UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA NÍVEL MESTRADO

Linfócitos T CD8+ na COVID-19: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES EM FORMAS CLÍNICAS LEVE E GRAVE DA DOENÇA.

FRANCISCO SANDRO AURELIANO

JOÃO PESSOA - PB
2022

FRANCISCO SANDRO AURELIANO

LINFÓCITOS T CD8+ NA COVID-19: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES EM FORMAS CLÍNICAS LEVE E GRAVE DA DOENÇA.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª. Drª. Tatjana Keesen de Souza Lima
Co-orientadora: Profª. Drª. Daniele Idalino Janebro

JOÃO PESSOA – PB
2022

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A927l Aureliano, Francisco Sandro.
Linfócitos T CD8+ na COVID-19 : avaliação de biomarcadores em formas clínicas leve e grave da doença / Francisco Sandro Aureliano. - João Pessoa, 2022.
80 f. : il.

Orientação: Tatjana Keesen de Souza Lima.
Coorientação: Daniele Idalino Janebro.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBiotec.

1. COVID-19. 2. Biomarcadores. 3. Células TCD8+. I. Lima, Tatjana Keesen de Souza. II. Janebro, Daniele Idalino. III. Título.

UFPB/BC CDU 578.834(043)

Elaborado por RUSTON SAMMEVILLE ALEXANDRE MARQUES DA SILVA - CRB-15/386

João Pessoa, 12 de agosto de 2022

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata da **32ª** (trigésima segunda) Dissertação de Mestrado do discente **Francisco Sandro Aureliano** do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**,** candidato ao título de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Aplicada aos Recursos Renováveis.

Às quatorze horas (14h) do dia doze de agosto do ano de dois mil e vinte e dois (12/08/2022), no endereço eletrônico https://meet.google.com/xqp-thga-bhk, divulgado na página eletrônica do Programa, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o discente **Francisco Sandro Aureliano**, candidato ao título de Mestre em Biotecnologia. Foram componentes da Banca Examinadora os professores doutores **Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente** (Orientadora e presidente, Universidade Federal da Paraíba), **Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes** (membro interno, Universidade Federal da Paraíba) e **Rafael de Almeida Travassos** (membro externo, Universidade Federal da Paraíba). Dando início aos trabalhos, a presidente da banca professora Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o candidato, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado *"***LINFÓCITOS T CD8^{+} NA COVID-19: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES EM FORMAS CLÍNICAS LEVE E GRAVE DA DOENÇA***"*. Após discorrer sobre o referido tema, o candidato foi arguido pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, a Banca Examinadora procedeu à avaliação e julgamento do candidato em caráter secreto, concluindo por atribuir-lhe o conceito **APROVADO**. Em face da aprovação, declarou o presidente achar-se o candidato **Francisco Sandro Aureliano** legalmente habilitado a receber o Título de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração **Biotecnologia Aplicada à Saúde**, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que faz jus.

Tatjana Keesen de Souza Lima

Profa. Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente (Orientadora e presidente)

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (examinador interno)

Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos (examinador extern

Aos meus pais, Francisco Aureliano e Josefa de Souza.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à **Deus**, por ser a razão da minha existência, meu melhor amigo e meu refúgio! A ti sou grato pela força nos momentos difíceis, pelas oportunidades de viver momentos incríveis e por toda a aprendizagem a mim proporcionada ao logo dessa jornada.

Aos meus pais, **Francisco Aureliano e Josefa de Souza**, por serem meus grandes amores e meus melhores exemplos de vida! Obrigado por tanto amor, carinho, proteção e por nunca medirem esforços para me proporcionar sempre o melhor! OBRIGADO POR TUDO!

Aos **meus familiares**, tios, avós, primos, por todo carinho e apoio na minha caminhada.

Às minhas pastoras e amigas, **Cinthya Martins** e **Bruna Alencar**, por cada palavra de conforto, fé e esperança, por cada abraço e por me colocarem em suas orações. Vocês são bênçãos na minha vida.

À **Família LABIDIC,** agradeço imensamente por me aceitarem, me acolherem tão bem! **Fany,** serei eternamente grato por me apresentar à essa Família, pelos conselhos, incentivos, puxões de orelha, pelas boas conversa, pareceria e por sua amizade. **Pedro,** por todo suporte no desenvolvimento desse trabalho e amizade. Pedrão, te admiro demais. Que você conquiste todos os teus sonhos! **Fernanda,** muito obrigado pela sua amizade, seus incentivos científicos e por me encorajar muitas vezes. Muito obrigado! **Fernando e Léo**, a alegria de vocês é contagiante, sempre dispostos a ajudar e a aprender. Que vocês alcem voos cada vez mais alto**.** **Tat**, minha orientadora, obrigado por abrir as portas da sua casa (LABIDIC) para um novato (Eu). A ti sou grato, por me acolher na sua linda família científica, pela confiança, paciência, respeito, orientações, conselhos, por cada ensinamento, por ser tão presente e pela oportunidade fazer parte da sua equipe. GRATIDÃO!

À minha coorientadora **Daniele Idalino**, muito obrigado por todo apoio!

A **todos os professores** do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, 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.

Aos membros da Banca Examinadora, **Rafael de Almeida Travassos, Ulrich Vasconcelos da Rocha, Ian Porto Gurgel do Amaral e Josiane de Campos Cruz** por colaborarem enriquecendo este trabalho. Muito obrigado!

À **Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba - FAPESQPB**, pelo auxílio financeiro necessário para a concretização deste trabalho.

RESUMO

A doença do Coronavírus-19 (COVID-19) é uma doença respiratória altamente transmissível causada pelo Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS CoV-2). Os HCoVs de maior importância epidemiológica são MERS-CoV causador da síndrome respiratória do Oriente Médio, o SARS-CoV causador da síndrome respiratória aguda grave e o SARS-CoV-2 causadores da COVID-19. O SARS-CoV-2 é um beta coronavírus, de RNA e surgiu inicialmente na China em dezembro de 2019, cujos primeiros casos foram associados ao Mercado Atacadista de Frutos do Mar da cidade de Wuhan. Desde seu surgimento, os casos de COVID-19 têm se alastrado por diversos países, classificando assim uma pandemia. Os infectados por SARS-CoV-2, podem não apresentar sintomas ou apresentar sintomas variando de leves à letal. A atual situação pandêmica declarada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em março de 2020, devido a disseminação do SARS-CoV-2 tem sido desafiadora para as autoridades em saúde a encontrar tanto soluções terapêuticas como preventivas para a doença, assim como compreender os seus efeitos no organismo humano do ponto de vista imunológico. Alguns descritos relatam principalmente alterações leucocitárias, com linfopenia e diminuição das células T, incluído as células T CD8+. As alterações na subpopulação de linfócitos T $CD8^+$ elevam a produção dos níveis de expressão dos marcadores de ativação, proliferação e modulação indicando que pode haver respostas de células T $CD8^+$ específicas nos pacientes com COVID-19. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo investigar os mecanismos imunomodulatórios mediados pelas células T CD8 +, correlacionando as características clínicas de pacientes recuperados de formas leve e grave da COVID-19, no intuito de caracterizar presença de marcadores prognósticos. Para tal, amostras de sangue periférico foram obtidas de voluntários recrutados e distribuídos nos grupos controle (CTL - n = 9), leve IgG - (n = 5), leve IgG+ (n=6) e grave (n = 7). Amostras de PBMCs foram obtidas e incubadas sob 4 diferentes condições: não estimuladas (meio), estimuladas com peptídeos SARS-CoV-2 (Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2), e estimuladas com *Staphylococcal enterotoxin* B (SEB). As células T CD8+ foram analisadas e classificadas quanto a expressão de marcadores de ativação (CD38 e CD69), de proliferação (Ki-67), bem como à produção da citocina INF-ɣ e perfil citotóxico através da coexpressão de granzima B e perforina, e o marcador de degranulação CD107a entre os grupos controles e recuperados. As nossas análises demonstram de forma geral que tanto indivíduos que tiverem COVID leve e são IgG +, quanto indivíduos que tiveram a COVID na forma clínica grave apresentaram uma frequência menor de células T CD8+. Além disso, os dados demostraram ainda, que os grupos leves IgG- e/ou IgG+ apresentaram uma expressiva produção de marcadores de ativação CD69 e CD38, IFN - γ e células T CD8+ mais citotóxicas. Podemos concluir que os marcadores de ativação, degranulção e a citocina pró-inflamatória IFN – γ podem ser possíveis marcadores de prognóstico para a COVID-19 na forma clínica leve. Essa abordagem poderá nortear investimento em pesquisas na área da Biotecnologia, com abordagem em desenvolvimento de possíveis terapias alvo para esses marcadores, ou até mesmo desenvolvimento de testes diagnósticos mais rápidos e eficazes na predição de doenças graves.

.

Palavras-chave: Biomarcadores, COVID-19, Células TCD8+.

ABSTRACT

Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) is a highly transmissible acute respiratory disease caused by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). The HCoVs of greatest epidemiological importance are MERS-CoV causing Middle East respiratory syndrome, SARS-CoV causing severe acute respiratory syndrome, and more recently SARS-CoV-2 causing COVID-19. SARS-CoV-2 is an RNA beta coronavirus and initially emerged in China in December 2019, where the first cases were associated with the Wuhan Seafood Wholesale Market, China. Since its emergence, cases of COVID-19 have spread across several countries, thus classifying it as a pandemic. Those infected with SARS-CoV-2 may have no symptoms or have symptoms ranging from mild to lethal. The current pandemic situation declared by the World Health Organization (WHO) in March 2020, due to the spread of SARS-CoV-2, has been challenging for health authorities to find both therapeutic and preventive solutions for the disease, as well as understand its effects on the human organism from an immunological point of view. Some described mainly report leukocyte alterations, with lymphopenia and a decrease in T cells, including CD8+ T cells. Changes in the subpopulation of CD8+ T lymphocytes have increased the production of expression levels of activation, proliferation, and modulation markers indicating that there may be specific CD8+ T cell responses in patients with COVID-19. Thus, the present study aimed to investigate the immunomodulatory mechanisms mediated by CD8 + T cells, correlating the clinical characteristics of patients recovered from mild and severe forms of COVID-19, in order to characterize the presence of prognostic markers. To this end, peripheral blood samples were obtained from recruited volunteers and distributed into control (CTL - n = 9), mild IgG - (n = 5), mild IgG+ (n = 6) and severe (n = 7) groups. Samples of PBMCs were obtained and incubated under 4 different conditions: unstimulated (medium), stimulated with SARS-CoV-2 peptides (Pool Spike CoV-2 and Pool CoV-2) and stimulated with Staphylococcal enterotoxin B (SEB). CD8+ T cells were analyzed and classified regarding the expression of markers of activation (CD38 and CD69), proliferation (Ki-67), as well as the production of the cytokine INF-ɣ and cytotoxic profile through the co-expression of granzyme B and perforin, and the degranulation marker CD107a between the control and recovered groups. Our analyzes generally demonstrate that both individuals who have mild COVID and are IgG+, and individuals who have severe clinical COVID-19 had a lower frequency of CD8+ T cells. In addition, the data also showed that the IgG- and/or IgG+ light groups showed an expressive production of activation markers CD69 and CD38, IFN – γ, and more cytotoxic CD8+ T cells. We can conclude that markers of activation, degranulation, and the pro-inflammatory cytokine IFN - γ may be possible prognostic markers for COVID-19 in the mild clinical form. This approach could guide investment in research in the area of Biotechnology, with an approach in the development of possible target therapies for these markers, or even the development of faster and more effective diagnostic tests in the prediction of serious diseases.

Keywords: Biomarkers. COVID-19. CD8+ T cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação dos principais países com maior número de casos confirmados e morte por COVID-19 até março de 2022**.**.....19

Figura 2 - Rotas de transmissão propostas para a infecção pelo SARS-CoV-2.....23

Figura 3 - Estratégia de Análise utilizada para identificar as subpopulações de linfócitos T CD8+ e marcadores imunológicos em amostras de PBMC.....41

Figura 4 - Frequência de células T CD8+ ativadas em sangue periférico de voluntários.....46

Figura 5 - Perfil de expressão de CD69 e CD38 em células TCD8+.....47

Figura 6: perfil de expressão de IFNγ em células T CD8+.....49

Figura 7 - Frequência da produção de granzima B, perforina e CD107a pelas células T CD8+ em sangue periférico de voluntários.....51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA Albumina Sérica Bovina

CDC Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CD Grupamento de Diferenciação

CEP Comitê de Ética em Pesquisa

COVID-19 doença do Coronavírus-19

CTL Controle

CTLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

CO_2 Dióxido de Carbono

DAMPs Padrões Moleculares Associados a Danos

DRA Doença Respiratória Aguda

E Proteína do Envelope

ECA 2 Enzima Conversora de Angiotensina 2

ELA Esclerose Lateral Amiotrófica

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

HCoVs Coronavírus Humano

HLA Antígeno Leucocitário Humano

IFN Interferon

IL Interleucina

ILCs células linfoides inatas

Ig Imunoglobulina

M Proteína de Membrana

MABs Anticorpos Monoclonais

MERS Síndrome Respiratória do Oriente Médio

MERS CoV Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio

MHC Complexo Principal de Histocompatibilidade

N Proteína do Nucleocapsídeo

NK Natural Killers

NLR Taxa de Neutrófilos/Linfócitos

nsp Proteínas não estruturais

NTD Domínio N Terminal

OMS Organização Mundial de Saúde

orf Janelas de Leitura Aberta

PAMPs Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PB *Permeabilization Buffer*

PCR Proteína C Reativa

PBMC Células Mononucleares do Sangue Periférico

PBS Solução Fosfato Salina

PRRs Receptores de Reconhecimento de Padrões

RE Retículo Endoplasmático

RBD Região de Ligação com o Receptor

rpm Rotação por Minuto

RPMI *Roswell Park Memorial Institute*

RLR Receptores *RIG-I-like*

RT-qPCR Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real

S Proteína Spike

SARS Síndrome Respiratória Aguda Grave

SARS CoV Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave

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

SEB *Staphylococcal enterotoxin* B

SDRA Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

SFB Soro Fetal Bovino

TA Temperatura Ambiente

TCR: Receptor de células T

Tfh – Células T foliculares

TLR Receptores *Toll-like*

TMPRSS2 Serina Protease Transmembranar 2

UTI Unidade de Terapia Intensiva

UTR Regiões Flanqueadas Não Traduzidas

VHS Velocidade de Hemossedimentação

Th1: Células T auxiliares do tipo 1

TNF-α: Fator de Necrose Tumoral-α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....18
2.1 Histórico e Epidemiologia 19
2.2 Agente Etiológico.....21
2.3 Transmissão e Mecanismo de Infecção.....23
2.4 Sinais, sintomas e diagnóstico.....26
2.5 Imunologia da COVID-19.....27
2.5.1 Imunidade Inata na COVID-19.....27
2.5.2 Imunidade Adaptativa na COVID-19.....31
3 OBJETIVOS 34
3.1 Objetivo Geral 35
3.2 Objetivos Específicos 35
4 METODOLOGIA 36
4.1 Considerações Éticas 37
4.2 Amostras Clínicas.....37
4.3 Ensaio de RT qPCR.....38
4.4 Desenho e preparação do Pool de peptídeos do SARS-CoV-2.....38
4.5 Processamento de Amostras e Obtenção do Soro.....39
4.6 Sorologia para Diagnóstico de Anticorpos IgG.....40
4.7 Imunofluorescência para Análise de Células T CD8+.....40
4.8 Anticorpos Monoclonais (MABs) 41
4.9 Aquisição e Análise dos dados por Citometria de Fluxo.....42
4.10 Análise estatística.....43
5 RESULTADOS.....44
5.1 Caracterização demográfica e clínica dos indivíduos saudáveis (CTL) e dos pacientes recuperados da COVID-19 inseridos nos grupos de estudo….....45
5.2 Avaliação da frequência da subpopulação de células T $CD8^+$ no grupo CTL e nos distintos grupos de pacientes recuperados da COVID-19….....47

5.3 Expressão dos marcadores de ativação CD69, CD38, Ki67 e PD1 na subpopulação de células T $CD8^+$….....48
5.4 Investigação dos níveis de IFNγ na subpopulação de células T CD8+ são observados em pacientes recuperados da forma leve da COVID-19. 49
5.5 Caracterização da atividade citotóxica das células T CD8+ mediante análise de produção de perforina, granzima B e CD107a em pacientes recuperados da COVID-19 e indivíduos não infectados pelo SARS-CoV-2.....50
6 DISCUSSÃO.....56
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....62
REFERÊNCIAS 64
APÊNDICES.....75

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os coronavírus (CoVs) constituem uma família de vírus de RNA com uma ampla gama de hospedeiros naturais, e foram descritos a mais de 50 anos como agentes causadores de infecções em diversas espécies de animais, incluindo seres humanos. Nos anos 1960, os coronavírus HCoV-229E, HKU1, OC43 e NL63 já haviam sido identificados como agentes causadores de infecções respiratórias leves em humanos. No entanto, os coronavírus que infectam humanos só se tornaram mais conhecidos em 2003, quando foi identificado o SARS-CoV responsável pela síndrome respiratória aguda grave (SARS), posteriormente com o MERS-CoV causador da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) em 2012 e mais recentemente com o surgimento da síndrome respiratória grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2) em 2019 (WEISS, 2005; ANDERSEN et al.,2020; PAULES et al., 2020).

O SARS-CoV-2 é um dos coronavírus que ficou conhecido por infectar seres humanos (ANDERSEN et al.,2020). No final de 2019 e início de 2020, diversos casos de pneumonia de causa desconhecida foram relatados na cidade de Wuhan, China (ZHU et al.,2020; LI et al.,2020). O “novo” coronavírus (nCov) foi isolado e identificado em 7 de janeiro de 2020 por cientistas chineses, e nomeado primariamente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como 2019-nCoV (LI et al.,2020). Trata-se de um membro da linhagem beta coronavírus, descoberto através de amostras de pacientes com pneumonia (ZHU et al., 2020). Ainda em meados de janeiro de 2020, países como Tailândia, Japão e Coréia do Sul, confirmaram a detecção de uma infecção humana pelo novo coronavírus da China (LI et al., 2020). O novo vírus se disseminou rapidamente chegando a diversos países causando doenças respiratórias de níveis variados, sendo declarada situação emergencial internacional pela OMS em janeiro de 2020, seguido da declaração de pandemia, também feita pela OMS em 11 de março do mesmo ano (OMS, 2020). A primeira confirmação da infecção por SARS-CoV-2 no Brasil foi notificada em 26 de fevereiro de 2020, na cidade de São Paulo – SP e a primeira morte foi registrada em 17 de março de 2020 em São Paulo (Brasil, 2020).

Estudos tem demostrado que a doença infecciosa por coronavírus (COVID-19) tem se apresentado de várias formas desde assintomática até casos graves. Quando sintomática, o quadro clínico pode variar de sinais e sintomas leves a graves, cursando

com doenças respiratórias graves, que se assemelham ao SARS-CoV e uma alta mortalidade tem sido observada. Diversos estudos ao redor do mundo tem sido realizado contemplando fisiopatologia, transmissão, gravidade, aspectos imunológicos e possíveis sequelas, dentre esses estudos tem se demonstrando que há uma hipercitocinemia inflamatória a exemplo da IL-6, IL-2 e IFN-γ, expressão de marcadores imunológicos e alterações em diversos parâmetros laboratoriais como contagem total de leucócitos com considerável variação, por vezes aparecendo alta ou diminuída, linfopenia, neutrofilia, aumento da proteína C reativa (PCR), aumento nas taxas da velocidade de hemossedimentação (VHS), dentre outros. Essas alterações estão associadas ao prognóstico da doença onde a maior parte das alterações estão sendo detectadas em pacientes graves (LIU et al., 2020; YE et al., 2020).

No que diz respeito à terapêutica, diversas abordagens medicamentosas incluindo antivirais como remdesivir, favipiravir, dentre outros, têm sido administradas em pacientes COVID-19, com a finalidade de encontrar um ou mais medicamento que seja eficiente. Porém, não se tem comprovação de efetividade medicamentosa contra a doença, sendo a terapia medicamentosa adotada até o momento apenas sintomática (SHEN et al., 2020).

Os aspectos imunológicos na COVID-19 ainda não estão bem compreendidos, no entanto, muitas alterações clínicas e laboratoriais já foram descritas, destacando a linfopenia com redução nas frequências das células T CD8 $^{+}$, hipercitocinemia, maior ativação das células citotóxicas, exaustão celular e a resposta imune ineficiente tem sido os eventos comumente observados nos casos de infecções respiratórias graves causadas pelo SARS-CoV-2 (CHIEN et al., 2006; LIU et al., 2020; COSTELA-RUIZ, 2020).

Diante do exposto, este trabalho visou avaliar o perfil imunológico das células T CD8+ em indivíduos recuperados da COVID-19 na busca por biomarcadores que possam ser correlacionados as características clínicas de pacientes recuperados das formas leve e grave da doença. Nesse contexto, a fim de avaliar o perfil de expressão de marcadores importantes no papel das subpopulações das células TCD8+, análises citométricas foram realizadas a partir da estimulação, mediante peptídeos antigênicos do SARS-CoV2, de amostras de células mononucleares de sangue periférico

(PBMCs) oriundas de indivíduos saudáveis e pacientes recuperados acometidos pelas formas leve e grave da COVID-19.

REFERENCIAL TEÓRICO

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico e Epidemiologia

O ano de 2020 foi marcado por uma crise de saúde Global poucas vezes vista na história da humanidade em decorrência do surgimento de um novo vírus. Tratava-se de um novo coronavírus (SARS-CoV-2) que até então não havia sido identificado em seres humanos (OMS, 2020a). Segundo Zhou et al. (2020), a epidemia teve início no dia 12 de dezembro de 2019 na China. Inicialmente as autoridades chinesas relataram casos de pneumonia de causas desconhecidas sendo a maioria associado a pessoas que relataram exposição em um Mercado Atacadista de Frutos do Mar na cidade de Wuhan, província de Hubei, na China (PAULES et al., 2020; HE et al.,2020).

Em 31 de dezembro de 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi informada formalmente sobre os vários casos da nova e misteriosa doença na cidade de Wuhan, China (OMS, 2020b), e no dia 07 de janeiro de 2020 o Centro Chinês de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) anunciou a identificação de um novo CoV que foi nomeado primariamente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como 2019-nCoV e posteriormente foi oficialmente designado como síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2) (GRALINSK et al.,2020; HE et al., 2020). O 2019-nCoV tratava-se de um vírus zoonótico, membro da linhagem beta coronavírus, descoberto através de amostras de pacientes com pneumonia (ZHU et al., 2020).

Ainda em janeiro de 2020, países como Tailândia, Japão e Coréia do Sul, confirmaram a detecção de uma infecção humana pelo novo coronavírus da China (LI et al., 2020). O surto causado pelo SARS-CoV-2 aumentou substancialmente e em 26 de janeiro de 2020 havia registro de 2.761 casos de infecção, 80 mortes associadas ao novo vírus na China e aproximadamente 33 casos da infecção em outros 10 países (Zhou et al., 2020). Não demorou muito para que o novo vírus se espalhasse por diversos países e continentes causando doenças respiratórias de níveis variados, sendo declarada situação emergencial de saúde pública de preocupação internacional pela OMS em 31 de janeiro de 2020, e em 11 de fevereiro de 2020 foi designado o nome COVID-19 para a doença causada pelo novo coronavírus, que em 11 de março de 2020 a doença foi caracterizada como uma pandemia (OMS, 2020d). Devido à natureza infecciosa do novo coronavírus, os números de pessoas infectadas

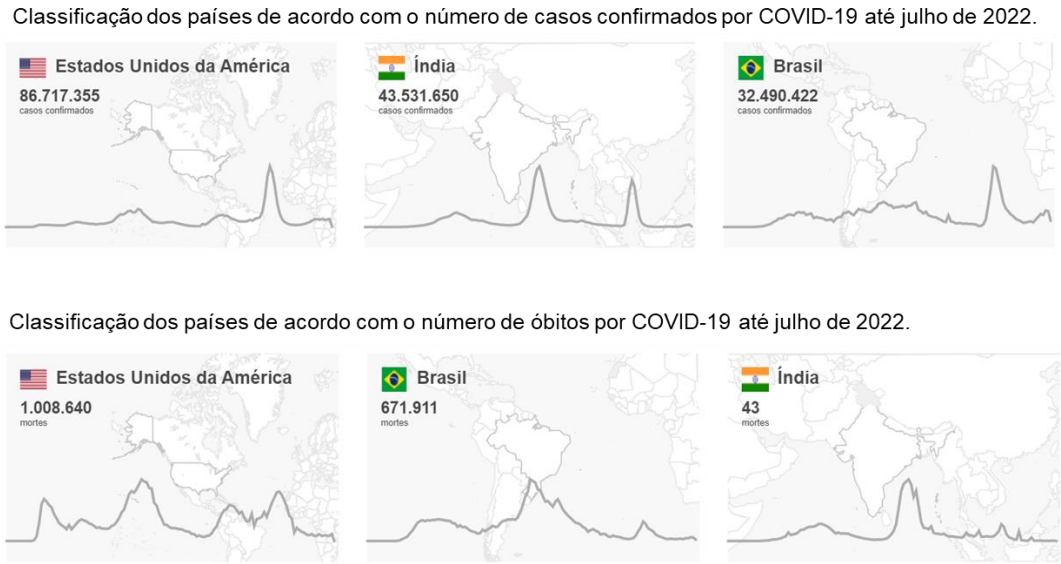
confirmadas aumentaram exponencialmente em poucos dias, de modo que, no dia 25 de março os números globais chegaram na casa dos 413.467 testados positivos e 18.433 fatalidades confirmadas (SRIVASTAVA et al., 2020; ZU et al., 2020; CALLAWAY; CYRANOSKI, 2020; OMS, 2020c; OMS, 2020d.).

No Brasil, o primeiro caso de infecção por SARS- CoV-2 foi confirmado em um homem de 61 anos em retorno de viagem da Itália em 26 de fevereiro de 2020 (JORNAL FOLHA DE SÃO PAULO, 2020a), e seu primeiro óbito no dia 17 de março de 2020 na cidade de São Paulo, um homem de 62 anos (JORNAL FOLHA DE SÃO PAULO, 2020b).

Em 27 de julho de 2021, 19 meses após a confirmação do primeiro caso, o mundo totalizava aproximadamente 195 milhões de casos de COVID 19 confirmados e 4,1 milhões de óbitos, de acordo com os dados da OMS e o Brasil já registrava cerca de 19 milhões de casos e 549 mil óbitos (OMS, 2021).

Atualmente os números globais de confirmados e óbitos são alarmantes, segundo dados obtidos da OMS em 05 de julho de 2022 os casos confirmados chegam na casa dos 547.901.157 enquanto os óbitos somavam 6.339.899 (OMS, 2022). Até março de 2022, o Brasil ocupava a 3ª posição entre os países com maior número de casos confirmados (Figura 1) e a 2ª posição com maior número de mortes em razão da COVID-19 ao longo desse período pandêmico (figura 1) (WHO, 2022)

Figura 1 – Classificação dos principais países com maior número de casos confirmados e morte por COVID-19 até março de 2022



Fonte: Painel da OMS sobre o coronavírus - COVID-19, 2022

Em julho de 2020, o Nordeste se destacava como a segunda região com maiores porcentagens de ocorrências no Brasil, sendo 789.896 confirmados e 27.383 óbitos (BRASIL, 2020a). Já em 24 de julho de 2022 a primeira região que aparece com maior número de infectados é a Sudeste, com 13.293.422 casos confirmados e 324.512 óbitos, enquanto que o Nordeste apareceu como a terceira região brasileira mais afetada em termos de infecção pela COVID-19, registrando assim 6.706.888 casos confirmado e 130.561 óbitos e a região Norte a menos afetada registrando 2.667.766 casos seguido por 50.57 óbitos (BRASIL, 2022b).

Dentre os estados nordestinos, em 24 de julho de 2022, a Paraíba registrou 642.266 casos confirmados e 10.339 óbitos (BRASIL, 2022a). Em nível municipal, a capital paraibana, João Pessoa, segue liderando o *ranking* das ocorrências por COVID-19. Segundo dados da Secretaria estadual de Saúde da Paraíba (2022), em 25 de julho de 2022 a capital da Paraíba encontra-se com os índices de 159.248 testados positivos e 3.231 óbitos por COVID-19 (BRASIL, 2022b).

2.2 Agente Etiológico

Os coronavírus (CoVs) são uma grande família de vírus de RNA, classificados na ordem Nidovirales e na família Coronaviridae sendo essa, subdividida em duas subfamílias Coronavirinae *e* Torovirinae com uma ampla gama de hospedeiros naturais. Os Coronavirinae são capazes de se comportarem como vírus zoonóticos, capazes de causar doenças em diversas espécies de animais domésticos e selvagens, bem como em seres humanos e atualmente são classificados em quatro gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus, Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus,* em que o SARS - CoV- 2, assim como o SARS - CoV e o MERS – CoV pertencem ao gênero *Betacoronavirus,* apresentando os seguintes subgêneros*: Embecovírus, Hibecovírus, Merbecovírus* e *Sarbecovírus* (PATRICK et al.,2009; WEISS, 2011; XAVIER et al., 2020; LI et al., 2019; WASSENAAR; GORBALENYA et al., 2020).

Os coronavírus são vírus envelopados com diâmetro de 60 a 130 nm, contêm um genoma de ácido ribonucleico - RNA de fita simples de sentido positivo, capazes de infectar aves (*Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*), além de várias espécies de mamíferos, dentre eles o humano (*Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus*). Dos coronavírus pertencentes a subfamília *Coronavirinae* e gênero *Betacoronavirus,* os

SARS – CoVs e os MERS CoVs foram caracterizados por serem transmitidos por morcegos, sendo estes, reservatório natural para ambos, transmitindo para gatos e camelos respectivamente, como hospedeiros intermediários, e por fim, transmitidos ao humano (PATRICK et al.,2009; WEISS.,2011; XAVIER et al., 2020; LI et al., 2019; JUNEJO et. al. 2020; ANDERSEN et al., 2020).

O SARS-CoV-2 é o sétimo coronavírus conhecido por infectar seres humanos (ANDERSEN et al.,2020). Os coronavírus humano (HCoVs), normalmente causam resfriados leves em indivíduos saudáveis, e por isso, esses patógenos recebiam relativamente pouca importância. Porém, nas últimas duas décadas, os HCoVs patogênicos têm emergido causando surtos endêmicos, epidêmicos e pandêmicos denominados por síndromes respiratórias graves tais como síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) em 2002, síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) em 2012 e síndrome respiratória grave coronavírus 2 (SARS – CoV -2) em 2019 (PATRICK et al.,2009; PAULES et al., 2020; WEISS, 2011; HE et al.,2020).

O SARS-CoV-2, assim como outros coronavírus, é um vírus de RNA de sentido positivo, de cadeia simples, envelopado e não segmentado. Seu genoma apresenta um tamanho de 27 a 32kb, grande quando comparado a outros vírus, além disso, o genoma do SARS-CoV-2 consiste ~~em~~ duas regiões não traduzidas terminais 5’ UTR e 3′ UTR, dois grandes complexos - ORF1A e ORF1B codificante para proteínas não estruturais (NSPs), um gene da proteína *spike* (S), gene da proteína do envelope (E), gene da proteína da membrana (M), gene da proteína nucleocapsídeo (N), e genes para proteínas acessórias (QAMAR et al., 2020; ASTUTI I, YSRAFIL, 2020).

Estudos afirmam que o SARS-CoV-2 dispõe na sua estrutura de quatro proteínas principais sendo elas a glicoproteína *spike* (S), a glicoproteína de envelope (E), a glicoproteína de membrana (M) e a glicoproteína do nucleocapsídeo (N). A proteína spike (S) na superfície do vírus e apresenta uma conformação transmembranar, onde o domínio funcional S1 está associada ao tropismo celular e interação com o receptor na membrana da célula hospedeira, enquanto que o S2 medeia o processo de fusão das membranas virais e celulares. A proteína do nucleocapsídeo (N) é expressa durante o processo de infecção, participando do endereçamento do RNA viral além de facilitar o processo de replicação, processamento e montagem do vírus. Um outro componente importante é a proteína M, que interage com todas as outras proteínas estruturais com a finalidade de

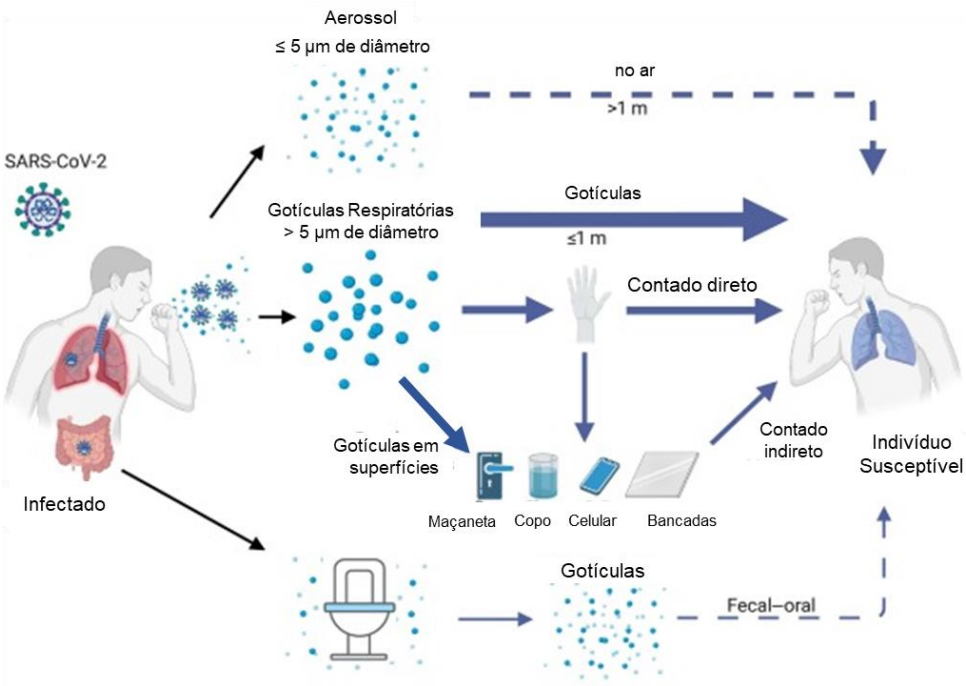
estabilizar a montagem viral. A proteína de envelope (E) que atua juntamente com as demais proteínas estruturais no início do processo de infecção e montagem viral (BIANCHI et al., 2020; WALLS et al., 2020; TILOCCA et al., 2020; RABAAN et al., 2020; ASTUTI I, YSRAFIL, 2020).

2.3 Transmissão e Mecanismo de Infecção

A transmissão do SARS-CoV-2 exige que uma carga viral mínima, ainda não conhecida, de vírus competente para que haja a replicação entre em contato com um sítio anatômico vulnerável de um indivíduo susceptível (Eric et al., 2021).

No início da pandemia da COVID-19, muitas hipóteses a respeito da dinâmica da transmissão do vírus foram levantadas e por se tratar de um agente infeccioso das vias aéreas respiratórias logo associou-se que a principal forma de transmissão seria através do contato com gotículas respiratórias, aerossol, contato direto com superfícies contaminadas e devido a manifestação de quadros gastrointestinais presentes em alguns casos, elencou-se a possibilidade da ocorrência de transmissão por via fecal-oral (Figura 2). Estudos tem relatados que a transmissão do SARS-CoV-2 pode ocorrer por várias vias aceitáveis e depende de vários fatores, incluindo a dose infecciosa, viabilidade do vírus, distância e duração da exposição, diversos fatores ambientais como temperatura, umidade, precipitação, pH, ventilação, radiação ultravioleta solar, entre outros , e fatores do hospedeiro tais como a taxa de respiração, morfologia do trato respiratório, tecidos-alvo, distribuição de receptores, barreiras do hospedeiro e respostas imunes (Harrison et al., 2020; Escandón et al., 2021; Wang et al.,2021; Eric et al.,2021.).

Figura 2 - Rotas de transmissão propostas para a infecção pelo SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de Harrison *et al*. (2020)

Conforme reconhecido pelo CDC, o principal modo pelo qual as pessoas são infectadas com SARS-CoV-2 é através da exposição a fluidos respiratórios que transportam vírus infecciosos. Durante a expiração, os indivíduos infectados liberam fluidos respiratórios na forma de gotículas, isso acontece através da fala, tosse, canto, exercícios, espirro e até mesmo na respiração tranquila, e essas gotículas carregam vírus e transmitem infecção. A exposição ocorre de três maneiras principais: (1) inalação de gotículas respiratórias muito finas e partículas de aerossol, (2) deposição de gotículas e partículas respiratórias em membranas mucosas expostas na boca, nariz ou olhos por respingos e *sprays* diretos e (3) tocar as membranas mucosas com as mãos sujas diretamente por fluidos respiratórios contendo vírus ou indiretamente ao tocar superfícies com vírus ativo (CDC, 2021; Escandón et al., 2021).

Ainda segundo Escandón et al. (2021), a transmissão respiratória, por meio de aerossóis e gotículas inaláveis de curto alcance, é o principal modo de transmissão do novo coronavírus. Já a transmissão por contato físico e por contato indireto com objetos e superfícies, representam um papel menor na disseminação do SARS-CoV-2, e a transmissão por aerossol de longo alcance pode ocorrer, sob condições como exposição prolongadas em ambientes fechados com ausência de ventilação, sendo a transmissão fecal-oral considerada insignificante com base nas evidências existentes.

O novo coronavírus, causador da COVID-19, é um vírus revestido por um grupo de proteínas conhecidas como “*Spike protein*” (proteína “S”), essa proteína apresenta um domínio de ligação ao receptor (RBD) que medeia o contato direto com um receptor celular da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) expresso na superfície das células de vários órgãos, incluindo as células epiteliais das vias respiratórias, e um sítio de clivagem polibásico S1/S2 que é clivado proteoliticamente pela catepsina L celular e pela serina protease transmembranar 2 (TMPRSS2). O mecanismo de infecção viral do SARS-CoV-2 na célula hospedeira inicia através da interação com o domínio funcional S1 da proteína *spike* (S) com o receptor da ECA-2. Esse contato entre os receptores previamente citados mobiliza a TMPRSS2 para o sítio de infecção viral, acarretando na clivagem da proteína *spike* nos domínios funcionais S1 e S2, de modo que S1 se dissocie de S2 levando sua ativação, que mediada pelo domínio funcional interno S2 exposto, promove a fusão viral com a membrana celular (JIANG et al.,2020; HOFFMANN et al., 2020; LI et al., 2020; LUKASSEN et al., 2020; ASTUTI et al., 2020; Escandón et al., 2021).

Uma vez que acontece a fusão do vírus à membrana da célula hospedeira, vai haver a internalização do vírus em um processo conhecido como endocitose. A endocitose leva à formação de uma organela dentro da célula conhecida como endossomo primário, com um pH próximo de 6,5 que sensibiliza as proteínas estruturais virais, à medida que o endossomo direciona-se para regiões próximas do núcleo seu pH é acidificado (baixa para 6,0 aproximadamente), aumentando o processo de exposição do material genético viral no citoplasma O SARS-CoV-2 utiliza da maquinari celular para desempenhar o papel transcricional (HARRISON et al., 2020; Escandón et al., 2021).

Uma vez que o RNA viral chega no citoplasma da célula hospedeira vai ser usado como molde para a síntese de mais RNA Viral e de proteínas virais. As proteínas recém-sintetizadas são direcionadas para o retículo endoplasmático (RE) onde serão traduzidos nas proteínas constituintes da partícula viral, essas proteínas virais integram o RNA viral recém produzido para a formação de novos vírus no RE e são direcionadas ao complexo de Golgi, onde são preparados para liberação e embrulhados em membranas do complexo golgiense, formando assim uma vesícula, essa por sua vez, sai do complexo de Golgi em direção à membrana da célula hospedeira fundindo-se a ela e consequentemente libera novos vírus com capacidade

infecciosa (JIANG et al., 2020; HARRISON et al., 2020; ASTUTI, YSRAFIL. 2020; CESPEDES; DE SOUZA, J. C. R. P. 2020; ESCANDÓN et al., 2021).

2.4 Sinais, sintomas e diagnóstico

Sabe-se que o SARS-CoV-2 é um vírus infeccioso respiratório que afeta as vias respiratórias superiores e inferiores, diante disso os indivíduos podem apresentar quadro de sintomas distintos. Outros fatores como fisiológicos, por exemplo o estado nutricional e idade, patológicos como comorbidades preexistentes e imunológicos, podem acarretar apresentações clínicas tidas como leves, moderadas ou graves. O início da manifestação dos sinais e sintomas em pacientes SARS-CoV-2 positivos acontecem após um período de incubação viral, que varia de 1-14 dias com média de 5-6 dias. (BACKER; KLINKENBERG; WALLINGA, 2020; CDC, 2020; ASTUTI, I.; YSRAFIL, 2020; LINTON et al., 2020).

Estudos demostram que clinicamente, a infecção com SARS-CoV-2 pode se apresentar em uma das seguintes condições: assintomáticos, indivíduos com doença respiratória aguda (DRA) ou pacientes com pneumonia em diferentes graus de gravidade (XAVIER et al., 2020). As manifestações do quadro clínico comum, inicialmente se assemelham aos sintomas de outras infecções respiratórias como resfriado e influenza, porém, com maior proporção de evoluções para infecções graves e críticas. Os sintomas que podem se manifestar são congestão ou coriza, tosse seca, febre, fadiga, mialgia, podendo ser acompanhados de cefaleia, secreções respiratórias, diarreia, dispneia, disgeusia ou anosmia e quando comparada com outras infecções respiratórias a COVID-19 se apresenta com maior proporção de evoluções para infecções graves e críticas levando à admissão em unidade de terapia intensiva (UTI) exigindo oxigenoterapia e/ou suporte ventilatório além de estar relacionada com alta mortalidade (XAVIER et al., 2020; GUPTA et al., 2020; HE et al.,2020).

Uma parcela importante dos pacientes tende apresentar um bom prognóstico, entretanto, idosos e pessoas com distúrbios já existentes, como doenças pulmonar obstrutiva crônica, cardiovasculares, renais, diabetes, podem progredir para síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e/ou desencadear manifestações extrarrespiratórias como choque séptico, disfunção da coagulação, complicações

cárdica, renal, hepática e falência múltipla de órgãos podendo levar ao óbito (GUO et al., 2019; XAVIER et al.,2020). Outros sintomas inespecíficos correlacionados com o agravo do quadro de infecção pelo SARS-CoV-2 inclui manifestações neurológicas que podem ser divididas em manifestações do sistema nervoso central, tais como doenças cerebrovasculares e consciência prejudicada, manifestações do sistema nervoso periférico e sensorial como perca do paladar ou olfato citados anteriormente e manifestações do sistema nervoso associado ao músculo esquelético como a lesão muscular esquelética (ASTUTI, I.; YSRAFIL, 2020; MAO, 2020.).

Atualmente as principais metodologias para confirmar a infecção pelo SARS CoV-2 são:

- ✓ Ensaios Moleculares de Reação em Cadeia de Polimerase, sendo a técnica da RT-qPCR considerada como padrão-ouro para a detecção precoce de vírus. Essa técnica tem como objetivo a detecção do RNA do SARS-CoV-2 mediante amostras da nasofaringe e/ou orofaríngea obtida a partir de coleta com *swab* entre o 3º e 7º dia de infecção potencial (RAI et al., 2021).
- ✓ Testes sorológicos com a finalidade de detectar qualitativamente e /ou quantitativamente anticorpos IgM, IgG e IgA no sangue periférico, utilizando a técnica de ELISA ou Imunocromatografia, sendo esta última também utilizada para detectar qualitativamente os antígenos virais em secreções de nasofaringe e/ou orofaringe (RAI et al., 2021).
- ✓ Diagnóstico por imagem: Através de tomografia computadorizada de alta resolução, objetiva observar alterações tomográficas pulmonar que sejam compatíveis com a COVID-19 (BRASIL, 2021c).

2.5 Imunologia da COVID-19

2.5.1 Imunidade Inata na COVID-19

O sistema imunológico é uma potente barreira contra diversas infecções que podem acometer o organismo. Esse sistema desempenha diversos mecanismos celulares e moleculares capazes de defender a homeostase fisiológica frente a um desafio e a sua atuação em infecções virais é essencial para a detecção e eliminação do vírus. Diante dessas infecções, uma das primeiras linhas de defesa recrutadas ao local da infecção são as células constituintes da imunidade inata, que apresenta um

papel fundamental na orquestração da resposta inicial (HEINONEN et al., 2019; VABRET et al., 2020**;** LI et al., 2020; McKechnie & Blish, 2020).

Os mecanismos das respostas imunológicas desencadeados pela infecção do SARS-CoV – 2 ainda não estão bem elucidados e tem mostrado uma vasta complexidade no que diz respeito às respostas imunes protetoras eficientes ou ineficazes no indivíduo infectado (LI et al., 2020; HOSSEINI et al., 2020). Tanto a resposta imune inata como a adaptativa têm um papel fundamental nos processos de reconhecimento e eliminação de patógenos estranhos. Estudos têm evidenciado que uma resposta imune baixa ou irrestrita durante a infecção por SARS-CoV-2 impulsiona os padrões clínicos, a magnitude da doença e a progressão da COVID-19 (PERICO et al.,2021; HOSSEINI et al., 2020). Sendo assim, a compreensão das respostas imunológicas frente a infecção por SARS-CoV-2 são indispensáveis para um melhor desenvolvimento de estratégias preventivas e novas percepções terapêuticas cada vez mais eficientes no que se refere aos quadros clínicos apresentados pela COVID-19 (PERICO et al.,2021).

A imunidade inata parece ter papel central na defesa contra o SARS-CoV-2 (BRITO et al.,2020). O sistema imune inato do hospedeiro detecta infecções virais usando receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) para reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e a padrões moleculares associados a danos (DAMPs). De acordo com Brito et al (2020), os principais PRRs conhecidos incluem receptores *Toll-like* (TLR), receptores *RIG-I-like* (RLR), *NOD-like* (NLR), entre outros. As células imunes inatas, incluindo macrófagos, monócitos, células dendríticas, neutrófilos e células linfoides inatas (ILCs), como células *natural killer* (NK), estão armadas com um arsenal de PRRs que reconhecem PAMPs ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) para induzir vias de sinalização inflamatória e respostas imunes, e dependendo do receptor estimulado, diferentes respostas biológicas do hospedeiro são desencadeadas. A sinalização através desses receptores em células imunes inatas em resposta a patógenos, PAMPs ou DAMPs leva à produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, bem como à indução de morte celular para limpar as células infectadas. Até o momento, vários PRRs, em particular, TLRs, RLRs e NLRs, demonstraram ativar suas vias de sinalização em resposta ao SARS-CoV-2 (DIAMOND et al., 2022; LI et al., 2020; BRITO et al., 2020; PERICO et al., 2020).

As diferentes células imunes como monócitos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos, migram para o epitélio pulmonar, na tentativa de conter o SARS-CoV-2. Quando essa tentativa de limitar a infecção é exacerbada, há efeitos oxidativos e inflamatórios inespecíficos podendo resultar em danos secundários aos tecidos funcionais e não infectados (BRITO et al.,2020; LI et al.,2020). Essas células da imunidade inata secretam citocinas pró-inflamatórias que inibem a replicação viral, estimulam a resposta imune adaptativa, recrutam outras células imunes para o local da infecção, e reconhecem agentes invasores através da interação com receptores que interagem com padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), secretados por diferentes células do sistema imune. Até o momento a compreensão da resposta imune inata específica ao SARS-CoV-2 ainda é limitada. No entanto, o epitélio das mucosas do trato respiratório representa o sítio anatômico inicial da infecção do SARS-CoV-2, e durante o processo da transcrição viral as células epiteliais infectadas passam a liberar padrões moleculares como PAMPs (Ex: RNA viral) e DAMPs (Ex: ATP), cuja função é interagir com receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) expresso nas células da imunidade inata como receptores RIG citosólico e receptores do tipo Toll-like (TLRs). Além disso, sabe- se que o SARS-CoV-2 é um vírus citopático, induzindo processos de piroptose celular e esse processo é capaz de exacerbar o ambiente inflamatório do epitélio respiratório através da liberação principalmente de citocinas (HEINONEN et al., 2019; VABRET et al., 2020; LI et al., 2020; GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2020; DIAMOND et al., 2022).

Consequentemente, tanto nos eventos de ativação de cascatas de sinalização desencadeados pela ativação dos PRRs, como os fatores liberados no processo de piroptose recrutam diversas populações celulares ao local através da secreção de citocinas com características pró-inflamatórias induzindo o recrutamento de macrófagos alveolares, monócitos e linfócitos. Além disso, a ativação dos monócitos e macrófagos, no sítio infeccioso, promove a secreção de fator de necrose tumoral pró-inflamatória alfa (TNF-α), IL-1, IL-6 e IL-18, que juntos potencializam os efeitos antivirais das células recrutadas, além de potencializar também a resposta imune adaptativa (VABRET et al., 2020; PARK et al., 2020; HUANG et al., 2020; ZHANG et al., 2020; GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2020).

Segundo Diamond et al (2022), a sinalização dos PRR envolvida pelo SARS-CoV-2 induz a liberação simultânea de citocinas pró-inflamatórias incluindo Interferons tipo I e III, IL-1β, IL-6, TNF, IL-12, IFN-β, IFN-γ, IL-17. Tais citocinas quando expressas auxiliam na eliminação de infecções, mas também mantêm a homeostase celular. No entanto, a liberação desregulada das citocinas pró-inflamatórias contribui para a hipercitocinemia também conhecida como tempestade de citocinas, condição presente em pacientes com a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), complicações tromboembólicas, danos pulmonares e complicações tromboembólicas em pacientes graves da doença. A tempestade de citocinas também pode ser entendida 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) (DIAMOND et al., 2022; LOWERY; SARIOL; PERLMAN., 2021; Karki; Kanneganti, 2021).

A PANoptose é uma via de morte celular programada inflamatória imune inata dependente de PANoptossomas, complexos contendo caspase com ou sem componentes do inflamassoma, além de proteínas induzidas pelo sinergismo de TNF e IFN-γ principalmente em macrófagos inflamatórios que ativa a via da caspase-8 levando a morte celular, sendo capaz de atuar em um sistema de feedback positivo, resultando em mais liberação de citocinas, acarretando assim em uma sobrecarga inflamatória tecidual causando danos aos tecidos, órgãos e até falência múltipla de órgãos do hospedeiro com risco de vida pela COVID-19 (ZHENG et al., 2020; DIAMOND et al., 2022; LOWERY; SARIOL; PERLMAN., 2021 BANOTH et al., 2020).

As células naturais killer (NK) também são conhecidas por apresentarem atividade antiviral, por expressarem receptores para MHC classe I, que regulam a produção de citocinas ou citotoxicidade mediada por células. Contudo, 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 de que, pacientes com as formas leve, moderadas e graves da COVID-19 apresentam um perfil de células NKs mais ativadas, porém apresentando um fenótipo exausto pela expressão de PD-1 (PERICO et al., 2020; BRITO et al., 2020; DEMARIA et al., 2020; VITTE et al., 2020). Eosinófilos e Basófilos, por sua vez, apresentam frequência e atividade reduzida na infecção por SARS-CoV-

2, sobretudo em pacientes que desenvolvem formas moderadas e principalmente graves da COVID-19. (PERICO et al., 2020; VIGÓN et al., 2021; VITTE et al., 2020).

2.5.2 Imunidade Adaptativa na COVID-19

A imunidade adaptativa na COVID-19 apresenta um papel essencial no reconhecimento e eliminação de patógenos estranhos (PERICO et al., 2021). Sendo assim, tem-se que é necessário à apresentação do antígeno para estimular a imunidade humoral e celular do corpo, que são mediadas por células B e T específicas do vírus (LI et al., 2020). Em linhas gerais, a ativação adaptativa é considerada como um requisito fundamental para eliminar os invasores, construir uma memória imunológica adequada, como também para limitar a ativação inata (EKŞIOĞLU-DEMIRALP et al., 2020).

No que se diz respeito aos mecanismos imunológicos na COVID-19, ainda não estão bem elucidados, no entanto, a compreensão da resposta imune frente ao SARS-COV-2 torna-se fundamental para a determinação da susceptibilidade desse indivíduo baseado nas respostas imunológicas de memória previamente estabelecidas pelas células T e B em pacientes convalescentes, assim como, para a compreensão da susceptibilidade à progressão da doença, eficácia das intervenções terapêuticas além de poder entender os melhores marcadores imune na doença (LI et al., 2020; GRIFONI et al., 2020).

Estudos tem apontado que a infecção pelo novo coronavírus pode comprometer a linhagem linfocitárias desses pacientes, causando alterações na contagem dos linfócitos, o que pode ser denominado de linfopenia e foi evidenciado que essa linfopenia afeta diretamente os linfócitos T CD4+ e T CD8+, provocando assim, uma baixa na contagem absoluta de células T, especificamente nas células T CD8+, o que pode estar resultando no agravamento das respostas inflamatórias (LIU et al., 2020; MENDES et al.,2021; SANTOS et al.,2022). Nesse contexto EKŞIOĞLU-DEMIRALP et al. (2020), relatam o aumento de células T em pacientes apresentando a forma leve, enquanto que em termos de frequência, indivíduos moderados e graves demonstraram redução em comparação ao grupo controle.

A linfopenia é uma característica comum da COVID-19 grave, caracterizada por números absolutos reduzidos de células T CD4+ e particularmente CD8+ e essa

depleção celular se correlaciona com a gravidade da COVID-19 (PERICO et al., 2020). Estudo realizado por QINC et al. (2020), demonstrou que pacientes acometidos pela COVID-19 a contagem total de células B, células T e células NK reduziram significativamente em todos os grupos de infectados, principalmente no grupo dos casos graves quando comparado com indivíduos saudáveis (IWAMURA et al., 2021; QINC et al., 2020). Já em relação aos indivíduos recuperados da COVID-19 que foram 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 termos gerais, a atuação controlada de células B e T encontram-se ligadas à patogênese da COVID-19 e ao processo de eliminação viral, entretanto o fornecimento de imunidade duradoura e proteção à reinfecção ainda não são bem compreendidos (TRIGGLE et al., 2021).

A apresentação de antígenos virais pode ser mediada por células apresentadoras de antígenos por meio das moléculas de MHC classe II, promovendo a ativação de células T CD4+. Isso pode resultar na produção e liberação de interleucina (IL)-12, que juntamente com o IFN-α, aumenta a expressão do MHC classe I e a ativação das células NK, o que permite a atuação dos mecanismos antivirais e a erradicação das células infectadas pelo SARS-CoV-2, e por outro lado também pode atuar coestimulando a produção de linfócitos com perfil Th1 (BRITO et al.,2020).

Na infecção pelo SARS-CoV-2 diversos estudos buscam demonstrar a dinâmica interação entre a imunidade adaptativa promovida pelos linfócitos T e os eventos que direcionam para as gravidades dos pacientes acometidos pela COVID-19 (LIU et al. 2020). A busca constante de linfócitos T com respostas especifica para o SARS-CoV-2 em pacientes recuperados tem sido uma das alternativas desenvolvidas por alguns cientistas. Um grupo de pesquisadores dos Estados Unidos da América utilizando indivíduos saudáveis não infectados e pacientes convalescentes leves, observaram reatividade de células T específicas para a proteína *Spike* e proteína da Membrana do SARS-CoV-2 em células T CD4+ e CD8+, com uma acentuada secreção de INF-ɣ e viés imunológico para diferenciação na subpopulação CD4+ Th1, enquanto que as células T $CD8^{+}$ secretavam INF-ɣ, TNF e granzima, corroborando para a ideia de uma memória imunológica contra uma

reinfecção mediada principalmente pela secreção de citocinas com características pró-inflamatórias (GRIFONI; WEISKOPF; RAMIREZ, 2020).

É possível observar que, após entrada do vírus na célula-alvo, peptídeos virais são apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) ou antígeno leucocitário humano (HLA) classe I aos linfócitos T CD8+, que exercem sua função citotóxica, levando à morte celular por apoptose da célula infectada (Brito et al., 2020). Em pacientes com COVID -19 grave, estudos tem relatado alterações no estado de ativação e/ou diferenciação das células CD8 T com aumento nos níveis de expressão dos receptores inibitórios TIM3. Outros estudos sugerem que as células T CD8 quando hiperativadas produzem altos níveis de expressão de marcadores naturais relacionados a células T assassinas, aumento da citotoxicidade além de expressarem marcadores de ativação (CD38) e de proliferação (Ki67) indicando que pode haver respostas de células T CD8 específicas nos pacientes com COVID-19 (Kim et al.; Chen; John Wherr, 2020).

Quanto a resposta humoral, observa-se que os linfócitos B apresentam a capacidade de gerar anticorpos neutralizantes específicos contra o SARS-COV-2 em pacientes infectados, sobretudo direcionados à proteína *Spyke* e a proteína do Nucleocasídeo, os quais contribuem para o bloqueio da entrada do vírus nas células hospedeiras demonstrando um papel crítico desses anticorpos para a eliminação viral (LI et al., 2020; Ekşioğlu-Demiralp et al., 2020; XIE et al., 2020; MA et al., 2020; WANG 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 (TAN et al., 2022; BRITO et al., 2020; ROBINSON et al., 2021).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar biomarcadores imunológicos de superfície e intracelulares associados as funções celulares nos linfócitos T CD8+ em indivíduos não infectados pelo SARS-CoV- 2 e recuperados da COVID-19.

3.2 Objetivos Específicos

No grupo controle e nos grupos de pacientes previamente acometidos pela COVID-19:

✓ Análise das características clínico-epidemiológicas;

✓ Realizar diagnóstico molecular através da detecção de RNA Viral do SARS-CoV-2 pela técnica do RT-qPCR;

✓ Realização de diagnóstico sorológico através da detecção de anticorpos específicos ao SARS-COV-2 IgG;

✓ Identificação de marcadores imunológicos na COVID-19 a partir da utilização de estímulos por peptídeos antigênicos do SARS-COV-2:

- Avaliar a expressão de marcadores imunológicos na subpopulação de linfócitos T CD8+ através de marcadores de ativação (CD38 e CD69);
- Verificação a expressão de marcadores imunológicos na subpopulação de linfócitos T CD8+ através de marcadores de proliferação (Ki-67);
- Avaliar a população de linfócitos T CD8+ quanto a produção da citocina INF-ɣ;
- Caracterização da atividade citotóxica das células T CD8+ mediante análises de produção de perforina, granzima B e CD107a.

METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 Considerações Éticas

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

4.2 Amostras Clínicas

Amostras de sangue periférico para obtenção de PBMCs e secreção da nasofaringe/orofaringe provenientes de 27 pacientes voluntários acima de 18 anos foram coletadas durante o período de novembro de 2020 a maio de 2021, os quais encontram-se distribuídos em 4 grupos de estudo. Para o grupo controle (CTL - n = 9), foram incluídos indivíduos saudáveis sem enfermidades crônicas, que não faziam uso contínuo de medicamentos, além de apresentarem exames sorológicos e de RT-qPCR (PCR quantitativo em tempo real) negativos para COVID-19. Indivíduos recuperados da COVID-19 foram confirmados mediante prévio diagnóstico por RT qPCR durante a fase aguda. Objetivando garantir que todos os voluntários inseridos nos grupos em estudo não enfrentavam um quadro de reinfecção (para os grupos recuperados) ou uma infecção primária (para o grupo controle), foram coletadas amostras da nasofaringe ou orofaringe, mediante *swab*, para posterior realização do diagnóstico molecular RT-qPCR para detecção e quantificação sensível e específica de alvos de ácidos nucleicos viral. Também foi realizado diagnóstico sorológico para a detecção de anticorpos IgG específicos ao SARS-COV-2. Nesse aspecto, voluntários acometidos por um quadro leve da infecção foram divididos em dois grupos baseado na detecção de IgG após a cura: leve IgG- (n = 5) e leve IgG+ (n = 6), composto por voluntários que manifestaram sinais e sintomas leves compatíveis com a infecção, não necessitando de internação. O grupo grave (n = 7), por sua vez,

foi caracterizado por pessoas anteriormente acometidas pela infecção causada pelo SARS-CoV-2, na qual desenvolveram sinais e sintomas mais graves compatíveis com a infecção necessitando, portanto, de internação.

Todos os voluntários apresentaram idade igual ou superior a 18 anos, sendo não gestantes e não acometidos por problemas neurológicos (como síndrome de Guillain-Barré, Alzheimer, Parkinson, Esclerose Múltipla e Esclerose Lateral Amiotrófica - ELA), para isso, os participantes responderam a um questionário contendo indagações sobre possível comorbidade existente (APÊNDICE C). Os participantes da pesquisa foram informados sobre a importância da mesma bem como, via assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), participaram voluntariamente do projeto (APÊNDICE B). Ademais, os voluntários preencheram um questionário clínico epidemiológico contendo dados gerais somados a informações acerca de sua saúde bem como aspectos clínicos e laboratoriais relacionados ao início da doença (APÊNDICE C).

4.3 Ensaio de RT qPCR

A técnica de RT-qPCR foi realizada como descrito por Guerra-Gomes et al. (2021) (GUERRA-GOMES et al., 2021). Durante a coleta do sangue, amostras da nasofaringe ou orofaringe foram coletadas com o uso de *swab* para a extração e isolamento do RNA (QIAprep&amp Viral RNA UM Kit QIAGEN, USA). Em seguida o DNA viral foi amplificado através da técnica de RT-qPCR (SARS-CoV-2 N1+N2 Assay Kits - QIAGEN, USA) para a detecção do material genético do SARS-CoV-2 objetivando, assim, descartar um quadro de reeinfecção em voluntários inseridos nos grupos leve e grave e confirmar a inserção dos voluntários no grupo controle.

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

As análises consistiram na busca dos alelos mais frequentes de HLA de classe I/II na população brasileira, excluindo os alelos de populações isoladas. Em seguida, foram realizadas análises de afinidade de ligação, previsão de antigenicidade e dinâmica molecular peptídica entre MHC-I e II e proteínas do SARS-CoV-2. Assim, os peptídeos específicos do SARS-CoV-2 para CD8 (Tabela 1) foram sintetizados (Genone), liofilizados até uso, ressuspendidos em H_2O (MiliQ), agrupados (Pool CoV-

2) e armazenado a -20 °C até o uso. Os mesmos procedimentos foram realizados para peptídeos da proteína Spike SARS-CoV-2 (Tabela 1).

Tabela 1 – Lista de peptídeos escolhidos no estudo

		Nome	Peptídeo	Posição a.a.	Fonte
Pool Cov-2	Pool Spike	ORF1a	ILASFSASTSAFVET	476-490	Este estudo
		ORF1b	FVDGVPFVVSTGYHFR	4726-4741	Este estudo
		SPIKE_NTD	NIDGYFKIYSKHTPINLV	196-210	STEINHAGEN *et al*., 2021
		SPIKE_RBD	ATRFASVYAWNRKRI	344-358	STEINHAGEN *et al*., 2021
		SPIKE_S2	ALQIPFAMQMAYRFN	893-907	STEINHAGEN *et al*., 2021
		ORF3	KKRWQLALSKGVHFV	66-80	Este estudo
		E	FYVYSRVKNLNSSRV	56-70	Este estudo
		M	KEITVATSRTLSYYK	166-180	Este estudo
		ORF8	FYSKWYIRVGARKSA	41-55	Este estudo

Fonte: Adaptado de CSORDAS et al. (2021)

Para a predição dos epítopos 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 Epítopos Imunes e Recurso de Análise (IEDB), conforme descrito anteriormente (CSORDAS *et al*., 2018). A predição 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). O Processo de desenvolvimento dos polipeptídeos antigênicos de coronavírus da síndrome respiratória aguda grave e sua aplicação descrita acima está sob proteção patentearia (Número do processo: BR 10 2022 005518 1) do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (APÊNDICE D).

4.5 Processamento de Amostras e Obtenção do Soro

Para a aquisição do soro dos pacientes, os tubos de coleta com as amostras foram mantidos à temperatura ambiente (TA) por, no mínimo, 1 hora para que houvesse a retração do coágulo. Em seguida, os tubos foram centrifugados à 1.500

rpm durante 5 minutos à TA e encaminhados para câmara de fluxo laminar, local onde o soro foi transferido para tubos microtubos secos e esterilizados. Por fim, o soro foi mantido por 24h à -20ºC e, posteriormente, transferidos para um freezer -80ºC, ficando armazenados até a utilização para o teste sorológico.

4.6 Sorologia para Diagnóstico de Anticorpos IgG

O teste sorológico foi realizado utilizando o Kit Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG em amostras sanguíneas dos voluntários inseridos em todos os grupos estudados. O teste foi realizado seguindo todas as orientações do fabricante, visando confirmar ou descartar a presença dos anticorpos contra o COVID-19 nas amostras coletadas (EUROIMMUN a PerkinElmer company – REF. El 2606-9601 G).

4.7 Imunofluorescência para Análise de Células T CD8+

Aproximadamente 25 mL de sangue periférico foram coletadas em tubos heparinizados para obtenção de PBMC (tubos BD Vacutainer® Plus com Heparina de Sódio), mediante separação por gradiente de densidade (Ficoll Paque™Plus - GE Healthcare, Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA). Inicialmente, uma diluição 1:1 do volume de sangue coletado com Solução Fosfato Salina (PBS) foi realizada em tubos de centrifugação, com capacidade para 5 mL, esterilizados. Em seguida, as amostras diluídas foram, cuidadosamente, inseridas sobre o Ficoll e posteriormente submetidas à centrifugação (40min, 2000rpm, 20°C). Com isso, o anel de PBMC foi coletado, lavado por 3 vezes com PBS e, em cada ciclo de lavagem, as amostras eram centrifugadas (10min, 1200rpm, 4°C) e o sobrenadante descartado.

Na sequência, as células foram mantidas em RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementadas com 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) e 10% Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma-Aldrich). Uma concentração de 2,5 X 10^5 células/poço foi utilizada em microplacas de 96 poços de fundo em U sob 4 condições: células não estímuladas (meio), estimuladas com *Pool Spike* CoV-2 (1 µg/poço), *Pool* CoV-2 (1 µg/poço) e *Staphylococcal enterotoxin* B (SEB) (1 µg/poço) das *Staphylococcus aureus* (Sigma-Aldrich) por 16 horas em estufa 5% CO_2 à 37°C.

Em seguida, 10µL/poço de Brefeldina A (1mg/mL) (Sigma Aldrich) – para marcação intracelular - foi adicionada e as amostras novamente incubadas em estufa

5% CO_2 à 37°C durante 4 horas. Posteriormente, a placa foi retirada da estufa e centrifugada por 8 minutos (1300rpm, 4°C). O sobrenadante foi desprezado e as células suspensas por agitação. Em seguida, os anticorpos para marcadores de superfície, já diluídos, conforme titulação padronizada na fase de padronização dos reagentes, num volume final de 40μL 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 μL de PBS/ poço.

A placa foi então centrifugada durante 8 minutos (1300rpm, 4°C), seguida da remoção do sobrenadante e na sequência, agitada para suspenção das células. Em seguida, 100μL de PBS e 100μL de solução de formaldeído 4% foram adicionados em cada poço de marcação extracelular por 20 min à 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 150μL 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, 40μL 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, 150μL/poço de PB foi adicionada, a placa foi centrifugada durante 8 minutos (1300rpm, 4°C) e o sobrenadante desprezado.

Posteriormente, 200μL/poço de solução Wash B (PBS/BSA) foi adicionada. Por fim, o volume final de 200μL/poço de solução contendo as células marcadas foi transferido para tubos próprios para leitura no citômetro de fluxo FACS$_{CANTO}$II (BD Biosciences). As células foram mantidas a 4°C, ao abrigo da luz para que as fluorescências não fossem perdidas até o momento da leitura. A figura 8A traz um resumo acerca das etapas metodológicas associadas ao protocolo de citometria de fluxo.

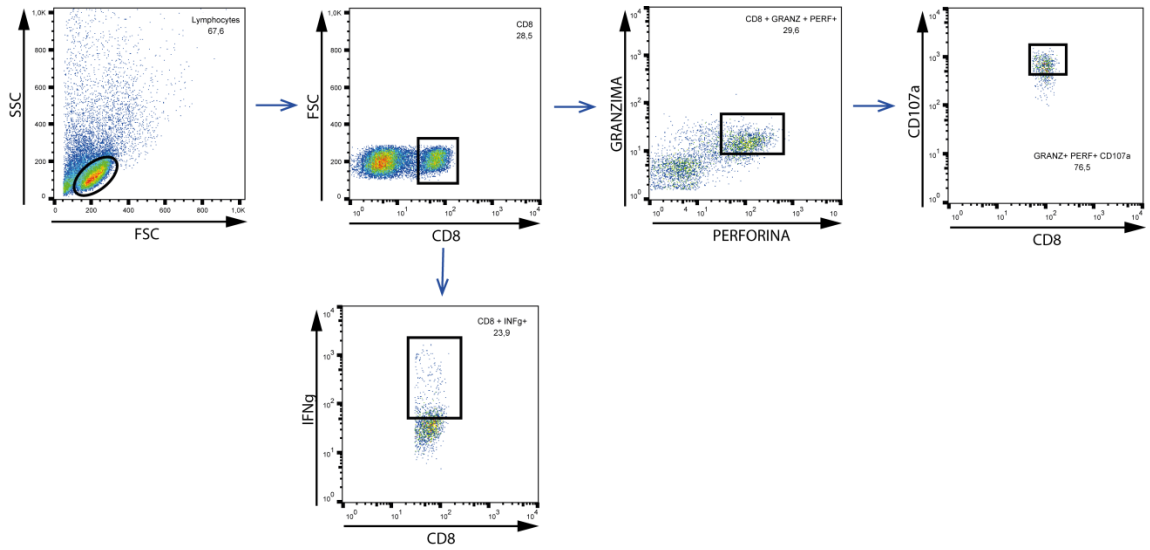
4.8 Anticorpos Monoclonais (MABs)

Os anticorpos monoclonais utilizados para a marcação de moléculas de superfície foram: controles de isotipo (FITC e PE) como controle negativo, anti-CD107a, anti-CD38, anti-CD69, e anti-PD-1. Para as marcações intracelulares os seguintes anticorpos foram utilizados: anti-Ki67, anti- IFN-γ, anti-granzima B, anti-perforina. Sendo assim, para a caracterização de linfócitos T CD8+ e a análise de expressão de marcadores imunológicos pelas células em estudo, foi usado fluorocromos conjugados a anticorpos específicos para os parâmetros de interesse como fluorocromos, anti-CD8 (APC-Cy5) para a identificação das células T CD8+ e fluorocromos (FITC, PE, APC e PECY7) para a detecção de Ki67, CD69, CD38, PD-1, INFγ, Perforina, Granzima B e CD107a pela subpopulação avaliada no presente trabalho. Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos das companhias BD PharmigenTM (CA, USA), Ebioscience (San Diego, CA, USA), Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA) ou Biolegend (San Diego, CA, USA).

4.9 Aquisição e Análise dos dados por Citometria de Fluxo

As amostras celulares previamente marcadas com os anticorpos monoclonais fluorescentes acima revelados foram adquiridas em citômetro de fluxo modelo FACS CANTO II (BD Biosciences). Durante a aquisição dos dados foram coletados 30.000 eventos (células) sendo os mesmos, analisados utilizando o *software Flowjo* v.10.8.1 (BD, Ashland - EUA). A estratégia de análise utilizada no software supracitado, se deu da seguinte forma: inicialmente selecionamos a região correspondente aos linfócitos totais mediante os parâmetros tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A). Em seguida, células T CD8+ foram identificadas através dos parâmetros FSC-A e CD8. Dentro desta população, selecionamos as células ativadas utilizando os parâmetros CD8. Finalmente, com as células de interesse identificadas, avaliamos a expressão das proteínas relacionados à atividade imunológica das células estudadas. A Figura 3 ilustra a estratégia descrita neste tópico. Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos das companhias BD PharmigenTM (CA, USA) ou *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, Massachusetts, EUA).

Figura 3 - Estratégia de Análise utilizada para identificar as subpopulações de linfócitos T CD8+ e marcadores imunológicos em amostras de PBMC



Fonte: Aureliano et al. (2022)

4.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas com auxílio do *software GraphPad Prism* versão 8.4.3. Teste de normalidade Shapiro-Wilk foi realizado. Para a comparação de múltiplos grupos, os testes *Two-Way* Anova (seguido pelo pós-teste de Tukey) e one-way ANOVA (seguido pelo pós-teste de Tukey) ou teste de Kruskal-Wallis (seguido pelo pós-teste de Dunn) foi utilizada onde apropriado. Para análises comparativas entre dois grupos, teste t de Student ou Mann-Whitney foram usados onde apropriado. Os resultados foram mostrados como média ± erro padrão de média (SEM). O intervalo de confiança foi de 95% e os valores foram considerados significativos quando $p<0.05$. Para criar o *heat map* acerca dos marcadores imunológicos analisados, foi utilizado o *software* Morpheus (https://software.broadinstitute.org/morpheus/).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5. 1 Caracterização demográfica e clínica dos indivíduos saudáveis (CTL) e dos pacientes recuperados da COVID-19 inseridos nos grupos de estudo.

Para o presente estudo, 18 voluntários recuperados da COVID-19 e 9 indivíduos não acometidos pelo SARS-CoV2 foram recrutados e avaliados. A coleta das amostras aconteceu entre o período de novembro de 2020 a junho de 2021. Todos esses indivíduos incluídos na pesquisa não haviam sido vacinados para esta doença e foram distribuídos em 4 grupos. Para o grupo controle, 9 indivíduos, sendo 4 homens e 5 mulheres, com média de idade de 35,62 (±8,07) foram avaliados. O grupo leve IgG- foi composto por 5 pacientes, sendo 3 do sexo masculino e 2 do sexo feminino, com média de idade de 35,2 (±7,35), enquanto 6 voluntários compuseram o grupo leve IgG+ 6 (3 homens:3 mulheres) com uma média de idade 35,8 (±3,18). Por fim, do grupo grave participaram 7 voluntários com uma distribuição de 3 e 4 componentes do sexo feminino e masculino, respectivamente. A idade média para o grupo foi 40 (±12,16).

Em termos gerais, os sintomas predominantes relatados entre os indivíduos recuperados da COVID-19 foram cefaleia, fadiga, febre, tosse seca e dificuldade respiratória. Entretanto, também foram citados sintomas como arrepios, artralgia, coriza, diarreia, dor de garganta, inchaço ocular, mialgia, náusea, obstrução nasal, anosmia, ageusia, taquipneia, tosse produtiva e vômito. A maior parte dos voluntários (73,33%) tiveram sintomas por mais de 15 dias, sendo 60% destes acometidos por um quadro leve da doença e 40% quadro grave. Comorbidades como obesidade, hipertensão e asma foram relatadas pelos pacientes recuperados da COVID-19. O intervalo entre o final dos sintomas e a data da coleta de amostras para o presente estudo realizada variou de 1 à 11 meses (Tabela 2).

Tabela 2 - Características demográficas e clínicas de voluntários inseridos nos grupos estudados

	Indivíduos Saudáveis n= 9 (%)	**COVID-19 n= 18 (%)**
Média de Idade (DP)	37,22 ± 9,12	37,88 ± 10,36

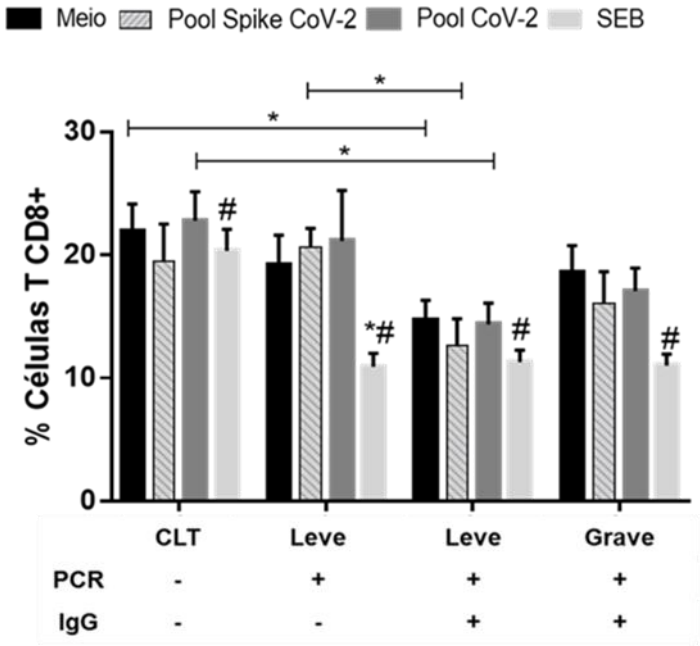
Gênero		
Masculino	4/9 (44.44)	4/18 (22.22)
Feminino	5/9 (55.56)	14/18 (77.78)
Grau de severidade		
Controle	9/9 (100)	N/A
Leve IgG-	N/A	5/18 (27.77)
Leve IgG +	N/A	6/18 (33.33)
Grave	N/A	7/18 (38.89)
Comprometimento pulmonar		
Grave 25-49	N/A	2/18 (11.11)
Grave >50	N/A	0/18 (0)
Comorbidades		
Hipertensão	-	4/18 (22.22)
Obesidade	-	9/18 (50.0)
Pneumopata	-	1/18 (5.56)
Início e Fim dos Sintomas (dias)		
Até 10 dias	N/A	2/18 (11.11)
Entre 10 a 12 dias	N/A	3/18 (16.67)
Acima de 12 dias	N/A	13/18 (72.22)
Sintomas		
Arrepios	N/A	8/18 (44.44)
Artralgia	N/A	5/18 (27.78)
Cefaleia	N/A	15/18 (83.33)
Coriza	N/A	8/18 (44.44)
Diarreia	N/A	7/18 (38.89)
Dificuldade Respiratória	N/A	9/18 (50.00)
Dor de Garganta	N/A	9/18 (55.00)
Fadiga	N/A	14/18 (77.78)
Febre	N/A	11/18 (61.11)
Inchaço Ocular	N/A	3/18 (16.67)
Mialgia	N/A	8/18 (44.44)
Náuseas	N/A	4/18 (22.22)
Obstrução Nasal	N/A	7/18 (38.89)
Perda de Olfato ou Paladar	N/A	8/18 (44.44)
Taquipneia	N/A	5/18 (27.78)
Tosse com Catarro Espesso	N/A	4/18 (22.22)
Tosse Seca	N/A	10/18 (55.56)
Vômito	N/A	3/18 (16.67)

Fonte: Aureliano et al. (2022)

5.2 Avaliação da frequência da subpopulação de células T CD8$^+$ no grupo CTL e nos distintos grupos de pacientes recuperados da COVID-19.

A análise de PBMC por citometria de fluxo de indivíduos recuperados da COVID-19 revela que aqueles acometidos pela forma leve da doença com níveis detectáveis de IgG possuem uma menor frequência de linfócitos T CD8+ quando comparados aos demais grupos em amostras não estimuladas e estimuladas com Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2. A frequência de células T CD8+ ativadas em PBMCs não estimuladas de indivíduos do grupo leve IgG+ também foram menores em comparação com o grupo grave. Finalmente, nos grupos leves e o grupo grave, o estímulo do SEB causou uma diminuição nas células T CD8+ ativadas quando comparado com as outras condições do mesmo grupo (Figura 4).

Figura 4 - Frequência de células T CD8+ ativadas em sangue periférico de voluntários



Fonte: AURELIANO et al., 2022. Frequência de células T CD8+. PBMCs foram coletadas de indivíduos inseridos nos grupos controle (n = 9), Leve IgG- (n = 5), Leve IgG+ (n = 6) e grave (n = 7). As amostras foram incubadas por 16 horas em 4 condições: meio (não estimuladas), peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2 ou SEB. PBMCs não estimuladas e estimuladas com SEB foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Os dados são apresentados como média ± 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). Para análises comparativas entre dois grupos, teste t de Student ou Mann-Whitney foram usados onde apropriado. Barras de erro mostram a variabilidade dos dados de cada subgrupo. Linhas horizontais (——) indicam diferenças significativas no mesmo subgrupo entre diferentes grupos. p* < 0.05; p** ≤ 0.01. Os símbolos caracterizados por letras minúsculas representam diferenças entre subgrupos dentro de cada grupo: **a** (meio x Pool Spike CoV-2); **b** (Pool Spike CoV-2 x Pool CoV-2); **c** (meio x Pool CoV-2); O # representa

diferenças significativas do SEB no mesmo grupo. O símbolo ***** representa diferenças significativas *do SEB entre os grupos.* SEB, Staphylococcal enterotoxin B.

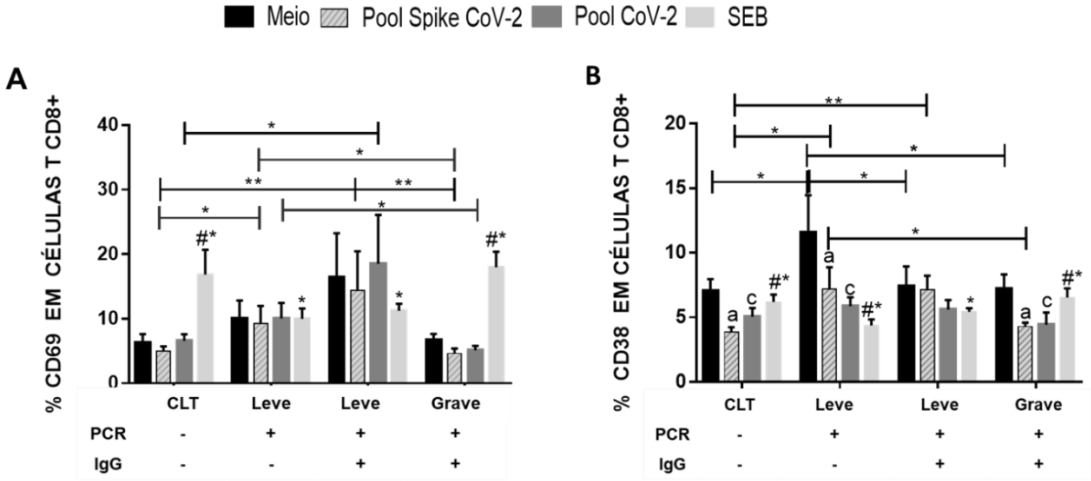
5.3 Expressão dos marcadores de ativação CD69, CD38, Ki67 e PD1 na subpopulação de células T CD8^{+}.

Para a investigação, PBMCs foram estimuladas com os antígenos peptídicos do SARS-CoV-2 e após marcação com CD8, os marcadores de ativação como os CD69, CD38, Ki67 e PD-1 foram avaliados. As análises de PBMC por citometria de fluxo de pacientes recuperados da COVID-19 revelou que indivíduos acometidos pela forma leve da doença com IgG positivo (leve IgG+) possuem expressão mais elevada de CD69 em células TCD8+ em comparação ao grupo controle em amostras não estimuladas e estimuladas com Pool Spike CoV-2 e Pool CoV-2. Observou-se ainda, que a expressão de CD69 em pacientes Leve IgG + também foi maior quando comparado ao grupo Leve sem produção de IgG (Leve IgG-) e ao grupo Grave (Figura 5 A).

No grupo leve IgG+, as condições Pool CoV-2 e *Pool Spike* CoV-2 apresentaram níveis elevados na frequência das células estudadas em comparação com os demais grupos. Já no grupo grave, o estímulo do SEB não causou diferenças significativas quando comparado com o grupo Controle (Figura 3A).

Em relação à expressão de CD38, a subpopulação de células T CD8+ estimuladas pelo Pool Spike CoV-2 apresentaram um aumento significativo na frequência de CD38 no grupo Leve IgG- quando comparado aos grupos Controle e Grave (Figura 5B).

Figura 5 - Perfil de expressão de CD69 e CD38 em células T CD8+



Fonte: AURELIANO et al., 2022. **(A)** perfil de expressão de CD69 em células T CD8+. **(B)** perfil de expressão de CD38 em células T CD8+. PBMCs foram coletadas de indivíduos inseridos nos grupos controle (n = 9), Leve IgG- (n = 5), Leve IgG+ (n = 6) e grave (n = 7). As amostras foram incubadas por 16 horas em 4 condições: meio (não estimuladas), peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2 ou SEB. PBMCs não estimuladas e estimuladas com SEB foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Os dados são apresentados como média ± 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). Para análises comparativas entre dois grupos, teste t de Student ou Mann-Whitney foram usados onde apropriado. Barras de erro mostram a variabilidade dos dados de cada subgrupo. Linhas horizontais (——) indicam diferenças significativas no mesmo subgrupo entre diferentes grupos. p* < 0.05; p** ≤ 0.01. Os símbolos caracterizados por letras minúsculas representam diferenças entre subgrupos dentro de cada grupo: **a** (meio x Pool Spike CoV-2); **b** (Pool Spike CoV-2 x Pool CoV-2); **c** (meio x Pool CoV-2); O # representa diferenças significativas do SEB no mesmo grupo. O símbolo ***** representa diferenças significativas *do SEB entre os grupos.* SEB, Staphylococcal enterotoxin B.

Em termos gerais, diferenças significativas não foram encontradas na frequência de expressão do Ki67 e PD-1 nas células T CD8+ (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência de Ki67 e PD-1 em células T CD8+, incubadas sem estímulo (Meio) e estimuladas **(**Peptídeos Pool-CoV2 e Spike Pool)

Ki-67	**Saudável**	**Leve IgG-**	**Leve IgG+**	**Grave**
MEIO	10,63 ± 4,91	14,43 ± 9,53	13,44 ± 8,56	18,35 ± 14,73
POOL SPIKE CoV-2	9,05 ± 8,36	13,79 ± 11,33	10,93 ± 3,99[a]	14,55 ± 9,36
POOL CoV-2	20,21 ± 24,38	13,73 ± 11,33	15,10 ± 13,76	16,26 ± 8,63
SEB	23,10 ± 1,55	12,83 ± 2,32	6,52 ± 0,89	13,94 ± 4,55
PD1	**Saudável**	**Leve IgG -**	**Leve IgG +**	**Grave**
MEIO	2,99 ± 0,79	4,16 ± 2,04	2,77 ± 2,62	2,77 ± 2,62
POOL SPIKE CoV-2	3,34 ± 1,02	3,28 ± 1,40	4,58 ± 2,85[b]	4,58 ± 2,85
POOL CoV-2	3,64 ± 1,48	3,42 ± 1,54	4,95 ± 3,57	4,95 ± 3,57
SEB	3,42 ± 0,63	5,24 ± 0,90	3,86 ± 0,72	3,86 ± 0,72

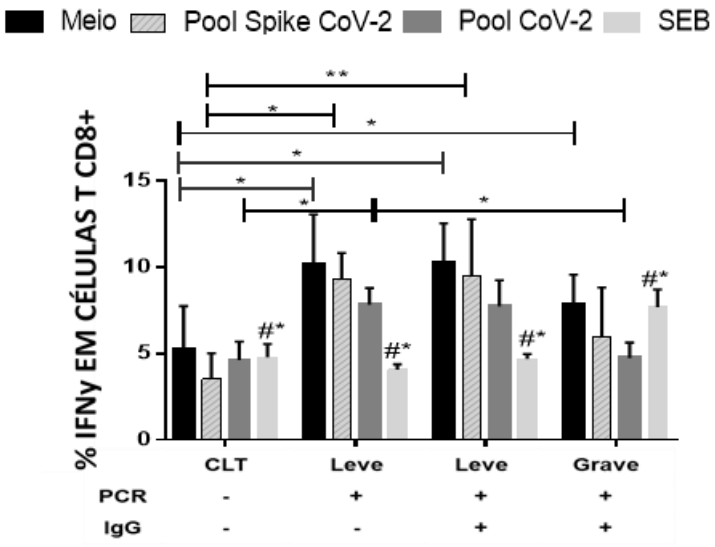
Fonte: AURELINO et al.,2022. [a] Diferenças estatísticas foram observadas no grupo Leve IgG+ entre o Pool Spike CoV-2 e o SEB ($p < 0.05$) no marcador de ativação Ki-67 em células T CD8+.[b]Diferenças estatísticas foram observadas no grupo Leve IgG+ entre o Pool Spike CoV-2 e o SEB ($p < 0.05$) no marcador PD-1 em células T CD8+. Para análises do Ki-67, PBMCs foram coletadas de indivíduos inseridos nos grupos controle (n = 3), Leve IgG- (n = 5), Leve IgG+ (n = 5) e grave (n = 5). Já para a analises do marcador PD-1, PBMCs foram coletadas de indivíduos inseridos nos grupos controle (n = 8), Leve IgG- (n = 4), Leve IgG+ (n = 5) e grave (n = 7). As amostras foram incubadas por 16 horas em 4 condições (subgrupos): meio (não estimuladas), peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2 ou SEB. PBMCs não estimuladas e estimuladas com SEB foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Os dados são apresentados como média ± SEM.

5.4 Investigação dos níveis de IFNγ na subpopulação de células T CD8+ são observados em pacientes recuperados da forma leve da COVID-19.

Comparado ao grupo controle, as amostras não estimuladas, bem como as estimuladas com *Pool* CoV-2, *Pool Spike* CoV-2 dos grupos Leves (IgG- e IgG+) apresentaram maiores níveis de IFNγ sendo expressos pelas células estudadas. As células T CD8+ demonstraram uma diminuição na expressão dessa citocina na presença do *Pool Spike* CoV-2 e do *Pool* Cov-2 no grupo Grave em relação aos grupos leves (IgG- e IgG+). Ainda em amostras submetidas ao estímulo com SEB, o grupo grave apresentou maior frequência de células TCD8+ produtoras de IFNγ, que os demais grupos estudados.

Diferenças significativas não foram encontradas na frequência de expressão de IFNγ entre os grupos Leve IgG- e IgG + nas subpopulações de células T CD8+ (Figura 6).

Figura 6 - Perfil de expressão de IFNγ em células T CD8



Fonte: AURELIANO et al., 2022. **Figura 6:** perfil de expressão de IFNγ em células T CD8+. PBMCs foram coletadas de indivíduos inseridos nos grupos controle (n = 9), Leve IgG- (n = 5), Leve IgG+ (n = 6) e grave (n = 7). As amostras foram incubadas por 16 horas em 4 condições: meio (não estimuladas), peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2 ou SEB. PBMCs não estimuladas e estimuladas com SEB foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Os dados são apresentados como média ± 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). Para análises comparativas entre dois grupos, teste t de Student ou Mann-Whitney foram usados onde apropriado. Barras de erro mostram a variabilidade dos dados de cada subgrupo. Linhas horizontais (——) indicam diferenças significativas no mesmo subgrupo entre diferentes grupos. $p^* < 0.05$; $p^{**} \leq 0.01$. Os símbolos caracterizados por letras minúsculas representam diferenças entre subgrupos dentro de cada grupo: **a** (meio x Pool Spike CoV-2); **b** (Pool Spike CoV-2 x Pool CoV-2); **c** (meio x Pool CoV-2); O # representa diferenças significativas do SEB no mesmo grupo. O símbolo ***** representa diferenças significativas *do SEB entre os grupos.* SEB, Staphylococcal enterotoxin B.

5.5 Caracterização da atividade citotóxica das células T CD8+ mediante análise de produção de perforina, granzima B e CD107a em pacientes recuperados da COVID-19 e indivíduos não infectados pelo SARS-CoV-2.

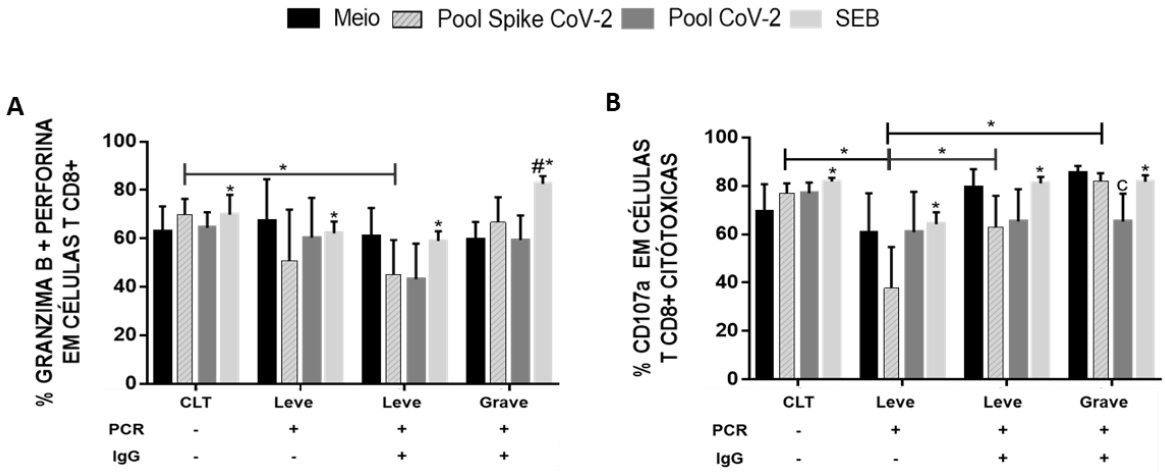
Dentre os mecanismos usados pelas células T CD8+ está a produção de grânulos citotóxicos perforina e granzima B analisadas no presente estudo. Comparando o grupo controle ao grupo grave, amostras não estimuladas, bem como as estimuladas com *Pool* CoV-2, *Pool Spike* CoV-2 não apresentaram diferenças significativas. Diante disso, percebe-se que os indivíduos controles e pacientes graves apresentaram células T CD8 + mais citotóxicas.

Em relação à expressão dos grânulos de toxicidade Granzima B e Perforina em células T CD8+, as amostras de pacientes leves não produtores de anticorpos estimuladas pelo *Pool Spike* CoV-2 apresentaram uma diminuição significativa na frequência de Granzima B e Perforina comparado aos outros grupos que também foram estimulados pelo Pool Spike Cov-2.

Por fim, acerca da coexpressão dos grânulos, PBMCs estimuladas com o SEB, apresentou diferenças significativas entre o SEB x Meio no grupo Grave e entre o SEB do grupo grave e SEB dos Grupos leves e controle (Figura 7A).

Finalmente, ao comparar a frequência da expressão de CD107a entre os distintos grupos na subpopulação de células T CD8+, foi observado que o grupo leve IgG- apresenta menor expressão de CD107a em comparação a todos os outros grupos submetidos ao estímulo Pool Spike CoV-2 (IgG- x CTL/ IgG+/Grave), percebe-se ainda menor frequência na expressão de CD107a entre o grupo Leve IgG+ comparado com o controle e o grave, quando estimulado com Pool Spike Cov-2 (IgG+ x CTL/Grave). Quando estimulado com Pool CoV-2, observou-se menor expressão do CD107a no grupo grave em relação ao não estimulado dentro do mesmo grupo. (Figura 7B).

Figura 7 - Frequência da produção de granzima B, perforina e CD107a pelas células T CD8+ em sangue periférico de voluntários



Fonte: AURELIANO et al., 2022. ***(A)*** perfil de expressão de Granzima B e perforina em células T CD8+. **(B)** perfil de expressão de CD107a em células TCD+. PBMCs foram coletadas de indivíduos inseridos nos grupos controle (n = 9), Leve IgG- (n = 5), Leve IgG+ (n = 5) e grave (n = 7). As amostras foram incubadas por 16 horas em 4 condições: meio (não estimuladas), peptídeos Pool Spike CoV-2, peptídeos Pool CoV-2 ou SEB. PBMCs não estimuladas e estimuladas com SEB foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Os dados são apresentados como média ± 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). Para análises comparativas entre dois grupos, teste t de Student ou Mann-Whitney foram usados onde apropriado. Barras de erro mostram a variabilidade dos dados de cada subgrupo. Linhas horizontais (——) indicam diferenças significativas no mesmo subgrupo entre diferentes grupos. p* < 0.05; p** ≤ 0.01. Os símbolos caracterizados por letras minúsculas representam diferenças entre subgrupos dentro de cada grupo: **a** (meio x Pool Spike CoV-2); **b** (Pool Spike CoV-2 x Pool CoV-2); **c** (meio x Pool CoV-2); O # representa diferenças significativas do SEB no mesmo grupo. O símbolo ***** representa diferenças significativas *do SEB entre os grupos.* SEB, Staphylococcal enterotoxin B.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Para a realização desse estudo as amostras foram coletadas, processadas, submetidas a analises sorológicas e a analises de Citometria de Fluxo no período de novembro de 2020 a maio de 2021, tais procedimentos foram realizados no Laboratório de Imunologia das doenças Infecciosa, localizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, durante esse período algumas as variantes do Sars - CoV- 2 foram sendo identificadas gradualmente a exemplo da variante Alfa (B.1.1.7), identificada no Reino Unido em setembro de 2020, a variante Delta (B.1.617.2), identificada em outubro de 2020 na Índia, a variante Beta (B.1.351), identificada em dezembro de 2020 na África do sul, Variante Gama (P.1), identificada no Brasil em janeiro de 2021 (OMS, 2021). Com decorrer da pandemia novas variantes foram sendo identificadas e isso foi mudando o perfil clínico característico da doença, como sintomas que por vezes se apresentaram mais leves e mais raramente evoluindo para gravidade, isso também se deve ao surgimento das vacinas.

Desde o início da pandemia de COVID-19, houve um aumento significativo de investigações desenvolvidas para caracterizar os perfis imunológicos durante diferentes fases da doença, em diferentes localizações geográficas (LIU et al., 2020). No entanto, os resultados variaram, o que pode ser devido à diferença nas preparações das amostras clínicas, plataformas de ensaio e critérios de recursão dos pacientes entre os estudos (LIU et al., 2020).

Nessa conjuntura, estudos envolvendo a avaliação da frequência de diversas células imunes, assim como vários marcadores de ativação celular, degranulação, exaustão celular, citocinas, citotoxidade, dentre outros, em indivíduos acometidos por SARS-CoV- 2 têm sido realizados (HORENSTEIN et al.,2021; CUNHA et al., 2022).

Em quadros de infecções virais, as células T CD8+ constituem o principal subconjunto celular atuante nessa linha de defesa mediando a morte das células infectadas por citotoxicidade marcada pela expressão de granzimas e perforina, assim como, pela secreção de citocinas pró-inflamatórias como o IFN-γ (HERRMANN et al., 2020; FLAMENTE et al.; MATYUSHENKO et al., 2021). Nesse sentido, no presente estudo, foram realizadas análises da subpopulação de células T CD8+ em voluntários recuperados das formas leve e grave da COVID-19.

A análise em citometria de fluxo das PBMCs dos grupos de indivíduos aqui estudados revelou que, comparado ao grupo controle, a frequências das células T CD8+ foi menor no grupo leve IgG + e no grupo grave. Comparando os grupos leves, observou-se que o grupo leve produtor de anticorpos manteve a menor frequência de células T CD8+ em relação ao grupo leve não produtor de anticorpos. Em contrapartida, foi perceptível um aumento na frequência das células T CD8+ na presença do *Pool Spike* CoV-2 no grupo leve IgG-. Dessa forma, a baixa frequência de células T CD8+ prevaleceu nos grupos leve IgG+ e grave de pacientes convalescente da COVID-19. Biase et al. (2020) observaram que os pacientes com COVID-19 apresentam redução nos números absolutos de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, que apresentam marcadores relacionados à ativação ou exaustão/senescência, corroborando assim com os nossos resultados (Zhang et al 2022).

O perfil de ativação da subpopulação de células T CD8+ foi aqui avaliado através da análise da expressão de CD69, CD38 e do marcador de proliferação celular Ki67. O CD69 é um receptor de lectina C tipo II ligado à membrana e é considerado um marcador clássico de ativação precoce em linfócitos devido ao seu rápido surgimento na membrana plasmática dos linfócitos T após o envolvimento de TCR/CD3 ativando citocinas. A expressão de CD69 é imediatamente aumentada após ativação na maioria dos leucócitos, em várias condições inflamatórias, justificando assim, o seu uso comum como marcador de linfócitos ativados.

Files et al., (2021) avaliando a frequência de marcadores de ativação de células T em células T CD8+ em pacientes hospitalizados por COVID-19, demonstraram que houve uma maior expressão de CD69 em relação à pacientes que não foram hospitalizados. O mesmo estudo demonstrou um grande período de manutenção de alterações imunológicas após a infecção por SARS-CoV-2, sugerindo que o aumento na expressão de CD69 pode ser mantido em indivíduos convalescentes (FILES et al., 2021). Em acréscimo, Youngs et al., (2021) ao investigar 41 pacientes com quadro grave da COVID-19, verificaram que a expressão de CD69 em células T foi significativamente maior em pacientes que morreram versus aqueles que sobreviveram, porém, uma limitação apresentada deste estudo foi que ele se concentrou apenas em subpopulações de células linfoides inatas (ILCs), tornando difícil contextualizar esses achados dentro da resposta imune geral.

As descrições acima citadas, corroboram com o aqui observado, no que diz respeito ao aumento da expressão de CD69 pelas células T CD8+ em pacientes leves recuperados, uma vez que nas análises, a subpopulação de células T CD8+, avaliadas nesse trabalho, apresentaram um perfil responsivo ao estímulo pelo *Pool Spike* CoV-2 e *Pool* CoV-2 em relação a expressão de CD69 nos grupos avaliados. No grupo leve produtor de anticorpos observou-se uma alta expressão do CD69 na presença do *Pool Spike* CoV-2 em relação aos demais grupos. O aumento na expressão de CD69 também foi observado no Grupo leve não produtor de anticorpos em comparação ao grupo CTL e o grupo grave. Comparando o perfil de ativação dos grupos leves, observa-se uma maior expressão do CD69 no grupo leve IgG+. Tal achado, pode ser sugestivo de uma resposta imune das células T CD8 mais eficiente no combate a Infecção pelo SARS-CoV-2 (Files et al.,2021).

Apesar do CD69 ter seu papel estabelecido como marcador de ativação, evidências sugerem que o ele também atua como um importante regulador das respostas imunes determinando, portanto, padrões de liberação de citocinas, bem como de endereçamento e migração de linfócitos ativados (CÍBRIAN; SÁNCHEZ-MADRID., 2017).

Um outro marcador precoce utilizado para a identificação de células T ativadas é o CD38, uma glicoproteína com funções ectoenzimáticas multifuncionais e pode ser encontrado expresso na superfície celular ou em compartimentos intracelulares, como membrana nuclear, retículo endoplasmático e mitocôndrias. A Expressão do CD38 pode ser encontrada em células epiteliais prostáticas, astrócitos de ilhotas pancreáticas, células musculares lisas, rins, intestino e cérebro. Entretanto, o CD38 é predominantemente expresso em células imunes em resposta à estimulação por citocinas e interferon - *γ*. No que diz respeito a expressão do CD38 em células imune, destaca-se uma alta expressão em células B, macrófagos, células dendríticas (DCs), células linfoides inatas (ILC), células *natural killer* (NK), células T, neutrófilos e monócitos (ZAYDA et al., 2020; HOGAN et al., 2019). Por se tratar de uma molécula pleiotrópica, diversas são as funções biológicas do CD38, dentre elas, destaca-se aqui, a influência nas respostas imunes inatas e adaptativas, regulando o tráfego de células como neutrófilos e células dendríticas para os locais de inflamação, a exemplo da quimiotaxia e migração transendotelial, bem como múltiplos aspectos relacionados à maturação das DCs como a polarização de T *helper* tipo 1 (Th1) e produção de

interleucinas. A expressão de CD38 por células T foi observada em de diferentes tipos de tumores, doenças autoimunes e processos inflamatórios induzidos por vírus (SCHIAVONE et al., 2018; ZAYDA et al., 2020). Nesse sentido, torna-se válido comentar que o CD38 têm sido amplamente avaliadas em um contexto de potencial imunoterápico no câncer, em distúrbios autoimunes e infecções virais, incluindo a infecção pelo novo coronavírus na qual pode também ser útil para o gerenciamento da resposta imunológica inflamatória presente na COVID-19 (AJAMI et al., 2021).

Dada a relevância do marcador supracitado, aqui foi observado um aumento na expressão de CD38 por células T CD8+ na presença do *Pool Spike* CoV-2 no grupo leve IgG- comparando com o grupo grave. Observou-se ainda que no grupo leve não produtor de anticorpos houve uma maior expressão nas células não estimuladas. Em termos gerais, foi verificado que os pacientes recuperados das formas leves possuem células T CD8+ mais ativadas expressando CD38. Zhang e Colaboradores (2022) ao avaliar a resposta imunológica em no trato respiratório e em sangue periférico demonstrou que baixas frequências de células T foram detectadas nas vias aéreas de COVID-19 com expressão aumentada de marcadores de ativação CD38. O aumento da frequência de células T ativada nas vias aéreas está associado à melhora da sobrevida, corroborando com os dados aqui observados (Zhang et al.,2022).

A proteína de morte celular programada 1 (PD-1) é comumente estudada nos processos cancerígenos. Trata-se de uma proteína de ponto de verificação (*Checkpoint*) nas células T, agindo como um tipo de interruptor impedindo que as células T ataquem outras células do indivíduo. Tal evento, acontece quando o PD-1 interage com ligante de morte celular programada 1 (PD-L1), uma proteína encontrada em células normais e cancerígenas, sinalizando assim às células T para deixar as outras células sozinhas, o que as ajuda a se esconder de um ataque imunológico (NISHIJIMA et al., 2019; SPAGNOLO et al.,2021).

A molécula de PD-1, embora tenha sido frequentemente classificada como marcador de exaustão celular, também demonstraram ser ativadas durante infecções agudas. Jouan et al. (2020) apresentaram essa molécula como um marcador de ativação usado rotineiramente para avaliar a exaustão de células T. Na atual conjuntura pandêmica, diversos estudos têm sido realizados, no sentido de avaliar a expressão de marcadores imunológicos incluído o PD-1 em indivíduos acometidos pela infecção do SARS-CoV-2 em variados graus de gravidade da doença. Uma

expressão aumentada de PD-1 foi descrita em células T CD4+ e NK em casos grave de COVID-19 (VARCHETTA et al.,2021; RHA et al., 2021).

Linfócitos T CD8+ efetores que expressam PD-1 foram descritos em malária, porém, em COVID-19 parece haver uma tendência de maior expressão de PD1 em células T CD8+ pode ser observada, embora sem significância estatística (HERRMANN et al., 2020). Nesse sentido, a presença da expressão de PD-1 também foi observada na população de células T CD8+ aqui avaliada sem alterações significativas entre os distintos grupos avaliados. O aumento na frequência de PD-1 em células T CD8+ foi induzido pelo *Pool Spike* CoV-2 apenas no grupo Leve IgG+ quando comparado aos demais grupos, indicando maior reatividade desse grupo a reexposição ao antígeno específico.

Estudos anteriores de células T e seu papel em pacientes com COVID-19 mostraram uma regulação positiva de receptores inibitórios como PD1 e portanto, foi sugerido que a exaustão das células T pode desempenhar um papel na fisiopatologia da infecção por COVID-19 (HERRMANN et al., 2020; RHA et al., 2021). Por outro lado, uma regulação positiva de receptores inibitórios em infecções agudas não necessariamente se correlaciona com a exaustão terminal dessas células, mas pode ser considerada uma característica da ativação imune geral para compensar respostas imunes excessivas (HERRMANN et al., 2020).

A proteína nuclear Ki67 é comumente usada para avaliar a proliferação celular e medir a capacidade proliferativa de células T e células tumorais. Seu valor preditivo e prognóstico também é estudado como um importante biomarcador de rotina na prática clínica. A expressão de Ki67 tem sido relatada em todas as fases do ciclo celular, sobretudo em células que estão nos estágios G1, S e G2 do ciclo celular, além disso, o Ki67 é considerado um marcador nuclear relacionado à proliferação principalmente de células tumorais (ZHOU et al., 2017).

Pouco tem sido relatado sobre a expressão de Ki67 em indivíduos acometidos por SARS-CoV-2, porém, uma expressão aumentada do Ki67 foi relatada em células de placentas positivas para a COVID-19, um aumento na frequência de monócitos KI67+ em casos moderados e graves da doença também foi observado (KIRATH et al., 2022), além disso, a presença de Ki67 em células T reativas a glicoproteínas *Spike* do SARS-CoV-2 em sangue periférico de pacientes com COVID-19 já foram relatadas, tal evento é característico da respostas de células T efetoras durante infecções virais

agudas (BRAUN et al., 2020). Por outro lado, Kldiashvili e colaboradores. (2022) ao avaliar grupos de indivíduos convalescentes da COVID-19 que apresentaram IgG + ou IgG -, observaram que houve aumento do nível de Ki67 nos indivíduos IgG negativo, e que a expressão de Ki67 é um indicador específico, quantitativo e reprodutível da proliferação de linfócitos T antígeno-específicos, afirmado assim que a memória imune de células T é desenvolvida nos indivíduos IgG negativo (KLDIASHVILI et al.,2022).

Apesar dos dados supracitados**,** neste estudo, a presença da expressão de Ki67 foi notada nas células T sem alterações significativas entre os distintos grupos avaliados. Um aumento na frequência de Ki67 no grupo leve IgG+ de células T CD8+ quando estimuladas pelo Pool Spike CoV-2 foi mais expressivo quando comparado às células não estimuladas ou estimuladas com o Pool CoV-2, indicando maior reatividade no grupo leve produtor de anticorpos em possível reexposição a antígenos específicos.

Também foi avaliada a produção de IFN-γ, trata-se de uma citocina inflamatória cuja deficiência do seu receptor tanto em células da imunidade inata como em células da imunidade adaptativa resultam em grande suscetibilidade à infecção por vírus, possibilitando assim, um aumento da replicação viral e redução da sobrevida do indivíduo infectado (LEE et al., 2018). Contudo, diante de um quadro inflamatório característico da COVID-19, o IFN-γ pode contribuir de diferentes formas para a patogênese da doença principalmente no início da infecção, esse início é caracterizado por febre, cansaço, prostração e tosse (ADMOU, 2021). Considerando que a gravidade da doença está associada com a hiperprodução de citocinas inflamatórias (hipercitocinemia), somadas ao aumento do estresse oxidativo, nota-se elevados níveis de IFN-γ em casos graves da COVID-19 e sua presença está correlacionada positivamente aos parâmetros de estresse oxidativo como o poder antioxidante total (PAT), peróxidos plasmáticos (d-ROM) e o índice de estresse oxidativo (PETRUSHEVSKA et al., 2021).

Por outro lado, em monócitos circulantes, o SARS CoV-2 induz uma alteração da expressão dos genes do Interferon (IFN) potencialmente responsável pela baixa expressão de HLA-DR nessas células, comprometendo a comunicação entre imunidade inata e adaptativa. Porém, a expressão do HLA-DR é restaurada a partir da administração de injeções de IFN-γ em pacientes com síndrome do desconforto

respiratório agudo sugerindo que a presença do IFN-γ de forma coordenada pode desencadear uma resposta adequada do hospedeiro contra o vírus (DICKEL et al., 2021).

Embora alguns estudos abordem o IFN- γ como um dos preditores de gravidade da COVID-19, o contexto imunológico precisa ser bem avaliado, no qual a hipercitocinemia, de fato, se associa com um pior prognóstico (HAN *et al*., 2020; ISLAM *et al*., 2021; PINTO *et al*., 2022). No que diz respeito à expressão de IFN- γ por células T CD8+, aqui avaliada, observou–se que tanto o grupo leve não produtor de anticorpos (leve IgG-), como o grupo leve produtor de anticorpos (leve IgG+) foram mais ativados, expressando IFN- γ, quando comparado ao grupo grave e ao grupo controle. Essa alta expressão IFN- γ nos grupos leves foi observada na presença e na ausência de estímulos. Tal evento pode acontecer pela maior ativação das células T CD8+ como já foi demostrado na expressão de CD69 e CD38 (Zhang et al.,2022).

Entretanto, é valido comentar que Herrmann et al (2020) destacaram que o papel e a função exatos das células T em pacientes com COVID-19 em relação a complicações imunológicas como hipercitocinemia, incluindo o IFN- γ, precisam ser melhor comprrendidos.

A produção de grânulos citotóxicos se configura como importante ferramenta de ação adotada por determinadas células do sistema imune (TAKEUCHI; SAITO, 2017). Linfócitos T citotóxicos (CTLs), por exemplo, são responsáveis por manterem a homeostase imunológica eliminando células infectadas por vírus e cancerosas. Essa função torna-se possível quando uma CTL se liga com uma célula alvo formando assim uma sinapse imunológica, então libera uma proteína formadora de poros dependente de Ca^{2+} (perforina) e proteases de serina pró-apoptóticas (granzimas) na fenda sináptica. Embora, tanto as CTLs como a célula-alvo sejam expostas à perforina dentro da sinapse, apenas a membrana das células alvo é rompida e com isso, as granzimas penetram através dos poros e consequentemente causa a morte celular, enquanto o CTL é invariavelmente poupado (Rudd-Schmidt et al.,2019).

Nos resultados do presente estudo, foi possível observar que as populações de células T CD8+ no grupo leve produtor de IgG sem estímulo apresentaram alta de coexpressão de Granzima B, Perforina e CD107a. Quando este grupo foi estimulado (*Pool Spike* Cov-2 e *Pool* CoV-2), passaram a ter uma baixa expressão de Granzima B, Perforina e CD107a, enquanto a frequência destas, foram maiores nos grupos

saudáveis e grave. Com isso, demostra-se que as células T CD8 do grupo leve IgG + apresentam-se mais citotóxicas do que as do grupo leve IgG-, e que as células T CD8 dos grupos CTL e grave são mais citotóxicas. Biase et al. (2020) ao estudarem um grupo de 39 pacientes hospitalizados com quadro de pneumonia e COVID-19 e um grupo controle, demonstraram que a expressão de granzima B e do marcador de degranulação CD107a por células T CD8+ estava aumentado tanto no grupo controle como no grupo de doentes com COVID-19, indicando que ambos os grupos apresentam células TCD8+ mais citotóxicas corroborando assim com os dados aqui observados.

Esse trabalho foi produzido no curso da pandemia, assim estes resultados representam o período de novembro de 2020 a maio de 2021, período esse onde a cepa predominante era a original e ainda não se tinha vacina e a população estudada não sofreu ataque de outras variantes como omicron e delta.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do cenário de saúde mundial ocasionado pela COVID-19, diversos estudos na área da biotecnologia e da imunologia se tornaram de suma importância para uma melhor compreensão dos mecanismos imunológicos objetivando aprimorar, desenvolver e aplicar novas estratégias preventivas, de diagnósticos precoce, terapêuticas eficazes contra a infecção, e até mesmo para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de vacinas.

Foi observado que os indivíduos recuperados pertencentes ao grupo leve IgG+ e ao grupo grave apresentaram diminuição na frequência dos linfócitos T CD8+ quando comparado ao grupo controle e ao grupo leve IgG-. Em indivíduos do grupo leve IgG+ constatou-se uma maior expressão do marcador de ativação CD69 e da citocina pró-inflamatória IFN-y. Foi observado ainda, que nos indivíduos acometidos pela forma leve da COVID-19 que não produziram anticorpos houve uma alta expressão do marcador de ativação CD38 e de IFN-y, esses achados, indicam que os grupos leves (IgG- e IgG+) apresentam células T CD8 mais ativadas promovendo assim respostas mais eficientes no combate a infecção. Além disso, ao avaliar a expressão do marcador de citotoxidade CD107a em células T CD8+ granzima B e perforina positivas constatou-se que os indivíduos recuperados do grupo leve produtor de anticorpos apresentam mais células T CD8+ citotóxicas comparado aos indivíduos do grupo leve não produtor de anticorpos, e que os indivíduos pertencentes ao grupo controle e o grupo grave foram mais citotóxicos.

Sendo assim, conclui–se que os pacientes leves apresentam um perfil de células T CD8+ ativadas expressando mais CD69, CD38, INF-y e uma degranulação do CD107a. Os resultados poderão contribuir com o direcionamento de investimentos em mais pesquisas na área, com abordagem direcionada para o desenvolvimento de possíveis terapias alvo para esses biomarcadores e para o aprimoramento de testes diagnósticos mais rápidos, específicos e eficazes na predição da gravidade da COVID-19, norteado assim, novas condutas clínicas e administração precoce de terapêutica mais eficazes, no combate e na progressão da doença. Contudo, ainda se faz necessário a realização de estudos adicionais para elucidar mais sobre a função desses biomarcadores na COVID-19.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, K.G; RAMBAUT, A.; LIPKIN, W. I.; HOLMES, E.C.; GARRY, R.F. A origem proximal do SARS-CoV-2 The proximal origin of SARS-CoV-2. Nat Med. v. 26, p. 450-452. 2020. <Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41591-020-0820-9>. Acesso em: 09 de maio de 2022.

Andrade, Miguel A; Bianchi, Martina; Benvenuto, Domenico; Giovanetti, Marta; Angeletti, Silvia; Ciccozzi, Massimo; Pascarella, Stefano. Sars-CoV-2 Envelope and Membrane Proteins: Structural Differences Linked to Virus Characteristics? Hindawi. **BioMed Research International**. p 1-6. 2020.

ASTUTI, I.; YSRAFIL. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. Diabetes Metab Syndr.v. 14, n. 4, p.407-412. 2020. <Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7165108/>. Acesso em: 09 de maio de 2022.

BACKER, J. A.; KLINKENBERG, D.; WALLINGA, J. Incubation period of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infections among travellers from Wuhan, China, 20–28 January 2020. **Euro Surveill.** v. 25, n. 5 pii=2000062, p. 1-6. 2020. < disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7014672/>. Acesso em: 09 de maio de 2022.

Banoth B, Tuladhar S, Karki R, Sharma BR, Briard B, Kesavardhana S, Burton A, Kanneganti TD. ZBP1 promotes fungi-induced inflammasome activation and pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis). J Biol Chem. 2020 Dec 25;295(52):18276-18283. doi: 10.1074/jbc.RA120.015924. Epub 2020 Oct 27. PMID: 33109609; PMCID: PMC7939383.

BRASIL. Governo do Estado da Paraíba. Dados Epidemiológicos COVID-19 Paraíba. 2022b. <disponível em: https://paraiba.pb.gov.br/diretas/saude/coronavirus/dados-epidemiologicos-covid> Acesso em: 25 de julho de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. COVID-19 Painel Coronavírus. 2022a. https://covid.saude.gov.br/. Acesso em: 25 de julho de 2022.

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

Braun, J., Loyal, L., Frentsch, M., Wendisch, D,. Georg, P., Kurth, F., Hippenstiel, S., Dingeldey, M., Kruse, B., Faucher, F., Baysal, B., Mangold, M., Henze, L., Lauster, R., Mall, M.A., Beyer, K., Rohmel,J., Voigt, S., Schmitz, J., Miltenyi, S., Demuth, I., Müller, M.A., Hocke, A., Witzenrath, M., Thiel, A. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. Nature **587,** 270–274 (2020). https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9

BRAZ AMARILIO DA CUNHA, D.; NAKAMURA PERISSÊ PEREIRA, C.; CARNEIRO DE AGUIAR, Y..; GODOI DE CARVALHO, S..; BARROZO FERNANDES BORGES,

J.; PINHEIRO SÃO PEDRO, J..; BERSAN MENEZES, P. H.; MORAES GONÇALVES, B..; FERNANDES DOS SANTOS CASTRO, F. USO DE MARCADORES BIOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE PACIENTES COM COVID-19: UMA REVISÃO DE LITERATURA. **RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar - ISSN 2675-6218**, *[S. l.]*, v. 2, n. 6, p. e26436, 2021. DOI: 10.47820/recima21.v2i6.436. Disponível em: https://recima21.com.br/index.php/recima21/article/view/436. Acesso em: 30 set. 2022.

Brito, Sávio Breno P; Braga, I. O.; Moraes, M.M.; Cunha, C.C.; Leão, S.C.; Takenami. I;. Immunopathological mechanisms involved in SARS-CoV-2 infection. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial [online]. 2020, v. 56 [Acessado 21 Abril 2022], e3352020. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20200056>. Epub 13 Nov 2020. ISSN 1678-4774.

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

CDC - Center for Disease Control and Prevention. Coronavírus Disease 2019 (COVID-19). Symptoms of Coronavírus. 2020. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html. [(Accessed on 10 march 2022)];

Centros dos EUA para Controle e Prevenção de Doenças. Resumo científico: transmissão SARS-CoV-2. 2021. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/sars-cov-2-transmission.html. Acesso em 12 de março de 2022.

CESPEDES, M.S.; DE SOUZA, J. C. R. P. Sars-CoV-2: A clinical update - II. REV **ASSOC MED BRAS**. v. 66, n. 4, p. 547-557. 2020.

Chen Z, John Wherry E. T respostas celular em pacientes com COVID-19. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(9):529-536. doi:10.1038/s41577-020-0402-6

CHIEN, J.Y; HSUEH, P.R; CHENG, W.C; YU, C.J; YANG, P.C. Temporal changes in cytokine/chemokine profiles and pulmonary involvement in severe acute respiratory syndrome**. *Respirology***. 2006; 11(6):715-722. doi:10.1111/j.1440-1843.2006.00942.x

COSTELA-RUIZ, V; ILLESCAS-MONTES, R; PUERTA-PUERTA, J.M; RUIZ, C; MELGUIZO-RODRÍGUEZ, L. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease [published online ahead of print, 2020 Jun 2]. Cytokine Growth Factor Rev. 2020; S1359-6101(20)30109-X. doi:10.1016/j.cytogfr.2020.06.001

Diamond, MS, Kanneganti, TD. Imunidade inata: a primeira linha de defesa contra SARS-CoV-2. *Nat Immunol* **23,** 165-176 (2022). https://doi.org/10.1038/s41590-021-01091-0.

Ekaterina Kldiashvili, Saba Iordanishvili, Tamar Shotadze. Determination of Ki67 after SARS-CoV-2 infection by enzyme linked immunoassay, 18 May 2022, PREPRINT (Version 1) available at Research Square [https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1238198/v1]

Ekşioğlu, D. E., Alan, S., Sili, U., Bakan, D. , Ocak, İ. , Yürekli, R. , Alpay, N. , Görçin, S. , & Yıldız, A. (2022). Células imunes inatas e adaptativas periféricas durante o COVID-19: neutrófilos funcionais, monócitos pró-inflamatórios e linfócitos semimortos . *Citometria Parte B: Citometria Clínica* , 102 (2), 153 – 167 . https://doi.org/10.1002/cyto.b.22042

Meyerowitz EA, Richterman A, Gandhi RT, Sax PE. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. Ann Intern Med.2021;174:69-79. [Epub ahead of print 17 September 2020]. doi:10.7326/M20-5008

Escandón, K., Rasmussen, AL, Bogoch, Murray, EJ., Escandón, K., Popescu, SV., Kindrachuk, J. Falso dicotomias COVID-19 e uma revisão abrangente das evidências sobre saúde pública, sintomatologia COVID-19, transmissão SARS-CoV-2, uso de máscara e reinfecção. *BMC Infect Dis* **21,** 710 (2021). https://doi.org/10.1186/s12879-021-06357-4

Flament, H., Rouland, M., Beaudoin, L., Toubal, A., Bertrand,L., Leburguês,S., Rousseau,C., Soulard, P., Gouda, Z., Cagninacci, L., Monteiro, A.C., Nedelec, M.A., Luz, S., Bailly, K., Andrieu, M., Pierre, B.S., Letourneur, F., Jouan,Y., Si-Tahar, M., Baranek, T., Paget, C., Boitard, C., Vallet-Pichard, A., Gautier, J.F., Lehuen, A. *l.* Outcome of SARS-CoV-2 infection is linked to MAIT cell activation and cytotoxicity. *Nat Immunol* **22,** 322–335 (2021). https://doi.org/10.1038/s41590-021-00870-z

GBB Mendes, BR Neri, MFB Almeida, VR Santiago, ARJ Parente, PEBM Filho, CB Sousa, JPM Lobão, LM Oliveira, LINFOPENIA ASSOCIADA À GRAVIDADE DE PACIENTES INFECTADOS PELO SARS-COV-2, Hematology, Transfusion and Cell Therapy, Volume 43, Supplement 1, 2021, Page S543, ISSN 2531-1379, https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.938.

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.

GORBALENYA, A.E., BAKER, S.C., BARIC, R.S. et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nat Microbiol.** v. 5, p. 536–544 2020.

GRIFONI, A.; WEISKOPF, D.; RAMIREZ, S. I.; Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. **Cel**. v. 181, p. 1489-1501. 2020.

GUO, Y; CAO, Q.; HONG, Z. Tan, YY.; Chen, SD.; Jin, HJ.; Tan, KS.; Wang, DY.; Yan, Y. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019

(COVID-19) outbreak – an update on the status. ***Military Medical Research.*** *Vol.*7**,** 11 (2020). https://doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0

GUPTA, A.; MADHAVAN, M.V.; SEHGAL, K. *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. ***Nature Medicine.*** *Vol.* **26,** 1017–1032 (2020). https://doi.org/10.1038/s41591-020-0968-3

Harrison, A G; Lin, Tao; Wang, Penghua. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. T*rends in Immunology*, 41 (12), pp. 1100-1115. (2020). Doi: https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004

HE, F; DENG, Y; LI, W. Coronavirus disease 2019: What we know? **Jounal of medical virology**. 2020 https://doi.org/10.1002/jmv.25766

HEINONEN, S.; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, R.; DIAZ, A.; OLIVA RODRIGUEZ-PASTOR, S.; RAMILO, O.; MEJIAS, A. Infant Immune Response to Respiratory Viral Infections. **Immunol Allergy Clin North Am**. v. 39, n. 3, p. 361-376. 2019.

Herrmann M, Schulte S, Wildner NH, Wittner M, Brehm TT, Ramharter M, Woost R, Lohse AW, Jacobs T, Schulze Zur Wiesch J. Analysis of Co-inhibitory Receptor Expression in COVID-19 Infection Compared to Acute *Plasmodium falciparum* Malaria: LAG-3 and TIM-3 Correlate With T Cell Activation and Course of Disease. Front Immunol. 2020 Aug 26;11:1870. doi: 10.3389/fimmu.2020.01870. PMID: 32983106; PMCID: PMC7479337.

HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; SCHROEDER, S.; et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell.** n. 181, n. 2, p. 271-280. 2020.

Horenstein AL, Faini AC, Malavasi F. CD38 in the age of COVID-19: a medical perspective. Physiol Rev. 2021 Oct 1;101(4):1457-1486. doi: 10.1152/physrev.00046.2020. Epub 2021 Mar 31. PMID: 33787351; PMCID: PMC8313238.

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

Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet. 2020 Feb 15;395(10223):497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5. Epub 2020 Jan 24. Erratum in: Lancet. 2020 Jan 30;: PMID: 31986264; PMCID: PMC7159299.

Jiang S, Hillyer C, Du L. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses. Trends Immunol. 2020 May;41(5):355-359. doi: 10.1016/j.it.2020.03.007. Epub 2020 Apr 2. Erratum in: Trends Immunol. 2020 Apr 24;: PMID: 32249063; PMCID: PMC7129017.

João Pedro Costa dos Santos, João Pedro Viana Lacerda, Mariana Ranucci da Cunha, Lucas Narciso Balchiunas, Ana Carolina de Azevedo Souza, Isabelle Assis Barbosa Borges, Henrique Thadeu Periard Mussi, LINFOPENIA DE ADMISSÃO ESTÁ ASSOCIADA A DESFECHOS DESFAVORÁVEIS EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM COVID-19?, The Brazilian Journal of Infectious Diseases,Volume 26, Supplement 1, 2022, ISSN 1413-8670, https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.102037.

JORNAL FOLHA DE SÃO PAULO. Brasil confirma primeiro caso do novo coronavírus. 2020. Disponível em:<https://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/2020/02/brasil-confirma-primeiro-caso-do-novo-coronavirus.shtml>.Acesso em: 03/03/2022.

JORNAL FOLHA DE SÃO PAULO. Brasil tem primeira morte pelo novo coronavírus; homem tinha diabetes e hipertensão. 2020. Disponível em: <https://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/2020/03/ brasil-tem-primeira-morte-pelo-novo-coronavirus.shtml>. Acesso em: 04/03/2022. Citado na página 31.

Jouan, Y; Antoine Guillon, Loïc Gonzalez, Yonatan Perez, Chloé Boisseau, Stephan Ehrmann, Marion Ferreira, Thomas Daix, Robin Jeannet, Bruno François, Pierre-François Dequin, Mustapha Si-Tahar, Thomas Baranek, Christophe Paget; Phenotypical and functional alteration of unconventional T cells in severe COVID-19 patients. *J Exp Med* 7 December 2020; 217 (12): e20200872. doi: https://doi.org/10.1084/jem.20200872

JUNEJO, Y.; OZASLANB, M.; SAFDARB, M.; et al. Novel SARS-CoV-2/COVID-19: Origin, pathogenesis, genes and genetic variations, immune responses and phylogenetic analysis. **Gene Reports**. 2020.

Karki R, Kanneganti TD. The 'cytokine storm': molecular mechanisms and therapeutic prospects. Trends Immunol. 2021 Aug;42(8):681-705. doi: 10.1016/j.it.2021.06.001. Epub 2021 Jul 1. PMID: 34217595.

Kim KD, Hwang I, Ku KB, Lee S, Kim* SJ, , Kim* C. **Progress and Challenges in the Development of COVID-19 Vaccines and Current Understanding of SARS-CoV-2- Specific Immune Responses**. J. Microbiol. Biotechnol. 2020;30:1109-1115. *https://doi.org/10.4014/jmb.2006.06006*

Kumar, Swatantra et al. “Host Immune Response and Immunobiology of Human SARS-CoV-2 Infection.” *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutics* 43–53. 30 Apr. 2020, doi:10.1007/978-981-15-4814-7_5

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

LI X.; LUK, H.K.H.; LAU, S.K.P.; WOO, P.C.Y. Human Coronaviruses: General Features. **Reference Module in Biomedical Sciences.** p. 1-7. 2019.

LI, G.; FAN, Y.; LAI, Y.; et al. Coronavirus infections and immune responses. **J Med Virol.** v. 92, n. 4, p. 424-432. 2020

LI, M.; CHEN, L.; ZHANG, J.; XIONG, C.; LI, X. The SARS-CoV-2 receptor ACE2 expression of maternal-fetal interface and fetal organs by single-cell transcriptome study. **PLoS ONE**. v. 15, n. 4. p, 1-12. 2020.

LINTON, N.M.; KOBAYASHI, T.; YANG, Y.; et al. Incubation Period and Other Epidemiological Characteristics of 2019 Novel Coronavirus Infections with Right Truncation: A Statistical Analysis of Publicly Available Case Data. **J Clin Med.** v. 9, n. 2, p. 538. 2020.

LIU, J.; LI, S.; LIU, J.; et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. **EBioMedicine**. v. 55, n. 102763, p. 1-9. 2020.

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.

LUKASSEN, S.; CHUA, R.L.; TREFZER, T.; et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. **EMBO J.**; 39(10): v. e105114. p, 1-15. 2020

Matyushenko, V.; Isakova-Sivak, I.; Kudryavtsev, I.; Goshina, A.; Chistyakova, A.; Stepanova, E.; Prokopenko, P.; Sychev, I.; Rudenko, L. Detection of IFNγ-Secreting $CD4^+$ and $CD8^+$ Memory T Cells in COVID-19 Convalescents after Stimulation of Peripheral Blood Mononuclear Cells with Live SARS-CoV-2. *Viruses* **2021**, *13*, 1490. https://doi.org/10.3390/v13081490

McKechnie JL, Blish CA. The Innate Immune System: Fighting on the Front Lines or Fanning the Flames of COVID-19?. *Cell Host Microbe*. 2020;27(6):863-869. doi:10.1016/j.chom.2020.05.009

Moss, P. A resposta imune de células T contra SARS-CoV-2. *Nat Immunol* **23,** 186-193 (2022). https://doi.org/10.1038/s41590-021-01122-w

Mourmouris P, Tzelves L, Roidi C, Fotsali A. COVID-19 transmission: a rapid systematic review of current knowledge. Osong Public Health Res Perspect. 2021;12(2):54-63. DOI: https://doi.org/10.24171/j.phrp.2021.12.2.02

Nishijima TF, Shachar SS, Nyrop KA, Muss HB. Safety and Tolerability of PD-1/PD-L1 Inhibitors Compared with Chemotherapy in Patients with Advanced Cancer: A Meta-Analysis. Oncologist. 2017 Apr;22(4):470-479. doi: 10.1634/theoncologist.2016-0419. Epub 2017 Mar 8. PMID: 28275115; PMCID: PMC5388381.

OMS – Organização Mundial de Saúde, 2020a. OPAS **Folha informativa sobre COVID-19**. Available online: https://www.paho.org/pt/covid19. [(Accessed on 01 march 2022)];

OMS – Organização Mundial de Saúde, 2020d. WHO announces COVID-19 outbreak a pandemic. https://www.euro.who.int/en/health-topics/health-

emergencies/coronavirus-covid-19/news/news/2020/3/who-announces-covid-19-outbreak-a-pandemic [(Accessed on 01 march 2022)];

OMS – Organização Mundial de Saúde, 2022. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. https://covid19.who.int/. [(Accessed on 01 march 2022)];

OMS – Organização Mundial de Saúde. Health Organization, 2020c. https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports. [(Accessed on 21 July 2020)];

OMS – Organização Mundial de Saúde. Novel Coronavirus—China. 2020b. Available online: http://www.who.int/csr/don/12-january-2020-novel-coronavirus-china/en/.[(Accessed on 01 march 2022)];

OPAS. OMS anuncia nomenclaturas simples e fáceis de pronunciar para variantes de interesse e de preocupação do SARS-CoV-2. https://www.paho.org/pt/noticias/1-6-2021-oms-anuncia-nomenclaturas-simples-e-faceis-pronunciar-para-variantes-interesse-e

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Disponível em: < Coronavirus disease (COVID-19) (who.int)>. Acessado em: 01/03/2021.

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.

Parrot T, Gorin JB, Ponzetta A, Maleki KT, Kammann T, Emgård J, Perez-Potti A, Sekine T, Rivera-Ballesteros O; Karolinska COVID-19 Study Group, Gredmark-Russ S, Rooyackers O, Folkesson E, Eriksson LI, Norrby-Teglund A, Ljunggren HG, Björkström NK, Aleman S, Buggert M, Klingström J, Strålin K, Sandberg JK. MAIT cell activation and dynamics associated with COVID-19 disease severity. Sci Immunol. 2020 Sep 28;5(51):eabe1670. doi: 10.1126/sciimmunol.abe1670. PMID: 32989174; PMCID: PMC7857393.

PATRICK C. Y. WOO; SUSANNA K. P. LAU; YI HUANG; KWOK-YUNG YUEN. Coronavirus Diversity, Phylogeny and Interspecies Jumping**. Experimental Biology and Medicine** 234(10):1117-27 · July 2009 https://doi.org/10.3181/0903-MR-94

PAULES CI, MARSTON HD, FAUCI AS. Coronavirus Infections—More Than Just the Common Cold. *JAMA.* 2020;323(8):707–708. doi:10.1001/jama.2020.0757
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.

Perico, L., Benigni, A., Casiraghi, F. *et al.* Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat Rev Nephrol* **17,** 46–64 (2021). https://doi.org/10.1038/s41581-020-00357-4

Petrushevska M, Zendelovska D, Atanasovska E, Eftimov A, Spasovska K. Presentation of cytokine profile in relation to oxidative stress parameters in patients with severe COVID-19: a case-control pilot study. F1000Res. 2021 Aug 2;10:719. doi: 10.12688/f1000research.55166.2. PMID: 34868558; PMCID: PMC8603313.

QAMAR, M.T.; ALQAHTANI, S.M.; MUBARAK A. ALAMRI, M.A. et al. Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. **Pré-print Journal of Pharmaceutical Analysis.** 2020.

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

RABAAN, A.A.; AL-AHMED, S.H.; HAQUE, S.; et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. **Infez Med**. n. 28. v. 2 p. 174-184. 2020.

RABI, F.A.; ZOUBI, M. S. A. L.; KASASBEH, G.A.; SALAMEH, D.M.; AL-NASSER, A.D.; SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far. **Pathogens**. v. 9, n. 3, p. 230-244. 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.

Rha MS, Jeong HW, Ko JH, Choi SJ, Seo IH, Lee JS, Sa M, Kim AR, Joo EJ, Ahn JY, Kim JH, Song KH, Kim ES, Oh DH, Ahn MY, Choi HK, Jeon JH, Choi JP, Kim HB, Kim YK, Park SH, Choi WS, Choi JY, Peck KR, Shin EC. PD-1-Expressing SARS-CoV-2-Specific $CD8^+$ T Cells Are Not Exhausted, but Functional in Patients with COVID-19. Immunity. 2021 Jan 12;54(1):44-52.e3. doi: 10.1016/j.immuni.2020.12.002. Epub 2020 Dec 14. PMID: 33338412; PMCID: PMC7834198.

Robinson MJ, Quast I, Tarlinton DM. Complement-in' the germinal center response. Nat Immunol. 2021 Jun;22(6):673-674. doi: 10.1038/s41590-021-00946-w. PMID: 34031616.

Rudd-Schmidt, J.A., Hodel, A.W., Noori, T. *et al.* Lipid order and charge protect killer T cells from accidental death. *Nat Commun* **10,** 5396 (2019). https://doi.org/10.1038/s41467-019-13385-x

Sarah De Biase, Laura Cook, Dawn A Skelton, Miles Witham, Ruth ten Hove, The COVID-19 rehabilitation pandemic, *Age and Ageing*, Volume 49, Issue 5, September 2020, Pages 696–700, https://doi.org/10.1093/ageing/afaa118

Schiavoni, I., Scagnolari, C., Horenstein, AL, Leone, P., Pierangeli, A., Malavasi, F., Ausiello, CM e Fedele, G. (2018), CD38 modula processos pró-inflamatórios acionados por vírus sincicial respiratório em células dendríticas derivadas de monócitos humanos. Imunologia, 154: 122-131. https://doi.org/10.1111/imm.12873

SHEN, C; WANG, Z; ZHAO, F. et al. Treatment of 5 critically ill patientes with COVID-19 with convalescente plasma. **JAMA**, mar. 2020. doi: 10.1001 / jama.2020.4783

Spagnolo, F , Boutros, A , Croce, E , et ai. Vacinação contra a gripe em pacientes com câncer recebendo inibidores de checkpoint imunológico: uma revisão sistemática. *Eur J Clin Invest* . 2021; 51 :e13604. https://doi.org/10.1111/eci.13604

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.

TAKEUCHI, A.; SAITO, T. CD4 CTL, a cytotoxic subset of CD4+ T cells, their differentiation and function. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1-7, 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00194/full>. Acesso em: 03 octuber. 2022.

Tian, Y., Carpp, LN, Miller, HER *et al.* Imunologia unicelular da infecção por SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol* **40,** 30-41 (2022). https://doi.org/10.1038/s41587-021-01131-y

TILOCCA , B.; SOGGIU, A.; SANGUINETTI, M.; et al. Immunoinformatic analysis of the SARS-CoV-2 envelope protein as a strategy to assess cross-protection against COVID-19. **Microbes Infect.** v. 22, n. 4, p. 182-187. 2020.

Vabret, N., Britton, G.J., Gruber, C., Hegde, S., Kim, J., Kuksin, M., Levantovsky, R., Malle, L., Moreira, A., Park., et al. (2020). The Sinai Immunology Review Project, Immunology of COVID-19: current state of the science, Immunity (2020), 52: 910-941. doi: https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.002

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

WALLS, A. C.; PARK, Y. J.; TORTORICI, M. A.; WALL, A.; MCGUIRE, A. T.; VEESLER, D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell.** v. 181, n. 2, p. 281-292. 2020

Wang CC, Prather KA, Sznitman J, Jimenez JL, Lakdawala SS, Tufekci Z, Marr LC. Airborne transmission of respiratory viruses. Science. 2021 Aug 27;373(6558):eabd9149. doi: 10.1126/science.abd9149. PMID: 34446582; PMCID: PMC8721651.

WASSENAAR, T.M; ZOU, Y. CoV/SARS-CoV-2: rapid classification of betacoronaviruses and identification of Traditional Chinese Medicine as potential origin of zoonotic coronaviruses. **Letters in Applied Microbiology.** p. 342-348. 2020.

WEISS SR, LEIBOWITZ JL. Chapter 4 - Coronavirus Pathogenesis. ***Advances in Virus Researh*.** Vol.81, p.85-164. 2011. doi:10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2

Wuji Zhang, Brendon Y. Chua, Kevin J. Selva, Lukasz Kedzierski, Thomas M. Ashhurst, Ebene R. Haycroft, Suzanne K. Shoffner-Beck, Lucas Hensen, David F. Boyd, Fiona James, Effie Mouhtouris , Jason C. Kwong , Kyra YL Chua ,George Drewet , Ana Copaescu, Julie E. Dobson, Louise C. Rowntree, Jennifer R. Habel, Lilith F. Allen, Hui-Fern Koay, Jessica A. Neil, Matthew J. Gartner, Cristina Y. Lee, Patiya Andersson, Katherine Kedzierska. SARS-CoV-2 infection results in immune responses in the respiratory tract and peripheral blood that suggest mechanisms of disease severity. *Nat Commun* **13**, 2774 (2022). https://doi.org/10.1038/s41467-022-30088-y

XAVIER, A.R; SILVA, J.S. ALMEIDA, J.P.C.L. et al. COVID-19: manifestações clínicas e laboratoriais na infecção pelo novo coronavírus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 56, e3232020, 2020. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442020000100302&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 31 jul. 2021. Epub 01-Jul-2020. https://doi.org/10.5935/1676-2444.20200049.

Youngs J, Provine NM, Lim N, Sharpe HR, Amini A, et al. (2021) Identification of immune correlates of fatal outcomes in critically ill COVID-19 patients. PLOS Pathogens 17(9): e1009804. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009804

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.

Zheng, Min et al. “Impaired NLRP3 inflammasome activation/pyroptosis leads to robust inflammatory cell death via caspase-8/RIPK3 during coronavirus infection.” *The Journal of biological chemistry* vol. 295,41 (2020): 14040-14052. doi:10.1074/jbc.RA120.015036

Zhou, P., Yang, XL., Wang, XG. *et ai.* Um surto de pneumonia associado a um novo coronavírus de provável origem de morcego. *Natureza* **579,** 270-273 (2020). https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7

Zhou, Yu MD a,b ; Hu, Wenqing MD c ; Chen, Ping PRO b,* ; Abe, Masanobu PRO d ; Shi, Lei MDb ; Tan, Si-yuan MD b ; Li, Yong MDb ; Zong, Liang DR b,e,* Ki67 é um marcador biológico de risco maligno de tumores estromais gastrointestinais, Medicina: agosto de 2017 - Volume 96 - Edição 34 - p e7911

ZHU, N.; ZHANG, D.; WANG, W.; LI, X.; YANG, B.; et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. The **New England Journal of Medicine**. v. 382, n.8, p.727-733, 2020. doi: 10.1056/NEJMoa2001017

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.

APÊNDICES

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

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

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

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

Versão: 2

CAAE: 31354720.0.0000.5188

Instituição Proponente: PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.101.879

Apresentação do Projeto:

Bem apresentado

Objetivo da Pesquisa:

Bem definido

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Realizada

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Factível

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados

Recomendações:

vide conclusoes

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

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TÍTULO DO PROJETO: PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE NO PADRÃO DE RESPOSTAS PATOGÊNICAS 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), responável 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 primiera coleta do seu sangue, precisaremos coletar novamente depois de 90 dias, 180 dias, 12 meses (1 no), 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. 1°, itens 2.II e 6; Portaria MS 2.201/11, Capítulo II, Artigos 5° e Capítulo III, Artigo 8°).

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 (1°

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 PATOGÊNICAS OU SUPRESSORAS DESENCADEADA POR ANTÍGENOS PEPTÍDICOS EM PACIENTES COM COVID-19**" autorizando o uso do meu sangue para a realização deste estudo.

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

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

APÊNDICE C – Questionário clínico epidemiológico

QUESTIONÁRIO

DADOS GERAIS	
NOME:	**TELEFONE:**
DATA DE NASCIMENTO: / /	**ETNIA:** ( ) INDÍGENA ( ) BRANCO ( ) PARDO ( ) AMARELO ( ) PRETO
SEXO: ( ) MASCULINO ( ) FEMININO	
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: ( ) POSITIVO ( ) NEGATIVO	**SOROLOGIA (IgG) CORONAVÍRUS** ( ) POSITIVO ( ) NEGATIVO
RT-PCR (DATA DA REALIZAÇÃO): / /	**RT-PCR** ( ) POSITIVO ( ) NEGATIVO
Tomou algum medicamento dutrante 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)