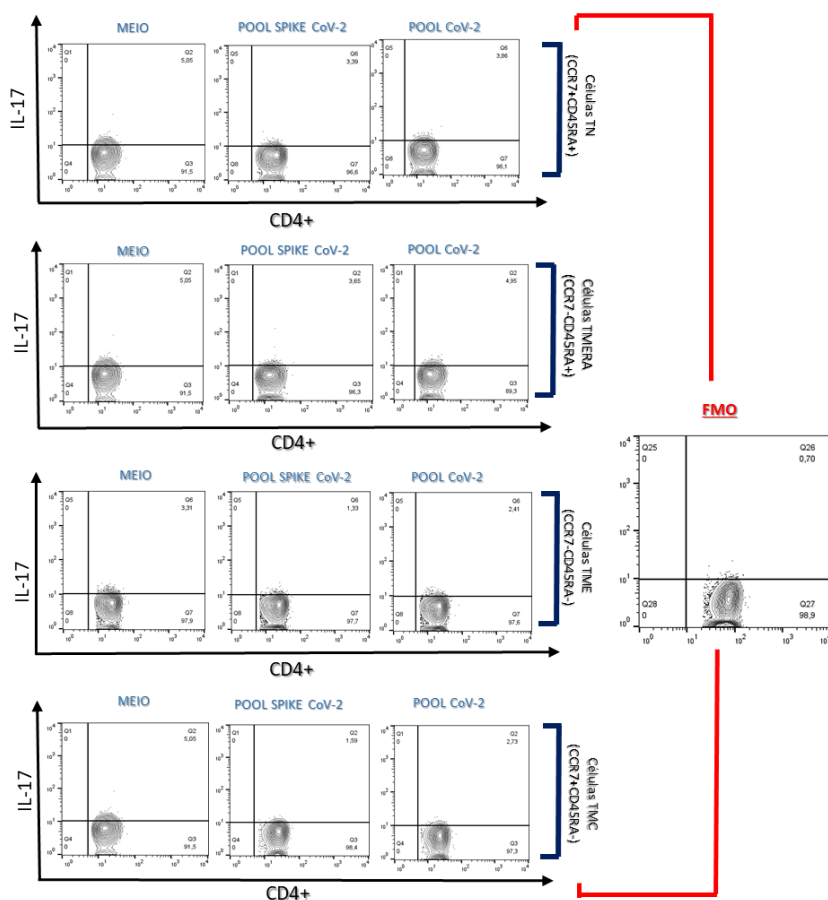
Por fim, amostras do grupo grave recuperado não estimuladas apresentaram níveis mais altos de células T CD4⁺ naive produtoras de IL-17 do que o grupo CTL (Figura 28A). Nos níveis de produção da IL-17 pelas células TMERA, TME, TMC CD4⁺ não foram observadas alterações significativas nas condições avaliadas (Figura 28B, 28C e 28D) (Figura 29).

Figura 28A – D. Perfil de expressão de IL-17 em células TN, TMERA, TME e TMC CD4+ nos grupos CTL, Leve Recuperado e Grave Recuperado



Fonte: Autoria própria, 2023. **(A)** Frequência de IL-17 em células TN CD4+. **(B)** Frequência de IL-17 em células TMERA CD4+. **(C)** Frequência de IL-17 em células TME CD4+. **(D)** Frequência de IL-17 em células TMC CD4+. PBMCs foram coletados de indivíduos nos grupos CTL (n = 8), Leve Recuperado (n = 7) e Grave Recuperado (n = 6). As amostras foram incubadas por 16 horas sob 3 condições (subgrupos): meio (não estimulado), peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2. PBMCs não estimulados foram usados como controle negativo. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. Grupos múltiplos foram comparados usando análise estatística Two-Way ANOVA (seguida pelo pós-teste de Tukey) e ANOVA de uma via (seguida pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn), quando apropriado. As barras de erro mostram a variabilidade dos dados para cada subgrupo. As linhas horizontais contínuas (—) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e Leve Recuperado, as linhas horizontais tracejadas (----) indicam diferenças significativas entre o grupo Leve Recuperado e Grave Recuperado e as linhas horizontais tracejadas com pontos (-.-) indicam diferenças significativas entre o grupo CTL e o Grave Recuperado (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os símbolos ●, ▼ e ■ representam cada voluntário inscrito nos grupos saudável, leve e grave, respectivamente, cujas amostras foram inseridas nas condições Meio, Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2. TN, células T naive (CD4+CCR7+CD45RA+); TMERA, células T de memória efetora reexpressando CD45RA (CD4+CCR7-CD45RA+); TME, células T de memória efetora (CD4+CCR7-CD45RA-); TMC, células T de memória central (CD4+CCR7+CD45RA-).

Figura 29. Subpopulações de células T CD4⁺ expressando IL-17 no sangue periférico de voluntários



Fonte: Autoria Própria, 2023. Gráficos representativos de citometria de fluxo mostrando a expressão de IL-17 entre células T CD4⁺ naiva e de memória em pacientes recuperados de COVID-19. Os números indicam porcentagens nos portões sorteados. Todas as condições de estímulo avaliadas são mostradas em colunas.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

A memória imunológica é uma marca significativa da imunidade adaptativa para estabelecer uma resposta imune aprimorada e eficaz após a reinfecção, portanto, a presença de subpopulações de células T de memória com fenótipos distintos expande nosso repertório imunológico, tornando-as um alvo relevante de estudo em COVID-19 (McGOOGAN., 2020; CRUZ-TAPIAS; CASTIBLANCO; ANAYA., 2013). No presente estudo, realizamos análises das subpopulações de células T CD8⁺/CD4⁺ naive, TME, TMC e TMERA em voluntários saudáveis, recuperados das formas leve e grave da COVID-19, antes do início da vacinação, caracterizando-as conjuntamente de forma inédita em relação ao perfil de ativação e produção de citocinas.

Nas infecções virais, as células T CD8⁺ se destacam por mediar a morte das células infectadas por citotoxicidade, bem como pela secreção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α . Essas citocinas também estão presentes no manejo de células imunes promovidas pelas células T CD4⁺ para o controle dessas infecções (WU; McGOOGAN., 2020; McGOOGAN., 2020). Dada a sua relevância, foram avaliadas a frequência de células T naive e subpopulações de memória CD8⁺ e CD4⁺ específicas para COVID-19. Em relação às subpopulações de células T CD4⁺, observou-se uma redução na frequência de células virgens em comparação ao grupo saudável na ausência de estimulação. Em contraste, a estimulação do Pool Spike CoV-2 elevou a frequência de células TMERA no grupo recuperado leve em comparação com o grupo grave. Tais resultados podem estar associados ao fato de que a infecção primária aguda promove uma rápida redistribuição das células T da periferia. As células T virgens se expandem notavelmente e se diferenciam em células T ativadas antígeno-específicas, como o fenótipo TMERA, caracterizado pela perda dos receptores de membrana CD28, CD27 e CD127, reexpressão de CD45RA e expressão de PD1/CD57 cuja polarização é estimulada devido à carga antigênica cumulativa induzida por infecções virais crônicas ou recorrentes (SALUMETS et al., 2022; LIPSITCH et al., 2020; LAUER et al., 2020).

ADAMO et al. (2021) demonstraram que pacientes recuperados de casos graves de COVID-19 apresentavam, após 6 meses de infecção, predominância de células TMERA e redução de subpopulações de células TMC CD8⁺, corroborando os dados aqui observados (ADAMO et al., 2022). Em nosso estudo, as células TMERA CD8⁺ não estimuladas mostraram uma frequência maior no grupo recuperado grave do que no grupo recuperado

leve, enquanto uma frequência maior de células T CD8⁺ TMC foi observada em pacientes que se recuperaram de casos leves do que graves, independentemente do estímulo. A presença marcante de células CD8⁺ TMERA tem sido associada ao excesso de inflamação e condições inflamatórias crônicas, como as que ocorrem em pacientes críticos na fase aguda do COVID-19, justificando assim o que foi observado em nossas amostras sem estimulação (SALUMETS et al., 2022; ACTIV3/TICO STUDY GROUP., 2022). A polarização das células da TMC, por sua vez, é favorecida pelo bloqueio da replicação do patógeno na fase aguda da doença, reduzindo a duração da apresentação antigênica e da inflamação, o que é corroborado pelo estudo de Salumets et al. (2021), em que a redução da viremia plasmática se correlacionou com o aumento do número de células de memória, cujo fenótipo predominante passou a ser CD8⁺CCR7-CD45RA⁺CD27⁺CD28, semelhante ao das células de memória central [MUELLER et al., 2013; SALUMETS et al., 2022]. Assim, sugere-se que a resposta imediata do grupo leve recuperado seja eficaz no controle da replicação viral na doença sintomática, favorecendo a geração da maior frequência de células TMC CD8⁺ de longa duração observadas em nossos resultados.

O perfil de ativação das distintas subpopulações de células naive e de memória também foi avaliado pela análise da expressão de CD69, CD137 e Ki67. O CD69 é descrito como um receptor de lectina C tipo II ligado à membrana, considerado um marcador clássico de ativação recente em linfócitos, devido ao seu rápido aparecimento na superfície dos linfócitos T. Células T CD8⁺ naive do grupo leve recuperado avaliados aqui mostraram uma frequência menor de CD69 do que o grupo grave recuperado na presença de Pool Spike CoV-2 e, em seguida, o grupo CTL na presença de Pool CoV-2. Adicionalmente, as células T de memória central CD8⁺ em contato com o Pool CoV-2 apresentaram menor expressão de CD69 pelo grupo leve recuperado em comparação ao grupo CTL. Padrão que se repete nas células CD4⁺ da TMC na ausência de peptídeos antigênicos. No entanto, ao considerar que o CD69 também atua como um importante regulador das respostas imunes, determinando padrões de liberação de citocinas inflamatórias e a migração de linfócitos ativados, esse resultado reafirma a maneira controlada como o grupo leve conduz a apresentação de antígenos e a diferenciação celular (PETRUSHEVSKA et al., 2021). File et al. (2021) demonstraram maior frequência de CD69 em pacientes hospitalizados em comparação com aqueles com doença leve na fase aguda da doença, corroborando com nossos dados em que Pool Spike CoV-2 e/ou Pool CoV-2 estimularam PBMCs de pacientes recuperados de quadro grave da COVID-19 tiveram maior expressão de CD69 por TMERA

CD4⁺ e CD8⁺, do que os outros grupos. Varchetta et al. (2021) descreveram uma proporção aumentada de células T especialmente CD8⁺ com alta expressão de CD69 circulante ao investigar pacientes com COVID-19 grave (VARCHETTA et al., 2021). Essas células mostraram um perfil responsivo favorável à inflamação exacerbada e eliminação viral semelhante ao subconjunto TMERA caracterizado por aumento da sensibilidade aos sinais inatos, agilidade na estruturação da resposta ao antígeno e alto perfil citotóxico (QINC et al., 2020; BRAUN et al., 2020).

O CD137, por sua vez, é caracterizado como um membro da família TNFR associado à sinalização coestimulatória, que regula a proliferação e sobrevivência de células T virgens, efectoras e de memória (MUELLER et al., 2013). O perfil de expressão desse marcador por células T CD8⁺ naive na ausência de pools antigênicos destacou a capacidade de células T CD8⁺ do grupo leve de responder à exposição viral, garantindo ativação e proliferação de células T de maneira controlada, evitando o estabelecimento de uma resposta imune exacerbada. Este grupo apresentou expressão reduzida de CD137 em relação aos demais grupos nesta condição, bem como na presença de Pool Spike CoV-2 em que manteve esta expressão em relação ao grupo CTL (PRIMORAC et al., 2022). As células T CD4⁺ naive, por sua vez, diante do antígeno, apresentaram maior expressão de CD137 nos grupos leve e grave recuperado, na presença do Pool CoV-2 em relação à CTL, sugerindo o papel deste subtipo celular, que através de sua ativação e diferenciação coordenará novamente a resposta imune humoral e celular contra o SARS-CoV-2 (PRIMORAC et al., 2022).

KANG et al. (2021), que demonstraram a presença de células T específicas para SARS-CoV-2 expressando amplamente CD69+CD137+, altamente sensíveis a estímulos antigênicos após 8 meses da fase sintomática da doença, achado que reforça o aqui demonstrado (KANG et al., 2021). Uma alta expressão de CD137 foi demonstrada pelo grupo leve recuperado em comparação com o grupo CTL e grave recuperado em células TME CD8⁺ estimuladas com Pool Spike CoV-2, bem como em células TME CD8⁺ estimuladas com Pool CoV-2 em relação ao grupo CTL. Neste mesmo grupo, as células TME CD4⁺ apresentaram maior frequência em comparação com CTL na ausência de estimulação. Em contraste, quando estimuladas pelo Pool CoV-2, essas células exibiram menor expressão de CD137 nos grupos leve e grave recuperados em comparação ao grupo CTL. Nas células TMC CD8⁺ e CD4⁺, por sua vez, observa-se que o grupo leve recuperado expressa mais CD137 do que o grupo recuperado grave na ausência de estímulo, bem como na presença de Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2, respectivamente. Durante a infecção grave

por SARS-CoV-2, o CD137 é considerado um biomarcador de gravidade porque seus níveis elevados de sua forma solúvel (sCD137) estão correlacionados com um prognóstico desfavorável (MUELLER et al., 2013; DE OLIVEIRA-MARQUES, 2022). No entanto, o padrão de expressão de CD137 pelas células CD8⁺ e CD4⁺ da TMC no grupo grave recuperado com estímulo antigênico pode indicar um mecanismo imunomodulador para atenuar a resposta inflamatória na reinfecção, dada a correlação da expressão maciça desse marcador com a doença grave. Além disso, as células TME CD4⁺ E CD8⁺ apresentam níveis semelhantes de CD137 entre os grupos recuperados leve e grave na maioria das condições aqui avaliadas, sugerindo a contribuição semelhante desse subtipo de células de memória para o controle da doença justificada por seu fenótipo de ação imediata que apresenta alta responsividade a infecções sucessivas e que migram amplamente entre os tecidos periféricos rapidamente (LIPSITCH et al., 2020; TAVUKAVOGLU et al., 2021).

Adicionalmente, a proteína nuclear Ki67 é comumente usada para avaliar a proliferação celular e medir a capacidade proliferativa de células T e células tumorais. A expressão de Ki67 é observada sobretudo em células que estão nas fases S, G2 e M do ciclo celular, ou seja, nas fases ativas da divisão celular. Em doenças como infecção por HIV, câncer e doenças autoimunes, o padrão de expressão de Ki67 em células T é usado para avaliar expansão de células T antígeno-específicas (MILLER et al., 2018; IMAIZUMI et al., 2021; DI ROSA; COSSARIZZA; HAYDAY., 2021). Uma expressão intensamente aumentada do Ki67 foi descrita em células de placentas positivas para a COVID-19 danificadas histologicamente, assim como uma elevação na frequência de monócitos Ki67⁺ em casos moderados e graves da doença também foi observada (KIRATH et al., 2022; DUT et al., 2022). Linfócitos T CD8⁺ efetores que expressam Ki67⁺ extensivamente são descritos em doenças inflamatórias, além disso, a presença de Ki67 em macrófagos do lúmen alveolar e linfócitos intersticiais presentes em infiltrados inflamatórios de pacientes com a COVID-19 já foram relatados (KUMAWAT et al., 2013; CARSANA et al., 2020). Nesse sentido, a presença da expressão de Ki67 também foi notada em todas as subpopulações aqui avaliadas sem alterações significativas na frequência deste marcador entre os subtipos celulares e entre os distintos grupos avaliados. O aumento na frequência de Ki67 em células T CD8⁺ de memória central foi induzido pelo Pool CoV-2 apenas no grupo Leve Recuperado quando comparado ao grupo não estimulado e estimulado pelo Pool CoV-2, indicando um maior grau de reatividade desse subtipo celular a reexposição ao antígeno específico.

Tendo em vista o papel das citocinas na fisiopatologia do COVID-19, avaliamos o perfil de expressão de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-17 em subpopulações de células T naïve e de memória. Avaliando o TNF- α expresso por linfócitos T CD4⁺ no grupo leve recuperado, observamos que nos estímulos Pool Spike CoV-2, as células T CD4⁺ naïve tiveram uma expressão maior em comparação com os outros grupos, bem como a memória central em comparação com o grupo CTL. Nas amostras não estimuladas do grupo leve recuperado, as células TMC CD8⁺ apresentaram elevada frequência de TNF- α do que os voluntários CTL e grave recuperados, enquanto as células TME CD4⁺TNF- α ⁺ foram mais proeminentes do que o grupo CTL apenas. Thieme et al. (2020) demonstraram a presença de células T de memória produtoras de TNF- α de longo prazo em convalescentes de COVID-19 (THIEME et al., 2020) e nossos achados mostraram uma expressão pronunciada de TNF- α em indivíduos com doença leve. Esses dados são corroborados por Queiroz et al. (2022) que encontraram níveis séricos mais elevados de TNF- α no grupo leve pós-covid em comparação com o grupo grave recuperado (QUEIROZ et al., 2022). Além disso, a associação entre citocinas do tipo Th1, como IFN- γ e TNF- α , eliminação viral e COVID-19 leve descrita por Anbalagan et al. (2022), reforça a capacidade do grupo leve recuperado de gerar uma resposta efetiva de memória celular para o controle da infecção, contribuindo com sintomas leves em uma reinfecção (ANBALAGAN et al., 2022; QUEIROZ et al., 2022).

O IFN- γ é definido como uma citocina inflamatória que possui uma atividade antiviral eficaz. Uma expressão mais alta dessa proteína também foi observada em células T CD4⁺ naïve de PBMCs não estimuladas do grupo leve recuperado. No Pool CoV-2 (para células CD8⁺ naïve e TME), as PBMC estimuladas do grupo grave recuperado apresentaram níveis mais baixos de IFN- γ em comparação com as dos voluntários recuperados de quadros leves da COVID-19 e/ou CTL. Na infecção por SARS CoV-2, esta citocina apresenta uma certa dualidade uma vez que a hiperprodução de IFN- γ e o aumento do stress oxidativo nas fases iniciais da doença se correlacionam com casos graves de COVID-19, enquanto a sua presença, de forma coordenada, permite uma adaptação imunológica para responder adequadamente contra o vírus (LEE; ASHKAR., 2018; DARIF et al., 2021; KANG et al., 2021). Na presença de Pool Spike CoV-2, as células TMERA CD8⁺ do grupo grave recuperado apresentaram níveis mais baixos de IFN- γ em comparação com aqueles de voluntários do grupo CTL e leve recuperado. No entanto, no grupo leve recuperado, encontramos maior expressão dessa citocina juntamente com níveis mais baixos de IL-10 e IL-17 na presença do pool CoV-2. A IL-10 é caracterizada por uma propriedade

imunoinibitória, enquanto a IL-17 tem papéis protetores dependentes do contexto e do tecido para manter a saúde em infecções (ZHAO et al., 2020; VARCHETTA et al., 2021). Assim, o perfil de citocinas apresentado pela célula T CD8 TMERA do grupo leve recuperado sugere uma resposta antiviral, na qual a redução de IL-10/IL-17 e a prevalência de IFN- γ poderiam contribuir para uma maior eficiência desta célula no controle a infecção.

Pacientes não hospitalizados têm células T CCR7⁺ específicas para SARS-CoV-2 que secretam IL-10, que também foi avaliada em outras subpopulações (VARCHETTA et al., 2021). As células T CD4⁺ naive do grupo leve recuperado mostraram uma expressão mais alta de IL-10 nas amostras não estimuladas e estimuladas do Pool Spike CoV-2 em comparação com os grupos CTL e grave recuperado, respectivamente. As células T CD8⁺ naive, por sua vez, apresentam maior expressão de IL-10 no grupo leve em comparação ao grupo CTL em comparação ao grupo grave sob estímulos Pool Spike CoV-2. Esses resultados sugerem uma atividade coordenada entre células T CD4⁺ e CD8⁺ naive no grupo leve recuperado, a fim de evitar uma resposta inflamatória exacerbada relacionada a casos graves da doença (CRUZ-TAPIA; CASTIBLANCO; ANAYA., 2013; LOWERY; SARIOL; PERLMAN, 2021). Além disso, as células T CD8⁺ de memória central dos grupos leve e grave recuperados também apresentaram uma expressão elevada de IL-10 em comparação com o grupo CTL na presença de Pool Spike CoV-2. Esses resultados são apoiados pelo fato de que esse subtipo celular se assemelha fenotipicamente às células Th2 produtoras de IL-10 (PENG et al., 2020). Muñoz et al. (2021) demonstraram que em respostas imunes exacerbadas causadas por infecções virais, células com fenótipo semelhante a Th2 que não expressam o fator de transcrição Tbet, suprimem fortemente as respostas pró-inflamatórias de células T naive e de memória via secreção de IL-10 (MUNOZ et al., 2021). Assim, a elevação das células TMC CD8⁺IL-10⁺ no grupo leve recuperado na presença de Pool Spike CoV-2 pode estar associada a uma alteração pró-inflamatória de longo prazo decorrente da COVID-19 e à necessidade de controlar essa condição em uma reinfecção (THIEME et al., 2020; PRIETL et al., 2022).

A IL-17, descrita como uma citocina responsável pela diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ para o fenótipo Th17, também foi aqui avaliada conforme mencionado anteriormente (MECKIF et al., 2020). Em comparação com CTL, células T CD4⁺ naive do grupo grave recuperado apresentaram maior frequência de IL-17 na ausência de estimulação. Voluntários do grupo grave recuperado também mostraram uma frequência reduzida de IL-17 em células TME e TMC CD8⁺, respectivamente, na presença de Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2. A

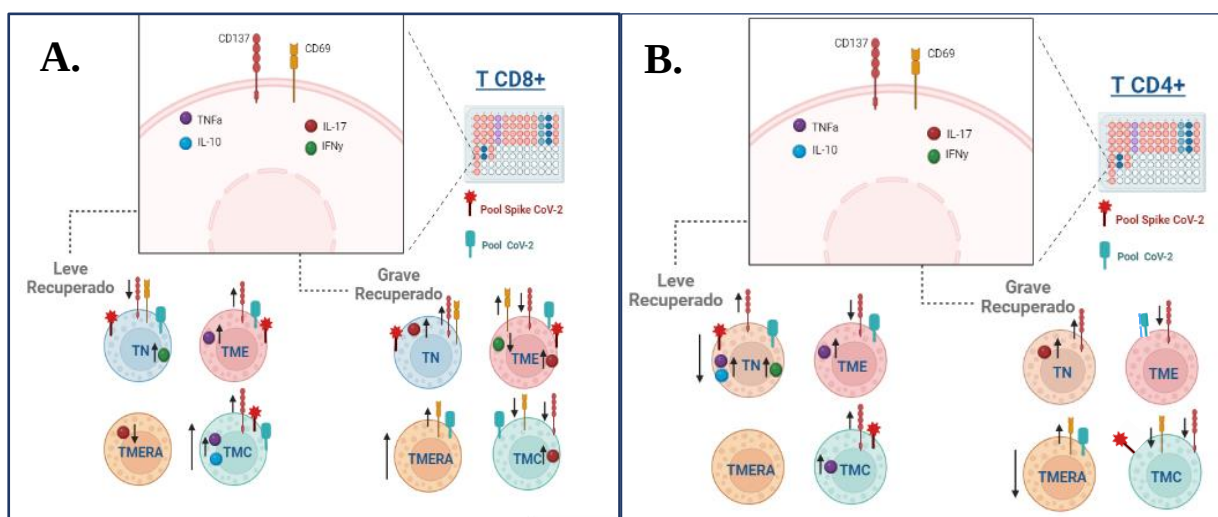
IL-17 tem alta frequência em pacientes críticos na fase aguda da doença, portanto, com base em nossos achados, pode-se sugerir que essa elevação permaneça nesse grupo por um período prolongado (GRIFONI et al., 2020). No entanto, estudos preliminares têm sugerido maior suscetibilidade à pneumonia secundária após infecção por influenza A em indivíduos sem sinalização funcional do receptor de IL-17, demonstrando assim o efeito protetor dessa citocina, o que amplia as perspectivas sobre o real papel da IL-17 na pacientes recuperados de casos graves de COVID-19 (CROWE et al., 2009).

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

Dado o impacto na saúde pública mundial causado pela COVID-19 nos últimos três anos, a elucidação de mecanismos imunológicos seguem sendo prioridade na comunidade científica no intuito de aprimorar, desenvolver e aplicar novas estratégias preventivas e terapêuticas à infecção. Dessa forma, no presente estudo foi demonstrada uma distribuição distinta na frequência de subconjuntos de células T CD4⁺ e CD8⁺ naive e de memória em indivíduos recuperados da infecção por SARS-CoV-2. Adicionalmente, também foi observado que os subtipos TME, TMC e TMERA de células T CD4⁺ e CD8⁺ apresentaram uma resposta heterogênea em relação aos marcadores de ativação. Interessante, voluntários recuperados de doença leve apresentaram expressão mais pronunciada de TNF- α por subconjuntos de células T CD4⁺ e CD8⁺ enquanto células TMERA CD8⁺ parecem ter uma assinatura antiviral devido ao perfil de expressão de IFN- γ , IL-10 e IL-17. Este estudo contribui para a elucidação dos papéis desenvolvidos por cada subpopulação de células T de memória durante a reexposição antigênica do SARS CoV-2 e sua ação no direcionamento do desfecho da doença.

Figura 30. Caracterização Fenotípica das subpopulações de células T CD8⁺ e CD4⁺ naive, de memória central, de memória efetora e de memória efetora que reexpressam o CD45RA



Legenda: (A) Perfil de Expressão do CD137, CD69, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-17 pelas células T CD8⁺ naive e subpopulações de memória. No grupo leve recuperado, as células TN reduziram a expressão do CD137 e CD69 sobretudo na presença do Pool CoV-2 e Pool Spike CoV-2, respectivamente. Bem como, uma elevação dos níveis de IFN- γ . As células TMERA apresentaram uma expressão reduzida de IL-17 na presença do Pool CoV-2. As células TME, por sua vez, apresentaram uma elevação na expressão de TNF- α na ausência de estímulo. Na presença do Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2 o presente subtipo celular apresentou elevada expressão de CD137.

As células T de memória central, na presença do Pool Spike CoV-2 apresentou elevada expressão de TNF- α e IL-10, assim como uma elevada expressão de CD137 na ausência de estímulo e na presença do Pool CoV-2. No grupo grave recuperado, um aumento na expressão de CD137, CD69 e IL-17 foram observados nas células TN quando estimulados pelo Pool Spike. As células TMERA do grupo grave apresentaram uma elevada expressão de CD69 na presença do Pool CoV-2. A célula TMC, na presença do Pool CoV-2 apresentou expressão reduzida de CD137, CD69 e uma elevação na produção de IL-17. Finalmente, as células TME apresentaram um aumento da produção de IL-17 e da expressão de CD69, em contrapartida, houve redução na expressão do CD137 e do IFN- γ na presença do Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2. **(B) Perfil de Expressão do CD137, CD69, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-17 pelas células T CD4⁺ naive e subpopulações de memória.** No grupo leve recuperado, as células TN na presença do Pool CoV-2 e Pool Spike CoV-2 apresentaram expressão elevada de CD137, IL-10, IFN- γ e TNF- α . As células TMERA não apresentaram alterações significativas. As células TME, por sua vez, apresentaram uma elevação na expressão de TNF- α na ausência de estímulo. Na presença do Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2 o presente subtipo celular apresentou elevada expressão de CD137. As células T de memória central, na ausência de estímulo apresentou elevação de TNF- α , assim como uma elevada expressão de CD137 na presença de estímulo. No grupo grave recuperado, um aumento na expressão de CD137 e IL-17 foram observados nas células TN. As células TMERA do grupo grave apresentaram uma elevada expressão de CD69 na presença do Pool CoV-2. A célula TMC, na presença do Pool Spike CoV-2 apresentou expressão reduzida de CD137 e CD69. Finalmente, as células TME apresentaram uma redução na expressão do CD137 na ausência de estímulo e na presença do Pool Spike CoV-2.

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2015.

ACTIV-3/TICO STUDY GROUP. The Association of Baseline Plasma SARS-CoV-2 Nucleocapsid Antigen Level and Outcomes in Patients Hospitalized With COVID-19. **Annals of internal medicine**, v. 175, n. 10, p. 1401-1410, 2022.

ADAMO, Sarah et al. Signature of long-lived memory CD8⁺ T cells in acute SARS-CoV-2 infection. **Nature**, v. 602, n. 7895, p. 148-155, 2022.

ADMOU, Brahim. COVID-19 et marqueurs immunologiques pertinents. **The Pan African Medical Journal**, v. 39, 2021.

AJAMI, Maryam et al. Recombinant CD137-Fc, its synthesis, and applications for improving the immune system functions, such as tumor immunotherapy and to reduce the inflammation due to the novel coronavirus. **Journal of cellular biochemistry**, v. 122, n. 9, p. 1072-1084, 2021.

ALSHARIF, W.; QURASHI, A. Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review. **Radiography**, v. 27, n. 2, p. 682-687, 2021.

ANANTHARAJ, Anbalagan et al. Resolution of viral load in mild COVID-19 patients is associated with both innate and adaptive immune responses. **Journal of Clinical Virology**, v. 146, p. 105060, 2022.

ARAF, Yusha et al. Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. **Journal of medical virology**, 2022.

ARORA, Pooja et al. Learning from history: coronavirus outbreaks in the past. **Dermatologic therapy**, v. 33, n. 4, p. e13343, 2020.

ARYA, Rimanshee et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. **Journal of molecular biology**, v. 433, n. 2, p. 166725, 2021.

BEHZAD, Shima et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19: Radiologic and clinical overview. **Clinical imaging**, v. 66, p. 35-41, 2020.

BHAT, Eijaz Ahmed et al. SARS-CoV-2: insight in genome structure, pathogenesis and viral receptor binding analysis—an updated review. **International immunopharmacology**, v. 95, p. 107493, 2021.

BOUROUIBA, Lydia. Turbulent gas clouds and respiratory pathogen emissions: potential implications for reducing transmission of COVID-19. **Jama**, v. 323, n. 18, p. 1837-1838, 2020.

BRANT, Ayslan 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: 02 mar. 2022.

BRANDÃO, Simone Cristina Soares et al. Papel do Endotélio na COVID-19 Grave. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, p. 1184-1189, 2021.

BRASIL, Ministério da Saúde. Como é transmitido?, 2021b. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/como-e-transmitido>>. Acesso em: 03 mar. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Diagnóstico, 2021b. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/diagnostico>>. Acesso em: 03 mar. 2022.

BRASIL Ministério da Saúde. Painel Coronavírus, 2022a. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 28 fev. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica Emergência de saúde pública de Importância nacional pela Doença pelo coronavírus 2019 – covid-19, 2021. Disponível em: <[gve_covid_16marc2021.indd \(saude.mg.gov.br\)](#)>. Acessado: 03 mar. 2022.

BRAUN, Julian et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. **Nature**, v. 587, n. 7833, p. 270-274, 2020.

BRÜSSOW, Harald. Immunology of COVID-19. **Environmental microbiology**, v. 22, n. 12, p. 4895-4908, 2020.

CALLAWAY, E.; CYRANOSKI, D.; Mallapaty, S. The coronavirus pandemic in five powerful charts. **Nature**. v. 579, p. 482-483. 2020.

CHAN, Jasper Fuk-Woo et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. **The lancet**, v. 395, n. 10223, p. 514-523, 2020.

CHEN, Zeyu; WHERRY, E. John. T cell responses in patients with COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 9, p. 529-536, 2020.

CHENG, Vincent CC et al. Escalating infection control response to the rapidly evolving epidemiology of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) due to SARS-CoV-2 in Hong Kong. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 41, n. 5, p. 493-498, 2020.

CIBRIÁN, Danay; SÁNCHEZ-MADRID, Francisco. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. **European journal of immunology**, v. 47, n. 6, p. 946-953, 2017.

COVID-19 Data Repository by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University. 2022. Disponível em: <<https://github.com/CSSEGISandData/COVID-19>>. Acessado em: 20 fev. 2022.

CROWE, C. R. et al. Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *J. Immunol.* **183**, 5301–5310 (2009).

CRUZ-TAPIAS, P.; CASTIBLANCO, J.; ANAYA, J. M. Major histocompatibility complex: antigen processing and presentation. In: *Autoimmunity: From Bench to Bedside* [Internet]. El Rosario University Press, 2013.

CUI, Jie; LI, Fang; SHI, Zheng-Li. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, n. 3, p. 181-192, 2019.

DANLADI, Jibrin; SABIR, Hemmen. Innate immunity, inflammation activation and heat-shock protein in COVID-19 pathogenesis. *Journal of Neuroimmunology*, v. 358, p. 577632, 2021.

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

DE CANDIA, Paola et al. T cells: warriors of SARS-CoV-2 infection. *Trends in immunology*, v. 42, n. 1, p. 18-30, 2021.

DEMARIA, O.; CARVELLI, J.; BATISTA, L.; et. al. Identification of druggable inhibitory immune checkpoints on Natural Killer cells in COVID-19. *Cellular & Molecular Immunology*, p. 1-3. 2020.

DE OLIVEIRA MARQUES, Mariana et al. Soluble CD137 as a potential biomarker for severe COVID-19. *Immunology Letters*, 2022.

DE SOUZA, Layse Costa et al. SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2: uma revisão narrativa dos principais Coronavírus do século. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 4, n. 1, p. 1419-1439, 2021.

DIAMOND, Michael S.; KANNEGANTI, Thirumala-Devi. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nature Immunology*, p. 1-12, 2022.

DI ROSA, Francesca; COSSARIZZA, Andrea; HAYDAY, Adrian C. To Ki or not to Ki: re-evaluating the use and potentials of Ki-67 for T cell analysis. *Frontiers in immunology*, v. 12, p. 1041, 2021.

DICKEL, Steffen et al. Case Report: Interferon- γ Restores Monocytic Human Leukocyte Antigen Receptor (mHLA-DR) in Severe COVID-19 With Acquired Immunosuppression Syndrome. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 1087, 2021.

DRAMÉ, Moustapha et al. Should RT-PCR be considered a gold standard in the diagnosis of Covid-19?. *Journal of medical virology*, 2020.

DROSTEN, C.; GUNTHER, S.; PREISER, W.; VAN DER WERF, S.; BRODT, H. R.; et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *The New England Journal of Medicine*. v. 348, n. 20, p.1967-76, 2003.

DUTT, Taru S. et al. Comprehensive Immune Profiling Reveals CD56+ Monocytes and CD31+ Endothelial Cells Are Increased in Severe COVID-19 Disease. *The Journal of*

Immunology, v. 208, n. 3, p. 685-696, 2022.

FERRERAS, Cristina et al. SARS-CoV-2-specific memory T lymphocytes from COVID-19 convalescent donors: identification, biobanking, and large-scale production for adoptive cell therapy. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 293, 2021.

FILES, Jacob K. et al. Sustained cellular immune dysregulation in individuals recovering from SARS-CoV-2 infection. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, n. 1, 2021.

GALLERANI, Eleonora et al. Impaired priming of SARS-CoV-2-specific naïve CD8⁺ T cells in older subjects. **Frontiers in immunology**, v. 12, 2021.

GANGAEV, A.; KETELAARS, S. L. C.; PATIWAEL, S. Profound CD8 T cell responses towards the SARS-CoV-2 ORF1ab in COVID-19 patients. **Immunology**. p. 1-20. 2020.

GARCÍA, María Molero; IZQUIERDO, J.; PÉREZ, M. Aspectos básicos del COVID-19 para el manejo desde Atención Primaria Basic aspects of COVID-19 for management from Primary Care. **Atencion Primaria**, 2020

GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; NETEA, M. G.; ROVINA, N.; et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. **Cell Host Microbe**. v. 27, n. 6, p. 992-1000.e3. 2020.

GRIFONI, Alba et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>>. Acesso em 02 mar. 2022.

GOPLEN, Nick P.; CHEON, In Su; SUN, Jie. Age-Related Dynamics of Lung-Resident Memory CD8⁺ T Cells in the Age of COVID-19. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 323, 2021

GUO, Li et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). **Clinical infectious diseases**, v. 71, n. 15, p. 778-785, 2020.

GUPTA, Sudhir et al. Molecular changes associated with increased TNF- α -induced apoptosis in naïve (TN) and central memory (TCM) CD8⁺ T cells in aged humans. **Immunity & Ageing**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2018.

HADJAD Heterogeneous patterns of IFN-I/III response in the respiratory tract of COVID-19 patients may be associated to COVID-19 severity.

HAN, Huan 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.

HEAD, Jennifer R.; ANDREJKO, Kristin L.; REMAIS, Justin V. Model-based assessment of SARS-CoV-2 Delta variant transmission dynamics within partially vaccinated K-12 school populations. **medRxiv**, 2021.

HELMY, Yosra 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 02 mar. 2022.

HOFFMANN, Markus et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **cell**, v. 181, n. 2, p. 271-280. e8, 2020.

HOSSEINI, Arezoo et al. Innate and adaptive immune responses Against coronavirus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 132, p. 110859, 2020.

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.

HUANG C, WANG Y, LI X, REN L, ZHAO J, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**. v. 395, n. 10223, p.497-506, 2020. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5

HUANG, Chaolin et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

HUANG, Fei et al. IL-10 served as an indicator in severe COVID-19 patients. **Journal of Medical Virology**, 2020.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2020. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/>>. Acessado em: 20 fev. 2022.

IWAMURA, Ana Paula D. et al. Immunity and inflammatory biomarkers in COVID-19: A systematic review. **Reviews in Medical Virology**, 2020.

IZDA, Vladislav; JEFFRIES, Matlock A.; SAWALHA, Amr H. COVID-19: A review of therapeutic strategies and vaccine candidates. **Clinical Immunology**, p. 108634, 2020.

JACKSON, Cody 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.

JARJOUR, Nicholas N.; MASOPUST, David; JAMESON, Stephen C. T cell memory: understanding COVID-19. **Immunity**, v. 54, n. 1, p. 14-18, 2021.

JOUAN, Youenn et al. Phenotypical and functional alteration of unconventional T cells in severe COVID-19 patients. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 12, 2020.

JORDAN, Stanley C. Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: relevance to acquired immunity and vaccine responses. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 204, n. 3, p. 310-320, 2021.

KAHN, Jeffrey S.; MCINTOSH, Kenneth. History and recent advances in coronavirus discovery. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 24, n. 11, p. S223-S227, 2005.

KAMAL, Marwa et al. Assessment and characterisation of post-COVID-19 manifestations. **International journal of clinical practice**, v. 75, n. 3, p. e13746, 2021.

KANG, Chang Kyung et al. Longitudinal analysis of human memory T-cell response according to the severity of illness up to 8 months after severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 224, n. 1, p. 39-48, 2021.

KARKI, Rajendra et al. Synergism of TNF- α and IFN- γ triggers inflammatory cell death, tissue damage, and mortality in SARS-CoV-2 infection and cytokine shock syndromes. **Cell**, v. 184, n. 1, p. 149-168. e17, 2021.

KASMI, Yassine et al. Coronaviridae: 100,000 years of emergence and reemergence. In: **Emerging and reemerging viral pathogens**. Academic Press, 2020. p. 127-149.

KAUR, Supreet et al. The looming storm: blood and cytokines in COVID-19. **Blood reviews**, v. 46, p. 100743, 2021.

KE, Zunlong et al. Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. **Nature**, v. 588, n. 7838, p. 498-502, 2020.

KIRATLI, Sevil et al. Ki-67 Expression Level in placentas with COVID-19 Infected Women. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 12, n. 1-S, p. 29-33, 2022.

KLEIN, Steffen et al. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2020.

KOKS, Sulev et al. COVID-19: Time for precision epidemiology. **Experimental Biology and Medicine**, v. 245, n. 8, p. 677-679, 2020.

KUNNUMAKKARA, Ajaikumar B. et al. COVID-19, cytokines, inflammation, and spices: How are they related?. **Life sciences**, v. 284, p. 119201, 2021.

KUMAWAT, Ashok Kumar et al. Microscopic colitis patients have increased proportions of Ki67+ proliferating and CD45RO+ active/memory CD8+ and CD4+ 8+ mucosal T cells. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 7, n. 9, p. 694-705, 2013.

IMAIZUMI, Ken et al. Ki67 expression and localization of T cells after neoadjuvant therapies as reliable predictive markers in rectal cancer. **Cancer science**, v. 111, n. 1, p. 23-35, 2020.

LAUER, Stephen A. et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. **Annals of internal medicine**, v. 172, n. 9, p. 577-582, 2020.

LIDLAW, Brian J.; CRAFT, Joseph E.; KAECH, Susan M. The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 2, p. 102-111, 2016.

LAITON-DONATO, Katherine et al. Characterization of the emerging B. 1.621 variant of interest of SARS-CoV-2. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 95, p. 105038, 2021.

LEE, SangJoon; CHANNAPPANAVAR, Rudragouda; KANNEGANTI, Thirumala-Devi. Coronaviruses: innate immunity, inflammasome activation, inflammatory cell death, and cytokines. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 12, p. 1083-1099, 2020.

LEE, Amanda J.; ASHKAR, Ali A. The dual nature of type I and type II interferons. **Frontiers in immunology**, p. 2061, 2018.

LEWIS, Dyani. Is the coronavirus airborne? Experts can't agree. **Nature**, v. 580, n. 7802, p. 175, 2020.

LEFRANÇOIS, Leo; MARZO, Amanda L. The descent of memory T-cell subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 8, p. 618-623, 2006.

LI, Xu et al. Single-Cell Analysis Reveals the Immune Characteristics of Myeloid Cells and Memory T Cells in Recovered COVID-19 Patients With Different Severities. **Frontiers in immunology**, p. 5507, 2022.

LIPSITCH, Marc et al. Cross-reactive memory T cells and herd immunity to SARS-CoV-2. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 11, p. 709-713, 2020.

Liu, Y. et al. 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) infections trigger an exaggerated cytokine response aggravating lung injury *ChinaXiv* <http://www.chinaxiv.org/abs/202002.00018> (2020).

LONG, Chunqin et al. Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT?. **European journal of radiology**, v. 126, p. 108961, 2020.

LOPEZ BERNAL, Jamie et al. Effectiveness of Covid-19 vaccines against the B. 1.617. 2 (Delta) variant. **N Engl J Med**, p. 585-594, 2021.

LOWERY, Shea A.; SARIOL, Alan; PERLMAN, Stanley. Innate immune and inflammatory responses to SARS-CoV-2: Implications for COVID-19. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 7, p. 1052-1062, 2021.

LU, Ligong et al. A potential role of interleukin 10 in COVID-19 pathogenesis. **Trends in Immunology**, v. 42, n. 1, p. 3-5, 2021.

LU, Roujian et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565-574, 2020.

MA, Huan et al. Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19. **Cellular & molecular immunology**, v. 17, n. 7, p. 773-775, 2020.

MA, Jiaqiang et al. PD1Hi CD8+ T cells correlate with exhausted signature and poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2019.

MACHHI, Jatin et al. The natural history, pathobiology, and clinical manifestations of SARS-CoV-2 infections. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 15, n. 3, p. 359-386, 2020.

MARRA, Marco A. et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. **Science**, v. 300, n. 5624, p. 1399-1404, 2003.

MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China. *Jama*. 2020;323(13):1239-42.

MECKIFF, Benjamin 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.

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

MILLER, Iain et al. Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence. **Cell reports**, v. 24, n. 5, p. 1105-1112. e5, 2018.

MORENS, David M. et al. Pandemic COVID-19 joins history's pandemic legion. **MBio**, v. 11, n. 3, p. e00812-20, 2020.

MOUSAVIZADEH, Leila; GHASEMI, Sorayya. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 54, n. 2, p. 159-163, 2021.

MOSS, Paul. The T cell immune response against SARS-CoV-2. **Nature immunology**, p. 1-8, 2022.

MUELLER, Scott N. et al. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. **Annual review of immunology**, v. 31, p. 137-161, 2013.

NOVELLI, Giuseppe et al. COVID-19 update: the first 6 months of the pandemic. **Human Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2020.

OCHANI, R. et al. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. **La Infezioni in Medicina**, v. 29, n. 1, p. 20-36, 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Disponível em: < Coronavirus disease (COVID-19) (who.int)>. Acessado em: 13 mar. 2022.

Organização Mundial de Saúde. Timeline: WHO's COVID-19 response, 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/interactive-timeline>>. Acesso em: 28 fev. 2022.

Organização Mundial de Saúde, 2020f. Novel Coronavirus(2019-nCoV) Situation Report – 10. Disponível em <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200130-sitrep-10-ncov.pdf?sfvrsn=d0b2e480_2>. Acessado em: 28 fev. 2022.

PACES, Jan et al. COVID-19 and the immune system. **Physiological research**, v. 69, n. 3, 2020.

PACHA, Omar; SALLMAN, Mary Alice; EVANS, Scott E. COVID-19: a case for inhibiting IL-17?. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 345-346, 2020.

PARK, W. B.; KWON, N. J.; CHOI, S. J.; et al. Virus Isolation from the First Patient with SARS-CoV-2 in Korea. **J Korean Med Sci**. v. 35, n. 7e84, p. 1-5. 2020.

PENG, M. et al. Association between nonspecific interstitial pneumonia and presence of CD20+ B lymphocytes within pulmonary lymphoid follicles. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, dez. 2017.

PENNOCK, Nathan D. et al. T cell responses: naive to memory and everything in between. **Advances in physiology education**, v. 37, n. 4, p. 273-283, 2013.

PETRUSHEVSKA, Marija et al. Presentation of cytokine profile in relation to oxidative stress parameters in patients with severe COVID-19: a case-control pilot study. **F1000Research**, v. 10, 2021.

POONIA, Bhawna; KOTTILIL, Shyam. Immune correlates of COVID-19 control. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 2535, 2020.

PITOISET, Fabien et al. Deep phenotyping of immune cell populations by optimized and standardized flow cytometry analyses. **Cytometry Part A**, v. 93, n. 8, p. 793-802, 2018.

PRIETL, Barbara et al. Chronic Inflammation Might Protect Hemodialysis Patients From Severe COVID-19. **Frontiers in immunology**, v. 13, 2022.

PRIMORAC, Dragan et al. Cellular Immunity—The Key to Long-Term Protection in Individuals Recovered from SARS-CoV-2 and after Vaccination. **Vaccines**, v. 10, n. 3, p. 442, 2022.

PROMPETCHARA, Eakachai; KETLOY, Chutitorn; PALAGA, Tanapat. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. **Asian Pacific journal of allergy and immunology**, v. 38, n. 1, p. 1-9, 2020.

QINC, ZhouL et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. **Clin Infect Dis**, 2020.

QUEIROZ, Maria Alice Freitas et al. Cytokine profiles associated with acute COVID-19 and long COVID-19 syndrome. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, p. 931, 2022.

RAHMAN, Noor et al. Virtual screening of natural products against type II transmembrane serine protease (TMPRSS2), the priming agent of coronavirus 2 (SARS-CoV-2). **Molecules**, v. 25, n. 10, p. 2271, 2020.

RAI, Praveen et al. Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 105, n. 2, p. 441-455, 2021.

REUSCH, Nico et al. Neutrophils in COVID-19. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 952, 2021.

RHA, Min-Seok et al. PD-1-expressing SARS-CoV-2-specific CD8⁺ T cells are not exhausted, but functional in patients with COVID-19. **Immunity**, v. 54, n. 1, p. 44-52. e3, 2021.

RODRIGUEZ-MORALES, Alfonso J. et al. COVID-19 in Latin America: The implications of the first confirmed case in Brazil. **Travel medicine and infectious disease**, v. 35, p. 101613, 2020.

RODRIGUEZ-MORALES, Alfonso J. et al. History is repeating itself: Probable zoonotic spillover as the cause of the 2019 novel Coronavirus Epidemic. **Infez Med**, v. 28, n. 1, p. 3-5, 2020.

ROKNI, Mohsen; GHASEMI, Vida; TAVAKOLI, Zahra. Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: comparison with SARS and MERS. **Reviews in medical virology**, v. 30, n. 3, p. e2107, 2020.

ROMANO, M., RUGGIERO, A., SQUEGLIA, F., MAGA, G., BERISIO, R., (2020). A structural view of SARS-CoV-2 RNA replication machinery: RNA synthesis, proofreading and final capping. *Cells*, 9, 1267.

RUENJAIMAN, Vichaya; HIRANKARN, Nattiya; PALAGA, Tanapat. Innate immunity in COVID-19: Drivers of pathogenesis and potential therapeutic targets. **Asian Pacific journal of allergy and immunology**, v. 39, n. 2, p. 69-77, 2021.

SAMJI, Tasleem; KHANNA, Kamal M. Understanding memory CD8⁺ T cells. **Immunology letters**, v. 185, p. 32-39, 2017.

SALLUSTO, Federica et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, n. 6754, p. 708-712, 1999.

SALUMETS, Ahto et al. Epigenetic quantification of immunosenescent CD8⁺ TEMRA cells in human blood. **Aging Cell**, v. 21, n. 5, p. e13607, 2022.

SCAGNOLARI, Carolina et al. Differential induction of type I and III interferon genes in the upper respiratory tract of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Virus Research**, v. 295, p. 198283, 2021.

SASIKALA, Mitnala et al. Immunological memory and neutralizing activity to a single dose of COVID-19 vaccine in previously infected individuals. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 108, p. 183-186, 2021.

SETTE, Alessandro; CROTTY, Shane. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. **Cell**, v. 184, n. 4, p. 861-880, 2021.

SCHULTZE, Joachim L.; ASCHENBRENNER, Anna C. COVID-19 and the human innate immune system. **Cell**, v. 184, n. 7, p. 1671-1692, 2021.

SETTE, Alessandro; CROTTY, Shane. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. **Cell**, 2021.

SIDIQ, Zeeshan et al. Benefits and limitations of serological assays in COVID-19 infection. **indian journal of tuberculosis**, v. 67, n. 4, p. S163-S166, 2020.

SRIVASTAVA, N.; BAXI, P.; RATHO, R.K.; SAXENA, S.K. Global Trends in Epidemiology of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)**. p. 9-21. 2020.

SUDRE, C. H. et al. Symptom clusters in Covid19: A potential clinical prediction tool from the COVID Symptom study app. **medRxiv**, 2020. doi:10.1101/2020.06.12.20129056

SULE, Waidi Folorunso; OLUWAYELU, Daniel Oladimeji. Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: challenges and prospects. **The Pan African Medical Journal**, v. 35, n. Suppl 2, 2020.

TAN, Anthony 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. 108728, 2021.

TANG, Yuanji et al. Epidemiology of COVID-19 in Brazil: using a mathematical model to estimate the outbreak peak and temporal evolution. **Emerging microbes & infections**, v. 9, n. 1, p. 1453-1456, 2020.

TAVUKCUOGLU, Ece et al. Functional responsiveness of memory T cells from COVID-19 patients. **Cellular Immunology**, v. 365, p. 104363, 2021.

THIEME, Constantin J. et al. Robust T cell response toward spike, membrane, and nucleocapsid SARS-CoV-2 proteins is not associated with recovery in critical COVID-19 patients. **Cell Reports Medicine**, v. 1, n. 6, p. 100092, 2020.

TRIGGLE, Chris R. et al. A comprehensive review of viral characteristics, transmission, pathophysiology, immune response, and management of SARS-CoV-2 and COVID-19 as a basis for controlling the pandemic. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 338, 2021.

TSEREL, Liina et al. Long-Term Elevated Inflammatory Protein Levels in Asymptomatic SARS-CoV-2 Infected Individuals. **Frontiers in Immunology**, p. 3804, 2021.

UGOLINI, Alessio; NUTI, Marianna. CD137+ T-Cells: Protagonists of the Immunotherapy Revolution. **Cancers**, v. 13, n. 3, p. 456, 2021.

VAN DEN BROEK, Theo; BORGHANS, José AM; VAN WIJK, Femke. The full spectrum of human naive T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 6, p. 363-373, 2018.

VARCHETTA, Stefania et al. Unique immunological profile in patients with COVID-19. **Cellular & molecular immunology**, v. 18, n. 3, p. 604-612, 2021.

VIGÓN, Lorena 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, 2021.

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: 19 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?login=true>>. Acesso em: 19 mar. 2022.

WANG, Dawei et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China. **Jama**, v. 323, n. 11, p. 1061-1069, 2020.

WILLINGER, Tim et al. Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 9, p. 5895-5903, 2005.

WRAPP, D., WANG, N., CORBETT, K.S., GOLDSMITH, J.A., HSIEH, C.-L., ABIONA, O., GRAHAM, B.S., MCLELLAN, J.S., (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 367.

WU, Di et al. The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 94, p. 44-48, 2020.

YAMAYOSHI, Seiya et al. Comparison of rapid antigen tests for COVID-19. **Viruses**, v. 12, n. 12, p. 1420, 2020.

YASUHARA, Jun et al. Clinical characteristics of COVID-19 in children: a systematic review. **Pediatric pulmonology**, v. 55, n. 10, p. 2565-2575, 2020.

YAN, R.; ZHANG, Y.; LI, Y.; XIA, L.; GUO, Y.; ZHOU, Q. Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. **Science**. v. 367, n. 6485, p. 1444-1448, 2020. doi: 10.1126/science.abb2762.

YAN, Z.-h et al. CD 137 is a Useful Marker for Identifying CD 4+ T Cell Responses to Mycobacterium tuberculosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 85, n. 5, p. 372-380, 2017.

YANG, Yongshi et al. The deadly coronaviruses: The 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China. **Journal of autoimmunity**, v. 109, p. 102434, 2020.

YE, Zheng et al. Chest CT manifestations of new coronavirus disease 2019 (COVID-19): a pictorial review. **European radiology**, v. 30, n. 8, p. 4381-4389, 2020.

YÜCE, Meral; FILIZTEKIN, Elif; ÖZKAYA, Korin Gasia. COVID-19 diagnosis—a review of current methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 172, p. 112752, 2021.

XIE, Jiajia et al. Characteristics of patients with coronavirus disease (COVID-19) confirmed using an IgM-IgG antibody test. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 10, p. 2004-2010, 2020.

ZAKI, A. M.; VAN BOHEEMEN, S.; BESTEBROER, T. M.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **The New England Journal of Medicine**. v. 367, n. 19, p.1814-20, 2012.

ZHAO, Qing et al. COVID-19 and cutaneous manifestations: a systematic review. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 34, n. 11, p. 2505-2510, 2020.

ZHAO, Yan et al. Longitudinal COVID-19 profiling associates IL-1RA and IL-10 with disease severity and RANTES with mild disease. **JCI insight**, v. 5, n. 13, 2020.

ZHANG, B.; ZHOU, X.; QIU, Y.; SONG, Y.; FENG, F.; FENG, J.; et al. Clinical characteristics of 82 cases of death from COVID-19. **PLoS ONE**. v. 15, n. 7 e0235458, p. 1-13. 2020.

ZHOU, Weilin; WANG, Wei. Fast-spreading SARS-CoV-2 variants: challenges to and new design strategies of COVID-19 vaccines. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2021.

ZHU, Na et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **New England journal of medicine**, 2020.

ZU, Z.Y.; JIANG, M.D.; XU, P.P. et al. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Perspective from China. **Radiology**. v. 296, n. 2, p. E15-E25. 2020.

ANEXOS

10. ANEXOS

ANEXO I - Parecer de Aprovação emitido pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley - UFPB

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE NO PADRÃO DE RESPOSTAS PATOGENICAS 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:

Factivei

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: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

**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: ____/____/____
____/____

ANEXO III – Questionário aplicado no recrutamento e para avaliação dos parâmetros clínicos e epidemiológicos dos voluntários da pesquisa.

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)

ANEXO IV – Comprovante do Depósito de Patente intitulada “PROCESSO DE POLIPEPTÍDEO ANTIGÊNICO DE CORONAVÍRUS DA SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE E SUA APLICAÇÃO”



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

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 Peticionamento Eletrônico em 23/03/2022 às 18:05, Petição 870220025047

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE POLIPEPTÍDEO ANTIGÊNICO DE CORONAVÍRUS DA SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE E SUA APLICAÇÃO

Resumo: A invenção se refere ao processo caracterizado por peptídeos antigênicos de coronavírus e sua aplicação. Especificamente, a invenção se refere a um polipeptídeo do vírus SARS-CoV-2 (SEQ ID NO: 1) visando à aplicação deste no preparo de potencial vacinal contra a doença COVID-19 e outras doenças infecciosas associadas, além da preparação de insumo para diagnóstico por detecção de SARS-CoV-2, ou preparação de medicamentos para o tratamento como antígeno de ligação a anticorpo neutralizante, tanto na medicina humana quanto veterinária.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

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

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 6**Nome:** BÁRBARA GUIMARÃES CSORDAS**CPF:** 99337789191**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Ficta:** Pesquisador**Endereço:** Rua Empresário João Valdeci Gonçalves, 821, Portal do Sol**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58046-515**País:** BRASIL**Telefone:** (67) 991 543614**Fax:****Email:** barbara.guima.csordas@gmail.com**Inventor 2 de 6****Nome:** TATJANA KEESEN DE SOUZA LIMA**CPF:** 97890472668**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Ficta:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Luzia Simões Bertolini, 101, Aeroclube**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58036-630**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 998 229995**Fax:****Email:** tat.keesen@cbiotec.ufpb.br**Inventor 3 de 6**

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

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

Nome: FERNANDO CÉZAR COMBERLANG QUEIROZ DAVIS DOS SANTOS

CPF: 11061732444

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Fielis: Estudante de Graduação

Endereço: Rua Bancário Enilson Lucena, 164, Bancários

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-360

País: BRASIL

Telefone: (83) 988 255562

Fax:

Email: fcezar14@gmail.com

Inventor 4 de 6

Nome: REPHANY FONSECA PEIXOTO

CPF: 09732965428

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Fielis: Doutorando

Endereço: Rua Hélio Rodrigues Ferreira, 200, Cuia

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58077-125

País: BRASIL

Telefone: (83) 981 041795

Fax:

Email: tanyfonseca01@gmail.com

Inventor 5 de 6

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

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

Nome: PEDRO HENRIQUE DE SOUSA PALMEIRA

CPF: 08920491461

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: Rua Jociana Telino, 370, Bancários

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58053-100

País: BRASIL

Telefone: (83) 998 151519

Fax:

Email: phopalmeira@gmail.com

Inventor 6 de 6

Nome: JOSÉ MARIA BARBOSA FILHO

CPF: 09857400434

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Elísio Jorge de Brito 29, Jardim Oceania

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58036-685

País: BRASIL

Telefone: (83) 988 290103

Fax:

Email: jbarbosa@itf.ufpb.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	00_Comprovante.pdf
Relatório Descritivo	01_Relatorio_descritivo.pdf
Reivindicação	02_Reivindicacoes.pdf
Desenho	03_Desenhos.pdf
Resumo	04_Resumo.pdf

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 23/03/2022 às 18:05, Petição 870220025647

APÊNDICES

11. APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo relacionado a dissertação aceito na revista *Scandinavian Journal of Immunology* (Fator de impacto: 2,256);

APÊNDICE B - Artigo não relacionado a dissertação, publicado na revista da Sociedade Brasileira de Medicina (Fator de impacto: 1,161);

APÊNDICE C – Artigo não relacionado a dissertação, publicado na revista *Lancet Infectious Diseases* (Fator de impacto: 19,864);

APÊNDICE D – Artigo não relacionado a tese publicado na revista *Parasitology Research* (Fator de impacto: 2,383);

APÊNDICE E - Artigo não relacionado a tese publicado na revista da *Science of the Total Environment* (Fator de impacto: 10,75);

APÊNDICE F - Artigo não relacionado a tese publicado na revista da *Microbes and Infection* (Fator de impacto: 9,57);

APÊNDICE G – Artigo não relacionado a tese publicado na revista *Cytokine* (Fator de impacto: 3,92);

APÊNDICE H – Artigo não relacionado a tese publicado na revista *Cytokine* (Fator de impacto: 3,92);

APÊNDICE I – Artigo não relacionado a tese publicado na revista *Human Immunology* (Fator de impacto: 2,21);

APÊNDICE J – Artigo não relacionado a tese publicado na revista *Tropical Medicine and Infectious Disease* (Fator de impacto: 3,71);

APÊNDICE K – Artigo relacionado a tese publicado na revista *Frontiers Immunology* (Fator de impacto: 8,78);

APÊNDICE L – Artigo relacionado a tese submetido na revista *Immunology* (Fator de impacto: 7,21);

APÊNDICE A

Received: 7 February 2018 | Accepted: 19 April 2018

DOI: 10.1111/aji.12668

HUMAN IMMUNOLOGY

WILEY **Immunology**

Dual immune effect of iNKT cells considering human cutaneous and visceral leishmaniasis: An example of cell plasticity according to different disease scenarios

B. M. Gois¹ | R. F. Peixoto¹ | B. L. L. Maciel² | J. A. S. Gomes³ |
F. L. A. A. de Azevedo⁴ | R. C. Veras⁴ | I. A. de Medeiros⁴ | T. C. S. de Lima Grisi⁵ |
D. A. M. de Araújo⁵ | L. P. G. do Amaral¹ | T. S. L. Keesen¹ 

¹Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

²Department of Nutrition, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil

³Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁴Research Institute for Drugs and Medicines, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁵Department of Biotechnology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

Correspondence

T. Keesen de Souza Lima, Laboratory of Immunology of Infectious Diseases of the Biotechnology Center of the Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

Email: tatiana.keesen@ciotec.ufpb.br

Abstract

Although the semi-invariant natural killer T cells (iNKT) are a small subpopulation of cells in the peripheral blood, they are presumed to play a role in early stages of infection against various pathogens, including protozoa. This work investigates the activation status and cytokine profile of iNKT cells during human *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* infection. We studied iNKT cells in patients with symptomatic active visceral leishmaniasis (AVL) (n = 8), patients with symptomatic active cutaneous leishmaniasis (ACL) (n = 13), negative endemic controls (NEC) (n = 6) and non-endemic controls (NonEC) (n = 6), with and without total *Leishmania* antigen stimulus (TLA). The number of iNKT cells in the peripheral blood of patients with ACL and AVL, unaltered in relation to control groups. Moreover, the iNKT cells from ACL showed a hyperactivation profile compared to patients with AVL. Additionally, TLA induced IFN- γ production in iNKT cells from patients with ACL, while in iNKT of patients with AVL, TLA induced a decrease in this cytokine. Higher IL-17 and IL-10 production by iNKT cells from patients with ACL were also observed compared to all other groups. There were no changes in iNKT IL-10-producing cells in AVL after TLA stimulation. However, TLA induced increase in IL-10 in iNKT cells in patients with ACL. These findings suggest that, although iNKT cells showed distinct profiles in patients with ACL and AVL, they play a dual role in immune modulation in both *Leishmania* infections.

1 | INTRODUCTION

NKT cells constitute a subpopulation of T cells that recognize glycolipid antigens presented by CD1d molecules.¹ Semi-invariant NKT (iNKT) cells are a major subset of these cells and they are effector cells, sharing

features with other conventional T lymphocytes.² They are unique in the response to infections because of their rapid release of IL-4, IFN- γ and TNF- α ^{3,4} and because they share features not only with Th1 and Th2 cells but also with Th17 cells.^{5,7} Human iNKT cells have been reported in peripheral blood, liver and in the bone marrow. In humans,² iNKT cells express a predominantly invariant TCR V α 24 J α 18 preferentially associated with V β 11.^{1,8}

B. de Gois Maciel and R. F. Peixoto are contributed equally to this work.

Scand J Immunol 2018; 97: 12668.
https://doi.org/10.1111/aji.12668

wileyonlinelibrary.com/journal/aji

© 2018 The Foundation for the Scandinavian Journal of Immunology | 1 of 9

APÊNDICE B



Rev Soc Bras Med Trop 50(1):19-26, January-February, 2017
doi: 10.1590/0037-8682-0419-2016

Major Article

Molecular and clinical epidemiological surveillance of dengue virus in Paraíba, Northeast Brazil

Isabel Cristina Guerra-Gomes^[1,12], Bruna Macêdo Gois^[1], Rephany Fonseca Peixoto^[1],
Camila Alves Oliveira^[2], Bruna Leal Lima Maciel^[4], Maria Izabel Ferreira Sarmiento^[5],
Anna Stella Cysneiros Pachá^[5], Josélio Maria Galvão Araújo^[3], Ian Porto Gurgel Amaral^[2]
and Tatjana Souza Lima Keesen^[1,12,13]

[1]. Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil. [2]. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil. [3]. Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil. [4]. Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil. [5]. Secretaria de Estado da Saúde da Paraíba, PB, Brazil.

Abstract

Introduction: Despite being the most prevalent arboviral disease worldwide, dengue has been neglected lately. However, recent epidemics of arboviruses such as Zika and chikungunya in locations throughout the world have alerted health authorities to these diseases. This study evaluated the incidence pattern of dengue, its clinical characteristics, and co-circulation of serotypes from 2007 to 2015 in Paraíba State, Northeast Brazil. **Methods:** Data on dengue cases from 2007 to 2015 were extracted from clinical reports of the National System for Notifiable Diseases [Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN)] of Brazil provided by the Paraíba Health Department. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assays for dengue serotypes were carried out on plasma samples obtained from patients with suspected dengue. The data were analysed using descriptive statistics. **Results:** According to clinical features, dengue fever ($n = 39,083$ (70.2%)) and dengue without warning signs ($n = 15,365$ (27.7%)) were the most common classifications of dengue. On RT-PCR, DENV 1 was the most commonly identified serotype (80.5%) in all years studied. Co-circulation of all four DENV serotypes was observed in 2013 and 2014. Furthermore, we observed an increase in dengue notifications in 2015, possibly due to the rise of Zika and chikungunya. **Conclusions:** Our findings support the hypothesis that co-circulation of the four DENV serotypes may be a reason for the increased prevalence of severe forms of dengue in the years studied. This study may contribute to directing research, health policy, and financial resources toward reducing poorly controlled epidemic diseases.

Keywords: DENV serotypes. Molecular epidemiology. Arboviruses.

INTRODUCTION

Dengue has been an endemic disease in Brazil for many decades¹; however, an unparalleled epidemic of diverse arboviruses, such as Zika and chikungunya, emerged as a new public health risk in 2015. Even though these arboviruses have some unique characteristics, they also share several clinical features that make them difficult to diagnose².

Among Brazilian states, Paraíba has a high prevalence of these arboviruses. Until 2015, there were no notification systems able to distinguish dengue from Zika and chikungunya cases. Currently, all cases are notified as suspected dengue and are only correctly classified after laboratory tests³. Molecular surveillance to differentiate these arboviruses is therefore

essential and should result in infections being correctly classified and assessment of the effectiveness of public health approaches, especially towards post-infection clinical outcomes.

Dengue virus (DENV) is one of the most common cause of morbidity and mortality⁴ and the most prevalent viral hemorrhagic fever in many tropical countries. It infects approximately 100 million people annually, causing epidemics in urban and peri-urban areas⁵. Southeast Asia has a particularly high disease burden; however, in the last two decades, Latin America and the Caribbean have also seen considerable expansion in case numbers⁶.

Dengue virus is a mosquito-borne virus of the Flaviviridae family and *Flavivirus* genus⁷. Its major vectors are *Aedes aegypti*, which prefers resting in sheltered dark areas inside houses⁸, and *Aedes albopictus*, which is not as well adapted to urban domestic environments, preferring the natural environment⁹.

The illness can be caused by any of the four DENV serotypes, DENV 1, DENV 2, DENV 3, and DENV 4⁷, and presents as

Corresponding author: Dra. Tatjana Souza Lima Keesen.
e-mail: tat.keesen@cbiotec.ufpb.br
Received 12 October 2016
Accepted 16 January 2017

APÊNDICE C

Correspondence

hospitals from September, 2011, to August, 2014. As the authors wrote, 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) became commercially available for Japanese children in February 2010, and it was incorporated into the routine immunisation schedule for children in April, 2013. Subsequently, 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) has replaced PCV7 since November, 2013.

We are concerned whether serotype replacement had been chronologically observed during the study period. Actually, based on the systematic literature review and pooled data analysis, the authors' group reported that serotype replacement occurred in adult pneumococcal pneumonia cases following the vaccination of children with PCV7 in Japan, although there was a significant decrease (-18.1%, 95% CI -24.6 to -11.5, $p < 0.001$) in the proportion of the PCV7-covered serotypes, there were significant increases in the proportions of serotypes covered by PCV13 but not by PCV7 (-9.9%, 3.3-16.4, $p = 0.003$) and serotypes covered by PPV23 but not by PCV7 (+9.4%, 2.6-16.2, $p = 0.007$).

It should be noted that, since June, 2014, the use of PCV13 for adults aged 65 years or older has been approved in Japan. Concerning the use of PCV13, the US Advisory Committee on Immunization Practices has recommended a dose of PCV13 followed by a dose of PPV23 with more than 1-year intervals between PCV13 and PPV23 for adults aged 65 years or older.²⁴ However, Japanese authorities of infectious diseases have not yet adopted this strategy and only the use of PPV23 is recommended, since the introduction of PCV7 and PCV13 in Japan was later than that of the USA and other countries.⁵ If chronological serotype replacement in Japan can be predicted to occur in a similar way as with other countries, the Japanese vaccine policy might be amended in the near future. We would be grateful if the authors could provide comments on how PCV13 should be incorporated

into the routine immunisation programme on the basis of their study results, since such an insight might also be useful for other countries.

EE reports personal fees from Daiichi Sankyo outside the submitted work. All other authors declare no competing interests.

*Tetsuya Tanimoto, Eiji Kurumi, Kanetaka Hosoda, Tamae Hamaki, Kenzo Takahashi
tanimoto@yahoo.co.jp

Navitas Clinic, Tokyo, Japan (TT, EK, KH, TH, KT); and Tokyo University Graduate School of Public Health, Tokyo, Japan (KT)

- 1 Suzuki M, Shoubhadrakul BG, Ichihara T, et al. Serotype-specific effectiveness of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against pneumococcal pneumonia in adults aged 65 years or older: a multicentre, prospective, non-negative design study. *Lancet Infect Dis* 2017; 17: 373-81.
- 2 Kozuh S, Suzuki M, Akiyoshi K, Morimoto K. Serotype replacement in adult pneumococcal pneumonia after the introduction of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine for children in Japan: a systematic literature review and pooled data analysis. *Jpn J Infect Dis* 2017; published online Mar 28. DOI: 10.1093/jids/jix006.311.
- 3 Tomaszek S, Bernice NM, Scowen C, et al. Use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine among adults aged ≥65 years: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014; 63: 822-25.
- 4 Kobayashi M, Bernice NM, Gierke R, et al. Intervals between PCV13 and PPV23 vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015; 64: 944-47.
- 5 The Japanese Association for Infectious Diseases. The Guideline for pneumococcal vaccination in adults aged 65 years or older (Japanese). 2015. <http://www.kansenshouko.jp/guidelines/65shakuV.html> (accessed April 7, 2017).

Guillain-Barré syndrome and arboviral infection in Brazil

Among the clinical manifestations associated with the recent Zika infection outbreak in South America and elsewhere are rash, conjunctivitis, Guillain-Barré syndrome (GBS) in exposed adults, and in the newborn so-called congenital Zika syndrome, especially microcephaly.² After accumulating epidemiological data

from the French Polynesia³ outbreak, attention has now focused on Zika infection as a trigger of GBS. The case for a specific, causal association between acute Zika infection and subsequent GBS was strongly made: 42 individuals were diagnosed with GBS, of whom all had Zika neutralising antibodies.

Annelies Wilder-Smith and colleagues² correctly highlight the public health threat posed by arboviral disease transmission beyond just Zika infection: South America shows co-circulation of several aedes mosquito-transmitted diseases, often with overlapping symptoms. In 2016, the National International Health Regulations Focal Point of Brazil notified PAHO and WHO of increased GBS, with 1708 cases registered during 2015. In the context of increased GBS cases in Brazil over the past 18 months, attention has focused on Zika as the driving infection.⁴ However, in a country with at least nine circulating pathogenic arboviruses, other viral infections could also be implicated. Previous case reports describe GBS following acute dengue infection.⁵ In the Paraíba region, we noted that most neurology-referred GBS cases during the height of the Zika virus crisis of 2016 did not necessarily follow acute Zika infections (table). During 2016, Paraíba experienced 9479 chikungunya and 1223 Zika acute cases, which were clinically notified and PCR-verified. Over this same period, there were 13 characterised GBS cases in the region, ten after chikungunya infection, two after dengue infection, and one after Zika infection. Chikungunya cases tended to show respiratory muscle involvement. Meanwhile in the Sergipe region, neurology referrals included a 72-year-old man with GBS who was diagnosed with acute chikungunya by PCR as well as a 22-year-old man who was PCR-positive for both chikungunya and Zika viruses and presented with ascending flaccid paralysis with encephalitis, sleepiness, and disorientation, with

Correspondence

Sex	Signs and symptoms during viral infection	Decrease in muscle power	Decreased muscle tone	Respiratory muscle involvement	Facial muscle involvement	Hospitalization	ZIKV/PCR	Serology, ChikV, DENV	Diagnosis	Outcome	
34	M	Fever, pain, exanthema, arthralgia	YES	YES	NO	NO	YES	NEG	ChikV IgM	GBS	Recovered
65	M	Fever, pain, exanthema, arthralgia	YES	YES	YES	YES	YES	NEG	ChikV IgM	GBS	Died
31	M	Fever, myalgia, chorioretinitis	YES	YES	YES	YES	YES	POS	NEG	GBS	Recovered
37	M	Fever, pain, exanthema, arthralgia	YES	YES	YES	YES	YES	NEG	ChikV IgM	GBS	Recovered
58	F	Fever, myalgia, pain, exanthema, arthralgia	YES	YES	NO	NO	YES	NEG	DENV IgM	GBS	Died
7	F	Fever, headache, vomiting	YES	YES	NO	NO	YES	NEG	ChikV IgG	GBS	Recovered
27	F	—	YES	YES	YES	NO	NO	NEG	ChikV Ig*	GBS	Recovered
26	F	Headache, vomiting, backpain	YES	YES	NO	NO	NO	NEG	DENV IgM	GBS	Recovered
58	F	Fever, myalgia, exanthema, arthralgia	YES	YES	YES	NO	YES	NEG	ChikV Ig*	GBS	Recovered
26	F	Headache, vomiting, backpain	YES	YES	NO	NO	YES	NEG	ChikV Ig*	GBS	Recovered
73	F	Myalgia, arthralgia	YES	YES	NO	YES	NO	NEG	ChikV Ig*	GBS	Recovered
47	F	Fever, pain, exanthema, arthralgia	YES	YES	YES	NO	NO	NEG	ChikV Ig*	GBS	Recovered

Note: ChikV, chikungunya virus (ChikV); Dengue (DENV), or Zika (ZIKV) infection. Chikungunya virus GBS often includes respiratory muscle involvement. The time between acute infection and GBS was longer and more variable following ChikV than following infections for ZIKV. *Cohort records across institutions in the USA indicated was IgM or IgG. GBS, Guillain-Barré syndrome.

Table. GBS cases in Paraíba, Brazil, after acute arboviral infection, by age in years

MRI revealing a hyperdense left parietal lesion.

The prevalent model of GBS aetiology is that the initial host antimicrobial response is through an innate, T cell-independent antibody repertoire recognising the glycans on lipooligosaccharides—these antibodies then bind to the glycans on nerve gangliosides, especially GM1 and GD1a gangliosides. Many unknowns remain in elucidating the differential glycobiology of GBS driven by different pathogens. Disease in this setting offers a window for characterisation of the association between different arbovirus triggers, different cross-reactive targets, and differential patterns of disease.

We declare no competing interests.

Tatjana Souza Lima Keiser,
Rogério P de Almeida,
Bruna Macêdo Gals,
Rephany Fonseca Patxot,
Anna Stella Cysneiros Pachá,
Fernanda Carolina Fernandes Vieira,
Marcelo Pakão, Rodrigo Carzaniga,
Rosemary J Boyton,
Daniel M Altmann

Immunology of Infectious Diseases Laboratory,
Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba,
Brazil (TSLK, BMS, R-P); Laboratório de Biologia

Molecular, Hospital Universitário, Universidade
Federal de Seropó, Acaju, São Il (RPA, M-P, RC);
Secretary of Health of Paraíba State, João Pessoa,
Paraíba, Brazil (AGP, RCV); and Department of
Medicine, Imperial College, St James's Hospital,
London W2 2BN, UK (DJG, DMA)

1. Peonias LG, Jamieson DJ, Powers AM, et al. Zikavirus. *N Engl J Med* 2016; **374**: 1532–43.
2. Cao-Lormeau VM, Blake A, Morn S, et al. Guillain-Barré syndrome outbreak associated with Zikavirus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* 2016; **387**: 1523–35.
3. Wilder-Smith A, Gubler DJ, Weaver SC, et al. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *Lancet Infect Dis* 2017; **17**: e101–06.
4. Assunção AQ, Silva MT, Assunção AP. Zikavirus-associated neurological disorders: a review. *Brain* 2016; **139**: 2122–30.
5. Fragoso MD, Gomes S, Brooks JJ, et al. Guillain-Barré syndrome and dengue fever: report on ten new cases in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2016; **74**: 1039–40.

HPV control and resistance in the Middle East and north Africa

We thank Murat Gültekin and Baki Akgöl, and we agree wholeheartedly with the fact that Islamic countries, and countries with more conservative sexual views based on religion in general,

should implement educational projects in government-organised programmes. As we mentioned in our original Correspondence,¹ the organisation of intervention policies based on awareness campaigns can be a very effective first step in the control of cervical cancer caused by HPV. However, a point that we would like to stress once more is that acceptance and implementation of these programmes, and in effect also vaccines, can be faced with difficulties because of stigmatisation that is based on religious and traditional values. One fact to keep in mind, is that using Turkey as a success story and example for the Middle East and north Africa (MENA) region at large can be difficult. For one, Turkey is not a traditional Islamic country, as was described in the letter by Gültekin and Akgöl, but rather a secular and stable progressive state in which HPV and its vaccination are becoming a hot medical topic² among the younger generation. However, the MENA region is very politically, culturally, and economically diverse and houses countries with the highest per capita incomes in the world while also being home to some of the most severely poverty-stricken

APÊNDICE D

Parasitology Research
<https://doi.org/10.1007/s00436-019-06403-w>

TREATMENT AND PROPHYLAXIS - ORIGINAL PAPER



Biological activity of Morita-Baylis-Hillman adduct homodimers in *L. infantum* and *L. amazonensis*: anti-*Leishmania* activity and cytotoxicity

Juliana da Câmara Rocha^{1,2} · Klinger Antonio da Franca Rodrigues³ · Patrícia Lima do Nascimento Nêris¹ · Larisse Virgolino da Silva² · Fernanda Silva Almeida⁴ · Viviane Silva Lima² · Raphany Fonseca Peixoto² · Juliana da Câmara Rocha⁵ · Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo⁶ · Robson Cavalcanti Veras⁶ · Isaac Almeida de Medeiros⁶ · Wagner André Vieira da Silva⁷ · Claudio G. Lima-Junior⁷ · Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos⁷ · Ian Porto Gurgel do Amaral² · Márcia Rosa de Oliveira⁸ · Tatjana de Souza Lima Keesen²

Received: 11 October 2018 / Accepted: 19 July 2019
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

This study is a report on the anti-*Leishmania* activity of Morita-Baylis-Hillman (MBH) homodimers adducts against the promastigote and axenic amastigote forms of *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and on the cytotoxicity of these adducts to human blood cells. Both studied homodimers, MBH 1 and MBH 2, showed activity against the promastigote forms of *L. infantum* and *L. amazonensis*, which are responsible for visceral and cutaneous leishmaniasis, respectively. Additionally, the homodimers presented biological activity against the axenic amastigote forms of these two *Leishmania* species. The adducts exhibited no hemolytic activity to human peripheral blood mononuclear cells or erythrocytes at the tested concentrations and achieved higher selectivity indices than amphotericin B. Evaluation of cell death by apoptosis revealed that the homodimers had better apoptosis/necrosis profiles than amphotericin B in the promastigote forms of both *L. infantum* and *L. amazonensis*. In conclusion, these Morita-Baylis-Hillman adducts had anti-*Leishmania* activity in an in vitro model and may thus be promising molecules in the search for new drugs to treat leishmaniasis.

Keywords *Leishmania* spp. · Anti-*Leishmania* activity · Treatments · Morita-Baylis-Hillman

Section Editor: Sarah Hendricks

Tatjana de Souza Lima Keesen
ta.keesen@cbiotec.ufpb.br

¹ Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58051-970, Brazil

² Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58059-900, Brazil

³ Coordenação do curso de Medicina, Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI 65202-020, Brazil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB 58429-500, Brazil

⁵ Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN 59078-970, Brazil

⁶ Instituto de Pesquisa de Medicamentos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58059-900, Brazil

⁷ Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba, Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba Campus I, João Pessoa, Paraíba 58059-900, Brazil

⁸ Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB 58059-900, Brazil

Published online: 07 August 2019

Springer

APÊNDICE E

Science of the Total Environment 617 (2018) 794–805



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

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



Correlation of dengue incidence and rainfall occurrence using wavelet transform for João Pessoa city

Celso Augusto Guimarães Santos ^{a,*}, Isabel Cristina Guerra-Gomes ^b, Bruna Macêdo Gois ^b,
Rephany Fonseca Peixoto ^b, Tatjana Souza Lima Keesen ^b, Richard Marques da Silva ^c

^a Federal University of Paraíba, Department of Civil and Environmental Engineering, 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil

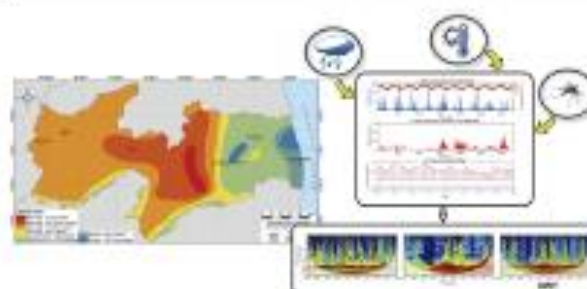
^b Federal University of Paraíba, Department of Molecular and Cellular Biology, 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil

^c Federal University of Paraíba, Department of Geosciences, 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil

HIGHLIGHTS

- Dengue incidence is strongly linked by specific rainfall frequencies.
- Greater time-lag association in the third month after the onset of rainfall.
- Rainfall and dengue incidence time series have a weak correlation at lag-0.
- Identification of rainfall lags might be useful predictors of dengue incidence.
- Cross-wavelet analysis identified the periods when the time series were in-phase.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 March 2018

Received in revised form 20 July 2018

Accepted 2 August 2018

Available online 22 August 2018

Editor: Scott Sheridan

Keywords:

Dengue

Brazil

GIS

Rainfall

TRMM

Wavelet

ABSTRACT

Dengue, a re-emerging disease, is one of the most important viral diseases transmitted by mosquitoes. In this study, 55,580 cases of dengue between 2007 and 2015 were reported in Paraíba State, among which, 308 were reported in João Pessoa city, with peaks in 2015, 2011 and 2013. Weather is considered to be a key factor in the temporal and spatial distribution of vector-transmitted diseases. Thus, the relationship between rainfall occurrence and dengue incidences reported from 2007 to 2015 in João Pessoa city, Paraíba State, Brazil, was analyzed by means of wavelet transforms, when a frequency analysis of both rainfall and dengue incidence signals was performed. To determine the relationship between rainfall and the incidence of dengue cases, a simple cross-correlation function was performed to identify lags in the rainfall and temperature variables that might be useful predictors of dengue incidence. The total rainfall within 90 days presented the most significant association with the number of dengue cases, whereas temperature was not found to be a useful predictor. The correlation between rainfall and the occurrence of dengue cases showed that the number of cases increased in the first few months after the rainy season. Wavelet analysis showed that in addition to the annual frequency presented in both time series, the dengue time series also presented the 3-year frequency from 2010. Cross-wavelet analysis revealed that such an annual frequency of both time series was in phase; however, after 2010, it was also possible to observe 45° up phase arrows,

* Corresponding author.

E-mail address: celso@uepb.edu.br (C.A.G. Santos).

APÊNDICE F

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 Góis ^{a,1}, Rephany Fonseca Peixoto ^{a,1}, Isabel Cristina Guerra-Gomes ^b,
Pedro Henrique de Sousa Palmeira ^a, Cinthia Nóbrega de Sousa Dias ^a,
Josélio Maria Galvão Araújo ^c, Robson Cavalcante Veras ^d, Isaac 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 Disease 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 Genes and Infectious Disease Laboratory of Post-Graduation Program on Renal Biology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 59078-900, 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 10 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^{hi}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 CD38, 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 pro-inflammatory response to stop the viral replication [4]. The chronic stages are characterized by intense cell influx and inflammatory

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

E-mail address: tatjanaslima@uepb.br (T.S.L. Keesen).

¹ These authors contributed equally.

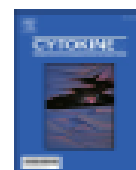
APÊNDICE G

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

Keywords:
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 bDMARDs such as JAK inhibitors and tsDMARDs 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 synoviocytes 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 kinase (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.cytok.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 H

Cytokine 157 (2022) 155971



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

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

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

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

^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 killer
Interferon
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 cytotoxic granules depleted by granzyme B and perforin. Compared to HC, PBMCs from mild CoV presented higher IL-67 and TIM-3 production after Pool CoV-2 and Pool Spike CoV-2 peptide 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 composition and IFN- α production by PBMCs. However, in severe CoV, Pool Spike CoV-2 reduced the composition 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; SBA, Staphylococcal enterotoxin B from *Staphylococcus aureus*; SSC-A, Side Scatter; FSC-A, Forward Scatter.

* Corresponding author.

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

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

Received 4 May 2022; Received in revised form 11 July 2022; Accepted 10 July 2022

Available online 23 July 2022

1043-4666/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

APÊNDICE I

ARTICLE IN PRESS

Human Immunology xxx (xxxx) xxx



Contents lists available at ScienceDirect



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



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, Cinthia 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 Paraíba Biology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal 59074-970, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 September 2021

Revised 16 December 2021

Accepted 8 January 2022

Available online xxx

Keywords:

Putnergic response

Costimulatory receptor

Arbovirus

Arthrogenic alphasvirus

Cytokines

ABSTRACT

Chikungunya is an important mosquito-borne disease caused by the arthrogenic 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 ectonucleotidases 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 arthrogenic 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 costimulatory 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, analysis of Mean Fluorescent Intensity (MFI) demonstrated a reduced density of LAMP, Perforin and Granzyme B compared to the healthy control. Finally, reduced levels of the ectonucleotidases 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 arthrogenic 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 Alphavirus 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]. Arthritis 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 a animal model [9].

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

* Corresponding author.

E-mail address: tackewen@chic.ufpb.br (T.S.L. Keesen).

APÊNDICE J



Tropical Medicine and
Infectious Disease



Article

Characterization of Regulatory T Cells in Patients Infected by *Leishmania Infantum*

Rephany E. Peixoto ¹, Bruna M. Gois ¹, Marineuma Martins ¹, Pedro Henrique S. Palmeira ¹, Juliana C. Rocha ¹, Juliana A. S. Gomes ², Fátima L. A. A. Azeredo ³, Robson C. Veras ³, Isaac A. de Medeiros ³, Teresa C. S. L. Grisi ⁴, Demétrius A. M. de Araújo ⁴, Ian E. G. Amaral ¹ and Tatjana S. L. Keesen ^{1,*}

¹ Immunology of Infectious Diseases Laboratory, Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil

² Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Pampulha, Belo Horizonte 31270-900, Brazil

³ Research Institute for Drugs and Medicines, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil

⁴ Department of Biotechnology, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil

* Correspondence: tat.kaseen@debiol.ufpb.br; Tel.: +55-(81)-3216-7371

Abstract: High IL-10 levels are pivotal to parasite survival in visceral leishmaniasis (VL). Antigenic stimuli induce IL-10 expression and release of adenosine by CD39/CD73. Due their intrinsic ability to express IL-10 and produce adenosine from extracellular ATP, we evaluated the IL-10, CD39, and CD73 expression by Regulatory T cells (Treg) correlated with VL pathology. Using flow cytometry, Treg cells was analyzed in peripheral blood samples from VL patients (in the presence and absence of *Leishmania infantum* soluble antigen (SLA)) and healthy individuals (negative endemic control—NEC group), without any treatment. Additionally, IL-10 levels in leukocytes culture supernatant were measured in all groups by ELISA assay. VL patients presented more Treg frequency than NEC group, independently of stimulation. ELISA results demonstrated that SLA induced higher IL-10 expression in the VL group. However, the NEC group had a higher Treg IL-10⁺ compared to the VL group without stimulation and SLA restored the IL-10 in Treg. Additionally, an increase in Treg CD73⁺ in the VL group independently of stimuli compared to that in the NEC group was observed. We suggest that Treg are not the main source of IL-10, while the CD73 pathway may be an attempt to modulate the exacerbation of immune response in VL disease.

Keywords: regulatory T cells; human leishmaniasis; VL immunomodulation



Citation: Peixoto, R.E.; Gois, B.M.; Martins, M.; Palmeira, P.H.S.; Rocha, J.C.; Gomes, J.A.S.; Azeredo, F.L.A.A.; Veras, R.C.; de Medeiros, I.A.; Grisi, T.C.S.L.; et al. Characterization of Regulatory T Cells in Patients Infected by *Leishmania Infantum*. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2023**, *8*, 18. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8010018>

Academic Editor: John Pezza

Received: 26 November 2022

Revised: 14 December 2022

Accepted: 23 December 2022

Published: 27 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Leishmania sp. is an intracellular pathogen that mainly infects phagocytes, causing leishmaniasis, an infectious anthroponotic disease reported as the second leading cause of death from parasitic infections worldwide. *Leishmania infantum* causes the most severe clinical form of the disease called visceral leishmaniasis (VL). Main clinical symptoms are fever, hepatosplenomegaly, and pancytopenia [1,2].

Pathogenesis of VL is characterized by the generation of a favorable microenvironment for the survival of protozoa and disease progression, mainly due to the suppression of a Th1 profile response and activation of IFN-γ-responsive macrophages mediated by the high production of regulatory cytokines, particularly IL-10 [3–5]. IL-10 plays a central role in the course of the immune response present in VL, contributing to the chronicity of the disease through mechanisms that compromise the migration and activation of leukocytes mediated by metabolites such as prostaglandins E and J and adenosine [6–9]. Adenosine, specifically produced through the hydrolysis of extracellular ATP by ectonucleotidases CD39/CD73, also contributes to the attenuation of the inflammatory response in leishmaniasis. It mainly reduces pro-inflammatory cytokine production, down-regulates of nitric oxide, and induces of IL-10 [10,11]. Interestingly, higher CD39 expression by Tregs could point to its better

APÊNDICE K



OPEN ACCESS

EDITED BY
Gavin Rieck,
Heinrich Heine University of Düsseldorf,
Germany

REVIEWED BY
Antonio C. R. Valente,
Federal University of Pará, Brazil
Devendra Kumar,
University of Nebraska Medical Center,
United States

*CORRESPONDENCE
Tatjana Souza Lima Keesen
✉tatkeesen@ufpa.br

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Viral Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 24 October 2022
ACCEPTED 22 February 2023
PUBLISHED 08 March 2023

CITATION
de Souza Palmeira PH, Peixoto RF,
Csordas BG, de Medeiros IS,
de Azevedo Fátima, Veras RC, Janeiro D,
Amadori PG and Keesen TS (2023)
Differential regulatory T cell signature after
recovery from mild COVID-19.
Front Immunol 14:1076922.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1076922

COPYRIGHT
© 2023 de Souza Palmeira, Peixoto, Csordas,
de Medeiros, de Azevedo, Veras, Janeiro,
Amadori and Keesen. This is an open-access
article distributed under the terms of the
Creative Commons Attribution License
(CC BY). The use, distribution or
reproduction in other forms is permitted
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Differential regulatory T cell signature after recovery from mild COVID-19

Pedro Henrique de Sousa Palmeira¹,
Rephany Fonseca Peixoto¹, Bárbara Guimarães Csordas²,
Isac Almeida de Medeiros²,
Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo³,
Robson Cavalcante Veras⁴, Daniele Idalino Janeiro⁵,
Ian P.G. Amaral⁶ and Tatjana Souza Lima Keesen^{1*}

¹Postgraduate program in Physiology Science, Immunology Laboratory of Infectious Diseases,
Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Pará, João Pessoa,
Paraná, Brazil; ²Postgraduate program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Immunology
Laboratory of Infectious Diseases, Federal University of Pará, João Pessoa, Paraná, Brazil;

³Research Institute for Drugs and Medicines, Federal University of Pará, João Pessoa,
Paraná, Brazil; ⁴Biotechnology Graduate Program, Immunology Laboratory of Infectious Diseases,
Federal University of Pará, João Pessoa, Paraná, Brazil; ⁵Immunology Laboratory of Infectious
Diseases, Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Pará, João Pessoa,
Paraná, Brazil

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is characterized by a range of symptoms in which host immune response have been associated with disease progression. However, the putative role of regulatory T cells (Tregs) in determining COVID-19 outcomes has not been thoroughly investigated. Here, we compared peripheral Tregs between volunteers not previously infected with SARS-CoV-2 (healthy control (HC)) and volunteers who recovered from mild (Mild Recovered) and severe (Severe Recovered) COVID-19. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were stimulated with SARS-CoV-2 synthetic peptides (Pool Spike CoV-2 and Pool CoV-2) or staphylococcal enterotoxin B (SEB). Results of a multicolor flow cytometric assay showed higher Treg frequency and expression of IL-10, IL-17, perforin, granzyme B, PD-1, and CD39/CD73 co-expression in Treg among the PBMC from the Mild Recovered group than in the Severe Recovered or HC groups for certain SARS-CoV-2 related stimulus. Moreover, Mild Recovered unstimulated samples presented a higher Tregs frequency and expression of IL-10 and granzyme B than did that of HC. Compared with Pool CoV-2 stimuli, Pool Spike CoV-2 reduced IL-10 expression and improved PD-1 expression in Tregs from volunteers in the Mild Recovered group. Interestingly, Pool Spike CoV-2 elicited a decrease in Treg IL-17⁺ frequency in the Severe Recovered group. In HC, the expression of latency-associated peptide (LAP) and cytotoxic granule co-expression by Tregs was higher in Pool CoV-2 stimulated samples. While Pool Spike CoV-2 stimulation reduced the frequency of IL-10⁺ and CTLA-4⁺ Tregs in PBMC from volunteers in the Mild Recovered group who had not experienced certain symptoms, higher levels of perforin and perforin⁺granzyme B⁺ co-expression by Tregs were found in the Mild Recovered group in volunteers who had experienced dyspnea. Finally, we found differential expression of CD39 and CD73 among volunteers in the Mild Recovered group between those who had and had not experienced musculoskeletal pain. Collectively, our study suggests that changes in

APÊNDICE L

Volunteers recovered from mild COVID-19 orchestrate a remarkable memory T cell response

Running Title: Heterogeneous response of memory T cells subsets in COVID-19.

Rephany Fonseca Peixoto¹, Pedro Henrique de Sousa Palmeira¹, Bárbara Guimarães Csordas², Isac Almeida de Medeiros⁴, Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo⁴, Robson Cavalcante Veras⁴, Daniele Janebro⁴, Ian P.G. do Amaral³, Tatjana Souza Lima Keesen⁵.

¹Postgraduate 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.

²Postgraduate program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Immunology Laboratory of Infectious Diseases, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil.

³Biotechnology Graduation Program, Immunology Laboratory of Infectious Diseases, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil.

⁴Research Institute for Drugs and Medicines, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil.

⁵Immunology Laboratory of Infectious Diseases, Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba 58051-900, Brazil, tat.keesen@cbiotec.ufpb.br.

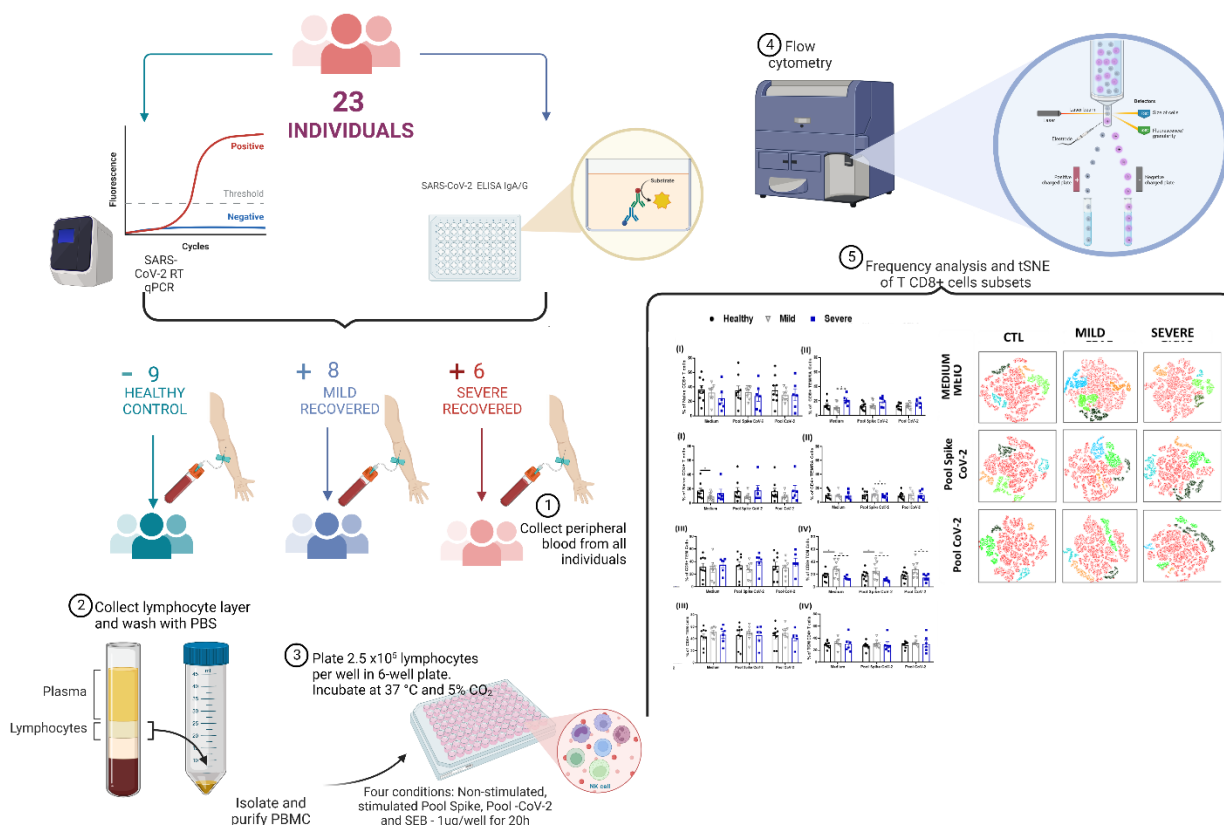
Correspondence should be addressed to Tatjana S. L. Keesen at tat.keesen@cbiotec.ufpb.br.

ABSTRACT

Memory T cells are essential for long-term immune protection in COVID-19 convalescents. In this study, naïve, effector memory that reexpresses CD45RA (TEMRA), effector memory (TEM), and central memory (TCM) CD4⁺ and CD8⁺ T cells obtained from unvaccinated COVID-19 survivors were exposed to SARS-CoV-2 Epitope Pools (EP) and evaluated by cytometry flow. Stimuli by EP (Pool Spike CoV-2 and Pool CoV-2) elicited a higher frequency of CD8⁺ TCM cells and CD4⁺ TEMRA cells in the recovered mild group. CD4⁺ and CD8⁺ TCM and TEM cells showed heterogeneity in the expression of CD137 and CD69 activation markers between mild and severe recovered groups. Also, we observed a predominance in CD137 expression by naïve CD4⁺ and CD8⁺ cells, TCM, and TEM from the mild recovered group when stimulated with antigenic pools. Additionally, a higher CD69 expression from the severe recovered group by CD4⁺ and CD8⁺ TEMRA cells was observed under SARS-CoV-2 Epitope Pools. Furthermore, CD4⁺ and CD8⁺ naïve, TCM, and TEM cell subsets from recovered mild volunteers had higher expression of TNF- α while the expression partner of IFN- γ , IL-10, and IL-17 point to an antiviral signature by TEMRA CD8⁺ cells. Our findings highlight the functional capacities of each memory T cell subpopulation from recovered COVID-19 patients during SARS CoV-2 antigenic reexposure.

Keywords: Immunological Memory. Central memory T cells. Effector memory T cells. SARS-CoV-2 infection. COVID-19.

Graphical Abstract



“Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com/)”

1 Introduction

SARS-CoV-2, the etiologic agent of a potentially severe acute respiratory infection called Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), has become the target of numerous studies around the world since it was first reported in December 2019 in Wuhan, China [1,2]. Such relevance is due to its high transmission capacity and global spread, which has caused a pandemic over the past two years, responsible for about 671 million cases and 6.84 million deaths from infection by its different variants worldwide [1,3,4].

COVID-19 clinical manifestations usually range from an asymptomatic profile that can evolve to respiratory failure associated with more severe disease cases [5,6,7]. The broad spectrum of clinical forms mentioned above is justified since SARS-CoV-2 is characterized as a cytopathic virus capable of inducing cellular pyroptosis processes, which exacerbates inflammation in the respiratory epithelium by attacking cytokines and innate recognition mechanisms through pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) [8, 9, 10, 11]. At the same time, CD8⁺ T cells have a cytotoxic effector phenotype characterized by high expression levels of molecules associated with potent cytotoxic functions, such as IFN- γ , granzyme B, perforin, and CD107a in the acute phase of the disease, as well as memory

subpopulations that are generated mainly in patients recovered from SARS-CoV-2 infection [12]. The presence of memory CD8⁺ T cells in COVID-19 was evidenced by the observation that convalescent individuals had protection against reexposure to the virus, and that this protection was not observed in the absence of CD8⁺ T cells [13,14].

CD4⁺ T cells show an increase in the expression of activation and/or exhaustion markers similar to that observed in CD8⁺ T cells, in addition to having the ability to differentiate into a variety of helper cells and effector cells, with the ability to instruct the B cells, assist CD8⁺ T cells, recruit innate cells, have direct antiviral activities, facilitate tissue repair and generate immune memory [15]. Additionally, it is known that patients with CD4⁺ cells with a prominent IFN γ -producing Th1 response commonly develop mild/moderate disease and have accelerated viral clearance. A Th17 phenotype is also cited as a contributor to the immune response established by CD4⁺ T cells in COVID-19 patients. In addition, these can also differentiate into a T CD4⁺ follicular (Tfh) phenotype, which assists in developing long-term humoral immunity [16, 17]. Thus, there is a correlation between the specific responses of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and the respective stages of the infection, suggesting the primordial role of these cell subtypes in antiviral surveillance [18].

The relevance of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in COVID-19 becomes clear when we consider that these are long-lived cells capable of producing specific antigens, which is particularly important for defense against new variants such as Omicron (B.1.1.529). [19, 20, 21, 22]. In addition, it should be noted that subtypes of CD4⁺ and CD8⁺ T cells can be distinguished based on CD45RA and CCR7 expression, as well as their effector functions: proliferative and migratory naive T cells (CD45RA⁺CCR7⁺), effector memory T cells that reexpress the CD45RA (TEMRA, CD45RA⁺CCR7⁻), central memory T cells (TCM, CD45RA⁻CCR7⁺) and effector memory T cells (TEM, CD45RA⁻CCR7⁻) [23, 24, 25].

This study aimed to investigate immunomodulatory mechanisms mediated by CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte subtypes in patients who recovered from mild and severe forms of COVID-19. In this context, to evaluate the CD4 and CD8 memory profiles, cytometric analyses were performed in PBMC samples from healthy individuals and recovered patients before vaccination before and after stimuli by antigenic peptides of SARS-CoV-2. This study aimed to investigate immunomodulatory mechanisms mediated by CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte subtypes in patients who recovered from mild and severe forms of COVID-19, in the search for markers of differential responses in these clinical forms of the disease.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Ethics Statement

All experiments complied with the relevant regulations, institutional guidelines, and ethical standards of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all the enrolled volunteers. This study was approved by the National Commission of Research Ethics (certificate CAAE: 31354720.0.0000.5188).

2.2 Patients recruitment

This study was conducted from May 2020 to May 2021 in Paraíba, Northeast Brazil. The study began when the SARS-CoV-2 virus of the original lineage was still circulating and continued with the alpha and gamma variants being first detected at the end of 2020 (between October and December). This study ended in May 2021, a few days after the delta variant was identified for the first time in Brazil (April 26, 2021) [26, 27]. It is worth noting that all individuals recruited in this research had not been vaccinated with any dose of the COVID-19 immunizations available in Brazil. Twenty-three volunteers were assigned into one of the groups: health individuals (HC, n=9), mild COVID-19 (n=8) or severe COVID-19 (n=6). The SARS-CoV-2 diagnosis was based on RT qPCR for COVID-19 during the acute phase and IgG serological tests (Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 assay, Perkin Elmer Company) after recovery. The recovered COVID-19 volunteers were assigned to either the Mild Recovered (patients who did not need hospitalization, n = 8) or Severe Recovered group (patients who presented severe pulmonary symptoms and required hospitalization, n = 6). For epidemiologic purposes, severe dyspnea, respiratory rate of 30 or more breaths per minute, blood oxygen saturation of 93% or less, and infiltrates in more than 50% of the lung were considered severe symptoms of COVID-19 [28]. In addition, a healthy control group (HC, n = 9) was included. Volunteers in the HC group were reportedly asymptomatic for the last 10 weeks, were negative by certified SARS-CoV-2 antibody test (Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 assay Perkin Elmer Company) and had a negative RT qPCR test for SARS-CoV-2. Whole blood for flow cytometry analysis was collected in sodium heparin-coated vacutainers tubes and gently agitated. The blood samples were processed on the day of collection.

2.3 RT qPCR assay

Quantitative real-time PCR (RT qPCR) was performed as described previously [29] at the time of sample collection for flow cytometry experiments. This procedure was essential to ensure that no SARS-CoV-2 infection or reinfection occurred in the HC and recovered volunteers. The RNA isolated from nasopharyngeal or oropharyngeal swabs was extracted (QIAprep& Viral RNA UM Kit, QIAGEN, USA) and amplified by one-step RT qPCR (SARS-CoV-2 N1+N2 Assay Kits, QIAGEN, USA).

2.4 Design and Preparation of SARS-CoV-2 Epitope Pools (EP)

Two EP were prepared as described elsewhere [30]: Pool CoV-2 contained peptides from the spike and non-spike proteins, whereas Pool Spike CoV-2 contained peptides from the spike protein only.

2.5 Isolation of plasma

Plasma samples were collected after centrifugation of whole blood at $400 \times g$ for 10 min at room temperature (25 °C). The undiluted plasma was then transferred to cryotubes, aliquoted, and stored at -80 °C for subsequent analysis.

2.6 Isolation of PBMCs

PBMC from HC and volunteers who had recovered from COVID-19 were obtained from heparinized venous blood using density gradient centrifugation (Ficoll-PaqueTM Plus, GE Healthcare, Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA). PBMC were centrifuged for 40 min at $400 \times g$ and washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) before counting. PBMC were maintained in RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) supplemented with antibiotics (penicillin, 200 U/mL; streptomycin, 0.1 mg/mL), 1 mM L-glutamine (1 mM), and 10% heat-inactivated AB Rh+ human serum (Sigma-Aldrich), hereafter referred to as medium. Cultures were set up at a concentration of 2.5×10^5 cells in 96-well plates in the presence or absence of SARS-CoV-2 antigens. The cells were incubated under 5% CO₂ in an incubator at 37 °C for 16 h. Next, brefeldin-A (1 mg/mL, Sigma-Aldrich) was added and the samples were incubated under 5% CO₂ in an incubator at 37 °C for 4 h.

2.7 Flow cytometry assay

Briefly, freshly isolated PBMC were plated at 2.5×10^5 cells per well in a 96-well U-bottom plate. Cocktails of Antibodies for extracellular staining were added and incubated for 30 min at 4 °C. For extracellular staining, the following antibodies from BD Biosciences were used: IgG isotypes control antibodies IgG3-FITC (clone J606, mouse BALB/c IgG₃, κ , cat. 555578) and IgG1-PE-Cy-7 (clone O4-46, mouse IgG₁, κ , cat. 561316), extracellular APC conjugated anti-CD3 (clone UCHT1, mouse BALB/c IgG₁, κ , cat. 555335), PERCP conjugated anti-CD8 (clone SK1, Mouse BALB/c IgG₁, κ , cat: 557871), FITC conjugated anti-CD45RA (clone: HI100, Mouse IgG2b, κ , cat. 555488), APC conjugated anti-CD45RA (clone: HI100, Mouse IgG2b, κ cat. 550855), PE-conjugated anti-CCR7 (Clone: 150503, Mouse IgG2a, cat. 560765), PECy7 conjugated anti-CCR7 (Clone: 3D12, Rat IgG2a, κ , cat.: 557648), FITC conjugated anti-CD69 (clone: FN50, Mouse IgG₁, κ , cat. 555530), APCCy7 conjugated anti-CD-4 (clone RPA-T4, Mouse IgG₁, κ , cat: 347314) and APC conjugated anti-CD-137 (Clone: 4B4-1, mouse BALB/c IgG₁, κ , cat. 550890). After incubation with antibodies for 30 min at 4 °C, the cells were washed with 150 μ L of PBS. The plate was centrifuged (8 min, $244 \times g$, 4 °C), the supernatant was removed, and 100 μ L of 4% formaldehyde and 100 μ L of PBS were added to the wells. The plate was incubated at room temperature (25°C) for 20 min to fix the extracellular staining. After centrifugation (8 min, $244 \times g$, 4 °C), the supernatant was discarded, and the samples were re-washed with 150 μ L of PBS. The plate was centrifuged yet again (8 min, $\times g$, 4 °C), and the supernatant was discarded. For intracellular staining, the cells were permeabilized with 150 μ L of permeabilization buffer (0.5% w/v bovine serum albumin (BSA) and 0.5% w/v saponin in PBS) for 10 min at room temperature (25 °C). After centrifugation (8 min, $244 \times g$, 4 °C), the supernatant was removed, and intracellular staining was performed. For intracellular staining, the following antibodies from Thermo Fisher Scientific and BD Bioscience were used: PE-conjugated anti-IL-10 (Clone: JES3-9D7, Rat IgG₁, cat. 559337), PE-conjugated anti-IL-17 (Clone: SCPL1362, Mouse IgG₁, κ , cat. 560436), PE-conjugated anti-TNF- α (Clone: MAb11, Mouse IgG₁, κ , cat. 554513) and PECy7 conjugated anti-IFN- γ (Clone: B27, Mouse IgG₁, κ , cat. 557643). All antibodies were used according to the manufacturer's instructions. The plate was then incubated for 45 min at room temperature (25 °C) and 150 μ L of permeabilization buffer was added. After centrifugation (8 min, $244 \times g$, 4 °C) the supernatant was removed. Finally, 200 μ L of wash B (PBS/BSA) was added, and the samples were transferred to fluorescence-activated cell sorting (FACS) tubes and maintained at 4 °C.

At least 70,000 gated events were acquired using FACS CANTO II (BD Biosciences) and analyzed using the FlowJo v.10.8 software (BD, Ashland - USA).

2.8 Flow Cytometry data analysis

All parameters evaluated on memory T cells were analyzed using FlowJo software v.10.8 (BD, Ashland - USA). Limits for the quadrant markers were set based on negative populations (cells) and isotype controls. The analysis strategy was as follows: for all the cell populations studied, lymphocytes were identified through the graph of size versus granularity due to prior knowledge about the characteristics of these cells. Then, the subpopulations of memory and naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells were analyzed for the expression of surface markers and intracellular cytokines. The analysis strategy used to identify memory and naive subtypes of CD4⁺ and CD8⁺ T cells started with the selection of total lymphocytes, followed by identifying the CD4⁺ or CD8⁺ subpopulation through the size graph versus CD4 or CD8. Then, subpopulations of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells (TN), CD4⁺ and CD8⁺ central memory T cells (TCM), CD4⁺ and CD8⁺ effector memory T cells (TEM), and CD4⁺ and CD8⁺ effector memory T cells that reexpress CD45RA (TEMRA) were then identified, using the CCR7 versus CD45RA plot. Finally, the analysis of the respective surface markers and cytokines was performed within the subpopulations of TN (CD4⁺/CD8⁺CCR7⁺CD45RA⁺), TCM (CD4⁺/CD8⁺CCR7⁺CD45RA⁻), TEM (CD4⁺/CD8⁺CCR7⁻CD45RA⁻) and TEMRA (CD4⁺/CD8⁺CCR7⁻CD45RA⁺) (Figure 1A).

2.9 Statistical analysis

Multiple comparisons were performed using two-way ANOVA and Tukey's post-hoc test or one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test. In addition, if the data were not normally distributed, Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons test was performed. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.4.3.

3 RESULTS

3.1 Characteristics of HC, Mild Recovered, and Severe Recovered volunteers

For this study, we recruited 23 volunteers and distributed them into three groups. In the HC group, 9 volunteers (4 male and 5 female) with a mean age of 37.22 (± 9.17) were

enrolled. The Mild Recovered group included 8 volunteers (3 male and 5 female) with a mean age of 34.75 (± 8.29). Finally, 6 volunteers were enrolled in the Severe Recovered group (4 male and 2 female) with a mean age of 38.83 (± 7.02) (Table 2–4). No significant differences in age were found between the groups. Most volunteers who experienced mild COVID-19 reported headaches, runny noses, and fatigue (Table 3). All volunteers in the severe recovery group experienced pulmonary infiltration, low oxygen saturation and headache, whereas almost all had high fever, tachypnea and fatigue (Table 4). Regarding comorbidities, obesity was a significant chronic disease observed among 50% of the recovered COVID-19 cases.

Finally, volunteers were asked to self-identify among the following ethnic–racial classifications: white, brown, black, yellow (Asian), and indigenous (Native American). Volunteers who self-classified as brown and white comprised 47.82% and 43.48%, respectively, whereas those of black and indigenous self-classification comprised 4.34% each. Thus, the demographic of the HC group was white (66.66%), brown (22.22%), and indigenous (11.11%); that of the Mild Recovered group was brown (75%) and white (25%), whereas that of the Severe Recovered group was brown (50%), white (33.33%), and black (16.66%). The demographic and clinical details of the volunteers are shown in Tables 2–4.

Table 2. Gender, age and ethnic-racial self-classification of healthy control volunteers (HC)

#Code	Gender	Age	Ethnic-racial self-classification
CTL 1	Female	47	White
CTL 2	Female	48	White
CLT 3	Male	47	White
CLT 4	Female	28	White
CLT 5	Male	36	White
CLT 6	Male	22	Brown
CLT 7	Female	36	Indigenous
CLT 8	Male	40	White
CLT 9	Female	31	Brown
MEAN	5F:4M	37.22(± 9.12)	

*F = Female; M = Male

Table 3. Gender, age, ethnic-racial self-classification, comorbidities and symptoms of mild recovered volunteers (Mild Recovered)

#Code	Gender	Age	Ethnic-racial self-classification	Comorbidities	Symptoms
COV3	Male	22	Brown	Guillain-Barré	Headache, Coryza, Cough with phlegm, Nasal obstruction, Chills, and Fatigue
COV5	Female	34	Brown	Obesity	Fever (37.5 °C), Headache, Dry cough, Myalgia, Chills, Fatigue, and Anosmia
COV6	Male	25	Brown		Fever (37.5 °C), Headache, Coryza, Sore throat, Dyspnea, Diarrhea, Fatigue, Anosmia, and Ageusia
COV9	Male	40	Brown		Headache, Coryza, and Dyspnea
COV10	Female	36	White	Obesity	Arthralgia and eye swelling
COV11	Female	39	Brown		Fever (38 °C), Headache, Coryza, sore throat, Dry cough, Dyspnea, Tachypnea, Arthralgia, Myalgia, Nausea, Vomiting, Diarrhea, Chills, Fatigue, Anosmia, and ageusia
COV13	Female	48	White	Hypertension	Headache, Dry cough, Dyspnea, Nasal obstruction, Arthralgia, Myalgia, Nausea, Vomiting, Diarrhea, Chills, Fatigue, Eye swelling, Anosmia, and Ageusia
COV15	Female	35	Brown	Obesity	Headache, Runny nose, Sore throat, Dry cough, Productive cough, Nasal obstruction, and Fatigue
MEAN	5F:3M		34,75 (±8.29)		

**F = Female; M = Male

Table 4. Gender, age, ethnic-racial self-classification, comorbidities and symptoms of severe recovered volunteers (Severe Recovered)

#Code	Gender	Age	Ethnic-racial self-classification	Comorbidities	Symptoms
COV2	Male	43	Brown	Hypertension and Obesity	Fever, Low blood oxygen saturation, Headache, Arthralgia, Myalgia, Lung infiltrate, Nausea, Diarrhea, Fatigue, Tachypnea, Eye swelling, Anosmia, and Ageusia
COV4	Female	38	White	Hypertension and Obesity	Fever, Low blood oxygen saturation, Headache, Dry cough, Cough with phlegm, Dyspnea, Tachypnea, Myalgia, Vomiting, Lung infiltrate, Chills, and Fatigue
COV14	Male	25	Black	Obesity	Low blood oxygen saturation, Fever, Headache, Lung infiltrates, Runny nose, Sore throat, Dry cough, Dyspnea, Nausea, Fatigue, Eye swelling, and Anosmia
COV16	Male	43	Brown	Asthma and Obesity	Low blood oxygen saturation, Fever, Headache, Sore throat, Cough with blood, Lung infiltrates, dyspnea, and Tachypnea
COV17	Female	40	Brown		Fever, Headache, Sore throat, Low blood oxygen saturation, Arthralgia, Myalgia, Lung infiltrate, Chills, Fatigue, Anosmia, Ageusia, and Tachypnea
COV18	Male	42	White	Obesity (IMC 38.5)	Low blood oxygen saturation, Fever, Headache, Runny nose, Sore throat, Lung infiltrates Dry cough, Dyspnea, Nasal obstruction, Tachypnea, Myalgia, Diarrhea, Chills, Fatigue, Anosmia, and Ageusia.
MEAN	2F:4M	38.83 (± 7.02)			

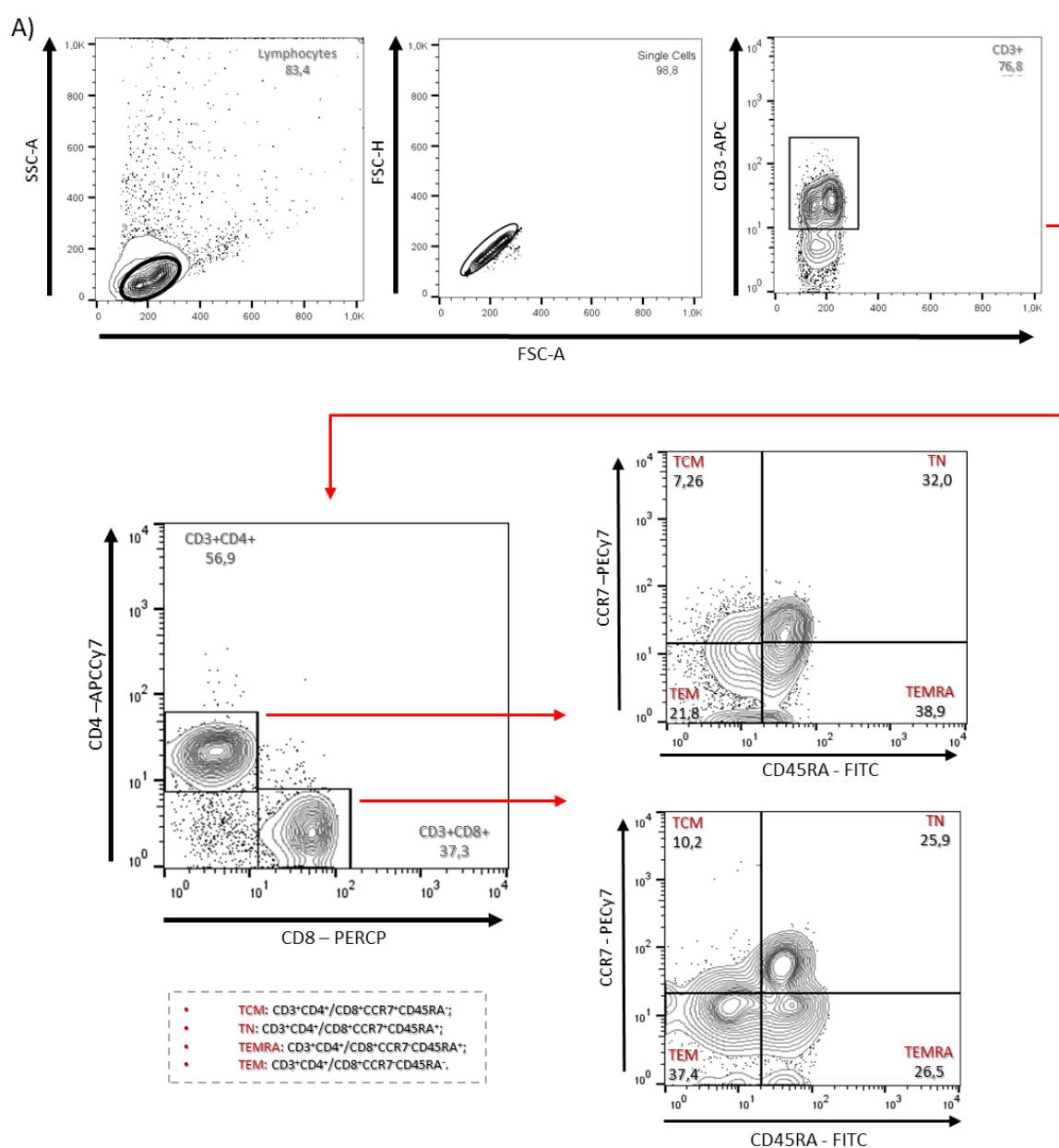
**F = Female; M = Male

3.2 Mild unvaccinated recovered patients had differences in frequencies of naïve and memory CD4 and CD8 T cells subpopulations

Analysis of PBMC from unvaccinated volunteers revealed that TEMRA CD8⁺ cells in the mild recovered COVID-19 group had a lower frequency than the severe groups for unstimulated samples (Figure 1B-II). In contrast, frequency of central memory CD8⁺ T cells in the mild recovered group was higher in pool spike and non-stimulated than in the other groups (Figure 1B-IV). Finally, the mild recovered group also showed a higher frequency of

CD8⁺ TCM cells when stimulated by Pool CoV-2 compared to the severe recovered group (Figure 1B-IV).

Unstimulated naïve CD4⁺ T cells in the mild recovered group, in turn, showed a reduced frequency compared to the HC group (Figure 1C-I). Spike CoV-2 stimulated samples from the severe recovered group to have a reduced frequency of CD4⁺ TEMRA cells compared to the mild recovery group (Figure 1C-II). Naïve CD8⁺ T cells, TCM CD4⁺ cells, CD8⁺ and CD4⁺ memory effectors T cells, in turn, showed no frequency variations in all clinical conditions evaluated (Figures 1B-I, 1B-III, 1C- III and, 1C-IV) (Supplementary Figure 1 and 2).



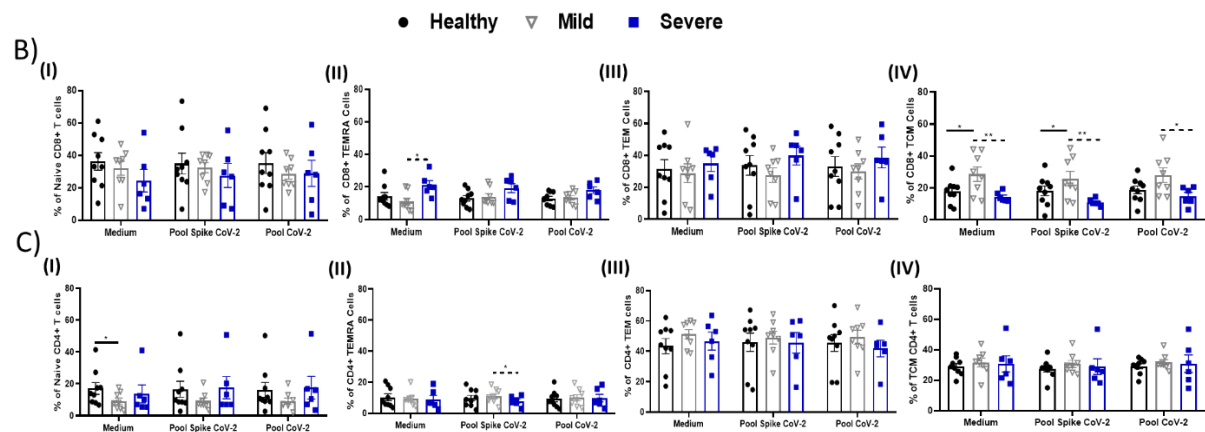


Fig. 1. Analysis of Naive, TEMRA, TEM, and TCM CD4+ and CD8+ cells frequency. (A) Analysis Strategy used to identify subpopulations of CD4+ and CD8+ Naive, TEMRA, TEM, and TCM lymphocytes in PBMC samples. (1B – I, II, III and IV) Frequency of CD8+ T cell subsets. (1C – I, II, III and IV) Frequency of CD4+ T cell subsets. PBMCs were collected from individuals in the HC (n = 9), mild CoV (n = 8), and severe CoV (n = 6) groups. Samples were incubated for 16 hours under three conditions (subgroups): medium (unstimulated), Pool Spike CoV-2 peptides, and Pool CoV-2 peptides. Unstimulated PBMCs were used as the negative control. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Multiple groups were compared using Two-Way ANOVA (followed by Tukey's post-test), one-way ANOVA (followed by Tukey's post-test) or Kruskal-Wallis test (followed by Dunn's post-test). The continuous horizontal lines (—) indicate significant differences between the HC and Mild CoV group, dashed horizontal lines (---) indicate significant differences between the Mild CoV and Severe CoV group, and dashed horizontal lines with dots (---•) indicate significant differences between the HC group and the Severe CoV (* p <0.05; ** p <0.01). The symbols $\bullet$, ∇ and $\blacksquare$ represent each volunteer enrolled in the healthy, mild, and severe groups whose samples were inserted in Medium, Pool Spike CoV-2, and Pool CoV-2 conditions. TCM, central memory T cells; TEM, effector memory T cells; TEMRA, effector memory T cells reexpressing CD45RA.

3.3 Heterogeneity in the expression of CD137 and CD69 activation markers by memory T cell subtypes between unvaccinated mild and severe recovered groups

This study evaluated the expression of activation marker CD137 in healthy individuals and patients who recovered from COVID-19 infection. The recovered naive CD8+ T cells from the mild group showed a reduced expression of CD137 in the absence of stimulation in comparison to the other groups and in the presence of Pool CoV-2 in comparison to the HC group (Figure 2A – I). However, in effector memory CD8+ T cells, Pool Spike CoV-2-stimulated samples in the mild recovered group presented a higher frequency of CD137 than those in the HC and severe recovered groups (Figure 2A-III). Furthermore, a higher frequency of CD137 was observed in the mild recovered group stimulated with Pool CoV-2 compared to the HC group (Figure 2A-III). In turn, the expression of CD137 from CD8+ TCM cells in the recovered mild group was higher compared to the HC and severe group in unstimulated and Pool CoV-2-stimulated samples (Figure 2A-IV).

Naive CD4+ T cells from the mild and severe recovered group showed elevated expression of CD137 in the presence of Pool CoV-2 compared to the HC group (Figure 2B-

I). A higher frequency of CD137 was also observed in the mild recovered group compared to the healthy group by CD4⁺ TEM cells in unstimulated samples (Figure 2B-III). However, in Pool CoV-2-stimulated samples, the mild and severe recovered group showed a reduced expression of CD137 compared to the HC group (Figure 2B-III). Additionally, central memory CD4⁺ T cells in the severe group showed a significant reduction in the frequency of CD137⁺ in the absence of stimulation compared to the other evaluated groups (Figure 2B-IV). A higher expression of CD137 is observed in the mild group compared to the severe group in Pool Spike CoV-2-stimulated samples (Figure 2B-IV). CD8⁺ and CD4⁺ TEMRA cells showed no significant frequency differences among the clinical conditions evaluated (Figures 2A-II and 2B-II) (Supplementary Figure 3).

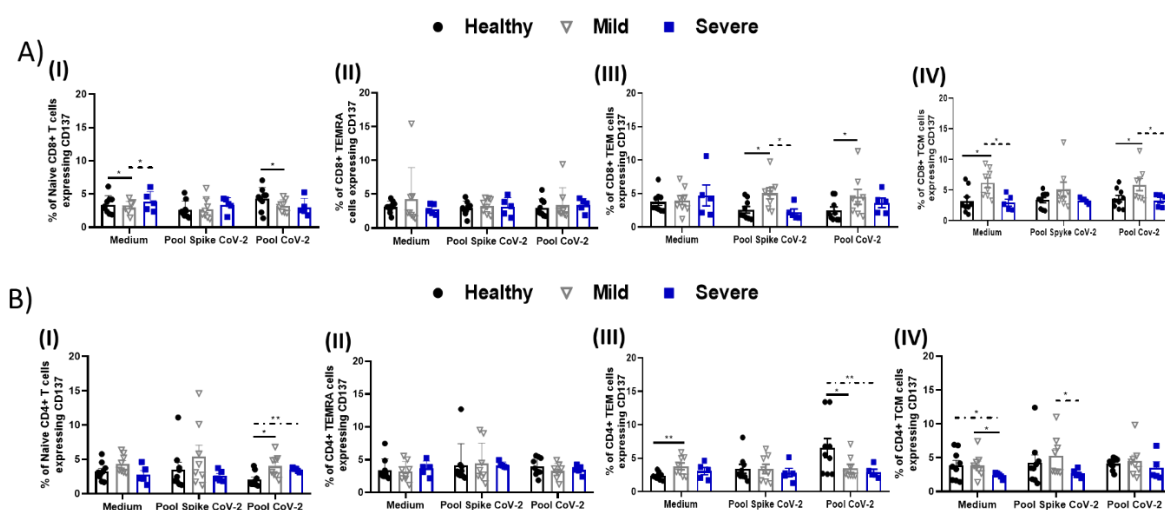


Fig. 2A – B. CD137 expression profile in CD8⁺ and CD4⁺ T naïve, TEMRA, TEM and TCM cells in HC, Mild CoV and Severe CoV Groups. (A- I, II, III and IV) Frequency of CD137 in CD8⁺ T Cells subsets. (B – I, II, III and IV) Frequency of CD137 in CD4⁺ T Cells subsets. PBMCs were collected from subjects in the HC (n = 9), mild CoV (n = 8), and severe CoV (n = 5) groups. Samples were incubated for 16 hours under three conditions (subgroups): medium (unstimulated), Pool Spike CoV-2 peptides, and Pool CoV-2 peptides. Unstimulated PBMCs were used as the negative control. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Multiple groups were compared using Two-Way ANOVA (followed by Tukey's post-test), one-way ANOVA (followed by Tukey's post-test) or Kruskal-Wallis test (followed by Dunn's post-test). The continuous horizontal lines (—) indicate significant differences between the HC and Mild CoV group, dashed horizontal lines (----) indicate significant differences between the Mild CoV and Severe CoV group, and dashed horizontal lines with dots (-.-) indicate significant differences between the HC group and the Severe CoV (*p<0.05; **p<0.01). The symbols ● ▼ and ■ represent each volunteer enrolled in the healthy, mild, and severe groups whose samples were inserted in Medium, Pool Spike CoV-2, and Pool CoV-2 conditions. TCM, central memory T cells; TEM, effector memory T cells; TEMRA, effector memory T cells reexpressing CD45RA.

The recovered severe group demonstrated a higher expression of CD69 of naive CD8⁺ T cells when stimulated by Pool Spike CoV-2 compared to the recovered mild group (Figure 3A-I). However, after stimulation by Pool CoV-2, the HC group showed a higher

CD69 frequency than the recovered mild group, a pattern also observed in TCM CD8+ cells from the same group (Figure 3A-I). In addition, Pool Spike CoV-2- and Pool CoV-2-stimulated samples in the severe recovered group showed a higher frequency of TEMRA CD8+CD69+ cells when compared to the mild recovered group (Figure 3A-II).

Pool CoV-2-stimulated samples in the severe recovered group showed TEMRA CD4+ cells with higher frequency when compared HC group (3B-II). TCM CD4+ cells from mild recovered, in turn, showed a reduced frequency of CD69 compared to the HC group (3B-IV). CD4+ naïve T cells, CD8+ TEM, and CD4+ TEM cells showed no significant frequency differences among the clinical conditions evaluated (Figures 3B-I, 3A-III, and 3B-III) (Supplementary Figure 4).

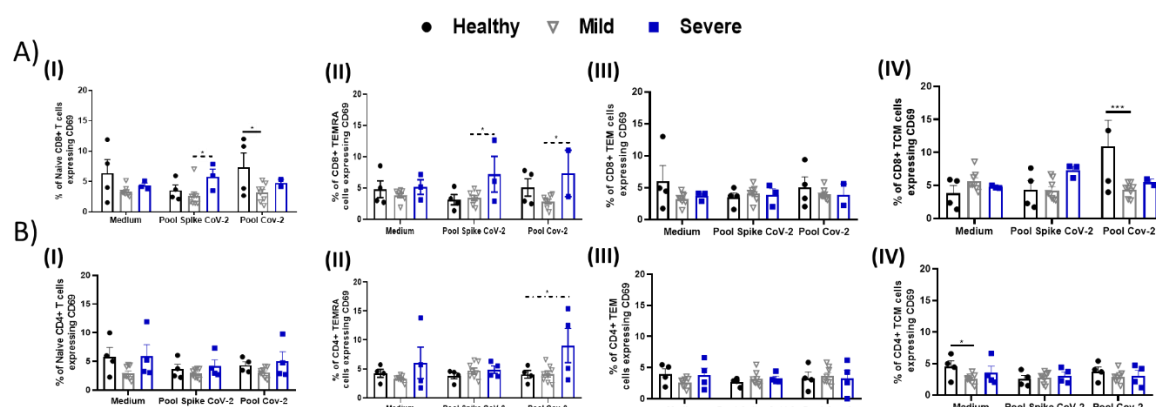


Fig. 3A – B. CD69 expression profile in T naïve, TEMRA, TEM and TCM CD4+ and CD8+ cells in HC, Mild CoV, and Severe CoV Groups. (A – I, II, III and IV) Frequency of CD69 in CD8+ T Cells subsets. (B – I, II, III and IV) Frequency of CD69 in CD4+ T Cells subsets. PBMCs were collected from subjects in the HC (n = 4), mild CoV (n = 8), and severe CoV (n = 4) groups. Samples were incubated for 16 hours under three conditions (subgroups): medium (unstimulated), Pool Spike CoV-2 peptides, and Pool CoV-2 peptides. Unstimulated PBMCs were used as the negative control. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Multiple groups were compared using Two-Way ANOVA (followed by Tukey's post-test), one-way ANOVA (followed by Tukey's post-test) or Kruskal-Wallis test (followed by Dunn's post-test). The continuous horizontal lines () indicate significant differences between the HC and Mild CoV group, dashed horizontal lines (----) indicate significant differences between the Mild CoV and Severe CoV group, and dashed horizontal lines with dots (-.-) indicate significant differences between the HC group and the Severe CoV (* p <0.05; ** p <0.01). The symbols ● ▼ and ■ represent each volunteer enrolled in the healthy, mild, and severe groups whose samples were inserted in Medium, Pool Spike CoV-2, and Pool CoV-2 conditions. TCM, central memory T cells; TEM, effector memory T cells; TEMRA, effector memory T cells reexpressing CD45RA.

3.4 CD4⁺ and CD8⁺ T cells subsets from unvaccinated mild recovered volunteers had higher expression of TNF- α while the expression pattern of IFN- γ , IL-10, and IL-17 point to an antiviral signature by TEMRA CD8⁺ cells

TEM cells from the mild recovered group in the absence of stimulation showed increased TNF- α production compared to the HC group (Figure 4A-III). An elevated frequency of TNF- α was also observed in the same unstimulated group compared to the HC group and severe recovered volunteers on CD8⁺ TCM cells (Figure 4A-IV).

Mild recovered samples in Pool Spike CoV-2 presence had higher TNF α -producing naïve CD4⁺ T cells than the HC and severe recovered groups (4B-I). In addition, TEM CD4⁺ cells from the mild recovered group without stimulation showed increased TNF- α production compared to the HC and severe recovered groups (Figure 4B - III). TCM CD4⁺ cells from the mild recovered group in Pool Spike CoV-2, in turn, had a higher expression of TNF- α compared to the HC group (Figure 4B – IV). Finally, significant differences in the expression of this cytokine were not demonstrated in naïve T CD8⁺, TEMRA CD8⁺, and CD4⁺ cells among the evaluated conditions (4A-I, 4A-II, and 4B-II) (Supplementary Figure 5).

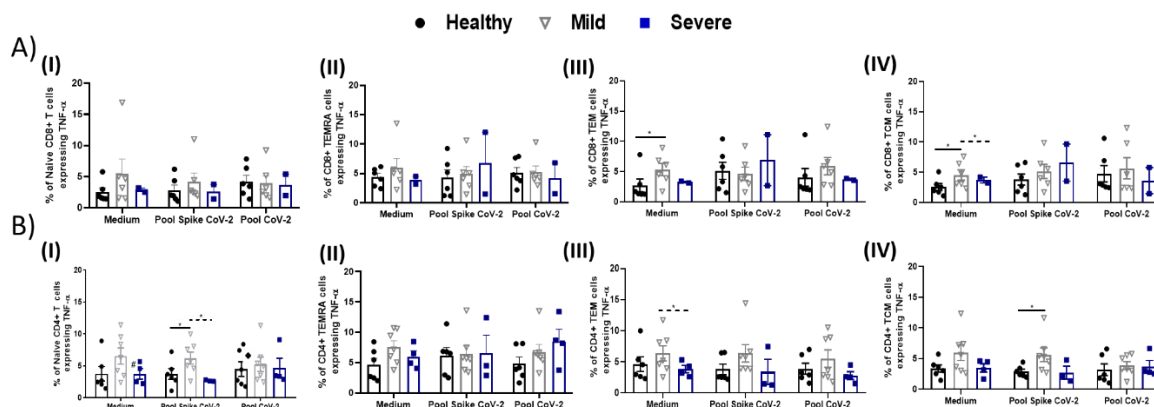


Fig. 4A – B. TNF- α expression by CD8⁺ and CD4⁺ Naïve and Memory Subsets T cells in healthy individuals (HC), mild (Mild CoV), and severe (Severe CoV) COVID-19 recovered patients. (A – I, II, III and IV) Frequency of TNF- α in CD8⁺ naïve, TEMRA, TEM, and TCM subsets. (B – I, II, III and IV) Frequency of TNF- α in CD4⁺ naïve, TEMRA, TEM, and TCM subsets. PBMCs were collected from subjects in the HC (n = 6), mild CoV (n = 7), and severe CoV (n = 4) groups. Samples were incubated for 16 hours under three conditions (subgroups): medium (unstimulated), Pool Spike CoV-2 peptides, and Pool CoV-2 peptides. Unstimulated PBMCs were used as the negative control. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Multiple groups were compared using Two-Way ANOVA (followed by Tukey's post-test), one-way ANOVA (followed by Tukey's post-test) or Kruskal-Wallis test (followed by Dunn's post-test). The continuous horizontal lines (—) indicate significant differences between the HC and Mild CoV group, dashed horizontal lines (----) indicate significant differences between the Mild CoV and Severe CoV group, and dashed horizontal lines with dots (- · -) indicate significant differences between the HC group and the Severe CoV (*p<0.05; **p<0.01). The symbols ● ▼ and ■ represent each volunteer enrolled in the healthy, mild, and severe groups whose samples

were inserted in Medium, Pool Spike CoV-2, and Pool CoV-2 conditions. TCM, central memory T cells; TEM, effector memory T cells; TEMRA, effector memory T cells reexpressing CD45RA.

We investigated cytokines production by CD8⁺ and CD4⁺ naïve, TEMRA, TEM, and TCM cells in all the groups. In Pool CoV-2-stimulated CD8⁺ naïve cells, higher production of IFN- γ in the mild recovered group than in the severe recovered group was observed (Figure 5A-I). Severe recovered Pool Spike CoV-2-stimulated samples had lower levels of IFN γ -producing TEMRA CD8⁺ than did the mild recovered and HC groups (Figure 5A-II). Additionally, in Pool CoV-2-stimulated cells, the expression of IFN γ was higher in the mild recovered group than in the HC group (Figure 5A-II). CD8⁺ TEM cells stimulated by Pool CoV-2 reduced IFN- γ production was observed in the severe recovered group compared to the HC group (Figure 5A-III). CD8⁺ TCM cells, in turn, showed no significant frequency variations in all clinical conditions evaluated (5A-IV).

Mild recovered non-stimulated samples had higher IFN- γ -producing naïve CD4⁺ T cells than the HC and severe recovered groups (5B-I). Finally, TEMRA, TEM, and TCM CD4⁺ cells did not demonstrate significant differences in this cytokine expression among the evaluated conditions (5B-II, III, and IV) (Supplementary Figure 6).

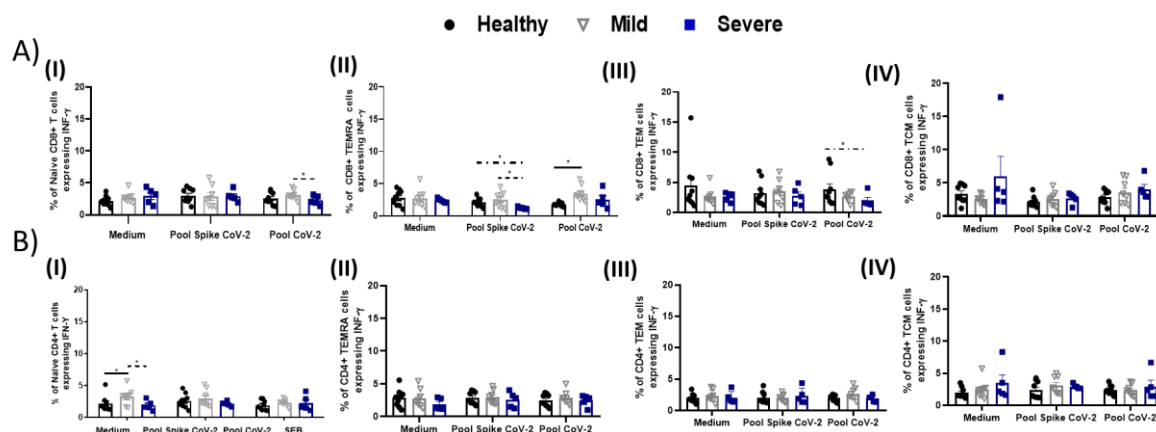


Fig. 5A – B. IFN- γ expression by CD8⁺ and CD4⁺ Naïve and Memory Subsets T cells in healthy individuals (HC), mild (Mild CoV), and severe (Severe CoV) COVID-19 recovered patients. (A – I, II, III and IV) Frequency of IFN- γ in CD8⁺ naïve, TEMRA, TEM, and TCM subsets. (B – I, II, III and IV) Frequency of IFN- γ in CD4⁺ naïve, TEMRA, TEM, and TCM subsets. PBMCs were collected from subjects in the HC (n = 9), mild CoV (n = 8), and severe CoV (n = 5) groups. Samples were incubated for 16 hours under three conditions (subgroups): medium (unstimulated), Pool Spike CoV-2 peptides, and Pool CoV-2 peptides. Unstimulated PBMCs were used as the negative control. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Multiple groups were compared using Two-Way ANOVA (followed by Tukey's post-test), one-way ANOVA (followed by Tukey's post-test) or Kruskal-Wallis test (followed by Dunn's post-test). The continuous horizontal lines (—) indicate significant differences between the HC and Mild CoV group, dashed horizontal lines (----) indicate significant differences between the Mild CoV and Severe CoV group, and dashed horizontal lines with dots (-.-) indicate significant differences between the HC group and the Severe CoV (*p<0.05; **p<0.01). The symbols ● ▼ and ■ represent each volunteer enrolled in the healthy, mild, and severe groups whose samples

were inserted in Medium, Pool Spike CoV-2, and Pool CoV-2 conditions. TCM, central memory T cells; TEM, effector memory T cells; TEMRA, effector memory T cells reexpressing CD45RA.

A reduced frequency of IL-10⁺ in naïve CD8⁺ T in the mild and severe recovered groups stimulated with Pool Spike-CoV-2 was observed when compared to the HC group (Figure 6A-I). The mild recovered group also showed reduced IL-10 production in CD8⁺ TEMRA cells when stimulated with Pool CoV-2 in comparison to the HC group (Figure 6A - II). A higher expression of IL-10 by CD8⁺ TCM cells in the mild and severe recovered groups was observed when compared to the HC group after Pool Spike CoV-2 stimulus (Figure 6A-IV).

Mild recovered non-stimulated samples had higher levels of IL-10-producing naïve CD4⁺ T cells than the HC group (Figure 6B-I). In addition, higher levels of IL-10 by naïve CD4⁺ T cells were also observed in this same group after Pool Spike CoV-2 stimulus in relation to the severe group (Figure 6B-I). Finally, significant differences in this cytokine expression were not demonstrated in TEMRA, TEM, TCM CD4⁺, and TEM CD8⁺ cells among the evaluated conditions (6B-II, III, IV, and 5A-III) (Supplementary Figure 7).

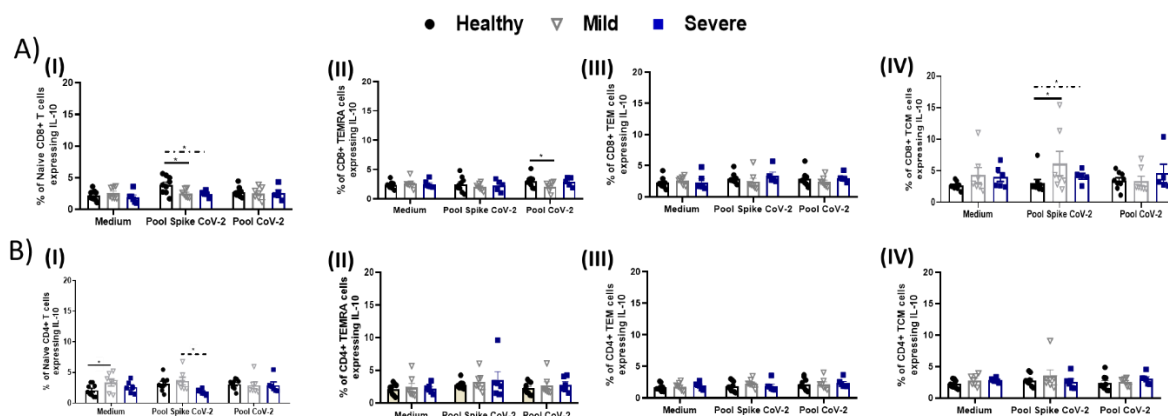


Fig. 6A – B. IL-10 expression by CD8⁺ and CD4⁺ Naïve and Memory Subsets T cells in healthy individuals (HC), mild (Mild CoV), and severe (Severe CoV) COVID-19 recovered patients. (A – I, II, III and IV) Frequency of IL-10 in CD8⁺ naïve, TEMRA, TEM, and TCM subsets. (B – I, II, III and IV) Frequency of IL-10 in CD4⁺ naïve, TEMRA, TEM, and TCM subsets. PBMCs were collected from subjects in the HC (n = 9), mild CoV (n = 7), and severe CoV (n = 6) groups. Samples were incubated for 16 hours under three conditions (subgroups): medium (unstimulated), Pool Spike CoV-2 peptides, and Pool CoV-2 peptides. Unstimulated PBMCs were used as the negative control. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Multiple groups were compared using Two-Way ANOVA (followed by Tukey's post-test), one-way ANOVA (followed by Tukey's post-test) or Kruskal-Wallis test (followed by Dunn's post-test). The continuous horizontal lines (—) indicate significant differences between the HC and Mild CoV group, dashed horizontal lines (----) indicate

significant differences between the Mild CoV and Severe CoV group, and dashed horizontal lines with dots (---) indicate significant differences between the HC group and the Severe CoV (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). The symbols ● ▼ and ■ represent each volunteer enrolled in the healthy, mild, and severe groups whose samples were inserted in Medium, Pool Spike CoV-2, and Pool CoV-2 conditions. TCM, central memory T cells; TEM, effector memory T cells; TEMRA, effector memory T cells reexpressing CD45RA.

TEMRA cells from the mild group recovered in contact with Pool CoV-2 showed a reduction in IL-17 production compared to the HC group (Figure 7A-II). An elevated IL-17+ TEM CD8+ frequency was observed in PBMC from volunteers in the severe recovered group stimulated with Pool Spike-CoV-2 compared to mild recovered volunteers (Figure 7A-III). The same pattern was observed in TCM cells in Pool CoV-2 (Figure 7A-IV).

Severe recovered non-stimulated samples had higher levels of IL-17-producing naïve CD4+ T cells than the HC group (7B-I). Finally, significant differences in this cytokine expression were not observed in TEMRA, TEM, TCM CD4+, and naïve T CD8+ cells among the evaluated conditions (7B-II, III, IV, and 6A-I) (Supplementary Figure 8).

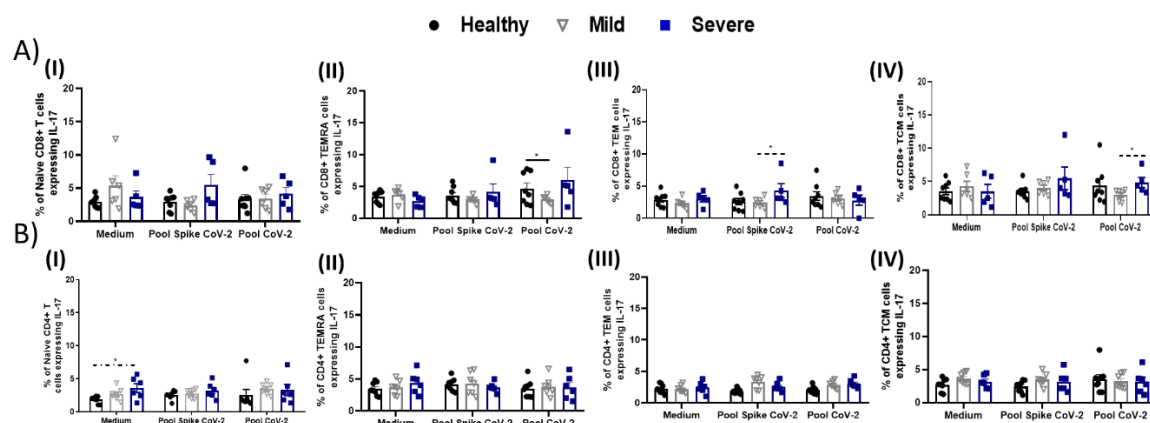


Fig. 7A – B. IL-17 expression by CD8+ and CD4+ Naïve and Memory Subsets T cells in healthy individuals (HC), mild (Mild CoV), and severe (Severe CoV) COVID-19 recovered patients. (A – I, II, III and IV) Frequency of IL-17 in CD8+ naïve, TEMRA, TEM, and TCM subsets. (B – I, II, III and IV) Frequency of IL-17 in CD4+ naïve, TEMRA, TEM, and TCM subsets. PBMCs were collected from subjects in the HC (n = 8), mild CoV (n = 7), and severe CoV (n = 6) groups. Samples were incubated for 16 hours under three conditions (subgroups): medium (unstimulated), Pool Spike CoV-2 peptides, and Pool CoV-2 peptides. Unstimulated PBMCs were used as the negative control. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Multiple groups were compared using Two-Way ANOVA (followed by Tukey's post-test), one-way ANOVA (followed by Tukey's post-test) or Kruskal-Wallis test (followed by Dunn's post-test). The continuous horizontal lines (—) indicate significant differences between the HC and Mild CoV group, dashed horizontal lines (----) indicate significant differences between the Mild CoV and Severe CoV group, and dashed horizontal lines with dots (---) indicate significant differences between the HC group and the Severe CoV (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). The symbols ● ▼ and ■ represent each volunteer enrolled in the healthy, mild, and severe groups whose samples were inserted in Medium, Pool Spike CoV-2, and Pool CoV-2 conditions. TCM, central memory T cells; TEM, effector memory T cells; TEMRA, effector memory T cells reexpressing CD45RA.

4 DISCUSSION

Immunological memory is a significant hallmark of adaptive immunity for establishing an enhanced and effective immune response upon reinfection. Thus, the presence of memory T-cell subpopulations with distinct phenotypes and functional properties expands our immune repertoire, making them a relevant study target in COVID-19 [29, 30]. In this sense, the present study jointly and unprecedentedly characterized the subpopulations of naïve, TEM, TCM, and TEMRA CD8⁺ and CD4⁺ T cells in volunteers recovered from mild and severe forms of COVID-19 regarding the profile of activation and production of cytokines.

In viral infections, CD8⁺ T cells stand out for mediating the death of infected cells by cytotoxicity and for the secretion of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF- α . These cytokines are also present in the immune cell management promoted by CD4⁺ T cells to control infections [28, 29]. Given their relevance, the frequency of naïve T cells and COVID-19-specific CD8⁺ and CD4⁺ memory subpopulations were evaluated. Regarding CD4⁺ T cell subpopulations, a reduction in naïve cell frequency was observed compared to the HC group in absence of CoV peptide stimulation. In contrast, Pool Spike CoV-2 stimulation elevated TEMRA cell frequency in the mild recovered group compared to the severe group. These findings may be associated with the rapid redistribution of T cells from the periphery caused by the primary infection.. Naïve T cells expand remarkably and differentiate into antigen-specific activated T cells, such as the TEMRA phenotype, characterized by loss of membrane receptors CD28, CD27, and CD127, CD45RA re-expression and PD1/CD57 expression whose polarization is stimulated due to cumulative antigenic load induced by chronic or recurrent viral infections [31,32,33].

ADAMO et al. (2021) demonstrated that patients recovered from severe cases of COVID-19 had, after 6 months of infection, have a predominance of TEMRA cells and a reduction in subpopulations of TCM CD8⁺ cells, corroborating the data observed here [34]. In our study, unstimulated TEMRA CD8⁺ cells showed a higher frequency in the severe recovered group than in the mild recovered group. In comparison, a higher frequency of TCM CD8⁺ T cells was observed in patients who recovered from mild compared to severe cases, regardless of CoV peptide stimulus. The significant presence of TEMRA CD8⁺ cells has been associated with excess inflammation and chronic inflammatory conditions such

as those that occur in critically ill in the acute phase of COVID-19, thus justifying what was observed in our samples without stimulation [31, 35]. TCM cell polarization, in turn, is favored by the inhibition of pathogen replication in the acute phase of the disease, which reduces the duration of antigen presentation and inflammation. This is corroborated by the Salumets et al. (2021) study in which the reduction in plasma viremia correlated well with the increase in the number of memory cells, whose predominant phenotype became $CD8^+CCR7^+CD45RA^+CD27^+CD28^-$, similar to central memory cells [31, 36]. Thus, it's suggested that the immediate response of the mild group is effective in controlling viral replication in symptomatic disease, favoring the generation of the highest frequency of long-term TCM $CD8^+$ cells observed in our results.

The activation profile of the distinct subpopulations of naïve and memory cells was also evaluated by analyzing the expression of CD137 and CD69. CD137 is characterized as a member of the TNFR family associated with costimulatory signaling, which regulates the proliferation and survival of naïve, effector, and memory T cells [37]. The expression profile of this marker by naïve $CD8^+$ T cells in the absence of antigenic pools highlighted the ability of the mild group to respond to viral waiting at $CD8^+$ T cells level, ensuring activation and proliferation of T cells in a controlled manner and thus preventing an exacerbated immune response. However, the mild recovered group also showed reduced expression of CD137 after stimulation by Pool Spike CoV-2, in which it maintained this expression compared to the HC group [38]. The naïve $CD4^+$ T cells, in turn, in the face of the antigen, showed a higher expression of CD137 in the groups of the mild and severe recovered patients in the presence of Pool CoV-2 in comparison to the HC group, suggesting the planned role of this cell subtype that, through its activation and the differentiation, will coordinate the humoral and cellular immune response against SARS-CoV-2 upon reinfection [38].

KANG et al. (2021) demonstrated that SARS-CoV-2-specific T cells broadly expressing $CD69^+CD137^+$ are highly sensitive to antigenic stimuli after 8 months of the symptomatic phase of the disease, a finding that reinforces the findings of the present study [39]. In fact, our pathogenic results an elevated expression of CD137 in $CD8^+$ TEM cells of the recovered mild group stimulated by the antigenic peptides evaluated here compared to the HC and severe group. In contrast, when stimulated by Pool CoV-2, TEM $CD4^+$ cells exhibited lower expression of CD137 in mild and severe recovered groups compared to the HC group. Regarding $CD8^+$ and $CD4^+$ TCM cells, in turn, it is observed that the recovered mild group

expresses more CD137 than the severe recovered group in the absence of CoV peptide stimulus, as well as after Pool Spike CoV-2 and Pool CoV-2 presence. During severe SARS-CoV-2 infection, CD137 is considered a severity biomarker because elevated levels of its soluble form (sCD137) correlate well with an unfavorable prognosis [36, 37]. However, the pattern of CD137 expression by TCM CD8⁺ and CD4⁺ cells in the recovered severe group after antigenic stimulus may indicate an immunomodulatory mechanism for attenuating inflammatory response upon reinfection, given the correlation of massive expression of this marker with severe forms of the disease. Additionally, TEM CD4⁺ and CD8⁺ cells have similar levels of CD137 between the mild and severe recovered groups in most of the conditions evaluated here, suggesting the similar contribution of this memory cell subtype to disease control justified by its ready-acting phenotype that presents high responsiveness to successive infections and that migrate widely and rapidly into peripheral tissues [32, 39].

CD69 is described as a membrane-bound C-lectin type II receptor considered a classic marker of recent activation in lymphocytes due to its rapid appearance on the surface of T lymphocytes. Naïve CD8⁺ T cells from mild recovered covid-19 evaluated here showed a lower frequency of CD69 than the severe recovered group after Pool Spike CoV-2 stimulus and then the HC group after Pool CoV-2 stimulus. Additionally, CD8⁺ central memory T cells after stimulation by Pool CoV-2 showed lower CD69 expression in the recovered mild group compared to the HC group, a pattern that was also observed in CD4⁺ TCM cells in absence of Cov peptides stimuli. However, considering that CD69 also acts as an essential regulator of immune responses, determining patterns of inflammatory cytokine release and the migration of activated lymphocytes, our findings point to a possible controlled antigen presentation and cell differentiation in mild COVID [40]. Files et al. (2021) demonstrated a higher frequency of CD69 in hospitalized patients compared to those with mild disease in the acute phase of the disease, corroborating our data in which PBMCs from severely recovered patients had higher CD69 expression by TEMRA CD4⁺ and CD8⁺ than the other groups after stimuli by CoV peptides. Varchetta et al. (2020) described an increased proportion of T cells, especially CD8⁺, that abundantly expressed circulating CD69 when investigating patients with severe COVID-19. These cells showed a responsive profile favorable to exacerbated inflammation and viral elimination similar to the TEMRA subset characterized by increased sensitivity to innate signals, agility in structuring response to antigen, and a high cytotoxic profile [41, 42].

Given the role of cytokines in COVID-19 pathophysiology, we evaluated the expression profile of TNF- α , IFN- γ , IL-10, and IL17 in naïve and memory T-cell subpopulations. Considering the TNF- α expressed in CD4⁺ T lymphocytes in the recovered mild group, we observed that after the Pool Spike CoV-2 stimulus, naïve and central memory T CD4⁺ cells had a higher expression of this marker compared to the other evaluated groups. In non-stimulated samples from the mild recovered group, TCM CD8⁺ cells showed a higher frequency of TNF- α than the HC and severe recovered volunteers, while CD4⁺TNF- α + TEM cells from mild recovered group were more pronounced than the HC group. Thieme et al. (2020) demonstrated the presence of long-term TNF- α -producing memory T cells in COVID-19 convalescents [43], and our findings showed a pronounced TNF- α expression by individuals that had mild disease. These data are corroborated by Queiroz et al. (2022), that found higher serum levels of TNF- α in the post-covid mild group compared to the severe group [44]. Moreover, the association between Th1-type cytokines, such as IFN- γ and TNF- α , viral clearance, and mild COVID-19 described by Anbalagan et al. (2022) reinforces the ability of the recovered mild group to generate an effective cellular memory response to control infection, contributing to mild symptoms upon reinfection [44, 45].

IFN is defined as an inflammatory cytokine that has an effective antiviral activity. A higher expression of this protein was also observed in naïve CD4⁺ T cells from the mild recovered group's non-stimulated PBMCs. After stimulus by Pool CoV-2 (for naïve and TEM CD8 cells), PBMC from the severe recovered group showed lower levels of IFN- γ compared to those in mild recovered and/or HC volunteers. In SARS-CoV-2 infection, this cytokine presents a certain duality since IFN- γ hyperproduction and an increased oxidative stress in the early stages of the disease correlates with severe cases of COVID-19 while IFN- γ presence, in a coordinated way, allows for the adaptive immune system to respond adequately to presence of the virus [46, 47, 48]. After Pool Spike CoV-2 stimulation, TEMRA CD8 cells from the severe recovered group showed lower levels of IFN- γ than those in mild recovered and/or HC volunteers. However, in the mild recovered group, we found higher expression of this cytokine together with lower levels of IL-10 and IL-17 after stimulation by the Pool CoV-2. IL-10 is immunoinhibitory, while IL-17 has context- and tissue-dependent protective roles for maintaining health in infections [49, 50]. Thus, the cytokine profile presented by the TEMRA CD8 T cell from the mild recovered group suggests an antiviral response in which the reduction of IL-10/IL-17 and the prevalence of IFN- γ could contribute to the greater efficiency of this cell in controlling the infection.

Non-hospitalized patients have SARS-CoV-2 specific CCR7⁺ T cells secreting IL-10, which was also evaluated in other subpopulations [49]. Naïve CD4⁺ T cells from the recovered mild group showed a higher expression of IL-10 in the non-stimulated and stimulated Pool Spike CoV-2 samples compared to HC and severe groups, respectively. Naïve CD8⁺ T cells, in turn, have a higher IL-10 expression in the mild group compared to the HC group in the unstimulated condition and compared to the severe group after Pool Spike CoV-2 stimulation. These results suggest a coordinated activity between naïve CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the mild recovered group to avoid the exacerbated inflammatory response observed in severe cases of the disease [30, 51]. Additionally, central memory CD8⁺ T cells from mild and severe recovered groups also presented an elevated expression of IL-10 compared to the HC group after Pool Spike CoV-2 stimulation. These results are supported by the fact that this cell subtype phenotypically resembles IL-10-producing Th2 cells [52]. Munoz et al. (2021) demonstrated that in exacerbated immune responses caused by viral infections, cells with a Th2-like phenotype that do not express the Tbet transcription factor strongly suppress the pro-inflammatory responses of naïve and memory T cells via secretion of IL-10 [52]. Thus, the elevation of TCM CD8⁺IL-10⁺ cells in the mild group after Pool Spike CoV-2 stimulus may be associated with a long-term pro-inflammatory change resulting from COVID-19 and the need to control this condition upon reinfection [53, 54].

IL-17, described as a cytokine responsible for CD4⁺ T lymphocyte differentiation to the Th17 phenotype, was also evaluated here [55]. Compared to the HC group, naïve CD4⁺ T cells from the severe recovered group had a higher frequency of IL-17 in the absence of CoV peptide stimulation. Severe recovered volunteers also showed a reduced frequency of IL-17 in TEM and TCM CD8⁺ cells, respectively, after stimulation by Pool Spike CoV-2 and Pool CoV-2. IL-17 has a high frequency in critically ill patients in the acute phase of the disease, so, based on our findings, it can be suggested that this elevation remains in this group for a prolonged period [56]. However, earlier studies have suggested a greater susceptibility to secondary pneumonia after influenza A infection in individuals without functional signaling of the IL-17 receptor, thus demonstrating the protective effects of this cytokine, which expands the perspectives on the fundamental role of IL-17 in patients recovered from severe cases of covid-19 [57].

In this study, we showed a distinct distribution in the frequency of naïve and memory CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets in individuals recovered from SARS-CoV-2 infection. We

also observed that TEM, TCM, and TEMRA subtypes of CD4⁺ and CD8⁺ T cells had a heterogeneous activation response. Interestingly, volunteers that recovered from mild clinical forms of the disease presented more pronounced expression of TNF- α by CD4⁺ and CD8⁺ T cells subsets, while TEMRA CD8⁺ cells seem to have an antiviral signature due to the expression profile of IFN- γ , IL-10, and IL-17. This study aids in the elucidation of the roles of memory T cell subpopulations during SARS CoV-2 antigenic reexposure and their action in directing the disease outcome. Moreover, despite limitations regarding the low number of volunteers that do not encompass Brazilian population diversity, all evaluated samples were obtained before the vaccine development and distribution.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the research reported in this paper.

FUNDING STATEMENT

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq CHAMADA 4 BRICS STI COVID-19 (Number 440939/2020-8) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES fellowships support (88887.506771/2020-00).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to all volunteers who, despite their difficulties, agreed to participate in our research and to all professionals working tirelessly to bring the COVID-19 pandemic to an end.

REFERENCES

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em: < https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019?adgroupsurvey=%7badgroupsurvey%7d&gclid=CjwKCAjwi9-HBhACEiwAPzUhHDG9gxMYstsIB_YZvO7u-kTy88iUn9M8l36YPAHsT1OVsvvW7V9RBoCkaQQA vD_BwE >. Acessado em: 1 September. 2022.

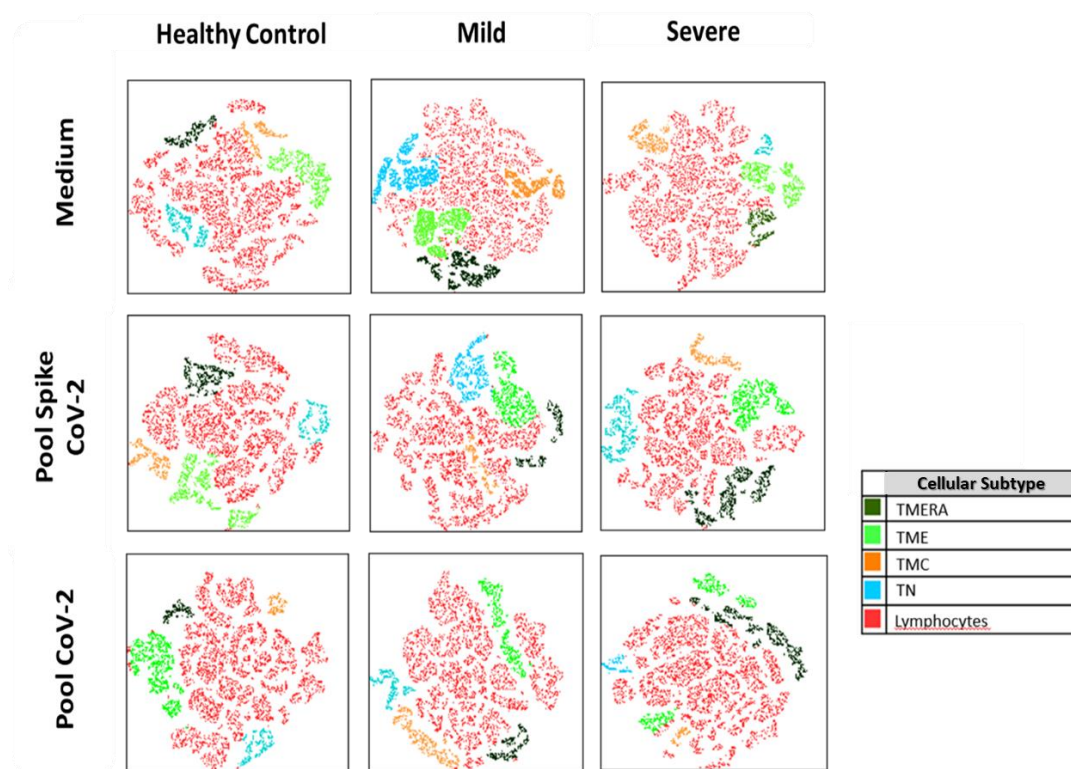
2. YAN, R.; ZHANG, Y.; LI, Y.; XIA, L.; GUO, Y.; ZHOU, Q. Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. **Science**. v. 367, n. 6485, p. 1444-1448, 2020. doi: 10.1126/science.abb2762.
3. LU, Roujian et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565-574, 2020.
4. IZDA, Vladislav; JEFFRIES, Matlock A.; SAWALHA, Amr H. COVID-19: A review of therapeutic strategies and vaccine candidates. **Clinical Immunology**, p. 108634, 2020
5. WU, Di et al. The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 94, p. 44-48, 2020.
6. BRASIL, Ministério da Saúde. Diagnóstico, 2021b. Available in: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/diagnostico>>. Accessed: 03 August. 2022.
7. BRASIL, Ministério da Saúde. Como é transmitido? 2021b. Available in: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/como-e-transmitido>>. Accessed: 03 mar. 2022.
8. PARK, W. B.; KWON, N. J.; CHOI, S. J.; et al. Virus Isolation from the First Patient with SARS-CoV-2 in Korea. **J Korean Med Sci**. v. 35, n. 7e84, p. 1-5. 2020.
9. ZHANG, B.; ZHOU, X.; QIU, Y.; SONG, Y.; FENG, F.; FENG, J.; et al. Clinical characteristics of 82 cases of death from COVID-19. **PLoS ONE**. v. 15, n. 7 e0235458, p. 1-13. 2020.
10. HUANG, Chaolin et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.
11. GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; NETEA, M. G.; ROVINA, N.; et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. **Cell Host Microbe**. v. 27, n. 6, p. 992-1000.e3. 2020.
12. CHEN, Zeyu; WHERRY, E. John. T cell responses in patients with COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 9, p. 529-536, 2020.
13. VIGÓN, Lorena 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, 2021.
14. PACES, Jan et al. COVID-19 and the immune system. **Physiological research**, v. 69, n. 3, 2020
15. SETTE, Alessandro; CROTTY, Shane. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. **Cell**, 2021.
16. JORDAN, Stanley C. Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: relevance to acquired immunity and vaccine responses. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 204, n. 3, p. 310-320, 2021.
17. POONIA, Bhawna; KOTILIL, Shyam. Immune correlates of COVID-19 control. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 2535, 2020.
18. MERAD, Miriam et al. The immunology and immunopathology of COVID-19. **Science**, v. 375, n. 6585, p. 1122-1127, 2022.
19. RHA, Min-Seok et al. PD-1-expressing SARS-CoV-2-specific CD8+ T cells are not exhausted, but functional in patients with COVID-19. **Immunity**, v. 54, n. 1, p. 44-52. e3, 2021.

20. SAMJI, Tasleem; KHANNA, Kamal M. Understanding memory CD8⁺ T cells. **Immunology letters**, v. 185, p. 32-39, 2017.
21. WILLINGER, Tim et al. Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 9, p. 5895-5903, 2005.
22. KUMAWAT, Ashok Kumar et al. Microscopic colitis patients have increased proportions of Ki67⁺ proliferating and CD45RO⁺ active/memory CD8⁺ and CD4⁺ 8⁺ mucosal T cells. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 7, n. 9, p. 694-705, 2013.
23. GALLERANI, Eleonora et al. Impaired priming of SARS-CoV-2-specific naive CD8⁺ T cells in older subjects. **Frontiers in immunology**, v. 12, 2021.
24. SAMJI, Tasleem; KHANNA, Kamal M. Understanding memory CD8⁺ T cells. **Immunology letters**, v. 185, p. 32-39, 2017.
25. PITOISET, Fabien et al. Deep phenotyping of immune cell populations by optimized and standardized flow cytometry analyses. **Cytometry Part A**, v. 93, n. 8, p. 793-802, 2018.
26. BRASIL. Ministério da Saúde. Informe Semanal nº 37 de Evidências sobre Variantes de Atenção de SARS-CoV-2 (2021). https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/publicacoes-tecnicas/informes-de-variantes/informe_s37.pdf/view [Accessed September 21, 2022].
27. Adamoski D, Baura VA, Rodrigues AC, Royer CA, Aoki MN, Tschá MK, et al. SARS-CoV-2 Delta and Omicron Variants Surge in Curitiba, Southern Brazil, and Its Impact on Overall COVID-19 Lethality. *Viruses* (2022) 14:1-8. doi: 10.3390/v14040809
28. Wu Z, Mcgoogan JM. 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* (2020) 323:1239-1242. doi: 10.1001/jama.2020.2648
29. MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China. *Jama*. 2020;323(13):1239-42.
30. CSORDAS, Bárbara Guimarães et al. Is IFN expression by NK cells a hallmark of severe COVID-19?. **Cytokine**, v. 157, p. 155971, 2022.
31. CRUZ-TAPIAS, P.; CASTIBLANCO, J.; ANAYA, J. M. Major histocompatibility complex: antigen processing and presentation. In: Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]. El Rosario University Press, 2013.
32. SALUMETS, Ahto et al. Epigenetic quantification of immunosenescent CD8⁺ TEMRA cells in human blood. **Aging Cell**, v. 21, n. 5, p. e13607, 2022.
33. LIPSITCH, Marc et al. Cross-reactive memory T cells and herd immunity to SARS-CoV-2. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 11, p. 709-713, 2020.
34. LAUER, Stephen A. et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. **Annals of internal medicine**, v. 172, n. 9, p. 577-582, 2020.
35. ADAMO, Sarah et al. Signature of long-lived memory CD8⁺ T cells in acute SARS-CoV-2 infection. **Nature**, v. 602, n. 7895, p. 148-155, 2022.
36. ACTIV-3/TICO STUDY GROUP. The Association of Baseline Plasma SARS-CoV-2 Nucleocapsid Antigen Level and Outcomes in Patients Hospitalized With COVID-19. **Annals of internal medicine**, v. 175, n. 10, p. 1401-1410, 2022.

37. DE OLIVEIRA MARQUES, Mariana et al. Soluble CD137 as a potential biomarker for severe COVID-19. **Immunology Letters**, 2022.
38. MUELLER, Scott N. et al. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. **Annual review of immunology**, v. 31, p. 137-161, 2013.
39. PRIMORAC, Dragan et al. Cellular Immunity—The Key to Long-Term Protection in Individuals Recovered from SARS-CoV-2 and after Vaccination. **Vaccines**, v. 10, n. 3, p. 442, 2022.
40. TAVUKCUOGLU, Ece et al. Functional responsiveness of memory T cells from COVID-19 patients. **Cellular Immunology**, v. 365, p. 104363, 2021.
41. PETRUSHEVSKA, Marija et al. Presentation of cytokine profile in relation to oxidative stress parameters in patients with severe COVID-19: a case-control pilot study. **F1000Research**, v. 10, 2021.
42. QINC, ZhouL et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. **Clin Infect Dis**, 2020.
43. BRAUN, Julian et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. **Nature**, v. 587, n. 7833, p. 270-274, 2020.
44. FILES, Jacob K. et al. Sustained cellular immune dysregulation in individuals recovering from SARS-CoV-2 infection. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, n. 1, 2021.
45. ANANTHARAJ, Anbalagan et al. Resolution of viral load in mild COVID-19 patients is associated with both innate and adaptive immune responses. **Journal of Clinical Virology**, v. 146, p. 105060, 2022.
46. QUEIROZ, Maria Alice Freitas et al. Cytokine profiles associated with acute COVID-19 and long COVID-19 syndrome. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, p. 931, 2022.
47. DARIF, Dounia et al. The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong?. **Microbial Pathogenesis**, v. 153, p. 104799, 2021.
48. KANG, Chang Kyung et al. Longitudinal analysis of human memory T-cell response according to the severity of illness up to 8 months after severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 224, n. 1, p. 39-48, 2021.
49. LEE, Amanda J.; ASHKAR, Ali A. The dual nature of type I and type II interferons. **Frontiers in immunology**, p. 2061, 2018.
50. VARCHETTA, Stefania et al. Unique immunological profile in patients with COVID-19. **Cellular & molecular immunology**, v. 18, n. 3, p. 604-612, 2021.
51. ZHAO, Yan et al. Longitudinal COVID-19 profiling associates IL-1RA and IL-10 with disease severity and RANTES with mild disease. **JCI insight**, v. 5, n. 13, 2020.
52. LOWERY, Shea A.; SARIOL, Alan; PERLMAN, Stanley. Innate immune and inflammatory responses to SARS-CoV-2: Implications for COVID-19. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 7, p. 1052-1062, 2021.

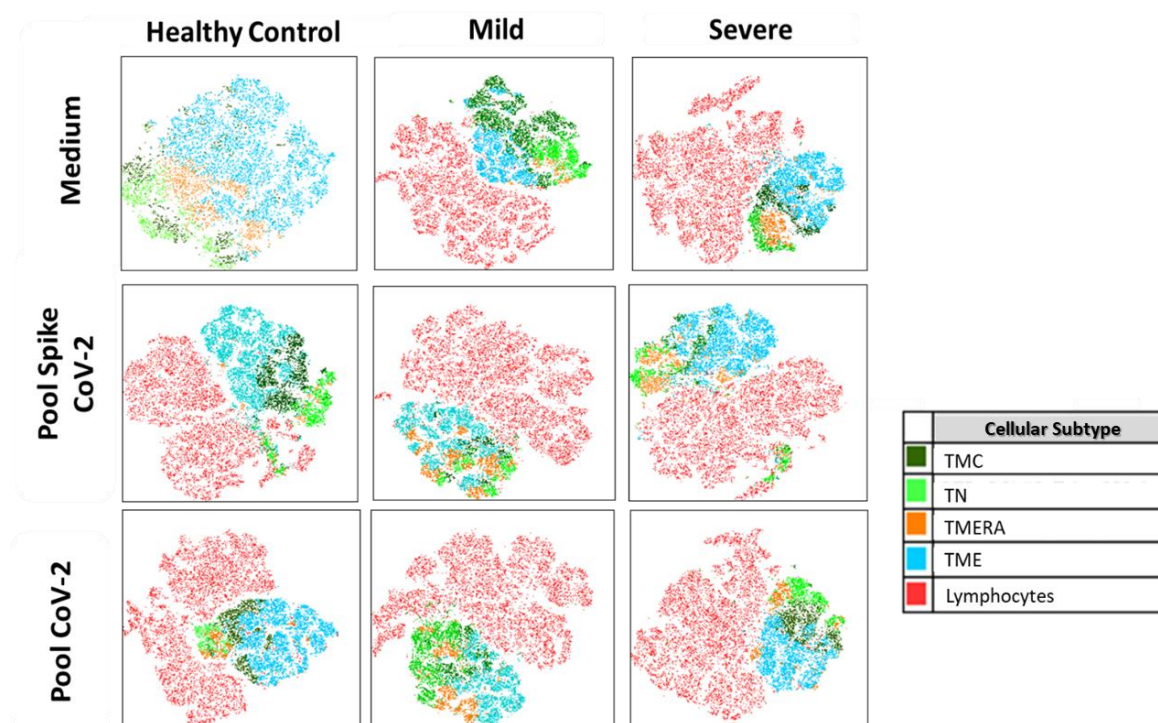
53. PENG, Yanchun et al. Broad and strong memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. **Nature immunology**, v. 21, n. 11, p. 1336-1345, 2020.
54. PRIETL, Barbara et al. Chronic Inflammation Might Protect Hemodialysis Patients From Severe COVID-19. **Frontiers in immunology**, v. 13, 2022.
55. THIEME, Constantin J. et al. Robust T cell response toward spike, membrane, and nucleocapsid SARS-CoV-2 proteins is not associated with recovery in critical COVID-19 patients. **Cell Reports Medicine**, v. 1, n. 6, p. 100092, 2020.
56. MECKIFF, Benjamin 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.
57. GRIFONI, Alba 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.
58. Crowe, C. R. et al. Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *J. Immunol.* **183**, 5301–5310 (2009).

SUPPLEMENTARY FIGURES

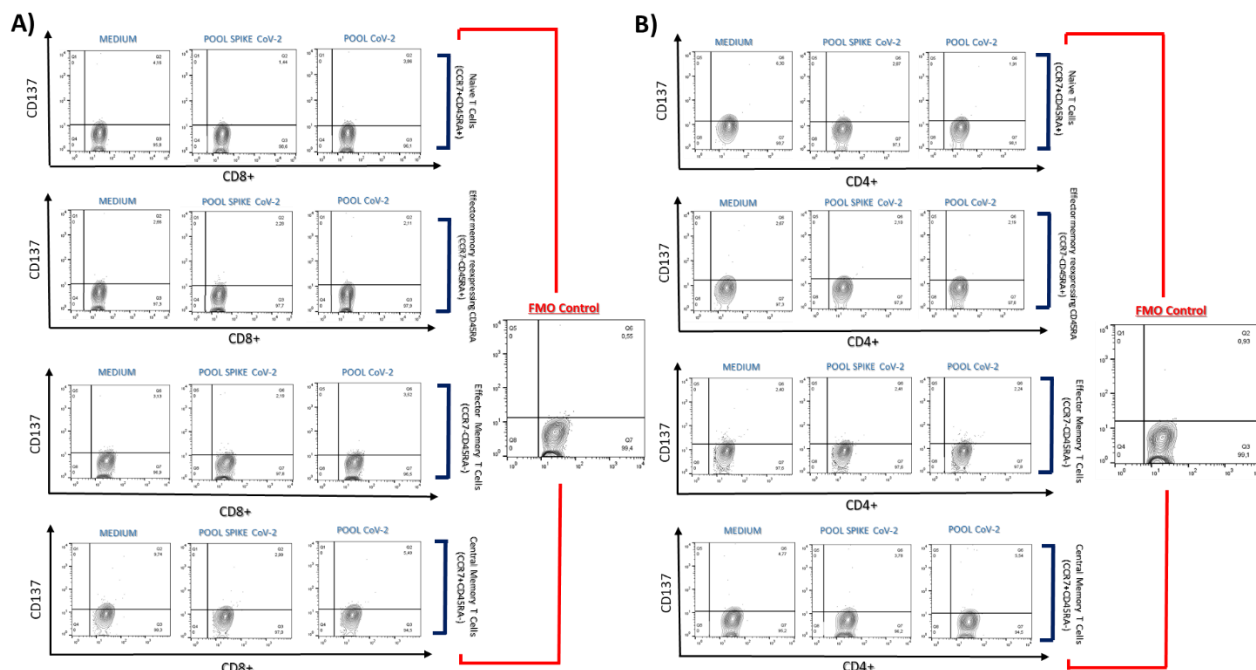


Supplementary Figure 1. Distribution of TEMRA, TEM, TCM and naïve CD8⁺ cells in peripheral blood of volunteers represented oft-distribution stochastic sub-incorporation operations (tSNE). Global visualization of tSNE of naïve and memory CD8⁺ T cells. Two-dimensional plots of tSNE (x, y) based on lymphocyte grouping by frequency and phenotypic similarity from CCR7 and CD45RA expression among TN (light green), TEMRA (orange), TEM (blue), and TCM (dark green) subpopulations were made.

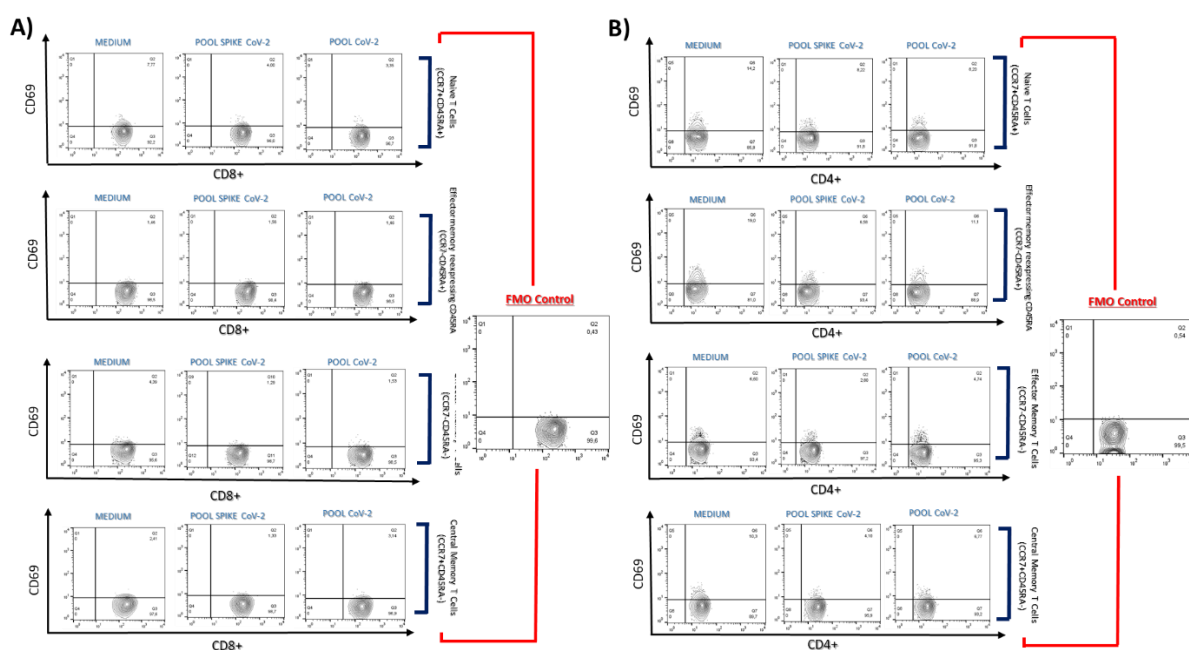
In addition, the concatenation of inter-subject data was performed. Therefore, the resulting FCS file was analyzed in the FlowJo tSNE module to reconstitute a unique two-dimensional graph that gathered the phenotypic similarities of these immune cells between individuals in the HC (n = 9), Mild CoV (n = 8) and severe CoV (n = 6) groups.



Supplementary Figure 2. Distribution of TEMRA, TEM, TCM and naïve CD4⁺ cells in peripheral blood of volunteers represented oft-distribution stochastic sub-incorporation operations (tSNE). Global visualization of tSNE of naïve and memory CD4⁺ T cells. Two-dimensional plots of tSNE (x, y) based on lymphocyte grouping by frequency and phenotypic similarity from CCR7 and CD45RA expression among TN (light green), TEMRA (orange), TEM (blue), and TCM (dark green) subpopulations were made. In addition, the concatenation of inter-subject data was performed. Therefore, the resulting FCS file was analyzed in the FlowJo tSNE module to reconstitute a unique two-dimensional graph that gathered the phenotypic similarities of these immune cells between individuals in the HC (n = 9), Mild CoV (n = 8) and severe CoV (n = 6).

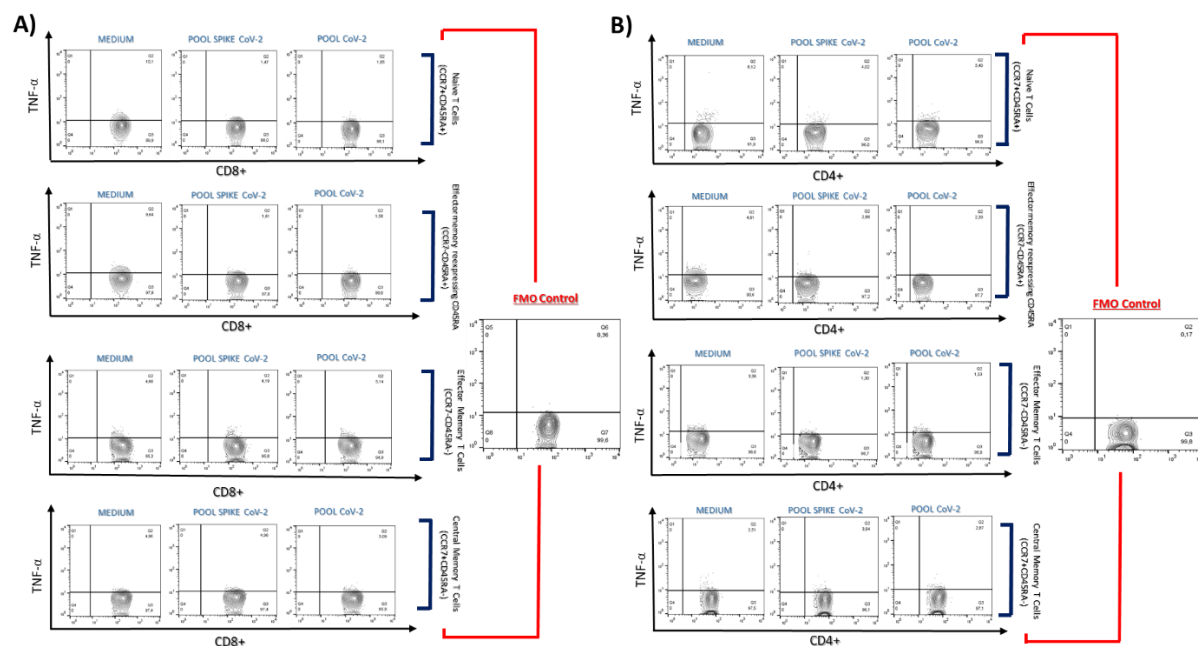


Supplementary Figure 3. CD8+ and CD4+ T cells subpopulations expressing CD137 in peripheral blood from volunteers. (A) Representative flow cytometry plots showing the expression of CD137 among naïve CD8+ T cells in patients recovered from COVID-19. (B) Representative flow cytometry plots showing the expression of CD137 among naïve CD4+ T cells in patients recovered from COVID-19. Numbers indicate percentages in the drawn gates. All stimulus conditions evaluated are shown in columns.

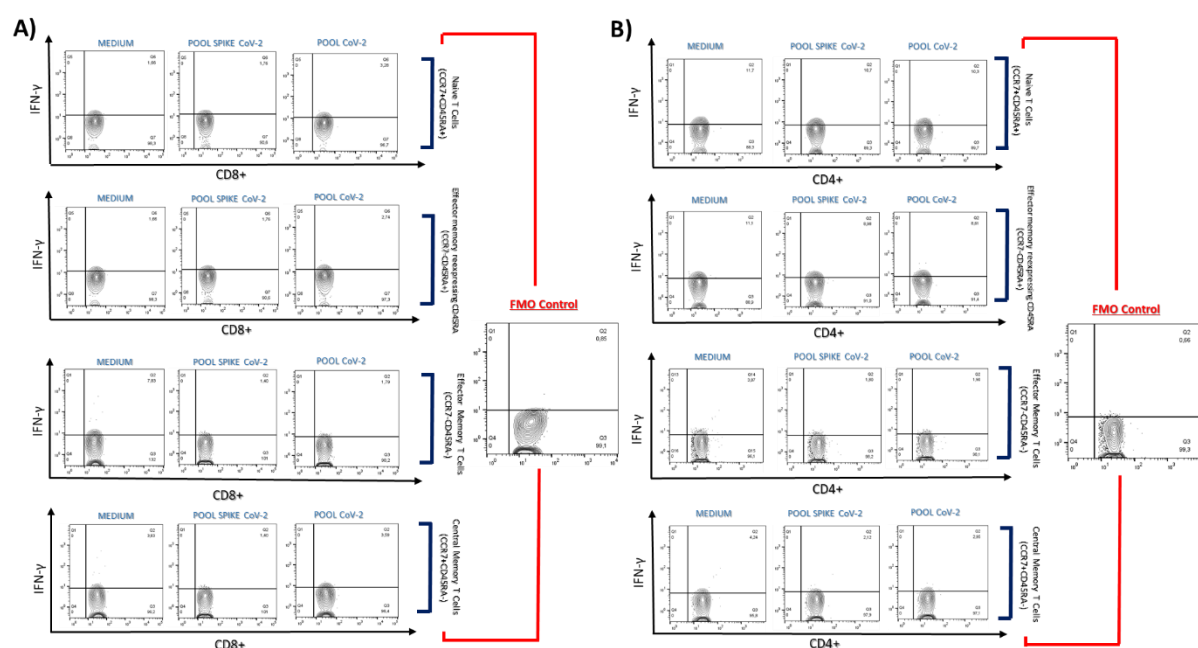


Supplementary Figure 4. CD8+ and CD4+ T cells subpopulations expressing CD69 in peripheral blood from volunteers. (A) Representative flow cytometry plots showing the expression of CD69 among naïve CD8+ T cells in patients recovered from COVID-19. (B) Representative flow cytometry plots showing the expression of CD69 among naïve CD4+ T cells in patients recovered from COVID-19. Numbers indicate percentages in the drawn gates. All stimulus conditions evaluated are shown in columns.

cells in patients recovered from COVID-19. Numbers indicate percentages in the drawn gates. All stimulus conditions evaluated are shown in columns.

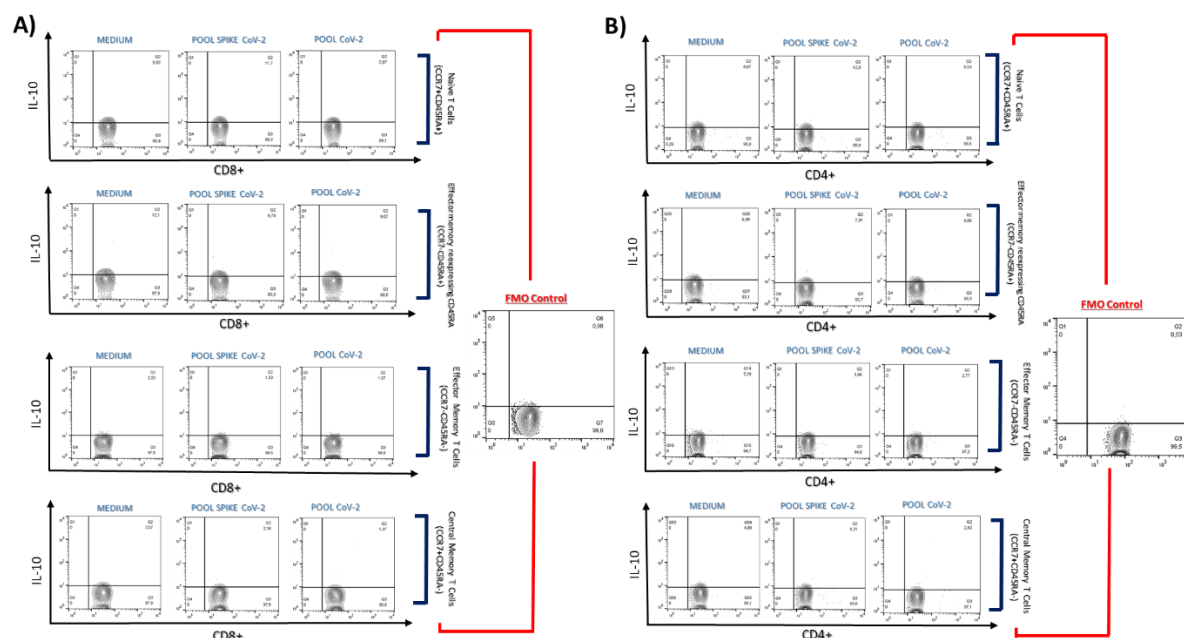


Supplementary Figure 5. CD8+ and CD4+ T cells subpopulations express TNF-α in peripheral blood from volunteers. (A) Representative flow cytometry plots showing the expression of TNF-α among naïve CD8+ T cells in patients recovered from COVID-19. (B) Representative flow cytometry plots showing the expression of TNF-α among effector memory CD8+ T cells in patients recovered from COVID-19. Numbers indicate percentages in the drawn gates. All stimulus conditions evaluated are shown in columns.

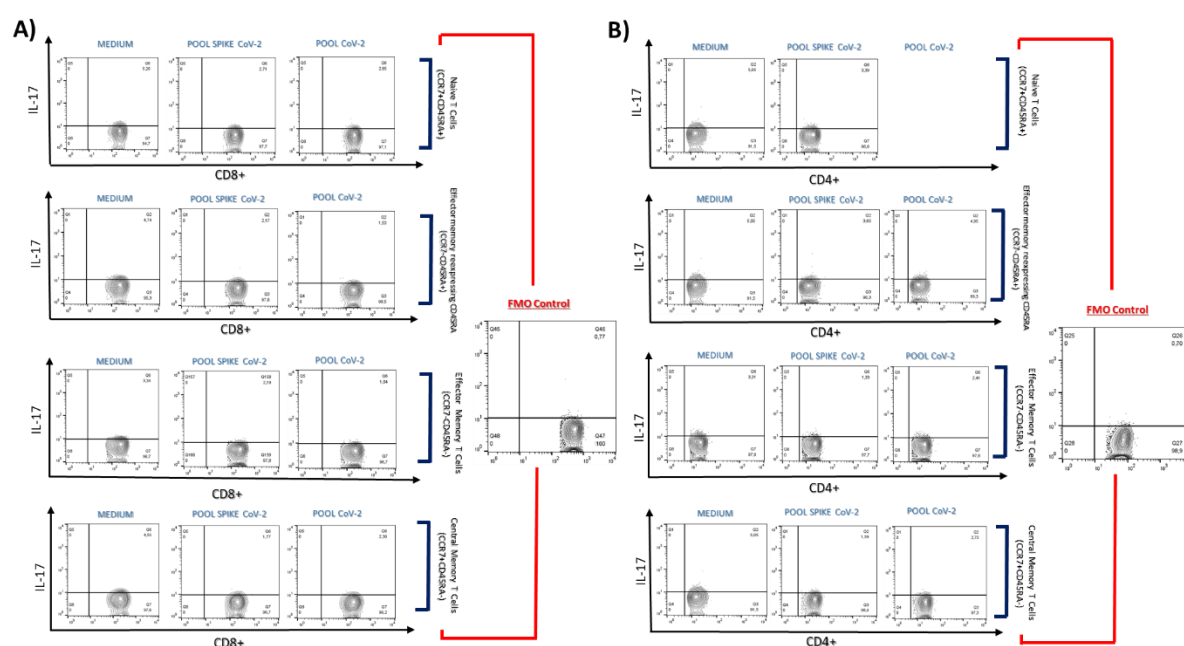


Supplementary Figure 6. CD8+ and CD4+ T cells subpopulations express IFN-γ in peripheral blood from volunteers. (A) Representative flow cytometry plots showing the expression of IFN-γ among effector memory CD8+ T cells in patients recovered from

COVID-19. (B) Representative flow cytometry plots showing the expression of IFN- γ among central memory CD8 $^{+}$ T cells in patients recovered from COVID-19. Numbers indicate percentages in the drawn gates. All stimulus conditions evaluated are shown in columns.



Supplementary Figure 7. CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T cells subpopulations expressing IL-10 in peripheral blood from volunteers. (A) Representative flow cytometry plots showing the expression of IL-10 among effector memory CD8 $^{+}$ T cells in patients recovered from COVID-19. (B) Representative flow cytometry plots showing the expression of IL-10 among central memory CD8 $^{+}$ T cells in patients recovered from COVID-19. Numbers indicate percentages in the drawn gates. All stimulus conditions evaluated are shown in columns.



Supplementary Figure 8. CD8+ and CD4+ T cells subpopulations expressing IL-17 in peripheral blood from volunteers. (A) Representative flow cytometry plots showing the expression of IL-17 among effector memory CD8+ T cells in patients recovered from COVID-19. (B) Representative flow cytometry plots showing the expression of IL-17 among central memory CD8+ T cells in patients recovered from COVID-19. Numbers indicate percentages in the drawn gates. All stimulus conditions evaluated are shown in columns.