



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

MARIANO FELISBERTO

**AVALIAÇÃO DO COMPARTIMENTO DE LINFÓCITOS B, EM
SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES NÃO VACINADOS
INFECTADOS PELO SARS-COV-2**

FLORIANÓPOLIS

2024

Mariano Felisberto

**AVALIAÇÃO DO COMPARTIMENTO DE LINFÓCITOS B, EM
SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES NÃO VACINADOS
INFECTADOS PELO SARS-COV-2**

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo M. Dalmarco

Florianópolis

2024

Felisberto, Mariano

AValiação DO COMPARTIMENTO DE LINfÓCITOS B, EM SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES NÃO VACINADOS INFECTADOS PELO SARS-COV-2 / Mariano Felisberto ; orientador, Eduardo Monguilhott Dalmarco, 2024.

82 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. SARS CoV-2. 3. Linfócitos B. 4. Citometria de fluxo. 5. COVID-19. I. Dalmarco, Eduardo Monguilhott. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Mariano Felisberto

**AVALIAÇÃO DO COMPARTIMENTO DE LINFÓCITOS B, EM SANGUE PERIFÉRICO
DE PACIENTES NÃO VACINADOS INFECTADOS PELO SARS-COV-2**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado, em 27 de março de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Fabiola Branco Filippin Monteiro, Dr.^a

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Carlos R. Zárate-Bladés, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Isabel Daufenback Machado, Dr.^a

Universidade Regional de Blumenau

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Farmácia.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Eduardo M. Dalmarco, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2024.

RESUMO

A COVID-19, doença causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, se espalhou globalmente após o primeiro caso ser reportado em Wuhan, China, em dezembro de 2019. Esta doença varia em gravidade podendo levar à morte. Estudos indicam que a resposta imunológica desempenha um papel fundamental na evolução da doença. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar o compartimento de células B, a presença de anticorpos contra o SARS-CoV-2, bem como a presença de RNA viral no sangue periférico de pacientes com COVID-19, em diferentes estágios clínicos da doença. Este estudo, observacional longitudinal, incluiu 133 pacientes com COVID-19 não vacinados contra o SARS-CoV-2. Os componentes celulares do compartimento de células B foram avaliados por citometria de fluxo e a presença de anticorpos específicos foi analisada através do ensaio imunoenzimático indireto. Já a presença de RNA viral no plasma dos pacientes foi verificada através da técnica de RT-qPCR, utilizando como alvo os genes ORF1a/b e N. Os resultados obtidos demonstraram que as células B de memória que não trocaram de classe (NS-MBC) e as células B de memória que trocaram de classe (CS-MBC) apresentaram contagem relativa reduzida em pacientes com doença moderada. Além disso, os plasmablastos e as células B de memória duplo-negativas (DN) apresentaram contagem aumentada em pacientes com condições clínicas moderadas a críticas. O aumento na contagem de células B DN também mostrou relação com um pior desfecho da doença (morte). Por outro lado, observamos que um aumento no número de CS-MBC indicava maiores chances de sobrevivência. Além disso, a pesquisa por anticorpos IgM, IgG e neutralizantes contra SARS-CoV-2 demonstrou uma correlação positiva com a gravidade da doença. Com relação a presença de RNA viral no plasma, os pacientes com quadro clínico crítico apresentavam um resultado positivo com maior frequência. Sendo assim, este estudo mostrou que a presença de anticorpos específicos contra o SARS-CoV-2 e a presença de RNA viral no plasma está relacionada com o desenvolvimento de quadros clínicos mais graves da COVID-19. Este estudo mostrou também que alterações nas contagens de subpopulações de linfócitos B tiveram relação com o desenvolvimento de sintomas mais graves da doença. Com os linfócitos B DN apresentando relação com um pior desfecho (morte) e as CS-MBC apresentando relação com um desfecho favorável (sobrevivência).

Palavras-chave: SARS CoV-2; COVID-19; Resposta imune; Linfócitos B; citometria de fluxo.

ABSTRACT

COVID-19, the disease caused by the coronavirus SARS-CoV-2, spread globally after the first case was reported in Wuhan, China, in December 2019. This disease varies in severity and can lead to death. Studies indicate that the immune response plays a fundamental role in the evolution of the disease. In this context, the present study aimed to analyze the B cell compartment, the presence of antibodies against SARS-CoV-2, as well as the presence of viral RNA in the peripheral blood of patients with COVID-19, at different clinical stages of the disease. illness. This longitudinal observational study included 133 patients with COVID-19 who were not vaccinated against SARS-CoV-2. The cellular components of the B cell compartment were evaluated by flow cytometry and the presence of specific antibodies was analyzed using indirect enzyme immunoassay. The presence of viral RNA in the patients' plasma was verified using the RT-qPCR technique, using the ORF1a/b and N genes as targets. The results obtained demonstrated that memory B cells that did not change class (NS-MBC) and class-switched memory B cells (CS-MBC) showed reduced relative counts in patients with moderate disease. Furthermore, plasmablasts and double-negative (DN) memory B cells showed increased counts in patients with moderate to critical clinical conditions. The increase in DN B cell count also showed a relationship with a worse outcome of the disease (death). On the other hand, we observed that an increase in the number of CS-MBC indicated greater chances of survival. Furthermore, the search for IgM, IgG and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 demonstrated a positive correlation with the severity of the disease. Regarding the presence of viral RNA in plasma, patients with a critical clinical condition presented a positive result more frequently. Therefore, this study showed that the presence of specific antibodies against SARS-CoV-2 and the presence of viral RNA in plasma are related to the development of more severe clinical conditions of COVID-19. This study also showed that changes in the counts of B lymphocyte subpopulations were related to the development of more severe symptoms of the disease. With DN B lymphocytes showing a relationship with a worse outcome (death) and CS-MBC showing a relationship with a favorable outcome (survival).

Keywords: SARS CoV-2; COVID-19; Immune response; B lymphocytes; Flow cytometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura viral e genômica do SARS-CoV-2	20
Figura 2. Internalização do SARS-CoV-2 na célula hospedeira	25
Figura 3. Maturação das células B	30
Figura 4. Estratégia de <i>gating</i> das células B	35
Figura 5. Alterações no compartimento de células B no sangue periférico de pacientes com COVID-19	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Extratificação da COVID-19 pela Organização Mundial da Saúde	24
Quadro 2. Informações técnicas dos marcadores utilizados no tubo de reação	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos pacientes com COVID-19	39
Tabela 2. Presença de RNA viral no plasma dos pacientes com COVID-19	40
Tabela 3. Alterações no compartimento de células B no sangue periférico de pacientes com COVID-19	41
Tabela 4. Avaliação da presença de anticorpos IgM, IgG e neutralizantes contra o SARS-CoV-2 em pacientes com COVID-19	43
Tabela 5 Alterações no compartimento de células B e mortalidade	44
Tabela 6. Alterações no compartimento de células B e o desfecho da COVID-19	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2019-nCoV	Novo Coronavírus de 2019
APCs	Células apresentadoras de antígenos (sigla traduzida do inglês, <i>Antigen Presenting Cells</i>)
APCH7	Alofococianina
BCR	Receptor da célula B (sigla traduzida do inglês, <i>B cell receptor</i>)
CD	Cluster de designação
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças (sigla traduzida do inglês, <i>Center for Disease Control and Prevention</i>)
CG	Centro Germinativo
CEPSH/UFSC	Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina
COVID-19	Doença causada pelo Coronavírus de 2019
CS	Classe trocada
DO	Densidade óptica
ds	Fita dupla (sigla traduzida do inglês, <i>double-strand</i>)
E	Envelope
EDTA/K3	Ácido Etilenodiaminotetracético Potássico (sigla traduzida do inglês, <i>Potassium Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
ECA2	Enzima Conversora da Angiotensina 2
ELISA	Imunoensaio enzimático (sigla traduzida do inglês, <i>enzyme-linked immunorbent assay</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FCS	Sítio de clivagem da Furina (sigla traduzida do inglês, <i>Furin Clivage Site</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FP	Peptídeo de fusão (sigla traduzida do inglês, <i>Fusion Peptide</i>)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (sigla traduzida do inglês, <i>Human immunodeficiency virus</i>)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IC	Intervalo de confiança
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF	Interferon
Kb	Kilobase

LB Linfócitos B
LT Linfócitos T
M Membrana
MBC Células B de memória
MERS-CoV Coronavírus causador da Síndrome Respiratória do Oriente Médio
n número
N Nucleocapsídeo
NK Matadoras naturais (sigla traduzida do inglês, *Natural Killers*)
nm Nanômetros
NS não trocada (sigla traduzida do inglês, *Non Switched*)
nsp Proteínas não estruturais (sigla traduzida do inglês, *Non Structural Proteins*)
OMS Organização Mundial da Saúde
OR Odds ratio
ORF Sequência aberta de leitura (sigla do inglês, *Open Reading Frame*)
PacB Azul pacífico/V450
PAMP Padrões moleculares associados à patógenos (sigla traduzida do inglês, *Pathogen-associated Molecular Patterns*)
Pangolin Atribuição Filogenética de Linhagens de Surto Global Nomeadas (sigla traduzida do inglês, *Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages*)
PBMC Células mononucleares do sangue periférico (sigla traduzida do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*)
PCR Reação em Cadeia da Polimerase (sigla traduzida do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)
PE Ficoeritrina
PerCP Cy5-5 Proteína clorofila peridina
PPR Receptores de reconhecimento de padrão (sigla traduzida do inglês, *Pattern Recognition Receptors*)
RBD Domínio de ligação do receptor (sigla traduzida do inglês, *Receptor-binding Domain*)
Rm *Rhinolophus malayanus*
RNA Ácido ribonucléico (sigla traduzida do inglês, *ribonucleic acid*)
RT Transcrição reversa (sigla traduzida do inglês, *Reverse Transcriptase*)
S *Spike*
SARS-CoV Coronavírus causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV-2 Coronavírus causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

SRAG Síndrome Respiratória Aguda Grave

Th T auxiliares (sigla traduzida do inglês, *T helper*)

TLR Receptores do tipo Toll (sigla traduzida do inglês, *Toll-like Receptors*)

TMPRSS2 Protease transmembrana da serina 2 (sigla traduzida do inglês, *Transmembrane Protease, Serine 2*)

TNF Fator de Necrose Tumoral (sigla traduzida do inglês, *Tumoral Necrose Factor*)

VoC Variantes de preocupação (sigla traduzida do inglês, *Variants of Concern*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 EMERGÊNCIA SANITÁRIA DO SÉCULO	18
3.2 CORONAVÍRUS	19
3.3 SARS-COV-2	20
3.4 TRANSMISSÃO E APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA COVID-19	22
3.5 PATOGENIA DO SARS-COV-2	24
3.6 RESPOSTA IMUNE AO SARS-COV-2	27
3.7 LINFÓCITOS B	28
3.8 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA COVID-19	31
4. METODOLOGIA	32
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	32
4.2 SELEÇÃO DOS PACIENTES E GRUPO CONTROLE	32
4.3 ANÁLISE MULTIPARAMÉTRICA DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE	33
4.4 DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE ANTICORPOS ANTI-SARS-COV-2 IGM E IGG	36
4.5 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE ANTICORPOS ANTI-SARS-COV-2 NEUTRALIZANTE	37
4.6 REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR)	37
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5. RESULTADOS	38
5.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES	38
5.2 PESQUISA DE RNA VIRAL NO PLASMA	39
5.3 ANÁLISE DO COMPARTIMENTO DE CÉLULAS B	40
5.4 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTICORPOS	43

5.5 ASSOCIAÇÃO MORTALIDADE E ALTERAÇÕES NO COMPARTIMENTO DE CÉLULAS B	44
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	50
8. LIMITAÇÕES	50
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	61
APÊNDICE B – PROTOCOLO DE SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES (PBMC)	66
APÊNDICE C – PROTOCOLO DE MARCAÇÃO DE SUPERFÍCIE	67
APÊNDICE D – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL DO PLASMA	68
APÊNDICE E – PROTOCOLO DE RT-PCR	70
APÊNDICE F - ARTIGO DA TESE PUBLICADO	74
APÊNDICE G - PARTICIPAÇÕES EM ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORAMENTO	76

1 INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, foi reportado em Wuham (China) o primeiro caso de infecção pelo coronavírus SARS-CoV-2, hoje conhecido como o agente etiológico da COVID-19. O SARS-CoV-2 se mostrou altamente virulento e rapidamente se espalhou pelo mundo. Com isso, em 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o início da pandemia de COVID-19 (WHO, 2021). Desde então, mais de 750 milhões de casos foram confirmados em todo o mundo, causando mais de 6,9 milhões de mortes (WHO, 2023). No Brasil, foram registrados, até o início do primeiro semestre de 2024, cerca de 38 milhões de casos e mais de 710 mil óbitos pela doença. O Estado de Santa Catarina, no mesmo período, contabilizou mais de 2 milhões de casos e 23 mil óbitos (Brasil, 2024).

O SARS-CoV-2 é capaz de causar uma síndrome respiratória de gravidade variável, onde os pacientes infectados podem se apresentar assintomáticos ou até mesmo com sintomas mais graves. Entre os sintomas mais comuns podemos citar febre, tosse, falta de ar, anosmia e ageusia. Por outro lado, alguns pacientes podem desenvolver quadros mais graves como, pneumonia, síndrome respiratória aguda grave, danos ao fígado, danos ao coração, trombose, acidente vascular cerebral, doença renal, doença neurológica e sepse (Merad *et al.*, 2022). Há indícios de que variações na resposta imune de cada indivíduo infectado pode estar relacionada à gravidade da doença, bem como a resistência ao seu desenvolvimento (Shi *et al.*, 2020).

Um esforço científico sem precedentes tem sido feito para caracterizar a resposta imunológica à infecção pelo SARS-CoV-2, buscando elucidar padrões que serão fundamentais para desenvolver e melhorar as estratégias de prevenção e tratamento da COVID-19 (Shrotri *et al.*, 2021). Atualmente já se sabe que a infecção pelo SARS-CoV-2 é capaz de ativar tanto a resposta imune inata quanto a resposta adaptativa. Em suma, após um indivíduo ser infectado pelo SARS-CoV-2, células apresentadoras de antígenos, que tiveram contato com o vírus, ativam linfócitos T (LT) que, por sua vez, estimulam os linfócitos B (LB) a produzirem anticorpos contra o vírus (Li *et al.*, 2020). Estudos recentes atribuíram a gravidade da COVID-19 a um problema na resposta imune do hospedeiro, onde casos graves mostraram uma resposta desregulada caracterizada por um estado hiper inflamatório e alterações nas contagens de subpopulações de leucócitos (Cervantes-Díaz *et al.*, 2022; Kalinina *et al.*, 2022; Mulchandani

et al., 2021). Além disso, evidências apontam que a ativação descontrolada da resposta imune inata e o excesso de resposta inflamatória, podem comprometer a resposta adaptativa, atrasando a produção e maturação de anticorpos específicos. Essa demora no desenvolvimento de resposta específica ao vírus, aumenta a chance de o hospedeiro desenvolver formas graves da doença. Ao contrário dos pacientes que apresentam sintomas leves da doença, os pacientes graves, costumam apresentar linfopenia, com redução do número de LT, LB e células natural killers (NK) (Huang *et al.*, 2020; Qin *et al.*, 2020; Tan *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020), bem como redução na população de monócitos, eosinófilos e basófilos (Qin *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

Tendo em vista a necessidade de elucidar o envolvimento do compartimento de células B e o prognóstico clínico na infecção por SARS-CoV-2, este trabalho teve como objetivo avaliar os subconjuntos de células B no sangue total de pacientes diagnosticados com COVID-19. Também foi avaliada a presença de anticorpos específicos contra o SARS-CoV-2, bem como a presença de RNA viral, em indivíduos em diferentes estágios clínicos da doença. Com a condução do presente estudo, foi possível identificar marcadores laboratoriais de prognóstico da doença, especialmente na população brasileira. A partir dos resultados obtidos, foi possível fornecer informações importantes para que as intervenções clínicas, na condução de casos de COVID-19, possam ser mais efetivas e individualizadas, evitando assim um desfecho desfavorável nos casos mais graves de COVID-19.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar, por meio de um estudo longitudinal, a relação entre o quadro clínico dos pacientes com COVID-19 e a presença de anticorpos contra o SARS-CoV-2, de RNA viral no plasma e as possíveis alterações no compartimento de células B no sangue periférico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar nos indivíduos infectados por SARS-CoV-2, os seguintes parâmetros:

- A presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgM, IgG e neutralizantes;
- A presença de RNA viral no plasma;
- As frequências absolutas e relativas de linfócitos B, e suas subpopulações, circulantes em sangue periférico;
- Verificar se existiu associação entre as características dos pacientes e a apresentação clínica da COVID-19 no momento da internação;
- Verificar se existe relação entre cada uma das análises laboratoriais com a apresentação clínica da COVID-19 no momento da internação;
- Verificar se existe relação entre os achados laboratoriais e o desfecho clínico dos pacientes incluídos no estudo.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 EMERGÊNCIA SANITÁRIA DO SÉCULO

No final de dezembro de 2019, foram reportados um número elevado de casos de pneumonia de origem desconhecida que foram epidemiologicamente relacionados à um mercado de Wuhan, Província de Hubei, China. Em 31 de dezembro de 2019, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças da China (China CDC, Sigla do inglês que quer dizer *Chinese Center for Disease Control and Prevention*) enviou uma equipe para acompanhar as autoridades locais e para conduzir uma investigação epidemiológica e etiológica. Após a coleta de amostras de lavado broncoalveolar de pacientes infectados, o agente etiológico foi identificado e se tratava de um vírus do gênero betacoronavírus que foi inicialmente denominado 2019-nCoV (sigla do inglês que quer dizer, Novo coronavírus de 2019) (Zhu *et al.*, 2020).

O número de casos de pessoas infectadas por este novo agente infeccioso aumentaram rapidamente, mostrando que sua transmissão entre humanos era muito eficiente. Em 23 janeiro de 2020 a China adotou medidas restritivas para evitar a disseminação do vírus (Koelle *et al.*, 2022). Porém, essas medidas não foram suficientes para evitar que este novo vírus se espalhasse por outros países, mostrando que seu controle seria um desafio para as autoridades sanitárias do mundo todo, com isso, em 31 de janeiro de 2020, a OMS declarou emergência global (Dhama *et al.*, 2020). Em 11 de fevereiro de 2020 a OMS anunciou que a denominação oficial da doença causada por este novo coronavírus seria COVID-19 e ainda no mês de fevereiro o 2019-nCoV recebeu um novo nome, passando a se chamar SARS-CoV-2. No final de fevereiro de 2020, o SARS-CoV-2 já havia se espalhado também por outras regiões do mundo (Koelle *et al.*, 2022). Com isso, apenas 3 meses após a identificação do primeiro caso, em 11 de março de 2020 a OMS declarou pandemia de COVID-19 (Dhama *et al.*, 2020). Vale ressaltar, que a habilidade de controlar um patógeno emergente depende da capacidade de isolar os indivíduos infectados. Porém, isto depende da proporção de casos assintomáticos, ou com sintomas leves, e o seu potencial de transmissão. Além disso, a capacidade de transmissão antes do início dos sintomas também influencia no controle da disseminação.

A pandemia de COVID-19 se tornou a mais crítica emergência sanitária deste século e o maior desafio para a humanidade desde a segunda guerra mundial. Até abril de 2020, 1.5 milhão de casos foram confirmados em mais de 184 países, com mais de 92 mil mortes em todo

o mundo (El-Shabasy *et al.*, 2022). No Brasil, já foram registrados cerca de 38 milhões de casos e mais de 710 mil óbitos pela doença, e o estado de Santa Catarina contabilizou mais de 2 milhões de casos e 23 mil óbitos (Brasil, 2024).

3.2 CORONAVÍRUS

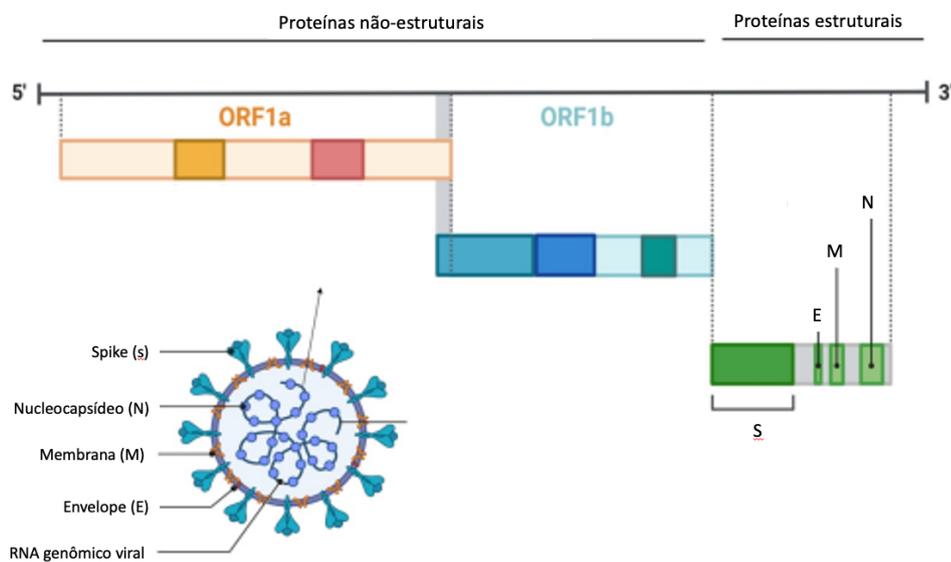
Os coronavírus podem causar infecções intestinais e respiratórias em uma ampla variedade de aves e mamíferos, incluindo animais de rebanho, animais domésticos e humanos. Por isso, os coronavírus representam um desafio para saúde pública, para a saúde veterinária e para a economia. Os coronavírus (CoVs) são vírus RNA de fita simples envelopados, com genoma de 26-32Kb, que pertencem à família dos *Coronaviridae* e podem ser divididos em 4 subgêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*. Sendo que, os *Alphacoronavirus* e os *Betacoronavirus* infectam exclusivamente mamíferos (Baggen *et al.*, 2021; V’Kovski *et al.*, 2021).

No início deste século, mais precisamente em 2002, tivemos o aparecimento de um *Betacoronavirus* capaz de infectar humanos e causar sintomas respiratórios graves, o SARS-CoV (sigla do inglês que significa coronavírus da síndrome respiratória aguda grave). Pouco tempo depois, em 2012, outro *Betacoronavirus* capaz de infectar humanos surgiu e ficou conhecido como MERS-CoV (sigla do inglês que significa coronavírus da síndrome respiratória do oriente médio). Com isso, ficou evidente que um novo desafio para a saúde pública do século XXI estava lançado já que novos coronavírus patogênicos poderiam aparecer em humanos (Baggen *et al.*, 2021; V’Kovski *et al.*, 2021). Prova disso é que em 2019 outro coronavírus, patogênico e capaz de infectar humanos, foi detectado em Wuhan, China, e causou um surto de pneumonia viral incomum. Este novo coronavírus compartilhava cerca 79% da sua sequência genômica com o SARS-CoV e 50% com o MERS-CoV e ficou conhecido como SARS-CoV-2. Este novo coronavírus parece ter sido originado em morcegos e provavelmente foi transmitido para o ser humano através de algum hospedeiro intermediário ainda não identificado. Por se tratar de um vírus altamente contagioso e que pode ser transmitido por pessoas assintomáticas, o SARS-CoV-2 se espalhou rapidamente pelo mundo todo, ceifando vidas humanas e obstruindo a atividade social e econômica (Baggen *et al.*, 2021; V’Kovski *et al.*, 2021).

3.3 SARS-COV-2

O vírion do SARS-CoV-2 é envelopado e pleomorfo com um diâmetro de aproximadamente 60-100nm. Seu genoma viral contém cerca de 30Kb de RNA fita-simples, com sentido positivo. O genoma viral do SARS-CoV-2 é compartilhado com outros betacoronavírus e contém seis sequências abertas de leitura (ORFs, sigla do inglês que quer dizer *open reading frame*) que codificam proteínas funcionais. Estas sequencias estão organizadas da seguinte forma, do 5' para 3': replicase (ORF1a/ORF1b), spike (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N) (Figura 1). Além disso, os coronavírus contêm múltiplos ORFs, intercalados entre os genes estruturais, que codificam pelo menos 16 proteínas não estruturais (nsp1–16) e um conjunto de proteínas acessórias putativas (ORF3a , ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 e ORF9b). Embora as proteínas acessórias do coronavírus não sejam essenciais para a replicação *in vitro*, acredita-se que essas proteínas sejam necessárias para a virulência *in vivo* (Baggen *et al.*, 2021).

Figura 1. Estrutura viral e genômica do SARS-CoV-2



O genoma viral do SARS-CoV-2 contém seis sequências abertas de leitura (ORFs, sigla do inglês que quer dizer *open reading frame*) que codificam as proteínas não estruturais ORF1a/ORF1b e as proteínas estruturais spike (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N). Estas proteínas estruturais dão forma à partícula viral, conforme representação esquemática da estrutura viral. Fonte: adaptado de Muhammad *et al.* (2021).

A maioria das proteínas codificadas pelo SARS-CoV-2 possuem tamanho similar as proteínas correspondentes no SARS-CoV, sendo que suas proteínas estruturais possuem mais de 90% de similaridade. A exceção fica por conta da proteína S, que é mais longa no SARS-CoV-2 e seu sítio de ligação ao receptor (RBD, sigla do inglês que quer dizer *receptor-binding domain*) possui apenas 73% de similaridade com os aminoácidos do SARS-CoV. Outra especificidade genômica do SARS-CoV-2 é a inserção de 4 resíduos de aminoácidos na junção entre as subunidades S1 e S2 da proteína S. Essa inserção é responsável por gerar um sítio de clivagem desta proteína, conhecido como sítio de clivagem da furina (FCS, sigla do inglês quer dizer *Furin cleavage site*) que habilita a furina, bem como outras proteases, a clivar efetivamente a proteína S. Esta característica não é compartilhada com outros vírus relacionados, exceto pelo RmYN02, que é um coronavírus que foi identificado recentemente em morcegos *Rhinolophus malayanus*, na China. Apesar do RmYN02 possuir essa característica genômica, seu site de clivagem não é funcional, indicando que esta característica do SARS-CoV-2 foi adquirida naturalmente (Hu *et al.*, 2021; Carbelli *et al.*, 2023).

O SARS-CoV-2 tem a capacidade de desenvolver mutações facilmente, possibilitando o aparecimento de diversas variantes deste vírus. O desenvolvimento de mutações pode ser considerado um processo normal durante a replicação viral e é mais frequente em vírus de genoma RNA. Estas mutações normalmente não fornecem vantagens ou desvantagens ao vírus, sendo consideradas neutras, porém, uma pequena parte pode fornecer novas propriedades que influenciam no comportamento do vírus durante a infecção (Grubaugh *et al.*, 2020). Estas novas propriedades que mutações fornecem ao vírus podem causar alterações na transmissão, infectividade e gravidade da doença, sendo que, nestes casos são consideradas mutações de preocupação (VoC, sigla do inglês que quer dizer *variants of concern*) (WHO, 2022). Após a identificação da primeira infecção em humanos pelo SARS-CoV-2, nos primeiros oito meses parecia que sua capacidade de evoluir era limitada. O motivo desta limitação inicial estava parcialmente relacionado a baixa população viral naquele momento, enquanto sua transmissão ainda não era generalizada, mas também pode ser devida à uma baixa testagem dos casos suspeitos (Markov *et al.*, 2023).

Porém, em dezembro de 2020, uma nova variante do SARS-CoV-2 foi identificada no Reino Unido e carregava mutações na região da proteína S. Esta linhagem foi denominada pela

Organização Mundial da Saúde (OMS) como VoC *Alpha* e pelo Pangolin (sigla do inglês que quer dizer *Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages*) como B.1.1.7. Após poucas semanas outras VoCs foram identificadas na África do Sul e Brasil, denominadas de VoC *Beta* (Pangolin B.1.351) e VoC *Gamma* (Pangolin P.1) respectivamente. Estas VoC se espalharam rapidamente, pois apresentavam maior capacidade de transmissão e de escapar do sistema imune do hospedeiro. Em maio de 2021, foi identificada a VoC *Delta* (Pangolin B.1.617.2) na Índia, que rapidamente superou as outras VoC's e levou à uma alta no número de casos de infecção pelo SARS-CoV-2 no mundo. Uma nova onda de infecção teve início em novembro de 2021, quando foi identificada a VoC *Ômicron* (Pangolin BA.1-BA.5) na África do Sul e Botsuwana. Cada uma destas novas VoC's apresentou vantagens significativas, para a disseminação do SARS-CoV-2, em relação a variantes que às precederam (Markov *et al.*, 2023).

3.4 TRANSMISSÃO E APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA COVID-19

A capacidade de transmissão do SARS-CoV-2 é muito alta e pode ser atribuída às características únicas deste vírus. O fato de pacientes assintomáticos ou pré-sintomáticos transmitirem a doença pode ser considerado o principal diferencial do SARS-CoV-2 para propagação em larga escala. Esta capacidade se deve ao fato de pacientes assintomáticos apresentarem uma carga viral muito semelhante à de pacientes sintomáticos, com isso seu potencial de transmissão parece ser o mesmo (Lippi & Henry, 2023).

O SARS-CoV-2 é transmitido principalmente pela via respiratória, através de aerossóis ou gotículas que podem ser expiradas durante a fala, tosse ou espirro de pacientes infectados. A transmissão destas partículas virais em humanos pode ser direta, através da respiração, ou indireta, ao tocar em superfícies contaminadas. Estas partículas virais podem permanecer no ar por até 3 horas aumentando as chances de infecção pelo vírus. Porém, a concentração de partículas virais nestas gotículas respiratórias ou aerossóis é inversamente proporcional a distância que ela pode percorrer desde o paciente infectado. Com isso, a transmissão ocorre principalmente através de aerossóis de curto alcance. Outras vias de transmissão também foram relatadas, entre elas podemos destacar a via fecal-oral, e através do contato com outros fluidos corporais como urina, lágrimas e leite materno. Porém, por possuírem uma baixa carga viral, a transmissão através destes outros fluidos corporais não

respiratórios é menos provável. Além disso, a transmissão vertical do SARS-CoV-2 pode ocorrer, porém, é muito raro a transmissão para o feto através da placenta ou para o bebê durante o parto (Hu *et al.*, 2021; To *et al.*, 2021; Ochani *et al.*, 2021).

A COVID-19 pode acometer pacientes de todas as idades, porém suas manifestações clínicas costumam ser diferentes de acordo com a idade. Em geral, homens com mais de 60 anos de idade, com comorbidades, tem maiores chances de desenvolver formas mais graves da doença, enquanto pacientes jovens e crianças costumam desenvolver formas mais leves. Porém, pacientes jovens também podem desenvolver formas graves da doença e até mesmo serem hospitalizados, mas com frequência menor (Hu *et al.*, 2021; Ochani *et al.*, 2021). A COVID-19 é uma doença primariamente respiratória e pode se manifestar como uma síndrome respiratória de gravidade variável, sendo que muitos pacientes são assintomáticos. O início dos sintomas costuma ser gradual e inclui febre, fadiga, mialgia, artralgia, rinorreia, dor de garganta e até mesmo conjuntivite. Porém, estes sintomas podem evoluir para uma febre persistente, tosse, hipóxia silenciosa, desconforto ou dor no peito, insuficiência respiratória e falência múltipla de órgãos. Além disso, também podem ocorrer sintomas extrapulmonares como, diarreia, linfopenia, trombocitopenia, rabdomiólise, tontura, síndrome de Guillain-Barré, arritmia cardíaca, pancreatite, *rash* cutâneo, e tromboembolismo (Merad *et al.*, 2022). Um estudo feito na China, com 72.314 pacientes, demonstrou que 81% dos pacientes diagnosticados com COVID-19 desenvolveram sintomas leves a moderados da doença, 14% sintomas graves e 5% foram considerados críticos e necessitavam de cuidados intensivos (Wu *et al.*, 2020).

A COVID-19 possui um amplo espectro clínico com diferentes apresentações da doença e variação na gravidade dos sintomas. Por isso, a OMS definiu critérios para padronizar a estratificação da doença de acordo com o quadro clínico dos pacientes (Quadro 1). Os pacientes com sintomas leves, semelhantes à quadros gripais e sem a presença de pneumonia, fazem parte do quadro leve da doença. Enquanto pacientes que apresentam doença pulmonar e pneumonia, mas com saturação de oxigênio acima de 90%, são considerados do quadro moderado da doença. Um paciente é considerado em estado grave da doença quando apresenta sinais de resposta inflamatória mais intensa, com sinais de pneumonia, frequência respiratória abaixo de 30 respirações por minuto, dificuldade para respirar e saturação de oxigênio menor que 90%. Já os pacientes incluídos no quadro crítico da doença, são aqueles que apresentam

sinais de hiperinflamação, bem como síndrome respiratória aguda grave (SRAG) e complicações trombóticas agudas, que podem levar a sepse e falência múltipla dos órgãos (WHO, 2021).

Quadro 1. Estratificação da COVID-19 pela Organização Mundial da Saúde

Leve	Moderada	Grave	Crítica
<ul style="list-style-type: none"> • Semelhantes a quadros gripais; • Sem pneumonia. 	<ul style="list-style-type: none"> • Doença pulmonar e pneumonia; • Saturação O₂ acima de 90%. 	<ul style="list-style-type: none"> • Resposta inflamatória intensa; • Pneumonia; • Fr. Respiratória abaixo de 30/min; • Saturação O₂ menor que 30%. 	<ul style="list-style-type: none"> • Hiperinflamação; • SRAG; • Complicações trombóticas; • Sepse; • Falência múltipla dos órgãos.

Fonte: adaptado de WHO, 202.

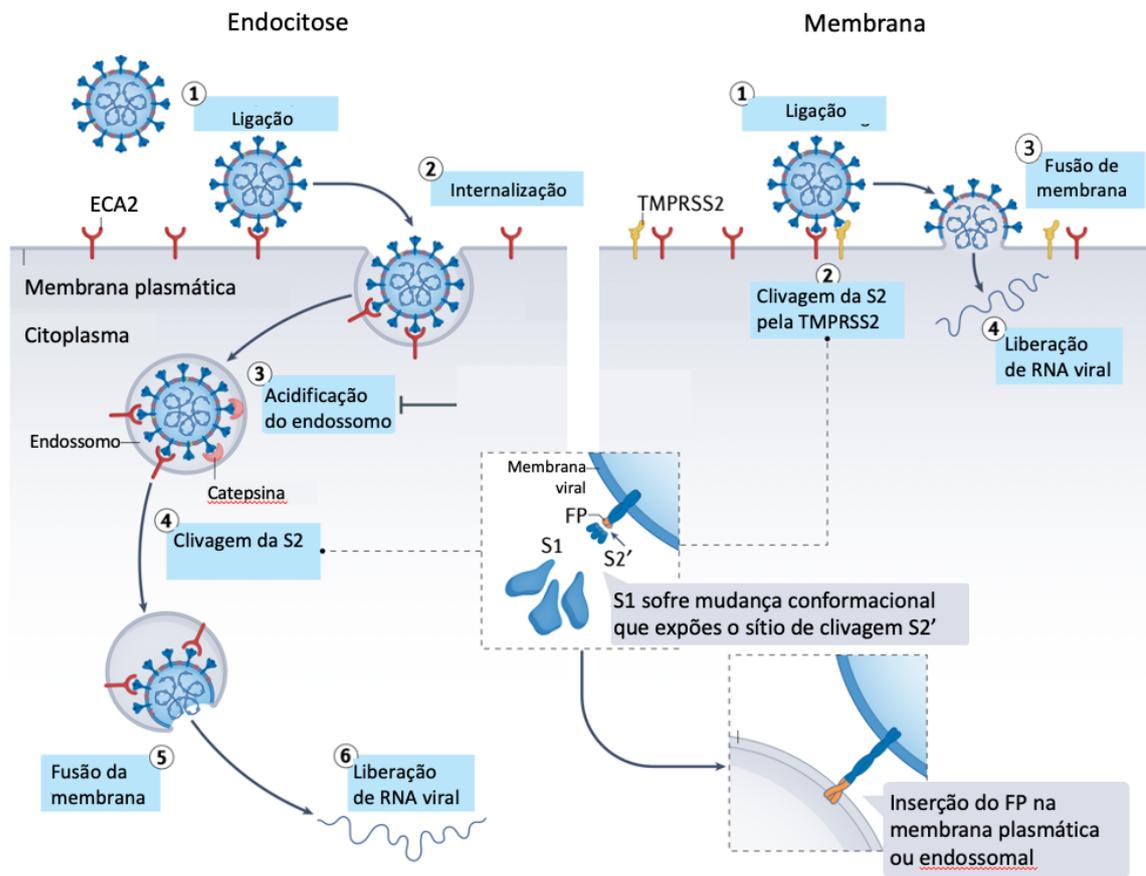
3.5 PATOGENIA DO SARS-COV-2

A entrada das partículas virais do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras é mediada pela proteína S, que está envolvida tanto na ligação do vírus a membrana celular bem como na sua fusão. A proteína S é uma glicoproteína montada como um trímero e possui múltiplas cópias na membrana do vírion, dando-lhe a aparência de coroa (que deu origem ao nome coronavírus). O principal fator que determina o tropismo deste vírus pelo hospedeiro é a proteína S, que por sua vez possui duas subunidades, a subunidade S1 e a subunidade S2. A subunidade S1 é responsável pela ligação da proteína S ao receptor de membrana ECA2 (enzima conversora de angiotensina 2), e a subunidade S2 é responsável por mediar a fusão do vírus com a membrana celular. O SARS-CoV-2 possui dois mecanismos de entrada na célula do hospedeiro. Quando a proteína S do vírus se liga ao receptor ECA2 na célula do hospedeiro, a subunidade S1 sofre uma mudança conformacional que expõe o sítio de clivagem S2' da subunidade S2, que pode ser clivado por diferentes proteínas, dependendo da rota de entrada. Quando a membrana celular apresenta a TMPRSS2 (sigla do inglês que significa *Transmembrane protease, serine 2*) a clivagem da subunidade S2 ocorre já nesta etapa de ligação com a membrana celular. Porém, quando a membrana celular não expressa TMPRSS2 suficiente ou quando o complexo vírus-

ECA2 não encontra TMPRSS2, o vírus ligado a membrana celular é internalizado via endocitose, formando endolisossomos, onde o sítio S2' é clivado por catepsinas.

As primeiras células que podem servir de alvo para as partículas virais do SARS-CoV-2, durante uma infecção natural em humanos, são as células multiciliadas da nasofaringe ou da traqueia e as células sustentaculares da mucosa nasal olfatória. Após o vírus entrar na célula hospedeira e iniciar a produção de suas proteínas estruturais e replicases, há a formação de sítios de replicação a partir das membranas do retículo endoplasmático. Nestes sítios de replicação a transcrição ocorre em vesículas de membrana dupla que protegem estes RNA dupla-fita (dsRNA, sigla do inglês que quer dizer *double-strand RNA*) de serem reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrão citoplasmático (PRRs, sigla do inglês que quer dizer *cytoplasmic pattern recognition receptors*). Após o reconhecimento das partículas virais, tem início uma cascata de sinalização que promove a transcrição de interferon do tipo I (IFN-I) e do tipo III (IFN-III). Interferons, bem como outras quemocinas, podem ser produzidos por células epiteliais adjacentes ou por células do sistema imune presentes no local da infecção (por exemplo neutrófilos e macrófagos) através do reconhecimento do SARS-CoV-2 por receptores do tipo *Toll-like* (TLRs, sigla do inglês que quer dizer *Toll-like receptors*), ou ainda por efeito parácrino de interferons produzidos localmente. Esta sinalização induz a produção de genes estimulados por interferons, com isso a célula entra em um estado antiviral, o que por sua vez interfere diretamente na resposta contra o vírus ou indiretamente através do recrutamento de células do sistema imune. Além disso, a produção de citocinas também promove o desenvolvimento de resposta imune adaptativa, através das células B e T, que ajudam a eliminar o vírus. Se o vírus não for eliminado pela resposta imune, ele pode se espalhar pelo trato respiratório inferior através da inalação de partículas virais originadas no trato respiratório superior ou por uma disseminação gradual ao longo da árvore traqueobrônquica. Outra possibilidade é que o sítio inicial da infecção seja o trato respiratório inferior, o que pode levar à uma infecção alveolar, causando inflamação e limitando a troca gasosa (Lamers *et al.*, 2022).

Figura 2. Internalização do SARS-CoV-2 na célula hospedeira



O SARS-CoV-2 possui dois mecanismos de entrada na célula do hospedeiro. Fusão direta com a membrana plasmática: a proteína S do vírus se liga ao receptor ECA2 na célula do hospedeiro, a subunidade S1 sofre uma mudança conformacional que expõe o sítio de clivagem S2' da subunidade S2, que é clivada pela TMPRSS2 (sigla do inglês que significa *Transmembrane protease, serine 2*). Via endocitose: o vírus ligado a membrana celular é internalizado via endocitose, formando endolisossomos com meio ácido, onde o sítio S2' é clivado por catepsinas. Em ambos os mecanismos, após a clivagem do sítio S2' o peptídeo de fusão (FP, sigla do inglês que quer dizer *Fusion peptide*) é exposto e as subunidades S1 e S2 são dissociadas gerando uma mudança conformacional na subunidade S2, que por sua vez insere o FP na membrana da célula hospedeira iniciando sua fusão. Após a fusão o RNA viral é exposto e tem início sua replicação, tradução, produção e liberação de novas partículas virais. Fonte: adaptado de Jackson *et al.* (2022).

3.6 RESPOSTA IMUNE AO SARS-COV-2

Após a infecção viral, o sistema imune inato reconhece o agente agressor através da interação entre o padrão molecular associado à patógenos (PAMP, sigla do inglês que quer dizer: *pathogen-associated molecular patterns*) do SARS-CoV-2 e os PRR's e os TLR's

(Mohammed *et al.*, 2022; Noor, 2022). Após este reconhecimento, tem início uma cascata de sinalização que resulta na produção de IFN-I e diversas citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-12 (IL-12). Essa resposta costuma ser rápida e contribui na eliminação do vírus através da fagocitose de partículas virais e da secreção de moléculas biologicamente ativas. As células que compõem essa primeira linha de defesa do hospedeiro são os monócitos/macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células natural *killer* e os mastócitos. Além disso, o sistema imune inato também atua de forma indireta na eliminação do vírus através da ativação de células do sistema imune adaptativo após a apresentação de antígenos (Abbas *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2020).

Uma resposta imune inata satisfatória é capaz de limitar o desenvolvimento viral nas células do hospedeiro, permitindo assim que o sistema imune adaptativo responda de forma rápida e efetiva, eliminando o vírus e criando uma memória para infecções futuras (Primorac *et al.*, 2022). O sistema imune adaptativo representa a segunda linha de defesa do hospedeiro frente a infecção pelo SARS-CoV-2 e é formada principalmente pelas células B, responsáveis pela produção de anticorpos, as células T CD4⁺, que tem funções de efectoras e de apoio a outras células, e as células T CD8⁺, que destroem as células infectadas (Sette & Crotty, 2021). A resposta imune humoral parece iniciar logo no início da infecção e para que uma memória imunológica seja formada, dois passos principais são necessários: primeiro ocorre uma exposição inicial ao patógeno que induz uma resposta antígeno-anticorpo específica de baixa afinidade; posteriormente ocorre a maturação das células T CD4⁺ e das células B nos tecidos linfoides secundários, onde os anticorpos específicos adquirem maior afinidade pelo antígeno e também trocam de classe de imunoglobulinas, gerando uma proteção duradoura (Shen *et al.*, 2023).

Apesar da interação entre o SARS-CoV-2 e o seu hospedeiro humano ter sido estudada desde a identificação deste vírus, as características moleculares da resposta imune, bem como as causas das diferentes apresentações clínicas da COVID-19 e as estratégias de evasão e exaustão do sistema imune que o vírus utiliza ainda não foram totalmente elucidadas. Estas interações entre o vírus e seu hospedeiro causam importantes diferenças nos sinais clínicos apresentados pelos pacientes infectados, onde alguns indivíduos permanecem assintomáticos

enquanto outros desenvolvem complicações graves da doença como pneumonia e síndromes respiratórias (Mohammed *et al.*, 2022).

3.7 LINFÓCITOS B

Entre os diversos tipos de leucócitos, que costumam estar em número menor que o normal na corrente sanguínea de pacientes com COVID-19, as células B merecem uma atenção especial, pois são responsáveis pela produção e maturação de anticorpos. Para entender melhor a relação destas células com a COVID-19, é necessário analisar também as subpopulações de células B nos pacientes infectados.

As células B podem circular no sangue periférico em diferentes estágios de maturação (Figura 3). Os estágios iniciais da maturação das células B ocorrem na medula óssea, porém, podemos encontrar pequenas quantidades de linfócitos B imaturos e transicionais na corrente sanguínea. Os linfócitos B transicionais representam um grupo de células que estão em transição entre os linfócitos B imaturos e *naive*, é neste estágio que estas células costumam migrar para o sangue periférico. Estas células em transição são funcionalmente imaturas e podem ser caracterizadas pela expressão de IgM, CD24 e CD38 (Salzer; Sack; Fuchs, 2019; Sims *et al.*, 2005). As células B transicionais rapidamente se diferenciam em células B *naive*, que também são um subtipo funcionalmente imaturo, que representam cerca de 60 a 70% das células B circulantes no sangue periférico. Estas células também podem migrar para folículos linfoides primários, linfonodos e baço. As células B *naive* podem ser identificadas pela expressão do receptor de células B (BCR, do inglês *B cell receptor*) formado por isotipos IgD e IgM (Cardoso *et al.*, 2021; Carsetti *et al.*, 2022).

Se as células B *naive* forem ativadas por um antígeno, tem início sua proliferação nos centros germinativos, onde continuam sua maturação, aumentando sua afinidade com o antígeno. O processo de maturação das células B pode ocorrer de forma independente de células apresentadoras de antígenos (APCs), após interagirem diretamente com antígenos na sua forma nativa, ou pode ocorrer via apresentação de antígeno por outras células nos órgãos linfoides (diferenciação T-dependente) (Bhattacharya, 2018; Carsetti *et al.*, 2022; Cooper, 2015; Perez-Andres *et al.*, 2010).

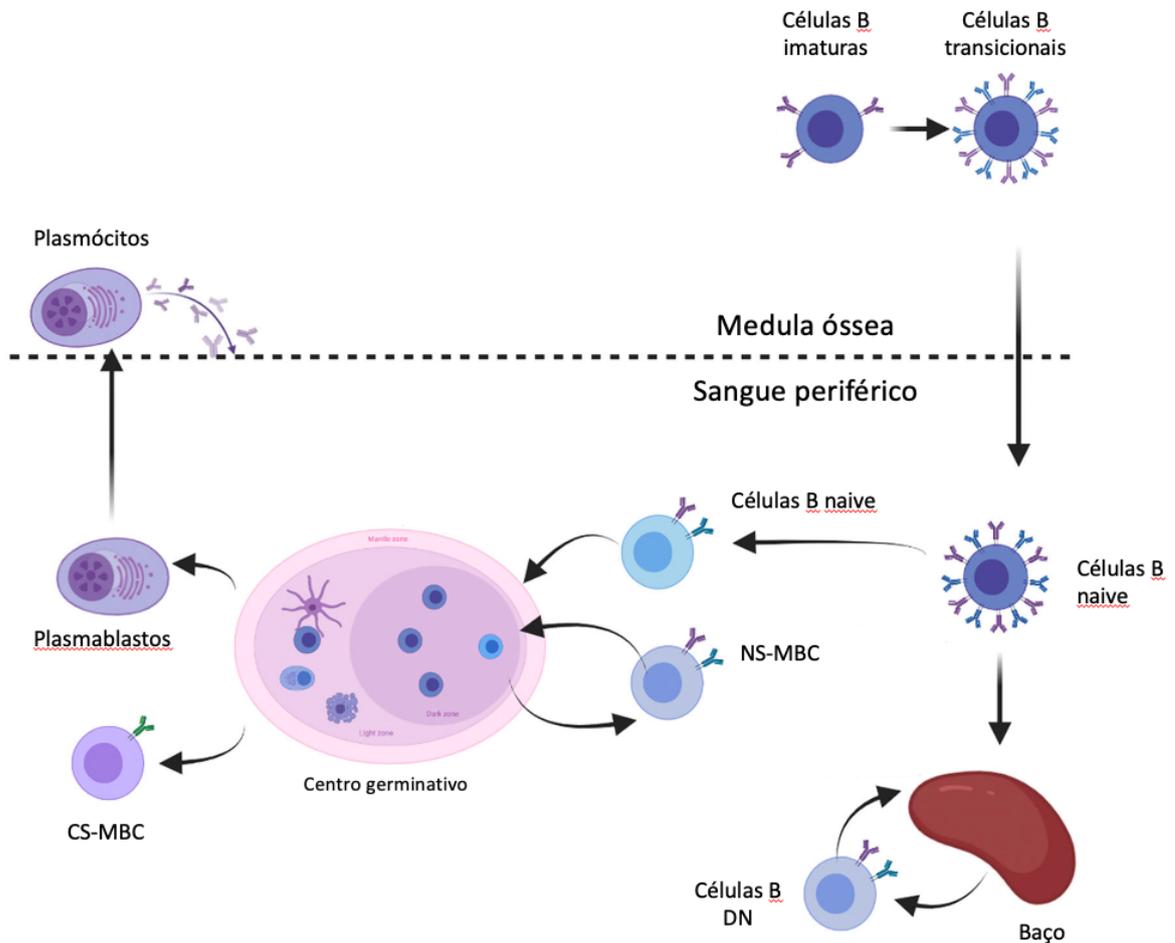
Após a entrada nos órgãos linfoides, os linfócitos B podem ser expostos a diferentes antígenos, seja através de APCs ou células T *helper* (Th), e assim continuam seu processo de

maturação no centro germinativo (CG). Na zona escura do CG, as células B iniciam os processos de expansão clonal, hipermutação somática e troca de classes de imunoglobulina. Como resultado deste fenômeno, o BCR destas células adquire uma alta afinidade com o antígeno de interesse. Após estas etapas, as células B migram para a zona clara do CG, onde ocorre a checagem da afinidade do BCR pelo antígeno, bem como a geração de células B de memória (MBC) e células plasmáticas. Estas células em estágio mais avançado de maturação podem circular pelo sangue periférico, residir em órgãos linfoides secundários ou migrar para a MO (Hong *et al.*, 2018; Perez-Andres *et al.*, 2010).

As células que, após o processo de maturação no centro germinativo, se tornaram MBC, podem ser divididas em MBC que não trocaram de classe (NS-MBC) e MBC que trocaram de classe de imunoglobulina (CS-MBC). As CS-MBC deixam de expressar IgD e IgM em sua membrana celular e passam a apresentar outras imunoglobulinas, como IgG, IgA e IgE. Já as NS-MBC seguem expressando IgD e IgM, ou somente IgM. Estas MBC representam cerca de 30% das células B circulantes no sangue periférico. A maior parte destas células, cerca de 96%, expressam CD27 em sua superfície, indicando um contato prévio com antígenos de maneira T-dependente. Porém, uma pequena parcela destas MBC, que deixaram de expressar IgD, não apresentam CD27 em sua superfície e por isso são denominadas células B duplo-negativas (DN). Estudos indicam que estas células B DN passam por um processo de maturação independente de células T, onde os antígenos são reconhecidos diretamente ou através do contato com proteínas do sistema complemento. Este processo de maturação extrafolicular pode ocorrer nos linfonodos e no baço (Abbas *et al.*, 2017; Cardoso *et al.*, 2021; Carsetti *et al.*, 2022).

Por fim, existem os plasmablastos, que pertencem ao último estágio da maturação dos linfócitos B no sangue periférico, e representam de 1 a 3% das células B circulantes. Essas células expressam em sua superfície CD38 e CD19, bem como uma expressão heterogênea de CD20. Ao retornar para a medula óssea, os plasmablastos se diferenciam em plasmócitos, que são células que já não apresentam mais capacidade de proliferação, porém, são capazes de secretar anticorpos com alta especificidade antigênica (Cardoso *et al.*, 2021; Carsetti *et al.*, 2022; Perez-Andres *et al.*, 2010).

Figura 3. Maturação das células B



O processo de maturação das células B inicia na medula óssea e após de diferenciar em células transitórias migram para o sangue periférico, onde se diferenciam células *naive*. Após ativação das células *naive*, pode ocorrer a maturação dessas células no centro germinativo, onde podem se diferenciar em NS-MBC (células B de memória que não trocaram de classe), CS-MB (células B de memória que trocaram de classe) e plasmablastos. Além disso, as células *naive* também podem sofrer um processo de maturação fora do centro germinativo (por exemplo, no baço) se diferenciando em células B DN (duplo negativas). No último estágio de maturação, os plasmablastos retornam para a medula óssea, onde se diferenciam em plasmócitos. Adaptado de Carseti *et al.* (2021).

3.8 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA COVID-19

Para controlar a disseminação de um agente infeccioso é preciso identificar os casos ativos da doença, para que os pacientes possam ser tratados, orientados a se isolar e evitar novas infecções. Para isso um diagnóstico rápido e preciso é essencial. No caso do SARS-CoV-2 a detecção do RNA viral através de testes moleculares, principalmente a reação da transcriptase

reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, sigla do inglês que dizer *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*), em amostras do trato respiratório, são considerados o padrão diagnóstico da COVID-19 pelo CDC e pela OMS (Ochani *et al.*, 2021). Além disso, também estão disponíveis testes suplementares para apoiar o diagnóstico da COVID-19, como testes de beira de leito, para detectar antígenos virais, bem como testes para detecção de anticorpos contra o SARS-CoV-2 (To *et al.*, 2021).

A detecção do RNA viral através de testes moleculares é feita através de kits comerciais ou desenvolvidos *in-house*. Os alvos moleculares destes testes incluem regiões do genoma viral que codificam proteínas estruturais como a proteína S, N e M, mas também alvos não estruturais como ORF1a/b (Hu *et al.*, 2021). A detecção molecular do RNA viral pode ser influenciada por muitos fatores, como tipo de amostra e progressão da doença. Para rastrear casos assintomáticos são utilizadas amostras do trato respiratório superior, obtidas através de *swabs* de nasofaringe e orofaringe, enquanto para pacientes sintomáticos, com tosse produtiva, as amostras são obtidas do trato respiratório inferior, através do escarro e lavado broncoalveolar. Além disso, também há relatos de testes que buscam o RNA viral em amostras alternativas, como saliva, urina, sangue total e autópsia (Ochani *et al.*, 2021).

Também podem ser utilizados para apoiar o diagnóstico clínico os testes para detecção de antígeno, principalmente o antígeno N que é expresso de maneira abundante no SARS-CoV-2. Sua detecção se dá através da captura do antígeno viral, presente em amostras clínicas, por anticorpos monoclonais, marcados com reveladores colorimétricos, fixados em uma coluna lateral de imunoensaio. Estes testes são de fácil execução e por isso podem ser realizados fora de ambientes de cuidados à saúde, porém, sua sensibilidade é menor que a dos testes moleculares (To *et al.*, 2021). Além da pesquisa por antígenos virais, também pode ser realizada a busca por anticorpos contra as proteínas S e N e por anticorpos neutralizantes contra o RBD, sigla do inglês que quer dizer *receptor bind domain*). Uma técnica rápida e segura para este tipo de pesquisa é o ensaio imunoenzimático (ELISA, sigla do inglês que quer dizer *enzyme-linked immunorbent assay*) utilizando soro de pacientes infectados ou suspeitos (Ochani *et al.*, 2021). O tempo médio para soroconversão dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 após o início dos sintomas é de 11 dias para anticorpos totais, 12 dias para imunoglobulinas da classe M (IgM) e 14 dias para imunoglobulinas da classe G (IgG). Os níveis de anticorpos IgM costumam

diminuir após 36 dias do início dos sintomas. Com relação aos anticorpos IgG e neutralizantes, o tempo médio de duração da positividade no soro de pacientes ainda é controverso (To *et al.*, 2021).

Devido a dificuldade de obtenção de amostras de qualidade para execução do RT-PCR, que aumentam significativamente o número de casos falso negativos, e da baixa sensibilidade dos ensaios imunológicos de apoio ao diagnóstico clínico da COVID-19, estes testes costumam ser utilizados em conjunto para melhor avaliar o quadro clínico do paciente infectado ou suspeito. Além destes testes, também é utilizado para apoiar o diagnóstico do paciente os exames de tomografia computadorizada ou raio-x de tórax, onde o resultado costuma mostrar um padrão de opacidade característico da COVID-19 (Hu *et al.*, 2021).

No Brasil, recomenda-se que pacientes suspeitos sejam submetidos à pesquisa de RNA viral, através da RT-PCR, e de antígenos virais, através de imunoenaios, utilizando amostra de *swab* de nasofaringe após três dias do início dos sintomas. Já os testes imunológicos para detecção de anticorpos contra antígenos virais devem ser realizados após o sétimo dia do início dos sintomas. Essas recomendações visam evitar resultados falso negativos para pesquisa de casos suspeitos de COVID-19 (Brasil, 2020).

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo observacional longitudinal.

4.2 SELEÇÃO DOS PACIENTES E GRUPO CONTROLE

Este estudo incluiu 133 pacientes com COVID-19, que não receberam nenhuma dose de vacina contra o SARS-CoV-2. Estes pacientes, que concordaram em participar deste estudo, foram atendidos entre agosto de 2020 a junho de 2021 no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina, que possui aproximadamente 200 leitos ativos, e no Hospital Nereu Ramos, que conta com cerca de 100 leitos, ambos em Florianópolis, Brasil. Os pacientes foram classificados de acordo com a gravidade da doença em leve, moderada, grave e crítica, de acordo com as diretrizes divulgadas pela Organização

Mundial da Saúde (WHO, 2021). Todos os participantes do estudo tiveram diagnóstico de COVID-19 confirmado por RT-PCR ou teste de antígeno e a amostra utilizada neste estudo foi coletada em até 15 após o diagnóstico. Pacientes com câncer, HIV, gestantes e aqueles que já haviam recebido vacinas contra SARS-CoV-2 foram excluídos do estudo. Além disso, 30 controles saudáveis foram obtidos de amostras pré-pandêmicas, que tiveram resultados negativos para anticorpos contra SARS-CoV-2 (IgM e IgG). Os critérios de exclusão para os controles saudáveis incluíram história de neoplasia, doenças crônicas e infecções nos últimos 7 dias. Para os testes laboratoriais foram colhidas amostras de sangue periférico (4mL) de todos os participantes, em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético potássico (EDTA/K3), o sangue foi processado em até 24 h após a coleta para análise por citometria de fluxo e separação do plasma. O plasma foi armazenado a -80°C para análise subsequente de anticorpos específicos IgM, IgG e neutralizantes contra o SARS-CoV-2, bem como para a pesquisa de RNA viral. Além disso, foram obtidos através dos prontuários dos pacientes dados como idade, gênero, histórico médico e o quadro clínico. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo CEPESH/UFSC nº CAAE 31124820.1.0000.0121 maio/2020). O consentimento informado por escrito foi obtido de todos os participantes (APÊNDICE A).

4.3 ANÁLISE MULTIPARAMÉTRICA DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE

As células do sistema imune foram analisadas utilizando uma metodologia de plataforma dupla. Onde um citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, EUA) com o software FACS Diva (BD Biosciences, EUA) foi utilizado para contagens de valores relativos das células imunes, e o analisador de células hematológicas Sysmex XE-2100D (Sysmex Corporation, Japão) foi utilizado para contagens de valores absolutos.

O volume de amostra utilizado foi de 1,5 mL de sangue periférico e as células mononucleares foram isoladas por gradiente de densidade com o uso de Ficoll-Hypaque 1077 (Sigma-Aldrich, Alemanha). Esta etapa de separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), por gradiente de densidade, teve a finalidade de obter uma amostra com maior concentração de células B, e este procedimento é descrito com mais detalhes no Apêndice B. Após o procedimento de separação, o pellet de PBMC, presente no tubo de poliestireno de

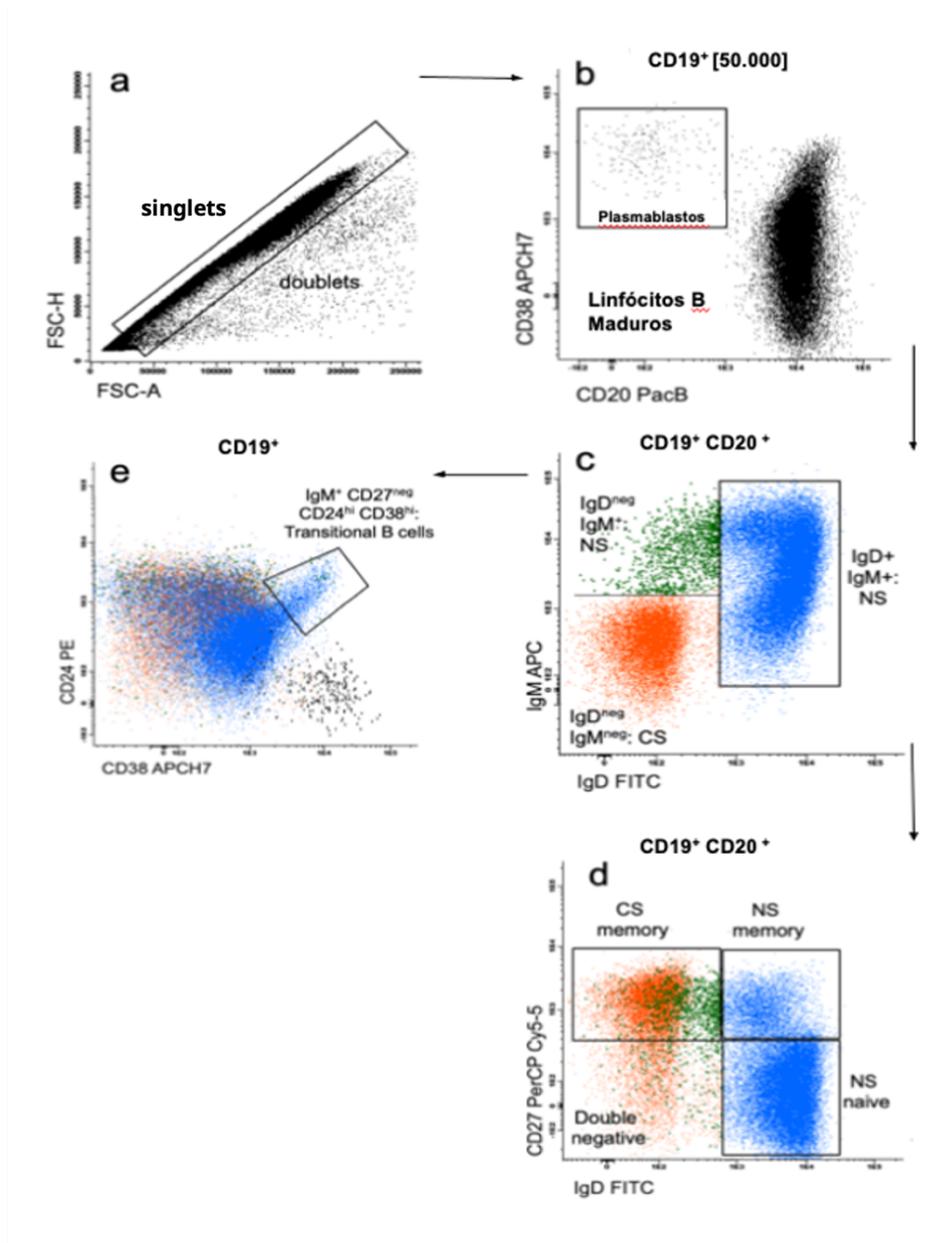
5 mL, foi ressuspendido com PBS e marcado com os anticorpos monoclonais do painel utilizado (Quadro 2).

Quadro 2. Informações técnicas dos marcadores utilizados no tubo de reação.

Marcador	Fluoróforo	Clone	Fabricante	Referência	μL/teste
CD20	V450	L27	BD Bioscience	642274	1
CD27	PerCP-Cy 5.5	MT271	BD Bioscience	560612	1
CD45	V500	HI30	BD Bioscience	560777	1
IgM	APC	G20-127	BD Bioscience	551062	10
CD38	APC-H7	HB7	BD Bioscience	653314	2
CD24	PE	ML5	BD Bioscience	555428	10
CD19	PE-Cy7	J3-119	Beckman Coulter	IM3628	2
IgD	FITC	IADB6	Beckman Coulter	B30652	5

APC: alofocianina; APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: pacific blue/V450; PacO: pacific Orange/V500; PE: ficoeritrina; PE-Cy7: ficoeritrina Cy7; PerCP Cy5-5: peridinina-clorofila-proteína; Ig: imunoglobulina. Fonte: o autor.

A marcação das PBMC foi realizada conforme protocolo descrito no Apêndice C. Após realizar o procedimento de marcação com os anticorpos de interesse, procedeu-se para a aquisição das amostras no citômetro de fluxo seguido pelo processamento dos dados obtidos. Para este procedimento, que visa avaliar os linfócitos B, inicialmente as células viáveis foram identificadas, baseado em seu tamanho e complexidade (Figura 4 - a), e assim a amostra foi adquirida até chegar a 50 mil eventos de células CD19⁺ (*stopping gate*).

Figura 4 – Estratégia de *gating* das células B

As células viáveis foram identificadas com base em seu tamanho e complexidade (a) e depois os linfócitos B CD19⁺ foram selecionados (até 50.000) e subdivididos em células B maduras e plasmablastos (b), baseado na expressão de CD38⁺ e CD20⁺. As células B maduras foram classificadas em *Naive*, NS-MBC, CS-MBC e células B DN com base na expressão de imunoglobulinas IgM e IgD e CD27 (c - d). Células B transicionais também foram identificadas baseado na expressão de CD24^{hi} CD38^{hi} (e). Hi: alta expressão; neg: expressão negativa; APC: alofocianina; APCH7: alofocianina H7; FITC: isotiocianato de fluoresceína; PacB: azul pacífico/V450; PE: ficoeritrina; PerCP Cy5-5: proteína clorofila peridina; e Ig: imunoglobulina. Fonte: Elaborado pelo autor.

Após aquisição, as células linfoides B foram selecionadas e subdivididas, utilizando a estratégia de *gating* proposta por Cardoso e Santos-Silva (2019), em células B maduras e plasmablastos com base na expressão de CD38 e CD20 (Figura 4 – b). Na etapa seguinte, as células B maduras foram classificadas em células B *naive* (em azul), NS-MBC (em verde), CS-MBC e células B DN (em laranja) de acordo com a expressão das imunoglobulinas IgD e IgM (Figura 4 - c) em conjunto com a expressão de CD27 (Figura 4 - d). As células B transitórias foram classificadas pela expressão forte de CD24 e CD38. A análise destes dados, foi realizada pelo *software* Infinicyt 2.0 (Cytognos, Espanha). Todos os anticorpos utilizados neste painel de marcação foram previamente titulados e uma compensação padrão automática foi aplicada a cada aquisição. O desempenho do citômetro de fluxo foi verificado diariamente com o uso de esferas de calibração (BD Biosciences, EUA).

4.4 DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE ANTICORPOS ANTI-SARS-COV-2 IGM E IGG

Para a avaliação de anticorpos IgM e IgG contra SARS-CoV-2, o kit Anti-2019-nCoV(S)-IgM (Wuhan Fine Biotech Co., China; Catálogo No.: EH4942) e Anti-2019-nCoV (N+S)-IgG (Wuhan Fine Biotech Co., China; Catálogo No.: EH4946) foram utilizados seguindo as instruções do fabricante. O método utilizado para detecção destes anticorpos é baseado em um ensaio imunoenzimático (ELISA, sigla em inglês que quer dizer *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) indireto, onde as placas de 96 poços são revestidas com as proteínas N e S do SARS-CoV-2 e, após a adição da amostra, são adicionados os anticorpos anti-IgM ou anti-IgG humano conjugados à uma peroxidase (HRP, do inglês *horseradish peroxidase*). A ligação antígeno-anticorpo é revelada pela adição de um substrato da HRP, que gera um produto de cor azul e se torna amarelo após a adição da solução de parada. A densidade óptica da cor revelada foi lida com um fotômetro adequado a 450nm, com um comprimento de onda de referência de 650nm. Amostras com absorbância acima do valor de corte foram consideradas positivas. O valor de corte para IgG e IgM contra SARS-CoV-2 foi calculado a partir da média dos controles negativos multiplicada por 2,1, de acordo com as instruções do fabricante.

4.5 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE ANTICORPOS ANTI-SARS-COV-2 NEUTRALIZANTE

Os anticorpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 foram analisados através do Kit de Detecção de Anticorpos de Neutralização cPass™ SARS-CoV-2 (GenScript Inc., EUA; N° de Catálogo: L00847) que mimetiza *in vitro* a interação entre o vírus e a célula hospedeira, e permite a detecção indireta de potenciais anticorpos neutralizantes de SARS-CoV-2 no sangue periférico. O método utilizado para detecção destes anticorpos é baseado em um ensaio imunoenzimático (ELISA, sigla em inglês que quer dizer *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) indireto, onde as placas de 96 poços são revestidas com receptores de ECA2 e, após a adição da amostra, são adicionadas partículas do RBD viral (proteína S) conjugados à uma peroxidase (HRP, do inglês *horseradish peroxidase*). A taxa de inibição, da ligação entre o RBD viral e o receptor de ECA2, foi calculada de acordo com a densidade óptica (OD) a 450nm, utilizando a seguinte fórmula: taxa de inibição (%) = $(1 - \text{valor de DO da amostra} / \text{valor de DO do controle negativo}) \times 100$. Os resultados foram interpretados como reativos quando a amostra apresentou um valor maior que 20% de taxa de inibição, conforme instrução do fabricante.

4.6 REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

Para analisar a presença de RNA do SARS-CoV-2 no plasma dos pacientes, as amostras foram previamente submetidas à extração do RNA viral, que foi realizada por meio do kit Quick-RNA Viral (Zymo Research, EUA), de acordo com as instruções do fabricante (Apêndice D). Após a etapa de extração e purificação do RNA viral presente no plasma dos pacientes, as amostras foram submetidas à transcrição reversa, onde o alvo de RNA isolado foi transcrito, gerando uma fita de DNA complementar pela enzima transcriptase reversa. No mesmo poço de reação, ocorreu simultaneamente a amplificação da sequência alvo, através de iniciadores específicos e uma sonda marcada com fluorescência (Apêndice E). Neste caso, os alvos utilizados foram os genes ORF1a/b e N do SARS-CoV-2. A presença destes genes específicos na amostra foi detectada através do aumento na fluorescência observada, utilizando um termociclador com detecção de emissão de fluorescência em Tempo Real (StepOne Plus, Applied Biosystems). Um valor quantitativo de ciclos (Cq) inferior a 37 foi definido como

resultado positivo, enquanto um Cq igual ou superior a 40 foi definido como teste negativo, com base nas instruções do fabricante do kit Xgen Master COVID-19 (Mobius Life Ciência, Brasil).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste Shapiro-Wilk. Sendo que, as variáveis não paramétricas, onde a distribuição dos dados não possuía normalidade, foram comparadas usando o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post-hoc de Dunn-Bonferroni. Neste caso os dados foram expressos como mediana, mínimo e máximo. Já as variáveis categóricas foram avaliadas através do teste qui-quadrado. Além disso, as variáveis obtidas neste estudo, foram comparadas com o desfecho (óbito/sobrevivência) por meio do teste U de Mann-Whitney e os resultados significativos foram submetidos à regressão logística multivariada e a chance de o desfecho ocorrer foi obtida através do cálculo *odds ratio*. A análise estatística foi realizada por meio do *software* MedCalc versão 20.015 (Bélgica) e um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado significativo.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

Neste estudo, foram incluídos 133 pacientes com COVID-19, que não haviam sido vacinados contra o SARS-CoV-2, e 30 controles saudáveis, cujo as amostras foram obtidas antes do início da pandemia. Os pacientes foram subdivididos de acordo com a apresentação clínica da doença nos grupos, leve (n=36), moderado (n=30), grave (n=32) e crítico (n=35). As características clínicas e demográficas dos pacientes com COVID-19 são descritas na Tabela 1. A mediana do tempo entre o início dos sintomas, associados à COVID-19, e a coleta da amostra utilizada neste estudo foi de 14 (4 – 12) dias, sendo que, um tempo menor foi observado no grupo crítico ($P < 0,001$). A mediana da idade dos pacientes com COVID-19 foi de 54 (22 - 98) anos e o grupo de pacientes com sintomas graves apresentou uma idade significativamente maior que o grupo controle ($P < 0,001$). Dos pacientes avaliados, 47,4% eram mulheres e 52,6% eram homens. As comorbidades mais presentes nos grupos de infectados foram hipertensão e

diabetes mellitus, presentes principalmente nos casos mais graves (respectivamente, $P < 0,001$ e $P = 0,003$).

Tabela 1. Características dos pacientes com COVID-19.

Variável	Controle	Todos (n = 133)	Leve (n = 36)	Moderado (n = 30)	Grave (n = 32)	Crítico (n = 35)	P
Tempo da coleta (dias), mediana (min- máx)		14 (4 – 38)	17 (6 – 23)	15 (6 – 27)	12 (7 – 38)	11 (4 -23)	<0,001
			a	a, b	b, c	c	
Idade (anos), mediana (min-máx)	54 (31 – 66)	54 (22 - 98)	41 (36 - 46)	53 (48 - 58)	55 (50 - 61)	62 (57 - 66)	<0,001
	a, b	a, b	a	b, c	b, c	c	
Gênero							
Feminino, n (%)	66,7	47,4	61,1	30	46,9	48,6	0,079
Masculino, n (%)	33,3	52,6	38,9	70	53,1	51,4	
Comorbidades							
Hipertensão arterial, n (%)		45,9	8,3	40	65,6	71,4	<0.001
Diabetes mellitus, n (%)		29,3	11,1	20	37,5	48,6	0,003
Obesidade (IMC ≥ 30 kg/m ²), n (%)		23,3	11,1	26,7	25	31,4	0,210
Cardiopatia, n (%)		7,5	8,3	6,7	9,4	5,7	0,943
Doença renal, n (%)		3	0	3,3	3,1	5,7	0,571
Doença pulmonar, n (%)		10,5	2,8	3,3	15,6	20	0,043
Outros, n (%)		10,5	0	26,7	9,4	8,6	0,005

IMC: Índice de massa corporal. Outras comorbidades incluem doença hepática, acidente vascular cerebral e infarto agudo do miocárdio. As variáveis não paramétricas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Dunn-Bonferroni. As variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado. Um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado significativo. Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística entre os grupos.

5.2 PESQUISA DE RNA VIRAL NO PLASMA

Com relação a presença de RNA viral no plasma dos pacientes, os resultados obtidos neste estudo são apresentados na Tabela 2, onde 16,5% dos pacientes apresentavam carga viral

detectável por RT-qPCR. Além disso, é possível observar que há associação entre a carga viral detectável no sangue periférico e a gravidade da doença ($P = 0,008$). Esse achado foi mais frequente em pacientes com quadro clínico crítico de COVID-19.

Tabela 2. Presença de RNA viral no plasma dos pacientes com COVID-19

	Controle	Leve	Moderado	Grave	Crítico	P
RT-qPCR						
Detectado (%)	16,5	8,3	6,7	15,6	34,3	0,008
Não detectado (%)	83,5	91,7	93,3	84,4	65,7	

As variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado. Um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado significativo.

5.3 ANÁLISE DO COMPARTIMENTO DE CÉLULAS B

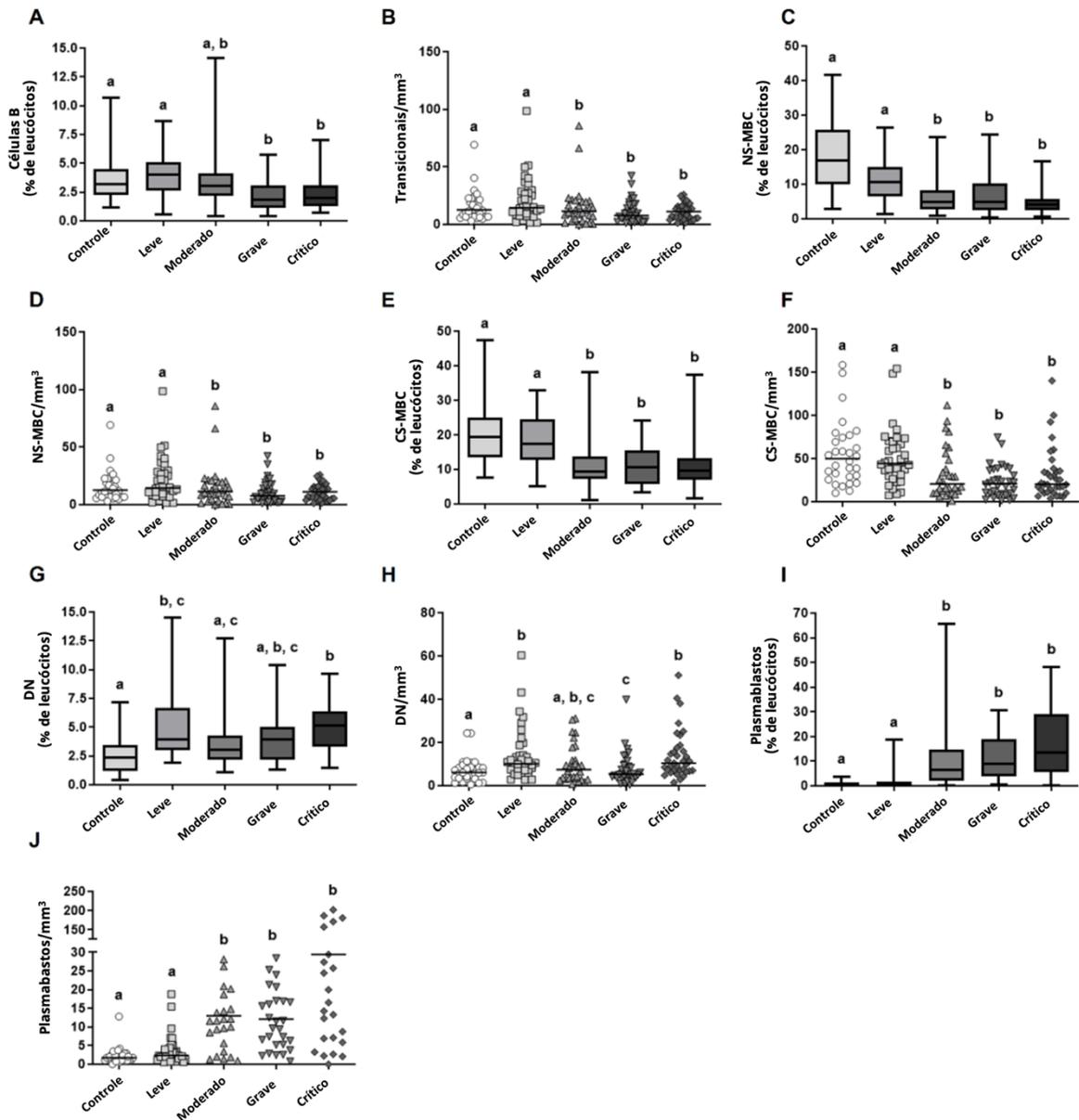
No presente estudo, ao investigar o compartimento de células B de pacientes com COVID-19, foi observada uma redução nos valores relativos de linfócitos B em pacientes com doença grave e crítica em comparação com os controles saudáveis ($P < 0,001$; Figura 5 A). As células B também foram subdivididas em células B *naive*, transicional, células B de memória que não trocaram de classe (NS-MBCs), células B de memória que trocaram de classe (CS-MBCs) e células B duplamente negativas (DN). Quando comparado com o controle, foi observada uma redução na quantidade absoluta de células transicionais ($P = 0,024$; Figura 5 B) e nos valores absolutos e relativos de NS-MBCs ($P < 0,001$; Figura 5 C-D) e CS-MBCs ($P < 0,001$; Figura 5 E-F). Essas diferenças foram encontradas em pacientes com COVID-19 moderado a crítico. Além disso, ao avaliar as frequências de células B DN, observou-se um aumento no valor relativo ($P = 0,001$; Figura 5 G) e absoluto ($P < 0,001$; Figura 5 H) dessas células em pacientes com COVID-19 dos grupos leve e crítico. Já os grupos moderado e grave não mostraram diferença em comparação com o grupo controle. As frequências de plasmablastos também foram avaliadas e apresentaram aumento em pacientes com doença moderada a crítica, tanto em valores relativos quanto absolutos ($P < 0,001$; Figura 5 I-J). Informações completas sobre os valores absolutos e relativos das células B e seus subtipos são fornecidas na Tabela 3.

Tabela 3. Alterações no compartimento de células B no sangue periférico de pacientes com COVID-19.

Variável	Controle	Leve	Moderado	Grave	Crítico	P
Linfócitos (% de leucócitos)	27,65 (12,14–45,25) a	31,25 (8,88–49,6) a	14,48 (2,51–39,76) b	10,09 (1,88–32,49) b	8,41 (2,91–29,94) b	<0,001
Linfócitos/mm ³	1798,58 (1000–3238) a,b	2196,87 (696–3785) a	1121,05 (300–3115) b, c	744,74 (47,70–2321) c	758,36 (314,00–3515) c	<0,001
Linfócitos B (% de leucócitos)	3,21 (1,14–10,71) a	4,04 (0,55–8,68) a	3,04 (0,42–14,13) a, b	1,81 (0,39–5,71) b	2,00 (0,70–7,00) b	<0,001
Linfócitos B/mm ³	223,63 (72,76–622) a,b	279,22 (44,77–659) a	198,42 (34,02–905,7) a,b	152,24 (16,84–633,1) b	186,70 (62,60–815) a,b	0,040
B <i>naive</i> (% de células B)	55,28 (27,25–80,35)	57,56 (31,73–77,78)	62,27 (21,78–82,60)	62,51 (38,29–78,67)	58,45 (31,47–79,95)	0,126
B <i>naive</i> /mm ³	134,52 (37,93–430,77)	143,08 (18,66–445,53)	144,72 (11,11–695,87)	104,63 (12,19–476,28)	128,54 (28,16–528,59)	0,451
B transicionais (% de células B)	5,51 (1,83–13,91) a,b	6,49 (0,74–14,86) a	5,96 (0,04–10,29) a,b	5,11 (1,41–12,47) a,b	4,28 (0,48–8,95) b	0,034
B transicionais /mm ³	12,51 (3,07–69,21) a,b	14,51 (1,50–98,59) a	11,51 (0,07–85,73) a, b	7,79 (1,11–42,23) b	4,28 (1,21–25,88) b	0,024
NS-MBC (% de células B)	16,91 (2,95–41,70) a	10,69 (1,36–26,36) a	4,78 (0,81–23,73) b	4,99 (0,39–24,44) b	4,22 (0,57–16,55) b	<0,001
NS-MBC/mm ³	37,50 (3,51–160,3) a	25,03 (2,72–107,6) a	11,15 (0,93–81,38) b	10,74 (0,63–77,32) b	7,57 (0,67–81,22) b	<0,001
CS-MBC (% de células B)	19,29 (7,71–47,49) a	17,29 (5,16–32,75) a	9,28 (1,00–38,14) b	10,52 (3,43–24,05) b	9,66 (1,62–37,30) b	<0,001
CS-MBC/mm ³	49,84 (10,1–158,3) a	44,17 (7,20–154,1) a	20,54 (1,15–111,75) b	20,85 (1,05–74,58) b	20,45 (3,62–140,0) b	<0,001
DN (% de células B)	2,39 (0,40–7,18) a	3,90 (1,88–14,4) b, c	3,02 (1,10–12,73) a, c	3,93 (1,3–10,4) a,b, c	5,14 (1,46–9,66) b	<0,001
DN/mm ³	6,07 (0,47 – 24,31) a	10,19 (2,71 – 60,29) b	7,46 (0,67 – 31,16) a, b, c	5,30 (0,34 – 39,85) c	10,40 (1,49 – 51,11) b	0,00 1
Plasmablastos (% de células B)	0,63 (0–3,84) a	0,89 (0,23–18,74) a	6,57 (0,19–65,45) b	9,03 (0,42–30,72) b	13,49 (0–47,97) b	<0,001
Plasmablastos/mm ³	1,75 (0–12,80) a	2,37 (0,51–40,23) a	13,00 (0,96–113,25) b	12,08 (0,74–118,92) b	29,43 (0–202,03) b	<0,001

Os resultados estão expressos em mediana (intervalo mín - máx). As diferenças foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis com o teste post-hoc de Dunn-Bonferroni. Um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado significativo. Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatística entre os grupos. MBC: Células B de memória; NS: sem troca de classe; CS: trocaram de classe; DN: duplo negativas.

Figura 5. Alterações no compartimento de células B no sangue periférico de pacientes com COVID-19.



Avaliação da frequência de células B totais (A), transicionais (B), NS-MBC (C e D), CS-MBC (F e G), DN (H) e plasmablastos (J) dentro do compartimento de linfócitos B dos pacientes com COVID-19. As variáveis foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Dunn-Bonferroni. Letras diferentes (a, b e c) indicam valores significativamente diferentes entre si. Um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado significativo. Elementos dos gráficos de caixas: whisker: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil. NS-MBC: linfócitos B de memória que não trocaram de classe; CS-MBC: linfócitos B de memória que trocaram de classe; DN: linfócitos B de memória duplo-negativos.

5.4 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTICORPOS CONTRA O SARS-COV-2

Além de analisar o compartimento de células B, este estudo também verificou a presença de anticorpos IgM, IgG e neutralizantes contra SARS-CoV-2 no soro dos pacientes com COVID-19 (Tabela 4). Onde foi possível observar uma diferença significativa entre os grupos de pacientes, com relação à presença de anticorpos IgM ($P = 0,017$) e IgG ($P = 0,019$), no soro dos pacientes.

Tabela 4. Avaliação da presença de anticorpos IgM, IgG e neutralizantes contra o SARS-CoV-2 em pacientes com COVID-19

Variável	Todos (n = 133)	Leve (n = 36)	Moderado (n = 30)	Grave (n = 32)	Crítico (n = 35)	P
IgM						
Não-reativo (%)	23,3	41,7	16,7	6,3	25,7	
Reativo (%)	66,2	44,4	76,7	84,4	62,9	0,017
Indeterminado (%)	10,5	13,9	6,7	9,4	11,4	
IgG						
Não-reativo (%)	23,3	33,3	10	21,9	25,7	
Reativo (%)	69,9	50	83,3	75	74,3	0,019
Indeterminado (%)	6,8	16,7	6,7	3,1	0	
Ac. neutralizantes						
Não-reativo (%)	55,6	55,6	20,0	28,1	34,3	
Reativo (%)	44,4	44,4	80,0	71,9	65,7	0,016
Ac. Neutralizantes (%) , mediana (min-máx)	68,0 (9,0–87,8)	45,7 (34,5–56,9)	64,8 (56,1 – 73,5)	66,3 (58,5 – 74,2)	58,7 (48,2 – 69)	0,032

As variáveis não paramétricas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Dunn-Bonferroni. As variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado. Um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado significativo. Ac= anticorpos; Ig= imunoglobulina.

Aparentemente, os pacientes com quadros clínicos mais graves (moderados a críticos) foram os que apresentaram anticorpos IgM e IgG com maior frequência. No entanto, mesmo em pacientes leves, pelo menos 50% dos pacientes apresentavam anticorpos IgG reagente. Além disso, 44,4% do total de pacientes apresentava anticorpos neutralizantes contra SARS-

CoV-2. Novamente, os grupos que apresentaram resultados reagentes com maior frequência foram os pacientes com COVID-19 moderado a crítico. Porém, na análise quantitativa, que indica a taxa de inibição (%) da ligação entre o RBD do SARS-CoV-2 e o receptor de ECA2, o resultado não foi significativamente diferente entre os grupos.

5.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE MORTALIDADE E ALTERAÇÕES NO COMPARTIMENTO DE CÉLULAS B

Depois de avaliar as alterações no compartimento de células B dos pacientes com COVID-19, foi analisada a relação entre essas alterações e o desfecho clínico destes pacientes. Primeiramente, todos os parâmetros foram comparados de acordo com o desfecho (óbito ou sobrevivida) por meio do teste de Mann-Whitney. Os parâmetros que apresentaram resultados significativos, quando comparados ao desfecho clínico foram linfócitos B (% de leucócitos e por mm^3), *naive* (por mm^3), transicionais (por mm^3), NS-MBC (por mm^3), CS-MBC (por mm^3), DN (% de células B), plasmablastos (% de células B) e plasmablastos (por mm^3) (Tabela 5).

Tabela 5. Alterações no compartimento de células B e mortalidade.

Variável	Desfecho		Mann-Whitney P
	Sobreviveram (n = 118)	óbito (n = 15)	
Linfócitos B (% de leucócitos)	2,65 (0,40 – 14,10)	1,20 (0,40 – 6,00)	0,002
Linfócitos B/ mm^3	213,80 (16,80 – 905,70)	131,00 (44,90 – 455,90)	0,012
<i>Naive</i> / mm^3	140,06 (11,11 - 695,87)	82,12 (18,92 – 248,05)	0,004
Transicionais/ mm^3	12,01 (0,07 – 98,59)	6,33 (1,58 – 22,62)	0,008
NS-MBC/ mm^3	15,96 (0,63 – 107,60)	6,31 (0,67 – 36,98)	0,004
CS-MBC/ mm^3	29,74 (1,05 – 154,15)	13,63 (3,62 – 38,43)	0,003
DN (% de células B)	3,61 (1,10 – 14,48)	5,55 (2,21 – 10,40)	0,010
Plasmablastos (% de células B)	3,93 (0 – 65,45)	19,91 (3,12 – 41,58)	<0,001
Plasmablastos/ mm^3	9,05 (0 – 202,03)	25,30 (2,10 – 88,38)	0,010

As diferenças foram analisadas utilizando o teste de Mann-Whitney. Um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado significativo. MBC: células B de memória; NS: sem troca de classe; CS: troca de classe; DN: duplo negativas.

Esses parâmetros foram então submetidos à regressão logística multivariada, que mostrou que a frequência relativa de células B DN (% de células B) estava relacionada ao desfecho ($P = 0,001$; *odds ratio* = 2,15, IC95% = 1,36 – 3,41), bem como os valores absolutos de CS-MBC ($P = 0,02$; *odds ratio* = 0,91, IC95% = 0,83 – 0,99) (Tabela 6).

Tabela 6. Alterações no compartimento de células B e o desfecho da COVID-19

Variável	Sobreviventes (n = 118)	Óbito (n = 15)	OR	95% CI	P
Linfócitos B (% de leucócitos)	2,65 (0,40 – 14,10)	1,20 (0,40 – 6,00)	0,70	0,34 – 1,44	0,338
Linfócitos B/mm ³	213,80 (16,80 – 905,70)	131,00 (44,90 – 455,90)	1,00	0,99 – 1,01	0,565
Naive /mm ³	140,06 (11,11 – 695,87)	82,12 (18,92 – 248,05)	1,00	0,99 – 1,02	0,704
Transicionais/mm ³	12,01 (0,07 – 98,59)	6,33 (1,58 – 22,62)	1,02	0,89 – 1,17	0,768
NS-MBC/mm ³	15,96 (0,63 – 107,60)	6,31 (0,67 – 36,98)	0,98	0,88 – 1,09	0,778
CS-MBC/mm ³	29,74 (1,05 – 154,15)	13,63 (3,62 – 38,43)	0,91	0,83 – 0,99	0,022
DN (% de células B)	3,61 (1,10 – 14,48)	5,55 (2,21 – 10,40)	2,15	1,36 – 3,41	0,001
Plasmablastos (% de células B)	3,93 (0 – 65,45)	19,91 (3,12 – 41,58)	1,07	0,99 – 1,16	0,102
Plasmablastos/mm ³	9,05 (0 – 202,03)	25,30 (2,10 – 88,38)	0,99	0,96 – 1,02	0,499

As variáveis foram analisadas utilizando uma regressão logística multivariada. Um valor de $P \leq 0,05$ foi considerado significativo. MBC: células B de memória; NS: sem troca de classe; CS: troca de classe; DN: duplo negativas. OR: odds ratio; 95% CI: 95% intervalo de confiança.

6. DISCUSSÃO

A disseminação do SARS-CoV-2 representou o problema de saúde pública mais desafiador dos últimos tempos. Sua alta taxa de infectividade e a possibilidade de transmissão por pacientes assintomáticos fizeram com que a COVID-19 rapidamente se tornasse uma pandemia (Li *et al.*, 2020). Nos primeiros meses da pandemia de COVID-19, os relatórios clínicos indicaram um prognóstico pior para pacientes de idade mais avançada com

comorbidades (Abayomi *et al.*, 2021; Alharbi *et al.*, 2022; Ge *et al.*, 2021). Nosso estudo demonstra o mesmo, onde pacientes com idade mais avançada e com comorbidades, como diabetes mellitus, hipertensão e doença pulmonar, apresentaram sintomas mais graves quando procuraram um hospital. Os demais dados demográficos não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos subgrupos de gravidade.

A apresentação clínica da COVID-19 é muito heterogênea e pode variar desde sintomas semelhantes aos da gripe até falência de múltiplos órgãos e morte do paciente. Dados epidemiológicos demonstram que 14% dos pacientes com COVID-19 apresentam doença grave e 5% apresentam condições consideradas críticas, necessitando de cuidados hospitalares (Li *et al.*, 2020). Nos primeiros meses após o início da pandemia de COVID-19, os relatórios clínicos já indicavam pior prognóstico para pacientes mais idosos e pacientes com comorbidades (Abayomi *et al.*, 2021; Alharbi *et al.*, 2021; Ge *et al.*, 2021). Este estudo, que avaliou pacientes não vacinados, demonstra o mesmo cenário, onde pacientes mais idosos apresentaram com maior frequência sintomas moderados a críticos. Além disso, a presença de comorbidades também esteve associada ao desenvolvimento de sintomas mais graves da doença.

Este estudo também demonstrou que a presença de RNA viral na circulação sanguínea de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 está associada à gravidade da doença. Outros estudos que avaliaram a presença viral no plasma de pacientes com COVID-19 encontraram resultados semelhantes, onde pacientes com sinais clínicos mais graves apresentaram maior frequência de detecção de RNA viral (Hagman *et al.*, 2022; Jacobs *et al.*, 2022; Ram-Mohan *et al.*, 2022; Rovito *et al.*, 2022). No estudo realizado por Rovito *et al.* (2022), os pacientes hospitalizados com COVID-19 foram avaliados quanto à resposta imunológica, à gravidade da doença e à presença de RNA viral na circulação sanguínea. Os autores observaram que pacientes com viremia detectável apresentavam quadros clínicos mais graves e resposta imune desregulada, o que não ocorria em pacientes com viremia indetectável. Ainda não se sabe como a presença do SARS-CoV-2 na corrente sanguínea pode influenciar a patogênese da COVID-19. Porém, os autores do referido estudo relatam que pacientes com viremia detectável geralmente apresentam perfil pró-inflamatório, com aumento da expressão de IFN- α e IL-6, que são citocinas produzidas após o reconhecimento de PAMPs. A presença do RNA do SARS-CoV-2 na corrente sanguínea pode ser responsável por maior exposição imunológica aos PAMPs, amplificando a resposta pró-inflamatória já característica de pacientes com COVID-

19 mais grave. Com isso, os autores trazem duas possibilidades que podem ser apontadas como possíveis causas dessa relação entre a viremia do SARS-CoV-2 e a gravidade da doença: 1) uma carga viral inicial elevada pode prejudicar o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa eficiente, devido à exaustão das células T. 2) uma resposta imune inicial defeituosa, possivelmente devido a fatores genéticos, pode levar à replicação viral descontrolada que pode eventualmente induzir viremia (Rovito *et al.*, 2022).

Com o presente estudo não é possível afirmar que o RNA viral, presente na corrente sanguínea dos pacientes, corresponde a partículas infecciosas do SARS-CoV-2. Porém, no estudo conduzido por Jacobs *et al.* (2022), os autores realizaram uma abordagem baseada em imagens e conseguiram visualizar, por meio de microscopia eletrônica, partículas virais no plasma de pacientes com COVID-19. Indicando que a viremia observada em pacientes com sinais clínicos mais graves da doença pode representar a presença de partículas virais intactas e viáveis. Além disso, o referido estudo também demonstrou associação entre o desenvolvimento de quadros clínicos mais graves da COVID-19 e a presença de RNA viral na corrente sanguínea (Jacobs *et al.*, 2022).

A origem da viremia do SARS-CoV-2 não é completamente compreendida, porém, muito provavelmente ocorre após lesão dos tecidos pulmonares, e assim o vírus atinge a corrente sanguínea, ou através da infecção direta das células endoteliais. O genoma do SARS-CoV-2 pode ser encontrado em tecidos como fígado, baço, coração e intestino, confirmando que a patogênese da COVID-19 envolve tecidos extrapulmonares. Portanto, a disseminação do SARS-CoV-2 na corrente sanguínea pode representar uma etapa importante na evolução da COVID-19 nos casos mais graves da doença, podendo até levar à falência de múltiplos órgãos e à morte (Hagman *et al.*, 2022; Ram-Mohan *et al.*, 2022; Rizzi *et al.*, 2023; Rovito *et al.*, 2022).

Após a infecção por SARS-CoV2, as células B *naive* ou as células B de memória, pré-existentes de exposições anteriores, são ativadas por meio do reconhecimento do antígeno viral. Assim, as células B ativadas iniciam a troca de classe de seu receptor antigênico para formar plasmablastos e plasmócitos, que são células especializadas secretoras de anticorpos, gerando imunidade humoral (Quast & Tarlinton, 2020). A apresentação clínica da COVID-19 pode ser um resultado da qualidade da resposta imune adaptativa, que tem grande importância na prevenção e no tratamento de infecções pelo SARS-CoV-2 (Woodruff *et al.*, 2020). Portanto,

neste estudo, procuramos avaliar a relação das contagens de células B e a gravidade da COVID-19. Como observado em nossos resultados, os pacientes com COVID-19 não mostraram qualquer redução na contagem absoluta de linfócitos B quando comparados ao grupo controle. No entanto, os pacientes com doença leve apresentaram maior contagem relativa de células B quando comparados aos grupos grave e crítico. Assim, o compartimento de linfócitos B foi avaliado e essas células foram subclassificadas em *naive*, transicionais, NS-MBC, CS-MBC, células B DN e plasmablastos.

Os resultados deste estudo mostraram que, para os pacientes avaliados, não houve alterações nas subpopulações de células B menos diferenciadas (*naive* e transicionais). No entanto, os NS-MBC e os CS-MBC, que representam células em estágio intermediário de diferenciação, estavam reduzidos nos pacientes com doença moderada. Assim, pode-se observar que, apesar da pequena alteração nos valores absolutos das células B totais, esse compartimento apresenta diversas alterações em pacientes com COVID-19. O efeito da COVID-19 no compartimento das células B varia muito entre os estudos na literatura, onde essas células algumas vezes estavam aumentadas e outras reduzidas (Kudryavtsev *et al.*, 2021; Laing *et al.*, 2020; Martín-Sánchez *et al.*, 2021; Sosa-Hernández *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020; Woodruff *et al.*, 2020). Apesar desta grande variação nos estudos presentes na literatura em relação ao compartimento de células B, de pacientes com COVID-19, há um consenso sobre o aumento de plasmablastos, observado principalmente em pacientes com manifestações mais graves da doença, mas também alterado em pacientes com sintomas menos grave (Hoehn *et al.*, 2021; Laing *et al.*, 2020; Martín-Sánchez *et al.*, 2021; Sosa-Hernández *et al.*, 2020; Wen *et al.*, 2020; Wilk *et al.*, 2020). Em alguns estudos, os plasmablastos chegam a compreender cerca de 30% do compartimento dos linfócitos B de pacientes com COVID-19 (Kaneko *et al.*, 2020, Mathew *et al.*, 2020). Como mostrado neste estudo, os plasmablastos também apresentaram aumento nos pacientes moderados, com aumento gradual até atingir o estado crítico, embora não tenha havido diferença significativa entre as condições clínicas moderada e crítica. Isso demonstra uma rápida diferenciação das células B, que após mudar de classe, diferenciam-se em plasmablastos. De acordo com Shuwa *et al.* (2021), essa diferenciação pode ocorrer em até sete dias após a internação. Além disso, este estudo também demonstrou um aumento no número de linfócitos B DN nos pacientes que apresentavam quadro clínico considerado grave. Essas observações estão de acordo com os achados de outros estudos, que propõem que o

declínio das células B de memória pode ser resultado da ativação de células de memória pré-existentes, que se diferenciam em células de memória "atípicas" (células CD27⁻ ou DN) ou plasmablastos/plasmócitos (De Biasi *et al.*, 2020; Kaneko *et al.*, 2020; Mathew *et al.*, 2020; Oliviero *et al.*, 2020; Sosa-Hernández *et al.*, 2020).

Além de avaliar o compartimento de células B em pacientes com COVID-19, a produção de anticorpos IgM, IgG e neutralizantes contra SARS-CoV-2 também foi avaliada. Em geral, uma maior carga de antígenos impulsiona maior reatividade de anticorpos (Merad *et al.*, 2022). No caso da COVID-19, isso parece ser verdade, uma vez que outros estudos, como o nosso, demonstram uma correlação positiva entre a positividade de anticorpos contra o SARS-CoV-2 e a gravidade da doença, possivelmente, pela resposta extrafolicular de células B (Sette & Crotty, 2021). Nossos resultados mostram que houve diferença na reatividade destes anticorpos de acordo com o quadro clínico dos pacientes. A maioria dos pacientes com condições clínicas moderadas a críticas apresentaram anticorpos reagentes. Estes achados corroboram outros estudos na literatura, que sugerem que a COVID-19 induz respostas específicas de células B e que o surgimento de anticorpos IgG, no soro dos pacientes, ocorre aproximadamente ao mesmo tempo que o de IgM, geralmente nas primeiras duas semanas após o início dos sintomas (Braun *et al.*, 2020; Grifoni *et al.*, 2020; Röltgen & Boyd, 2021). No mesmo período que a soroconversão ocorre, os anticorpos neutralizantes se desenvolvem rapidamente nos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2. Alguns dados recentes sugerem que a produção de anticorpos neutralizantes contra o vírus pode ser realizada mesmo por subtipos de células B com pouca ou nenhuma maturação de afinidade (Sette & Crotty, 2021).

Além de estar relacionado ao desenvolvimento de um curso mais crítico da doença, o aumento na contagem de linfócitos B DN também contribuiu para um pior desfecho da doença, na medida em que pacientes com maior porcentagem dessas células no compartimento B tinham maior chance de morte. O número elevado de células B DN no sangue periférico de pacientes com COVID-19 pode ser resultado de mecanismos extrafoliculares para o desenvolvimento de uma resposta humoral específica, o que pode representar um sinal de mau prognóstico (Kudryavtsev *et al.*, 2021). Para abordar essa questão, um estudo *post-mortem* obteve amostras de linfonodos e baços de pacientes que morreram de COVID-19 e encontrou um número reduzido de centros germinativos nos folículos desses tecidos linfóides secundários. Essas

observações sugerem função prejudicada do centro germinativo e falta de formação de células B de memória de vida longa nos pacientes mais graves (Röltgen & Boyd, 2021). Outra subpopulação de células B que tem se mostrado relacionada ao desfecho da doença é o CS-MBC, que parece proteger os pacientes da morte. Essas células dependem da apresentação do antígeno viral pelas células envolvidas na imunidade inata, no entanto, outros estudos mostraram que essas células apresentadoras do antígeno estão reduzidas em pacientes com sintomas mais graves da COVID-19 e isso poderia explicar a diminuição dessas células em pacientes que morreram (Walter *et al.*, 2022).

7. CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que os pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 apresentam anticorpos específicos contra o vírus já nos primeiros 14 dias de infecção. Além disso, o RNA viral do SARS-CoV-2 foi detectado com maior frequência em pacientes com quadro clínico mais grave da doença. Com relação ao compartimento de células B, este estudo demonstra que alterações nas contagens de subpopulações de linfócitos B está relacionada com o desenvolvimento de quadros clínicos mais graves, bem como com um pior desfecho da doença.

Com isso, sugerimos que os pacientes que se apresentam no hospital com sintomas moderados a críticos sejam testados quanto ao perfil de células B, principalmente para avaliar se o número de linfócitos B DN está aumentado dentro desse compartimento, visto a forte correlação dessa população celular com a mortalidade dos pacientes. Além disso, seria importante avaliar a frequência de CS-MBC, pois parece que essas células têm um efeito protetor para pacientes com COVID-19.

8. LIMITAÇÕES

As principais limitações deste estudo foram: os pacientes estavam em diferentes estágios da doença, com diferentes períodos entre o início dos sintomas e a coleta das amostras. Além disso, os pacientes, principalmente os internados, faziam uso de medicamentos diferentes, o que pode ter afetado seu perfil imunológico e inflamatório. Além disso, não avaliamos a variante do vírus que infectou os pacientes.

REFERÊNCIAS

ABAYOMI A.; OSIBOGUN A.; KANMA-OKAFOR O.; IDRIS J.; BOWALE A.; WRIGHT O.; *et al.* Morbidity and mortality outcomes of COVID-19 patients with and without hypertension in Lagos, Nigeria: a retrospective cohort study. **Glob Health Res Policy**, v. 6, n. 1, p. 26, 2021.

ABBAS, A. K. *et al.* **Cellular and Molecular Immunology**. 9th ed. Philadelphia: Elsevier, 2017.

ALHARBI A. M.; RABBANI S. I.; HALIM MOHAMED A. A.; ALMUSHAYTI B. K.; ALDHWAYAN N. I.; ALMOHAIMEED A. T.; *et al.* Analysis of potential risk factors associated with COVID-19 and hospitalization. **Front Public Health**, v. 10, p. 921-953, 2022.

BAGGEN J.; VANSTREELS E.; JANSEN S.; DAELEMANS D. Cellular host factors for SARS-CoV-2 infection. **Nat Microbiol**, v. 6, n. 10, p. 1219-1232, 2021.

BHATTACHARYA, M. Understanding B Lymphocyte Development: A Long Way to Go. In: **Lymphocytes**. London: IntechOpen, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes para diagnóstico e tratamento da COVID-19**. Versão 4. Brasília, DF: Ministério da saúde, 2020b. 98 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Painel de casos de doença pelo coronavírus 2019 (COVID-19) no Brasil pelo Ministério da Saúde**. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em: 30/05/2023.

BRAUN J.; LOYAL L.; FRENTSCH M.; WENDISCH D.; GEORG P.; KURTH F.; *et al.* SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. **Nature**, v. 587, n. 7833, p. 270-274, 2020.

CARABELLI A. M.; PEACOCK T. P.; THORNE L. G.; *et al.* SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. **Nat Rev Microbiol**, v. 21, n. 3, p. 162-177, 2023.

CARDOSO C. C.; MATIOLLO C.; PEREIRA C. H. J.; FONSECA J. S.; ALVES H. E. L.; SILVA O. M. D.; *et al.* B-cell compartment abnormalities are associated with ACLF and mortality in patients with liver cirrhosis. **Clin Res Hepatol Gastroenterol**, v. 45, n. 4, p. 101698.

CARSETTI R.; TERRERI S.; CONTI M. G.; FERNANDEZ SALINAS A.; CORRENTE F.; CAPPONI C.; *et al.* Comprehensive phenotyping of human peripheral blood B lymphocytes in healthy conditions. **Cytometry A**, v. 101, n. 2, p.131-139, 2022.

CERVANTES-DÍAZ R.; SOSA-HERNÁNDEZ V. A.; TORRES-RUIZ J.; ROMERO-RAMÍREZ S.; CAÑEZ-HERNÁNDEZ M.; PÉREZ-FRAGOSO A.; *et al.* Severity of SARS-CoV-2 infection is linked to double-negative (CD27- IgD-) B cell subset numbers. **Inflamm Res**, v. 71, n. 1, p.131-140, 2022.

CHEN F.; ZHANG Y.; LI X.; LI W.; LIU X.; XUE X. The Impact of ACE2 Polymorphisms on COVID-19 Disease: Susceptibility, Severity, and Therapy. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 11, p. 753721, 2021.

COOPER, M. D. The early history of B cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, p. 191–197, 2015.

DE BIASI S.; LO TARTARO D.; MESCHIARI M.; GIBELLINI L.; BELLINAZZI C.; BORELLA R.; *et al.* Expansion of plasmablasts and loss of memory B cells in peripheral blood from COVID-19 patients with pneumonia. **Eur J Immunol**, v. 50, n. 9, p. 1283-1294, 2020.

DHAMA K.; KHAN S.; TIWARI R.; *et al.* Coronavirus Disease 2019-COVID-19. **Clin Microbiol Rev**, v. 33, n. 4, p. e00028-20, 2020.

EL-SHABASY R. M.; NAYEL M. A.; TAHER M. M.; ABDELMONEM R.; SHOUEIR K. R.; KENAWY E. R. Three waves changes, new variant strains, and vaccination effect against COVID-19 pandemic. **Int J Biol Macromol**, v. 204, p. 161-168, 2022.

GE E.; LI Y.; WU S.; CANDIDO E.; WEI X. Association of pre-existing comorbidities with mortality and disease severity among 167,500 individuals with COVID-19 in Canada: A population-based cohort study. **PLoS One**, v. 16, n. 10, p. e0258154, 2021.

GRIFONI A.; WEISKOPF D.; RAMIREZ S. I.; MATEUS J.; DAN J. M.; MODERBACHER C. R.; *et al.* Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. **Cell**, v. 181, n. 7, p. 1489-1501, 2020

GRUBAUGH N. D.; PETRONE M. E.; HOLMES E. C. We shouldn't worry when a virus mutates during disease outbreaks. **Nat Microbiol**, v. 5, n. 4, p. 529-530, 2020.

HAGMAN K.; HEDENSTIERNA M.; RUDLING J.; GILLE-JOHNSON P.; HAMMAS B.; GRABBE M.; *et al.* Duration of SARS-CoV-2 viremia and its correlation to mortality and inflammatory parameters in patients hospitalized for COVID-19: a cohort study. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.102, p. 115595, 2022.

HOEHN K. B.; RAMANATHAN P.; UNTERMAN A.; SUMIDA T. S.; ASASHIMA H.; HAFLER D. A.; *et al.* Cutting Edge: Distinct B cell repertoires characterize patients with mild and severe COVID-19. **J Immunol**, v. 206, n. 12, p. 2785-2790, 2021.

HONG, S.; ZHANG, Z.; LIU, H.; TIAN, M., *et al.* B cells are the dominant antigen presenting cells that activate naive CD4. **Immunity**, v. 49, n. 4, p. 695-708, 2018.

HU B.; GUO H.; ZHOU P.; SHI Z. L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nat Rev Microbiol**, v. 19, n. 3, p. 141-154, 2021.

HUANG, C.; WANG, Y.; LI, X.; REN, L. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

JACKSON C. B.; FARZAN M.; CHEN B.; CHOE H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 23, n. 1, p. 3-20, 2022.

JACOBS J. L.; BAIN W.; NAQVI A.; STAINES B.; CASTANHA P. M. S.; YANG H.; *et al.* Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viremia Is Associated With Coronavirus Disease 2019 Severity and Predicts Clinical Outcomes. **Clin Infect Dis**, v. 74, p. 1525-1533, 2022.

KALININA O.; GOLOVKIN A.; ZAIKOVA E.; AQUINO A.; BEZRUKIKH V.; MELNIK O.; *et al.* Cytokine Storm Signature in Patients with Moderate and Severe COVID-19. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 16, p. 8879, 2022.

KANEKO N.; KUO H. H.; BOUCAU J.; FARMER J. R.; ALLARD-CHAMARD H.; MAHAJAN V. S.; *et al.* Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. **Cell**, v. 183, n. 1, p. 143-157.e13, 2020.

KOELLE K.; MARTIN M. A.; ANTIA R.; LOPMAN B.; DEAN N. E. The changing epidemiology of SARS-CoV-2. **Science**, v. 375, n. 6585, p. 1116-1121, 2022.

KUDRYAVTSEV I. V.; ARSENTIEVA N. A.; BATSUNOV O. K.; KOROBOVA Z. R.; KHAMITOVA I. V.; ISAKOV D. V.; *et al.* Alterations in B Cell and Follicular T-Helper Cell Subsets in Patients with Acute COVID-19 and COVID-19 Convalescents. **Curr Issues Mol Biol**, v. 44, n. 1, p. 194-205, 2021.

KUDRYAVTSEV I. V.; ARSENTIEVA N. A.; BATSUNOV O. K.; KOROBOVA Z. R.; KHAMITOVA I. V.; ISAKOV D. V.; *et al.* Alterations in B Cell and Follicular T-Helper Cell Subsets in Patients with Acute COVID-19 and COVID-19 Convalescents. **Curr Issues Mol Biol**, v. 44, n. 1p. 194-205, 2021.

LAINING A. G.; LORENC A.; DEL MOLINO DEL BARRIO I.; DAS A.; FISH M.; MONIN L.; *et al.* A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. **Nat Med**, v. 26, n. 10, p. 1623-1635, 2020.

LAMERS M. M.; HAAGMANS B. L.; SARS-CoV-2 pathogenesis. **Nat Rev Microbiol**, v. 20, n. 5, p. 270-284, 2022.

LI X.; GENG M.; PENG Y.; MENG L.; *et al.* Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **J Pharm Anal**, v. 10, n. 2, p. 102-108, 2020.

LI M.; GUO W.; DONG Y.; WANG X.; DAI D.; LIU X.; *et al.* Elevated Exhaustion Levels of NK and CD8+ T Cells as Indicators for Progression and Prognosis of COVID-19 Disease. **Front Immunol**, v. 11, p. 580237, 2020.

LIPPI G.; HENRY B. M. Understanding the biological success of SARS-CoV-2: Immuno-evasion strategies and beyond. *Eur J Intern Med*, v. S0953-6205, n. 23, p. 183-188, 2023.

MARKOV P. V.; GHAFARI M.; BEER M.; *et al.* The evolution of SARS-CoV-2. **Nat Rev Microbiol**, v. 21, n. 6, p. 361-379, 2023.

MARTÍN-SÁNCHEZ E.; GARCÉS J. J.; MAIA C.; INOGÉS S.; LÓPEZ-DÍAZ DE CERIO A.; CARMONA-TORRE F.; *et al.* Immunological Biomarkers of Fatal COVID-19: A Study of 868 Patients. **Front Immunol**, v. 12, p. 659018, 2021.

MATHEW D.; GILES J. R.; BAXTER A. E.; OLDRIDGE D. A.; GREENPLATE A. R.; WU J. E.; *et al.* Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. **Science**, v. 369, n. 6508, p. eabc8511, 2020.

MERAD M.; BLISH C. A.; SALLUSTO F.; IWASAKI A. The immunology and immunopathology of COVID-19. **Science**, v. 375, n. 6585, p. 1122-1127, 2022.

MOHAMMED R. N.; TAMJIDIFAR R.; RAHMAN H. S.; *et al.* A comprehensive review about immune responses and exhaustion during coronavirus disease (COVID-19). **Cell Commun Signal**, v. 20, n. 1, p. 79, 2022.

MULCHANDANI R.; LYNGDOH T.; KAKKAR A. K. Deciphering the COVID-19 cytokine storm: Systematic review and meta-analysis. **Eur J Clin Invest**, v. 51, n. 1, p. e13429, 2021.

NOOR R. Host Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and the COVID-19 Vaccine-Induced Immunity against SARS-CoV-2 and Its Variants. **Viruses**, v. 14, n. 11, p. 2541, 2022.

OCHANI R.; ASAD A.; YASMIN F.; *et al.* COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management. **Infez Med**, v. 29, n. 1, p. 20-36, 2021.

OLIVIERO B.; VARCHETTA S.; MELE D.; MANTOVANI S.; *et al.* Expansion of atypical memory B cells is a prominent feature of COVID-19. **Cell Mol Immunol**, v. 17, n. 10, p. 1101-1103, 2020.

PEREZ-ANDRES M.; PAIVA B.; NIETO W. G.; CARAUX A.; *et al.* Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 78, p. S47-60, 2010.

PRIMORAC D.; VRDOLJAK K.; BRLEK P.; *et al.* Adaptive Immune Responses and Immunity to SARS-CoV-2. **Front Immunol**, v. 13, p. 848582, 2022.

QIN C.; ZHOU L.; HU Z.; ZHANG S. *et al.* Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. **Clin Infect Dis**, v. 71, n. 15, p. 762-768, 2020.

QUAST I.; TARLINTON D. B cell memory: understanding COVID-19. **Immunity**, v. 54, n. 2, p. 205-210, 2021.

RAM-MOHAN N.; KIM D.; ZUDOCK E. J.; HASHEMI M. M.; *et al.* SARS-CoV-2 RNAemia Predicts Clinical Deterioration and Extrapulmonary Complications from COVID-19. **Clin Infect Dis**, v. 74, p. 218-226, 2022.

RIZZI M.; D'ONGHIA D.; TONELLO S.; MINISINI R.; *et al.* COVID-19 Biomarkers at the Crossroad between Patient Stratification and Targeted Therapy: The Role of Validated and Proposed Parameters. **Int J Mol Sci**, v. 24, p. 7099, 2023.

ROVITO R.; BONO V.; AUGELLO M.; TINCATI C.; *et al.* Association between SARS-CoV-2 RNAemia and dysregulated immune response in acutely ill hospitalized COVID-19 patients. **Sci Rep**, v. 12, p. 19658, 2022.

RÖLTGEN K.; BOYD S. D. Antibody and B cell responses to SARS-CoV-2 infection and vaccination. **Cell Host Microbe**, v. 29, n. 7, p. 1063-1075, 2021.

SALZER U.; SACK U.; FUCHS I. Flow Cytometry in the Diagnosis and Follow Up of Human Primary Immunodeficiencies. **EJIFCC**, v. 30, n. 4, p. 407-422, 2019.

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

SHEN J.; FAN J.; ZHAO Y.; *et al.* Innate and adaptive immunity to SARS-CoV-2 and predisposing factors. **Front Immunol**, v. 14, p. 1159326, 2023.

SHI Y.; WANG Y.; SHAO C.; HUANG J. *et al.* COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. **Cell Death Differ**, v. 27, n. 5, p. 1451-1454, 2020.

SHROTRI M.; VAN SCHALKWYK M. C. I.; POST N.; EDDY D.; *et al.* T cell response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. **PLoS One**, v. 16, n. 1, p. e0245532, 2021.

SHUWA H. A.; SHAW T. N.; KNIGHT S. B.; WEMYSS K.; *et al.* Alterations in T and B cell function persist in convalescent COVID-19 patients. **Med (N Y)**, v. 2, n. 6, p. 720-735, 2021.

SIMS G. P.; ETTINGER R.; SHIROTA Y.; YARBORO C. H., *et al.* Identification and characterization of circulating human transitional B cells. **Blood**, v. 105, n. 11, p. 4390-4398, 2005.

SOSA-HERNÁNDEZ V. A.; TORRES-RUIZ J.; CERVANTES-DÍAZ R.; ROMERO-RAMÍREZ S.; *et al.* B Cell Subsets as Severity-Associated Signatures in COVID-19 Patients. **Front Immunol**, v. 11, p. 611004, 2020.

SUN, L.; Wang X.; Saredy J.; Yuan Z.; *et al.* Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. **Redox Biology**, v. 37, p. 101759, 2020.

TAN M.; LIU Y.; ZHOU R.; DENG X.; *et al.* Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. **Immunology**, v. 160, n. 3, p. 261-268, 2020.

TO K. K.; SRIDHAR S.; CHIU K. H.; *et al.* Lessons learned 1 year after SARS-CoV-2 emergence leading to COVID-19 pandemic. **Emerg Microbes Infect**, v. 10, n. 1, p. 507-535, 2021.

V'KOVSKI P.; KRATZEL A.; STEINER S.; STALDER H.; THIEL V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nat Rev Microbiol**, v. 19, n. 3, p. 155-170, 2021.

WALTER L. O.; CARDOSO C. C.; SANTOS-PIRATH Í. M.; COSTA H. Z.; *et al.* The relationship between peripheral immune response and disease severity in SARS-CoV-2-infected subjects: A cross-sectional study. **Immunology**, v. 165, n. 4, p. 481-496, 2022.

WANG J.; JIANG M.; CHEN X.; MONTANER L. J. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. **J Leukoc Biol**, v. 108, n. 1, p. 17-41, 2020.

WEN W.; SU W.; TANG H.; LE W.; *et al.* Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing. **Cell Discov**, v. 4, p. 6:31, 2020 .

WILK A. J.; RUSTAGI A.; ZHAO N. Q.; ROQUE J.; *et al.* A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. **Nat Med**, v. 26, n. 7, p. 1070-1076, 2020.

WOODRUFF M. C.; RAMONELL R. P.; NGUYEN D. C.; CASHMAN K. S.; *et al.* Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. **Nat Immunol**, v. 21, n. 12, p. 1506-1516, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Coronavirus disease 2019 (COVID-19) **situation report**. 30 May 2023. World Health Organization; 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). COVID-19 clinical management: **living guidance**. 25 January 2021. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/338882>. Acesso em: 19 novembro 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Tracking SARS-CoV-2 variants**. Disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. Acesso em: 29 de julho 2022.

WU Z.; MCGOOGAN J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. **JAMA**, v. 323, n. 13, p. 1239-1242, 2020.

XU Z.; SHI L.; WANG Y.; ZHANG J. *et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. **Lancet Respir Med**, v. 8, n. 4, p. 420-422, 2020.

ZHANG B.; ZHOU X.; ZHU C.; SONG Y. *et al.* Immune Phenotyping Based on the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and IgG Level Predicts Disease Severity and Outcome for Patients With COVID-19. **Front Mol Biosci**, v. 7, p. 157, 2020.

ZHU N.; ZHANG D.; WANG W.; **et al.** A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med**, v. 382, n. 8, p. 727-733, 2020.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Análises Clínicas

Campus Universitário - Florianópolis, SC, 88049-000, Brasil

Tel: (048) 3721 2071

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Gostaríamos de convidá-lo a participar do projeto de pesquisa intitulado: Resposta Imune Dos Pacientes Infectados Pelo Sars-Cov-2, Um Estudo De Coorte conduzido pela Profa Dr^a Maria Cláudia Santos da Silva da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita. Por favor, leia com atenção as informações a seguir para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada. Este termo de consentimento livre e esclarecido cumpre as exigências contidas na Resolução CNS nº466/12.

QUAL A JUSTIFICATIVA E OBJETIVO DESTE ESTUDO?

A doença COVID-19 é uma infecção que ocorre nos pulmões e é causada pelo novo coronavírus, chamado de SARS-CoV-2. Enquanto que a maioria das pessoas com COVID-19 apresenta apenas a forma leve da doença, uma parcela desenvolve uma doença respiratória grave. Acredita-se que o aumento da gravidade da COVID-19, bem como o bloqueio do seu desenvolvimento esteja relacionada à proteção individual da pessoa infectada. Sabe-se que o coronavírus descontrola a proteção contra o vírus, o que pode atrasar a produção de anticorpos (defesa) contra o vírus e levar a piora da doença, que pode atingir vários órgãos, principalmente os pulmões. Além disso, não se sabe até o momento se os anticorpos (defesa) produzidos contra o coronavírus pelos infectados é capaz de evitar novas infecções. Dessa forma, a realização de

estudos para acompanhar e avaliar as mudanças que naturalmente acontecerão na resposta de pacientes com COVID-19 com o passar do tempo poderá auxiliar no entendimento de como a doença se desenvolve, o que pode auxiliar no tratamento dos pacientes. Diante disso, o objetivo do presente estudo é investigar o comportamento da resposta imune em pacientes com COVID-19 quando aparece a doença, e depois, após 6 e 12 meses, para ver se as mudanças de comportamento nessa resposta podem auxiliar na determinação da gravidade da doença.

QUAIS OS PROCEDIMENTOS DESTE ESTUDO?

Após o(a) Senhor(a) concordar em participar do estudo e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), serão coletados tubos de seu sangue. Além disso, o(a) Senhor(a) será contatado depois de 1, 6 e 12 meses pelos pesquisadores para realizar novas coletas de sangue e realização de exames. Sempre que possível, essas coletas de sangue serão realizadas com outras que o(a) Senhor(a) tenha que realizar devido a infecção por coronavírus. Após a coleta dos tubos de sangue, eles serão encaminhados ao laboratório de pesquisa, onde o sangue será utilizado para realizar os testes que avaliam algumas células ou proteínas envolvidas na resposta do seu sistema imune. Adicionalmente, será consultado o seu prontuário médico para coletarmos outras informações de interesse para o estudo, como resultados de exames de laboratório e tomografia computadorizada de tórax.

EU TENHO QUE PARTICIPAR? QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS ESPERADOS COM A PESQUISA?

Cabe ao Senhor(a) decidir se irá ou não participar. Mesmo que o(a) Senhor(a) não queira participar do estudo, isso não afetará de maneira nenhuma o padrão de cuidados que o(a) Senhor(a) receberá. Se decidir participar, o(a) Senhor(a) precisa assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Mesmo após ter assinado, é garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo para o(a) Senhor(a). Duas vias deste documento serão rubricadas e assinadas pelo(a) Senhor(a) e pelo pesquisador. Guarde cuidadosamente a sua via, pois é um documento que traz importantes informações de contato e garante os seus direitos como participante da

pesquisa. Pode ser que o(a) Senhor(a) não tenha nenhum benefício direto com o estudo. No entanto, com a conclusão deste trabalho, esperase identificar exames de laboratório que auxiliem a determinar o prognóstico de pessoas com COVID19, e compreender melhor a dinâmica da resposta imune ao coronavírus. Acredita-se que tal conhecimento auxiliará na forma como os médicos tratarão futuros pacientes, bem como facilitará ao governo brasileiro na tomada de decisões em políticas públicas relacionadas à COVID-19.

EXISTEM RISCOS OU DESCONFORTOS ASSOCIADOS COM A PARTICIPAÇÃO?

Não existem riscos importantes relacionados, pode ocorrer apenas com os procedimentos de coleta de sangue. No entanto, estes riscos serão potencialmente reduzidos pelos pesquisadores: a coleta de sangue será realizada em ambiente adequado e por equipe treinada. A equipe estará presente durante os procedimentos de coleta e tomará todos os cuidados necessários para que o (a) Senhor(a) tenha o mínimo de desconforto, apesar disto, poderá haver a possibilidade de formação de hematoma (manchas escuras) e sensação dolorosa no local da coleta. Se isso acontecer, a equipe tomará as medidas necessárias para diminuir este desconforto. Será assegurado o direito do(a) Senhor(a) não responder a qualquer pergunta se achar que ela é muito pessoal ou se sentir desconfortável em falar. Os dados/resultados obtidos serão armazenados codificados e manuseados com todo cuidado somente pelos pesquisadores para reduzir o risco de quebra de sigilo.

O QUE ACONTECERÁ COM AS INFORMAÇÕES DESTA PESQUISA E COMO OS MEUS DADOS PESSOAIS SERÃO UTILIZADOS?

As informações obtidas serão mantidas em sigilo e utilizadas exclusivamente para os fins desta pesquisa. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas. Seu anonimato será mantido quando da divulgação dos resultados nos meios científicos, pois os dados apresentados não incluirão nomes de pessoas, ou seja, apenas divulgaremos resultados obtidos como um todo. O(a) Senhor(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma.

QUE CUSTOS TEREI SE PARTICIPAR?

Não há despesas previstas para o(a) Senhor(a) em qualquer fase do estudo. Conforme previsto pelas normas brasileiras de pesquisa com a participação de seres humanos, o(a) Senhor(a) não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo. Caso alguma despesa extraordinária associada à pesquisa venha a ocorrer, o(a) Senhor(a) será ressarcido(a). Em qualquer momento, se sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, o(a) Senhor(a) terá direito a indenização.

COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?

Os pesquisadores são pessoas com quem você deve contar, no caso de dúvidas sobre o estudo ou sobre os seus direitos como participante. Quaisquer informações adicionais sobre a pesquisa, em qualquer momento, poderão ser solicitadas à Prof^a Dr^a Maria Cláudia Santos da Silva, do Departamento de Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde da UFSC (ACL/CCS/UFSC). A sua sala fica localizada no 2º piso do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH), ao lado do Núcleo Desenvolver – CEP 88040-970 - Florianópolis – SC. Seus dados de contato são: (48) 37212071; e-mail: maria.claudia.silva@ufsc.br. Em caso de dúvidas relacionadas aos procedimentos éticos da pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH). O CEPSH é um órgão colegiado interdisciplinar, deliberativo, consultivo e educativo, vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina, mas independente na tomada de decisões, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Dados para contato com o CEPSH- UFSC: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - Universidade Federal de Santa Catarina - Prédio Reitoria II - Rua: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC - CEP: 88.040-400 - Contato: (48) 3721-6094 ou cep.propesq@contato.ufsc.br

Segue abaixo os termos da declaração para poder participar do estudo:

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito do estudo “Resposta Imune Dos Pacientes Infectados Pelo Sars-Cov-2, Um Estudo De Coorte”. Eu discuti com os pesquisadores responsáveis sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar, caso seja necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento: antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo, perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Nome do participante/CPF

Assinatura

Data

ou

Responsável legal/CPF

Assinatura

Data

Responsável pelo estudo/CPF

Assinatura

Data

APÊNDICE B – PROTOCOLO DE SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES (PBMC)

Centrifugar a amostra por 10 minutos a 4.400 rpm para separar o plasma. Antes de retirar o plasma, fazer uma marca no tubo onde está o volume total. Dividir o volume de plasma em dois microtubos (criotubos) de 2mL devidamente identificados para armazenar em freezer -80°C. Adicionar PBS na mesma quantidade removida de plasma e homogeneizar por inversão.

Separação das PBMC:

1. Pipetar 2 mL de Ficoll-Hypaque a um tubo de poliestireno de 5mL identificado e deixar atingir a temperatura ambiente;
2. Em um outro tubo adicionar 1,5 mL de sangue total (sem plasma, com PBS) e 0,5 mL de PBS;
3. Inclinar o tubo de poliestireno de 5 mL e pipetar a amostra (2 mL de sangue total, sem plasma e com PBS) sobre o Ficoll com uma pipeta Pasteur (cuidar para não misturar);
4. Centrifugar por 30 minutos a 2.000 rpm;
5. Remover e descartar o sobrenadante, coletar o “anel” que contém as PBMC com uma pipeta Pasteur e transferir para outro tubo de 5mL identificado;
6. Adicionar PBS até o volume final de cerca de 4 mL, homogeneizar por inversão e centrifugar 5 minutos a 2.000 rpm;
7. Ressuspender o pellet com 100 uL de PBS;
8. Proceder a marcação do Tubo (marcação de superfície – protocolo Apêndice B);

Aquisição dos dados do tubo com PBMC para análise das células B:

Guardar 10.000 a 50.000 eventos CD19+ (stopping gate).

Fonte: Elaborada pelo autor (2024).

APÊNDICE C – PROTOCOLO DE MARCAÇÃO DE SUPERFÍCIE

1. Homogeneizar completamente a amostra de sangue-periférico (SP) com EDTA;
2. Identificar um tubo de poliestireno de 5 mL com as iniciais do paciente (amostra), e um tubo com as iniciais do paciente e a letra B (Branco).
3. Adicionar 30 uL de SP e 70uL de PBS ao tubo B;
4. Adicionar 100 uL de PBMC ressuspendidos com PBS;
5. Pipetar os anticorpos monoclonais, de acordo com o painel;
6. Homogeneizar em vórtex;
7. Incubar por 30 minutos no escuro e temperatura ambiente;
8. Adicionar 2 mL de solução lisante de hemácias, homogeneizar em vórtex;
9. Incubar por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente;
10. Centrifugar 5 minutos a 2.000 rpm;
11. Remover o sobrenadante com pipeta Pasteur e ressuspender a amostra em 2 mL de PBS;
12. Centrifugar 5 minutos a 2.000 rpm;
13. Remover o sobrenadante com pipeta Pasteur e ressuspender a amostra em 300 uL de PBS;
14. Adquirir imediatamente no citômetro ou manter em geladeira por no máximo 1 hora até a aquisição.

APÊNDICE D – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL DO PLASMA

Este protocolo consiste em três etapas: (I) preparação dos tampões, (II) preparação da amostra; (III) purificação do RNA.

Preparação dos tampões:

- Adicionar 250 uL de beta-mercaptoetanol (0,5%) em 100 mL de “Viral RNA Buffer” (presente no kit);
- Adicionar 24 mL de etanol (100%) no frasco de 6 mL de “Viral Wash Buffer”(presente no kit);

Preparação das amostras:

- Diluir as amostras em “DNA/RNA Shield (2x Concentrate)” em uma proporção de 1:1 e um volume final de 400 uL;

Purificação do RNA;

- Adicionar 800 uL de “Viral RNA Buffer” aos 400 uL da amostra diluída e misturar bem;
- Adicionar 5 µL do controle interno (fornecido no kit para RT-PCR) e homogeneizar em vortex por 10 segundos;
- Transferir a mistura para uma coluna “Zymo-Spin Column” (fornecido no kit) e centrifugar por 2 minutos à 10.000 x/g;
- Adicionar 400 uL de “Viral Wash Buffer” à coluna, centrifugar 30 segundos à 10,000 x/g e descartar o volume residual;
- Adicionar 40 uL de “DNase I Reaction Mix”(fornecido no kit) à coluna e incubar à temperatura ambiente por 15 minutos;
- Adicionar à coluna 500 uL de “RNA Prep Buffer”, centrifugar 30 segundos à 10,000 x/g e descartar o volume residual;

- Adicionar 500 uL de “Viral Wash Buffer” à coluna, centrifugar por 30 segundos à 10,000 x/g e descartar o volume residual;
- Adicionar 500 uL de etanol (100%) à coluna e centrifugar por um minuto , para garantir que todo o tampão de lavagem será removido.
- Cuidadosamente remover a coluna e colocala em outro tubo, livre de nuclease;
- Para eluir o RNA, adicionar 15 uL de ‘DNase/RNase-Free Water” (fornecido no kit) ao tubo com a coluna e centrifugar por 30 segundos à 10.000 x/g.

APÊNDICE F – PROTOCOLO DE RT-PCR

Preparação dos reagentes:

MIX CV19:

- Antes de utilizar, centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.

- Reconstituir a mix na área pré-PCR do laboratório. Abrir o tubo da mix liofilizada com cuidado para evitar que o pellet se desfaça e adicionar 390 μL do tampão de reidratação fornecido no kit. Homogeneizar gentilmente com a pipeta. Centrifugar brevemente (pulso) para remover bolhas geradas durante a homogeneização.

Controle Interno – CI:

- Manipular o controle interno (CI) na área pré-PCR do laboratório, longe do controle positivo liofilizado. Antes de utilizar, centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.

- Reconstituir o controle interno liofilizado com 500 μL de Água livre de RNase/DNase fornecida com o kit e homogeneizar completamente através de vortex.

- Uma vez que o controle interno tenha sido reconstituído, armazenar a -20°C . É recomendado armazenar em alíquotas para minimizar os ciclos de congelamento e descongelamento.

IMPORTANTE: O frasco de Água livre de RNase/DNase deve ser utilizado primeiramente para reconstituir o controle interno liofilizado, e em seguida pode ser utilizado para reconstituir o controle positivo.

Controle Positivo - CP

- Centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.

- Reconstituir o controle positivo liofilizado com 100 μL de Água livre de RNase/DNase fornecida com o kit.

- Uma vez que o controle positivo tenha sido reconstituído, armazenar a -20°C . É recomendado armazenar em alíquotas para minimizar os ciclos de congelamento e descongelamento.

Controle Negativo – CN:

- Solução pronta para uso.

- Antes de utilizar centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.

Procedimento de Amplificação:

- Adicionar 15 μ L da MIX CV19 em cada poço de acordo com o número de reações necessárias, incluindo amostras e controles.

- Adicionar e homogeneizar na Mix 5 μ L de RNA extraído de cada amostra, controle positivo reconstituído e controle negativo nos respectivos poços e fechar a placa/microtubos.

- Centrifugar brevemente a placa/microtubos.

- Colocar a placa/microtubos no equipamento.

- Após configurar a programação como descrito no subitem “Programação da PCR”, iniciar a corrida no termociclador.

Programação da PCR:

Etapa	Temperatura	Tempo	# Ciclos
Hold	45°C	15 min.	1
Hold	95°C	2 min.	1
Ciclo PCR (*Coleta de Dados)	95°C 60°C (*)	10 seg. 50 seg.	45

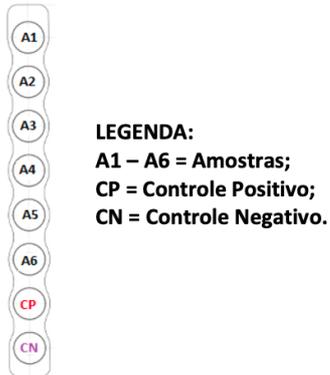
Seleção de detectores:

Selecionar os detectores informados na tabela abaixo:

Gene Alvo	Reporter
Gene ORF1ab	FAM
Controle interno	VIC
Gene N	ROX

Gabarito de teste:

Exemplo de gabarito para posicionamento das amostras e controles para a análise com o kit:



Validação da Corrida:

Validar a corrida como descrito na tabela abaixo:

Critério	Alvos	Controle Interno	Resultado do ensaio
Controle Negativo	Não detectado	Detectado inferior ao Ct de 35	Válido
	Não detectado	Detectado superior ao Ct de 35 / Não detectado	Inválido
	Detectado	Detectado	Inválido
Controle Positivo	Detectado	Não detectado	Válido
	Não detectado	Não detectado	Inválido
	Não detectado	Detectado	Inválido

Análise de amostras:

O usuário deve realizar uma análise cuidadosa no gráfico de amplificação para cada amostra e para todos os alvos após os parâmetros serem configurados, para confirmar a presença ou ausência do traço exponencial. Analisar os resultados das amostras como descrito na tabela abaixo:

Critério	Alvos		Controle interno (VIC)	resultado
	Gene ORF1a/b (FAM)	Gene N (ROX)		
Amostra	Detectado inferior ao Ct de 38	Detectado inferior ao Ct de 38	Detectado / Não Detectado	Amostra Positiva Válida
	Detectado inferior ao Ct de 38	Não Detectado / Detectado acima ou igual ao Ct de 38	Detectado / Não Detectado	Amostra Positiva Válida
	Não Detectado / Detectado acima ou igual ao Ct de 38	Detectado inferior ao Ct de 38	Detectado / Não Detectado	Amostra Sugestiva Positiva
	Não Detectado / Detectado acima ou igual ao Ct de 38	Não Detectado / Detectado acima ou igual ao Ct de 38	Detectado inferior ou igual ao Ct de 35	Amostra Negativa Válida
	Não Detectado / Detectado acima ou igual ao Ct de 38	Não Detectado / Detectado acima ou igual ao Ct de 38	Não Detectado / Detectado superior ou igual ao Ct de 35	Erro no experimento

APÊNDICE F - ARTIGO DA TESE PUBLICADO

ARTICLE

Lymphocyte B Subtypes in Peripheral Blood: A Prognostic Biomarker for COVID-19 Patients

Mariano Felisberto,^{a,b,†} Laura Otto Walter,^{a,b,†} Chandra Chiappin Cardoso,^c Íris Mattos Santos-Pirath,^c Heloisa Zorzi Costa,^c Rafaela Gartner,^b Isabel Werle,^b Eduarda Talita Bramorski Mohr,^{a,b} Julia Salvan da Rosa,^{a,b} Tainá Larissa Lubchinski,^{a,b} Iara Fabricia Kretzer,^b Ivete Ioshiko Masukawa,^{d,e} Patrícia de Almeida Vanny,^d Magali Chaves Luiz,^e Ana Carolina Rabello de Moraes,^{a,b} Maria Claudia Santos-Silva,^{a,c,b} and Eduardo Monguilhott Dalmarco ^{a,b,*}

Background: In view of the scientific gap in knowledge of the involvement of the B-cell compartment and clinical prognostic in SARS-CoV-2 infection, this work aims to evaluate the B-cell subsets and the presence of specific IgM and IgG, as well as neutralizing antibodies against SARS-CoV-2, in unvaccinated patients diagnosed with COVID-19.

Methods: This study included 133 patients with COVID-19. Cellular components were assessed by flow cytometry, and immunoglobulin levels and reactivity were measured by indirect enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: Our results showed no changes in less differentiated B cells. However, non-switched memory B cells (NS-MBCs) and class-switched memory B cells (CS-MBCs) were reduced in the patients with moderate disease. Also, plasmablasts and double-negative (DN) or "atypical" memory B cells were increased in groups of patients with moderate to critical conditions. In addition, the production of IgM, IgG, and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 demonstrated a positive correlation between the positivity of antibodies against SARS-CoV-2 and disease severity. Besides being related to the development of a more severe course of the disease, the increase in DN B-cell count also contributed to a poorer disease outcome in patients with a higher percentage of these cells. On the other hand, we observed an increase in the absolute number of CS-MBCs in patients with greater chances of survival.

Conclusions: This study demonstrates that the B-cell compartment may contribute to the development of clinical symptoms of COVID-19, with changes in B-cell subset counts linked to disease course and patient prognosis.

^aPostgraduate Program in Pharmacy, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil; ^bClinical Analysis Department, Health Sciences Center, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil; ^cClinical Analysis Department, Flow Cytometry Service, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil; ^dInfectious Disease Service, University Hospital—Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil; ^eInfectious Disease Service, State Health Department, Hospital Nereu Ramos, Florianópolis, SC, Brazil.

*Address correspondence to this author at: Postgraduate Program in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Delfino Conti St., 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil. E-mail: edalmarco@gmail.com or eduardo.dalmarco@ufsc.br.

[†]These authors contributed equally to this study.

Received August 17, 2023; accepted November 28, 2023.

<https://doi.org/10.1093/jalm/jfad123>

© Association for Diagnostics & Laboratory Medicine 2024. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

APÊNDICE G - PARTICIPAÇÕES EM ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORAMENTO



Received: 6 December 2021 | Accepted: 31 January 2022
DOI: 10.1111/imm.13457

ORIGINAL ARTICLE



The relationship between peripheral immune response and disease severity in SARS-CoV-2-infected subjects: A cross-sectional study

Laura Otto Walter¹ | Chandra Chiappin Cardoso² | Íris Mattos Santos-Pirath² |
Heloisa Zorzi Costa² | Rafaela Gartner³ | Isabel Werle³ |
Eduarda Talita Bramorski Mohr¹ | Julia Salvan da Rosa¹ | Mariano Felisberto¹ |
Iara Fabricia Kretzer³ | Ivete Ioshiko Masukawa^{4,5} | Patrícia de Almeida Vanny⁴ |
Magali Chaves Luiz⁵ | Ana Carolina Rabello de Moraes^{1,2} |
Eduardo Monguilhott Dalmarco^{1,2} | Maria Cláudia Santos-Silva^{1,2,3}

¹Postgraduate Program in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

²Division of Clinical Analysis, Flow Cytometry Service, University Hospital of the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

³Clinical Analysis Department, Health Sciences Center, Postgraduate Program in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

⁴Infectious Disease Service, University Hospital of the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

⁵Infectious Disease Service, Nereu Ramos Hospital, State Health Department, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

Correspondence

Laura Otto Walter and Maria Cláudia Santos-Silva, Postgraduate Program in Pharmacy, Clinical Analysis Department, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil.
Email: laurao.walter@gmail.com; maria.claudia.silva@ufsc.br

Senior author: Maria Cláudia Santos-Silva

Funding information

This study was supported by JBS S.A. (grant number: 14120/FEESC - Santa Catarina Teaching and Engineering Foundation) and by grants and fellowships from CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil). M. C. Santos-Silva and E. M. Dalmarco are recipients of a research fellowship from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Abstract

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a respiratory infection caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and marked by an intense inflammatory response and immune dysregulation in the most severe cases. In order to better clarify the relationship between peripheral immune system changes and the severity of COVID-19, this study aimed to evaluate the frequencies and absolute numbers of peripheral subsets of neutrophils, monocytes, and dendritic cells (DCs), in addition to quantifying the levels of inflammatory mediators. One hundred fifty-seven COVID-19 patients were stratified into mild, moderate, severe, and critical disease categories. The cellular components and circulating cytokines were assessed by flow cytometry. Nitric oxide (NOx) and myeloperoxidase (MPO) levels were measured by colourimetric tests. COVID-19 patients presented neutrophilia, with signs of emergency myelopoiesis. Alterations in the monocytic component were observed in patients with moderate to critical illness, with an increase in classical monocytes and a reduction in nonclassical monocytes, in addition to a reduction in the expression of HLA-DR in all subtypes of monocytes, indicating immunosuppression. DCs, especially plasmacytoid DCs, also showed a large reduction in moderate to critical patients. COVID-19 patients showed an increase in MPO, interleukin (IL)-12, IL-6, IL-10, and IL-8, accompanied by a reduction in IL-17A and NOx. IL-10 levels ≥ 14 pg/ml were strongly related to the worst outcome, with a sensitivity of 78.3% and a specificity of 79.1%. The results of this study indicate the presence of systemic



Received: 20 October 2022 | Accepted: 24 February 2023

DOI: 10.1111/imm.13635

ORIGINAL ARTICLE



T cell maturation is significantly affected by SARS-CoV-2 infection

Laura Otto Walter¹ | Chandra Chiappin Cardoso² | Íris Mattos Santos-Pirath² |
Heloisa Zorzi Costa² | Rafaela Gartner³ | Isabel Werle³ |
Eduarda Talita Bramorski Mohr¹ | Julia Salvan da Rosa¹ |
Tainá Larissa Lubschinski¹ | Mariano Felisberto¹ | Iara Fabricia Kretzer³ |
Ivete Ioshiko Masukawa^{4,5} | Patrícia de Almeida Vanny⁴ | Magali Chaves Luiz⁵ |
Ana Carolina Rabello de Moraes^{1,2} | Eduardo Monguilhott Dalmarco^{1,2} |
Maria Cláudia Santos-Silva^{1,2,3}

¹Postgraduate Program in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

²Division of Clinical Analysis, Flow Cytometry Service, University Hospital of the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

³Clinical Analysis Department, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

⁴Infectious Disease Service, University Hospital of the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

⁵Infectious Disease Service, Nereu Ramos Hospital, State Health Department, Florianópolis, Brazil

Correspondence

Maria Cláudia Santos-Silva, Postgraduate Program in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil.

Email: maria.claudia.silva@ufsc.br

Funding information

JBS S.A., Grant/Award Number: 14120/FEESC; CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel—Brazil); Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)

Abstract

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a respiratory tract infection caused by the new severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). An adequate T cell response is essential not only for fighting disease but also for the creation of immune memory. Thus, the present study aims to evaluate the T cells of patients with moderate, severe and critical COVID-19 not only at the time of illness but also 2 months after diagnosis to observe whether changes in this compartment persist. In this study, 166 COVID-19 patients were stratified into moderate/severe and critical disease categories. The maturation and activation of T cells were evaluated through flow cytometry. In addition, Treg cells were analysed. Until 15 days after diagnosis, patients presented a reduction in absolute and relative T lymphocyte counts. After 2 months, in moderate/severe patients, the counts returned to a similar level as that of the control group. In convalescent patients who had a critical illness, absolute T lymphocyte values increased considerably. Patients with active disease did not show differentiation of T cells. Nonetheless, after 2 months, patients with critical COVID-19 showed a significant increase in CD4⁺ EMRA (CD45RA⁺ effector memory) T lymphocytes. Furthermore, COVID-19 patients showed delayed T cell activation and reduced CD8⁺ suppressor T cells even 2 months after diagnosis. A reduction in CD4⁺ Treg cells was also observed, and their numbers returned to a similar level as that of healthy controls in convalescent patients. The results demonstrate that COVID-19 patients have a delayed activation and differentiation of T cells. In addition, these patients have a great reduction of T cells with a suppressor phenotype.

KEYWORDS

COVID-19, immune system, SARS-CoV-2, T lymphocytes, Treg



The anti-inflammatory activity of 2-iminothiazolidines: evidence for macrophage repolarization

Eduarda Talita Bramorski Mohr¹ · Tainá Larissa Lubschinski¹ · Julia Salvan da Rosa¹ · Guilherme Nicácio Vieira¹ · Mariano Felisberto¹ · Robson Ruan Romualdo¹ · Misael Ferreira² · Marcus Mandolesi Sá² · Eduardo Monguilhott Dalmarco¹

Received: 6 June 2022 / Accepted: 8 October 2022 / Published online: 22 October 2022
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2022

Abstract

Nowadays, macrophages are recognized as key cells involved in chronic inflammatory conditions, and play central roles in all inflammatory diseases and cancer. Due to their extensive involvement in the pathogenesis of inflammatory diseases, they are now considered a relevant therapeutic target in the development of new therapeutic strategies. 2-Iminothiazolidines are associated with important anti-inflammatory activity and represent a rich source for the development of new drugs and treatments. Our research focuses on evaluating the anti-inflammatory capacity of these compounds and their relationship with M1/M2 macrophage polarization. The results demonstrate that 2-iminothiazolidines have the capacity to decrease the levels of anti-inflammatory biomarkers, such as cytokines (IL-1 β , TNF- α , and IL-6), nitric oxide synthase (with impact on NO $_x$ production), and COX-2, following a significant decline in NF- κ B activation. We also observed an increase in levels of anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-13) in the *in vitro* model of RAW 264.7 macrophages induced by LPS. Moreover, this is the first report, suggesting that the anti-inflammatory activity of 2-iminothiazolidines is associated with the ability to enhance phagocytosis, increase Arginase-1 and CD206 expression, and increase the secretion of IL-10. Furthermore, an *in vivo* study using the acute lung injury model induced by LPS proved the anti-inflammatory activity of a selected 2-iminothiazolidine, named methyl 2-(benzoylimino)-3-methyl-4-(4-nitrobenzyl)-1,3-thiazolidine-4-carboxylate. All these results, taken together, lead us to hypothesize that the mechanism of anti-inflammatory effect observed with this compound is closely related to the ability of this compound to produce macrophage repolarization, from the M1 to the M2 phenotype.

Keywords 2-Iminothiazolidines · Anti-inflammatory · Pro-inflammatory cytokines · Anti-inflammatory cytokines · Macrophage repolarization

Introduction

The inflammatory process is a normal and adaptive response initiated after challenge by harmful stimuli (Aghasafari et al. 2019). This response is initiated locally; however, if the initial challenge is not eliminated, it can spread

systemically, leading to important changes in the normal homeostasis (Varela et al. 2018). An orchestrated acute inflammatory response is crucial to eliminate the challenge, with the concomitant initiation of tissue repair through the production of an effective immune memory (Fullerton and Gilroy 2016).

The first actors responsible for this intricate system are the resident immune cells. In this context, the macrophages play a pivotal role in recognizing the invading threat via pathogen recognition receptors (PRRs) (Gaber et al. 2017). The cell response is closely related to the activation of Toll-like receptors (TLR) upon recognition of specific ligands (e.g., lipopolysaccharides). Depending on the characterization of the harmful stimuli, different soluble mediators are produced, leading to the polarization of

✉ Eduardo Monguilhott Dalmarco
 edalmarco@gmail.com; eduardo.dalmarco@ufsc.br

¹ Department of Clinical Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário-Trindade, Florianópolis, SC 88040-970, Brazil

² Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário-Trindade, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil



Anti-inflammatory effects of coumarins on a murine model of acute lung injury (ALI): a brief systematic review

Gustavo Oliveira dos Reis¹ · Ziliani da Silva Buss² · Tainá Larissa Lubschinski¹ · Eduarda Talita Bramorski Mohr¹ · Mariano Felisberto¹ · Thais Elisete Pifatti Ribeiro¹ · Júlia Salvan da Rosa¹ · Filipe Carvalho Matheus³ · Eduardo Monguilhott Dalmarco^{1,2}

Received: 14 June 2023 / Accepted: 31 August 2023
 © The Author(s), under exclusive licence to Institute of Korean Medicine, Kyung Hee University 2023

Abstract

Acute lung injury (ALI) is one of most critical inflammatory conditions. It is produced by different scenarios, which poses a challenge for its clinical management and treatment. Coumarins, a class of natural and synthetic compounds, identified as important candidates for new drugs due to their anti-inflammatory action, could be an alternative for the development of new medicines to manage ALI. In this article, we compile the results of a literature review to conclude whether coumarins are as effective as anti-inflammatory compounds when used in LPS-induced ALI in mice. The outcomes used as parameters to answer this question were: the ability to reduce the influx of inflammatory cells, and edema in inflamed lungs. A total of eight manuscripts were reviewed that unanimously addressed the anti-inflammatory efficacy of coumarin compounds in inhibiting the formation of edema and the influx of leukocytes into the lungs in LPS-induced ALI in mice. Most of the studies also highlighted the role of compounds in decreasing the production of pro-inflammatory cytokines, and these effects were associated with interference in the cell signaling pathways, which were investigated by some of the studies included in this review. The assessment of methodological quality showed that the studies evaluated in this review had moderate to high risk of bias, related to the lack of data on randomization of the animals, and the blinding of the investigators, compromising the reliability of the experimental results of the published works. Leading the results of the manuscripts is possible affirm that coumarins have important anti-inflammatory effects in LPS-induced ALI in mice, and the effect is comparable to the reference anti-inflammatory drug dexamethasone.

✉ Eduardo Monguilhott Dalmarco
eduardo.dalmarco@ufsc.br; edalmarco@gmail.com

¹ Postgraduation Program in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil

² Department of Clinical Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário – Trindade, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

³ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil

Published online: 30 September 2023

Springer

Lessons from the field

Recruiting health professionals to the COVID-19 response, Brazil

Ianka Cristina Celuppi,^a Geovana dos Santos Lima,^a Alessandra Castro,^b Joao Pedro T Souza,^b Leonardo Mello,^b Gustavo Hoff,^b Mariano Felisberto,^a Celio Luiz Cunha,^a Jades Fernando Hammes,^a Raul Sidnei Wazlawick^a & Eduardo M Dalmarco^a

Problem The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic posed a major workforce challenge to Brazil, which has a large land area and a shortage of health workers in regions distant from the big cities.

Approach The Brazilian health ministry implemented a computerized solution to provide rapid support to states and municipalities to hire health professionals from large urban centres to work in underserved areas during the COVID-19 pandemic. We designed an online system for health professionals to register their willingness to work on the COVID-19 response; the system was launched to the public in April 2020.

Local setting Brazil is a large country with great heterogeneity in access to health care across its different regions. Before the initiative was launched, 5 156 020 health professionals were officially registered with professional councils. However, an estimated 3 200 000, more than 60% of them, were working in the two regions with the highest standard of living.

Relevant changes Up to February 2022, 1 007 138 health professionals had self-registered on the system, providing a sizeable database of professionals from a range of disciplines. Of these, 371 275 professionals were willing to work on the COVID-19 response in remote areas. By 1 February 2022, 157 755 professionals have been trained and deployed to these underserved areas.

Lessons learnt Partnership of the government with professional councils and the use of official communication channels were important strategies to improve registration and ensure the success of the scheme. We predict that the database will assist with future public health campaigns in Brazil.

Abstracts in [عربي](#), [中文](#), [Français](#), [Русский](#) and [Español](#) at the end of each article.

Introduction

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak was declared a pandemic by the World Health Organization in early 2020. Two years on, the pandemic still represents a major challenge for health systems, which must implement strategies to combat the spread of infection, restructure the health service network to meet the increased demand for treatment of respiratory symptoms, and continue to offer care for other health conditions.¹ Brazil too faced challenges such as a high demand for care, lack of hospital beds, illness of professionals, long-standing shortages of human resources and materials, and the need for professional training on the clinical management of people infected with COVID-19.^{2,3}

We describe how the Brazilian government implemented a computerized strategy to link health councils, health professionals and the government in the selection and assignment of health professionals to the most isolated and underserved regions of the country.

Local setting

The total population in Brazil is around 213.48 million people. Brazil's unified health system was established by the Brazilian Federal Constitution in 1988.⁴ Since then, Brazil's government has decentralized tasks and resources and increased the supply and access to health services, which has had a positive impact on the population's health and mortality.^{5,6} However, public health managers face some challenges in the implementation of the health policy, such as a lack of public infrastructure, lack of planning, difficulties in equitable distribution of resources

across regions, lack of human resources in some areas, and resistance to changes in health-care models and practices.⁷ While the two more developed regions of Brazil in terms of human development index have an estimated 3 200 000 (62%) of the 5 156 020 total health workforce, the two least developed regions have no more than about 700 000 (14%) of these professionals.

To meet the challenge of maintaining health assistance to all regions of the country during the COVID-19 pandemic, the health ministry coordinated workforce management policies and provided health professionals and institutional support to states and municipalities of the country. For this, the health ministry designed the initiative *O Brasil Conta Comigo*⁷ to provide institutional support for the recruitment of health professionals during the COVID-19 pandemic.

Approach

The initiative was instituted through a government ordinance on 31 March 2020,⁷ with the objective of training health professionals on COVID-19 clinical management protocols, after which they could participate in the national COVID-19 programme.

We designed an online system that would allow health professionals to self-register to work on the COVID-19 response. The aim was to create a database to support decisions on hiring health professionals by local health authority managers, thus facilitating the recruitment process, and ensuring that professionals were trained on clinical management protocols for COVID-19 infections. We developed the registration system following the model-view-controller architecture pattern, with Spring Framework (VMware, Palo Alto, United States of America), Java 8 (Oracle Corporation, Santa Clara, USA) and

^a Bridge Laboratory, Federal University of Santa Catarina, Lauro Linhares Street, Florianópolis, 88040-370, Brazil.

^b Department of Health Work Management, Ministry of Health, Brasília, Brazil.

Correspondence to Eduardo M Dalmarco (email: dalmarco@bridge.ufsc.br).

(Submitted: 18 February 2022 – Revised version received: 19 May 2022 – Accepted: 20 May 2022 – Published online: 13 June 2022)

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/CLSRComputer Law
&
Security Review

Organization and management of sensitive personal health data in electronic systems in countries with implemented data protection laws, lessons to Brazil: A brief systematic review

Miliane dos Santos Fantonelli^a, Wagner Luiz Zanotto^a,
Fabiana Magarrote Fernandes de Melo^a, Ianka Cristina Celuppi^{a,b},
Thaís Cardoso Lacerda^a, Fernanda Maia de Oliveira^a,
Jades Fernando Hammes^a, Célio Luiz Cunha^a, Mariano Felisberto^{a,c},
Ranieri Alves dos Santos^a, Daniel Scandolara^a, Julia Salvan da Rosa^c,
Júlia Meller Dias de Oliveira^{a,d}, Izabel Galhardo Demarchi^{a,c},
Raul Sidnei Wazlawick^{a,e}, Eduardo Monguilhott Dalmarco^{a,c,*}

^a Bridge Laboratory, Center of Technology Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^b Department of Nursing, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^c Postgraduation Program in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

^d Postgraduation Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

^e Department of Informatic and Statistical, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Access
Consent
Electronic health record
Electronic data processing

ABSTRACT

Personal health data has always been a big challenge for governments and health institutions around the world. Similarly, to Brazil, several countries have data protection laws, thus in this paper, we performed a systematic review to answer the question: what are the actions regarding organization and management of sensitive personal health data in countries with implemented data protection laws that can serve as examples of effective implementations of the data protection law in health systems? A total of 18 studies were included in this review, on outcomes consent and access. Regarding consent, we highlight processes for consent permission for sharing data with physicians or databases, for entering data in electronic medical records and for accessing data for conducting studies. About access: patient portal data, login/authorization for viewing medical data, database infrastructure and unauthorised access. The results showed that there are countries that are quite developed in terms of data protection in health, as we mentioned in the highlights about access and consent, but still we noticed a lack of documents about the work process involved in the im-

* Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Centro de Ciências de Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, SC 88040- 900, Brazil.

E-mail address: dalmarco@bridge.ufsc.br (E.M. Dalmarco).

<https://doi.org/10.1016/j.clsr.2023.105872>

0267-3649/© 2023 Miliane dos Santos Fantonelli, Wagner Luiz Zanotto, Fabiana Magarrote Fernandes de Melo, Ianka Cristina Celuppi, Thaís Cardoso Lacerda, Fernanda Maia de Oliveira, Jades Fernando Hammes, Célio Luiz Cunha, Mariano Felisberto, Ranieri Alves dos Santos, Daniel Scandolara, Julia Salvan da Rosa, Júlia Meller Dias de Oliveira, Izabel Galhardo Demarchi, Raul Sidnei Wazlawick, Eduardo Monguilhott Dalmarco. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Sistema de agendamento online: uma ferramenta do PEC e-SUS APS para facilitar o acesso à Atenção Primária no Brasil

PEC e-SUS APS online appointment scheduling system: a tool to facilitate access to Primary Care in Brazil

Lucas Postal (<https://orcid.org/0000-0001-7801-0573>)¹
 Ianka Cristina Celuppi (<https://orcid.org/0000-0002-2518-6644>)^{1,2}
 Geovana dos Santos Lima (<https://orcid.org/0000-0002-2299-5569>)^{1,2}
 Mariano Felisberto (<https://orcid.org/0000-0001-9268-4195>)^{1,3}
 Thaísa Cardoso Lacerda (<https://orcid.org/0000-0002-8185-5566>)¹
 Raul Sidnei Wazlawick (<https://orcid.org/0000-0003-4293-1359>)^{1,4}
 Eduardo Monguilhott Dalmarco (<https://orcid.org/0000-0002-5220-5396>)^{1,5}

Abstract Barriers faced by health services providing scheduled care result in high no-show rates. This article describes the main characteristics of an online appointment scheduling system incorporated into the citizens' electronic health record system (PEC e-SUS APS). Developed by the Bridge Laboratory, Federal University of Santa Catarina, which also developed the PEC e-SUS APS, the system allows patients to schedule appointments using the national patient communications hub, Conecte SUS Cidadão. The PEC e-SUS APS includes a professional's agenda module that allows patients to view available time slots and book and cancel appointments. Unfortunately, despite the benefits of online scheduling systems, their potential has been poorly exploited in Brazil. The main reasons for this include lack of information and training of health professionals on how to use the system and its potential benefits for Primary Health Care (PHC) services. Wider dissemination is needed to improve the adoption of the system and promote the routine use of this tool in health services in order to facilitate access to primary health care.

Key words Electronic Health Records, Mobile Applications, Appointments and Schedules, Primary Health Care, Unified Health System

Resumo A existência de barreiras nos serviços de demanda agendada resulta no elevado índice de absenteísmo. O objetivo deste manuscrito é apresentar as principais características do Sistema de Agendamento Online da estratégia e-SUS APS no Brasil. O Sistema de Agendamento Online desenvolvido pelo Laboratório Bridge da Universidade Federal de Santa Catarina, o qual também desenvolve o sistema de Prontuário Eletrônico do Cidadão (PEC e-SUS APS), e permite o agendamento de consultas através do aplicativo Conecte SUS Cidadão. O PEC e-SUS APS possui, entre outros, o módulo de agenda do profissional onde são realizadas as marcações e cancelamentos de consultas, permitindo a visualização de seus horários e disponibilidades. Embora o uso de sistemas de agendamento online seja capaz de fornecer benefícios, infelizmente eles têm sido pouco explorados na APS. Os principais motivos estão relacionados com a falta de informação e capacitação dos profissionais sobre o sistema e os impactos nos serviços prestados pelos estabelecimentos de saúde da APS. A fim de garantir a maior adoção e utilização do Sistema de Agendamento Online, é necessário ampliar a divulgação do sistema de modo a instituí-lo na rotina dos serviços como um instrumento facilitador do acesso à APS.

Palavras-chave Registros Eletrônicos de Saúde, Aplicativos Móveis, Agendamento de Consultas, Atenção Primária à Saúde, Sistema Único de Saúde

¹ Laboratório Bridge, Centro Tecnológico, R. Lauro Linhares 2055, Trindade, 88036-003 Florianópolis SC, Brasil. postal@bridge.ufsc.br

² Departamento de Enfermagem, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis SC, Brasil.

³ Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, UFSC, Florianópolis SC, Brasil.

⁴ Departamento de Informática e Estatística, Centro Tecnológico, UFSC, Florianópolis SC, Brasil.

⁵ Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, UFSC, Florianópolis SC, Brasil.

Factors associated with circulating zonulin in inflammatory bowel disease

Luiz Augusto Cardoso LACOMBE^{1,2}, Camila MATIOLLO^{2,3}, Julia Salvan da ROSA⁴,
Mariano FELISBERTO⁴, Eduardo Monguilhott DALMARCO⁴ and Leonardo de Lucca SCHIAVON^{1,2}

Received: 30 November 2021
Accepted: 21 January 2022

ABSTRACT – Background – Inflammatory bowel disease (IBD) comprises the spectrum between Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), a condition whose prevalence in countries such as Brazil has increased significantly in recent years. Changes in the intestinal epithelial barrier function and, consequently, an increase in intestinal permeability, have been suggested as important factors in the pathogenesis of different autoimmune conditions, including IBD. Therefore, there is a need for a practical tool to assess gut barrier integrity in these patients. **Objective** – To study factors associated with serum zonulin levels, a marker of intestinal permeability, in patients with IBD. **Methods** – This was a cross-sectional observational study that included 117 patients with IBD and 32 healthy controls. Disease activity was assessed by the Simple Clinical Colitis Activity Index (SCCAI) in UC and by the Harvey-Bradshaw Index (HBI) in CD subjects. Zonulin levels were measured by ELISA and inflammatory cytokines by Cytometric Bead Array, using commercially available kits. **Results** – The mean age of IBD patients was 44.0±15.9 years, 66.7% were female, 57 subjects were diagnosed with CD and 60 with UC. At evaluation, clinical remission was observed in 56.7% of CD patients and in 59.2% of UC subjects. No differences were observed in zonulin levels when comparing IBD patients with the control group (95.28 ng/mL vs 96.61 ng/mL, $P=0.573$) and when comparing patients with CD to those with UC (79.68 ng/mL vs 106.10 ng/mL, $P=0.887$). Among IBD group, zonulin concentrations were higher among females, correlated positively with body mass index (BMI) and age; and negatively with hemoglobin and hematocrit. In patients with UC, zonulin correlated negatively with hemoglobin, hematocrit, and albumin; and positively with BMI and SCCAI. Among CD patients, zonulin was positively correlated with age and BMI, but not with HBI. No correlations were observed between zonulin and circulating cytokines in IBD patients. **Conclusion** – In this cohort mostly comprised of patients in clinical remission, serum zonulin levels were not higher in patients with IBD than healthy controls, and correlated with variables not linked to baseline disease, such as sex, age and BMI. However, zonulin correlated with clinical and laboratory parameters of disease severity and activity among subjects with UC, but not among patients with CD. These findings indicate a potential role for zonulin as a biomarker in IBD, particularly in UC.

Keywords – Inflammatory bowel disease; intestinal permeability; zonulin; inflammatory cytokines; disease activity.

INTRODUCTION

Inflammatory bowel disease (IBD) comprises the spectrum between ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). Both are immune-mediated conditions characterized by chronic intestinal inflammation, being associated with greater morbidity and mortality and high costs to the health system⁽¹⁾. The pathophysiology of IBD is not yet fully understood, but genetic, environmental and intrinsic factors related to the individual with this condition contribute to the development of intestinal inflammation. Changes in the intestinal epithelial barrier function and, consequently, an increase in intestinal permeability, have been suggested as important factors in the pathogenesis of different autoimmune conditions, including IBD^(2,3).

The intestinal epithelial barrier separates the external micro-environment from the deeper layers of the host's mucosa. Thus, the intestinal lumen, which is located close to the apical region of

epithelial cells and contains a variety of macromolecules, bacterial compounds and antibodies, remains isolated from more internal regions of the organism, such as the lamina propria. For this to occur, it is necessary the integrity of the epithelial barrier, a property acquired through cell adhesion that is present through the junctional complex, composed of the structures tight junctions, adherens junctions and desmosomes. These protein structures have dynamic properties and influence the ability of the intestinal epithelium to control the passage of substrates through the paracellular pathway, being responsible, in part, for the intestinal permeability^(4,5).

Zonulin is a 47-kDa molecular weight protein described by Wang et al. which has the ability to increase intestinal permeability. Its identification was described by studies that investigated the pathophysiology of *Vibrio cholerae*, and identified a secondary enterotoxin, called zonula occludens toxin (Zot) and its endogenous homologous, then called zonulin⁽⁶⁾. The mechanism by which zonulin would modulate intestinal permeability, increasing it, was proposed

Declared conflict of interest of all authors: none

Disclosure of funding: no funding received

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Clínica Médica, Divisão de Gastroenterologia, Florianópolis, SC, Brasil. ² Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Florianópolis, SC, Brasil. ³ Hospital Universitário - UFSC/Esberth, Unidade de Laboratório de Análises Clínicas, Florianópolis, SC, Brasil. ⁴ Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, SC, Brasil.
Corresponding author: Luiz Augusto Cardoso Lacombe. E-mail: luiz_lacombe@hotmail.com