

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E
INFECTOLOGIA**

ANNA VICTÓRIA BERNARDES E BORGES

**ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL EM
PROFISSIONAIS DE SAÚDE ENVOLVIDOS NO
ENFRENTAMENTO DA COVID-19 NO MUNICÍPIO DE
UBERABA-MG.**

UBERABA

2022

ANNA VICTÓRIA BERNARDES E BORGES

**ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL EM
PROFISSIONAIS DE SAÚDE ENVOLVIDOS NO
ENFRENTAMENTO DA COVID-19 NO MUNICÍPIO DE
UBERABA-MG.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia, área de concentração Imunologia e Parasitologia Aplicadas, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências nas áreas de Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva.

Co-orientador: Virmondes Rodrigues Júnior

UBERABA

2022

Catálogo na fonte:
Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

B243a Borges, Anna Victória Bernardes e
 Análise da resposta imune celular e humoral em profissionais de
saúde envolvidos no enfrentamento da COVID-19 no município de
Uberaba-MG / Anna Victória Bernardes e Borges. -- 2022.
112 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Infectologia) –
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2022
Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior

1. COVID-19. 2. Imunidade. 3. Anticorpos. 4. Citocinas.
5. Vacinas. I. Silva, Marcos Vinícius da. II. Universidade Federal do
Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 619.98:578.834

ANNA VICTÓRIA BERNARDES E BORGES

**ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL EM
PROFISSIONAIS DE SAÚDE ENVOLVIDOS NO
ENFRENTAMENTO DA COVID-19 NO MUNICÍPIO DE
UBERABA-MG.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia, área de concentração Imunologia e Parasitologia Aplicadas, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências nas áreas de Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

02 de junho de 2022

Banca examinadora:

**Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva - Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

**Prof. David Nascimento Silva Teixeira
Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

**Prof. Marcelo Rodrigues Pinto
Universidade de Uberaba**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me conceder saúde, força e coragem, e por sempre me guiar pelo melhor caminho.

À minha família por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões e lutarem ao meu lado por sempre acreditarem em mim!

Aos meus amigos de curso e da vida que deram imenso suporte emocional mesmo quando não estavam de corpo presente.

Agradeço ao meu orientador por ter sido grande professor ao passar seu conhecimento com paciência e ternura.

Aos colegas de laboratório que tanto me ajudaram na realização de meus experimentos e tornaram meus dias mais leves e felizes. Assim como, colegas do Hospital de Clínicas-UFTM e do Laboratório de Patologia clínica que tornaram possível a realização do trabalho.

Aos voluntários que se disponibilizaram a fazer parte da pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Infectologia e à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, por me proporcionar a chance da realização do Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, incentivaram ou contribuíram para a realização deste estudo.

RESUMO

O SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, é da família dos coronavírus e especializaram-se para infectar humanos, burlando as defesas imunes do hospedeiro. A interação entre as proteínas do vírus e do hospedeiro faz com que se desenvolva a resposta imune celular e humoral. A imunidade celular contra o SARS-CoV-2 é caracterizada pela produção de citocinas, como IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10, e à morte de células infectadas. Já a imunidade humoral é determinada pela diferenciação dos plasmócitos, produzindo e secretando anticorpos específicos para controlar a replicação viral. Entre os grupos mais expostos ao contágio pelo vírus causador da COVID-19 estão os profissionais da saúde e pesquisadores. Por isso, nosso objetivo é dosar anticorpos anti-SARS-CoV-2 e citocinas para auxiliar na determinação de profissionais infectados assintomáticos, ser úteis no prognóstico e indicar repercussões sobre a imunidade. Foram coletados dados ocupacionais e de pré-exposição à COVID-19/vacinação e amostras de sangue de 267 profissionais em dois hospitais da cidade de Uberaba/MG, em dois momentos, com intervalo de 6 a 8 meses. Foram realizados ELISA para quantificação de anticorpos anti-SARS-CoV-2 baseados na proteína N e suas subclasses, além de citocinas. Onde 98 (36,7%) dos profissionais apresentaram IgG anti-SARS-CoV-2, indicando a COVID-19 prévia. Profissionais que desenvolviam atividades assistenciais tiveram maior nível de IgG em relação às atividades administrativas, devido ao possível contato com pacientes infectados. Houve queda de IgG e suas subclasses (IgG1 e IgG3) entre as coletas e em relação à positividade da sorologia de anticorpos anti-SARS-CoV-2, além de correlação negativa entre tempo e concentração de IgG. Foi visto aumento progressivo de IgG entre a administração de nenhuma e duas doses de vacinas e ao relacionar com a positividade ou não da sorologia de anticorpos anti-SARS-CoV-2. Houve diminuição de IFN- γ e IL-10 entre coletas. Nossos dados apontam significativo índice de prevalência de anticorpos anti-SARS-CoV-2 em profissionais da saúde. Conseguimos identificar um padrão da resposta imune humoral e celular, porém ainda são necessários mais estudos para compreender melhor esse padrão.

Palavras-Chaves: COVID-19, imunidade, anticorpos, citocinas, vacina.

ABSTRACT

SARS-CoV-2, the etiological agent of COVID-19, belongs to the coronavirus family and has specialized to infect humans, bypassing the host's immune defenses. The interaction between virus and host proteins causes the development of cellular and humoral immune responses. Cellular immunity against sars-cov-2 is characterized by the production of cytokines, such as IFN- γ , TNF- α , IL-6, and IL-10, and the death of infected cells. Humoral immunity is determined by the differentiation of plasma cells, producing and secreting specific antibodies to control viral replication. Among the groups most exposed to infection by the virus that causes COVID-19 are health professionals and researchers. The dosage of anti- SARS-CoV-2 antibodies and cytokines can help in the determination of asymptomatic infected professionals, be useful in the prognosis and indicate repercussions on immunity. Occupational and pre-exposure data to COVID-19/vaccination and blood samples were collected from 267 professionals in two hospitals in the city of Uberaba/MG, in two moments, with an interval of 6 to 8 months. ELISAs were performed to quantify anti-SARS-CoV-2 antibodies based on N protein and its subclasses, in addition to cytokines. Where 98 (36.7%) of professionals had anti-sars-cov-2 igg, indicating the previous covid-19. Professionals who developed care activities had a higher level of IgG in administrative activities, due to possible contact with infected patients. there was a decrease in igg and its subclasses (IgG 1 and IgG3) between collections and positive serology for anti-SARS-CoV-2 antibodies, in addition to a negative correlation between time and IgG concentration. A progressive increase in IgG was seen between the administration of none and two doses of vaccines and when related to the positivity or not of the serology of anti-SARS-CoV-2 antibodies. There was a decrease in IFN- γ and IL-10 between collections. Our data point to a significant prevalence rate of anti- SARS-CoV-2 antibodies in health professionals. We were able to identify a certain pattern of the humoral and cellular immune response, but further studies are needed to better understand this pattern.

Keywords: COVID-19, immunity, antibodies, cytokines, vaccines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura esquemática do SARS-CoV-2.....	16
Figura 2 – Interação vírus-célula hospedeira.....	19
Figura 3 – Imunidade Inata contra o SARS-CoV-2.....	22
Figura 4 – Imunidade Adaptativa contra o SARS-CoV-2.....	31
Figura 5 – Vacinas anti-SARS-CoV-2 administradas no Brasil.....	33
Organograma 1 – Atividade laboral de acordo com tempo de coleta.....	40
Figura 6 – Nível de IgG total e IgM em duas coletas.....	50
Figura 7 – Nível de IgG total em diferentes atividades laborais.....	51
Figura 8 – Nível de IgG total em diferentes classes de indivíduos positivados.....	52
Figura 9 – Nível de IgG total em autorrelato ou exames para COVID-19.....	53
Figura 10 – Nível de IgG total em relação às vacinas anti-SARS-CoV-2.....	55
Figura 11 – Nível de IgG total em relação às doses vacinais anti-SARS-CoV-2.....	56
Figura 12 – Nível de IgG subclasse em duas coletas.....	57
Figura 13 – Níveis de subclasses de IgG em relação à COVID-19.....	58
Figura 14 – Correlação entre subclasses de IgG.....	59
Figura 15 – Níveis de citocinas nas duas coletas.....	60
Figura 16 – Níveis de citocinas em relação à IgG total.....	61
Figura 17 – Níveis de citocinas em relação ao anticorpo IgM.....	62
Figura 18 – Níveis de citocinas em relação à sorologia para anticorpos anti-SARS-CoV-2.....	63
Figura 19 – Nível de citocinas em diferentes atividades laborais.....	64
Figura 20 – Nível de citocinas em profissionais da saúde com contato com pacientes positivados.....	65
Figura 21 – Nível de citocinas em profissionais da saúde com contato com colaboradores positivados.....	66
Figura 22 – Nível de citocinas em relação ao autorrelato de positividade para COVID-19.....	67
Figura 23 – Nível de citocinas em relação aos exames diagnósticos para COVID-19 realizados previamente.....	68
Figura 24 – Nível de citocinas em relação à vacinação antes da primeira coleta.....	69

Figura 25 – Nível de citocinas em relação à vacinação antes da segunda coleta.....	70
Figura 26 – Nível de citocinas em relação às doses vacinais anti-SARS-CoV-2.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados clínico-epidemiológicos.....	47
Tabela 2 – Comorbidades.....	101
Tabela 3 – Profissionais da Saúde.....	102

LISTA DE SIGLAS

BSA – Albumina de soro bovino
CatB – Cisteína proteases endossômicas, catepsina B
CatL – Cisteína proteases lisossomal, catepsina L
COVID-19 – Doença do Vírus Corona-19
CTLA-4 – Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
DAMPs – Padrões Moleculares Associados à Danos
DPP4 – Proteína dipeptidil peptidase 4
E – Envelope
ECA2 – Enzima conversora da angiotensina 2
EDTA – Ácido etilenodiaminotetra-acético
ELISA – Ensaio imunoenzimático
FOXP3 – *Forkhead box P3*
GATA3 – Proteína de transcrição GATA 3
GSDMD – Gasdermina D
HR – Repetição do heptada
IFN – Interferon
IgA – Imunoglobulina A
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IL – Interleucina
IRF – Fator regulador de Interferon
M – Membrana
MAVS – Proteína adaptadora de sinalização antiviral mitocondrial
MDA5 proteína 5 associada à diferenciação de melanoma
MERS-CoV – Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MG – Minas Gerais
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA – RNA mensageiro
MyD88 – Fator de diferenciação mielóide 88
N – Nucleocapsídeo
NAbs – Anticorpos neutralizantes

NF- κ B – Fator nuclear- κ B
NLR – Receptor do tipo NOD
NLRP3 – Domínio pirina da família NLR contendo 3
NSP – Proteína não estrutural
NTD – Domínio N-terminal
OMS – Organização Mundial da Saúde
ORF – Quadro de leitura aberta
PAMPs – Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PBS – Tampão fosfato-salino
PD-1 – Proteína de morte celular programada 1
PRR – Receptor de reconhecimento de padrões
RBD – Domínio de ligação ao receptor
RIG-I receptores semelhantes a gene I induzíveis por ácido retinóico
RLR – Receptor do tipo RIG
RNA – Ácido ribonucleico
ROR γ t – Receptor órfão relacionado ao ácido retinóico receptor γ t
S – Spike
SARS-CoV – Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV-2 – Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
STAT – Transdutor de sinal e do ativador de transcrição
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos
T reg – T regulatória
TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR – Receptores de células T
TGF- β – Fator de crescimento transformador
Th – T auxiliares
TIGIT – Imunoglobulina de células T e domínio ITIM
TIM-3 – Imunoglobulina de células T e domínio de mucina contendo-3
TLR – Receptor do tipo Toll
TMB – Tetrametilbenzidina
TMPRSS2 – Serina protease transmembrana celular 2
TNF – Fator de necrose tumoral
TOM70 – Translocases da membrana externa 70
TRIF – Adaptador contendo domínio TIR induzindo IFN-beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	O SARS-CoV-2	14
1.2	ESTRUTURA DO SARS-CoV-2	15
1.3	IMUNIDADE INATA CONTRA O SARS-CoV-2	19
1.3.1	Receptores de reconhecimento viral	20
1.3.2	Evasão da imunidade inata pelo SARS-CoV-2	22
1.4	IMUNIDADE ADAPTATIVA CONTRA O SARS-CoV-2	23
1.4.1	Imunidade adaptativa celular	23
1.4.2	Imunidade adaptativa humoral	29
1.5	RESPOSTAS VACINAIS CONTRA O SARS-CoV-2	32
2	JUSTIFICATIVA	37
3	OBJETIVO	38
3.1	OBJETIVO GERAL	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	39
4.2	POPULAÇÃO ALVO	39
4.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS PARTICIPANTES	39
4.4	COLETA DE DADOS E AMOSTRAS	40
4.4.1	Coleta de dados	40
4.4.2	Coleta de amostra	41
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS	41
4.6	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS	42
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
5	RESULTADOS	45
5.1	PADRÃO DA IMUNIDADE HUMORAL DOS PROFISSIONAIS DA SAÚDE	45
5.1.1	Dados clínico-epidemiológicos	45
5.1.2	Produção de IgG total	50
5.1.3	Nível de IgG total em relação às atividades laborais	50
5.1.4	Nível de IgG total em relação ao contato dos profissionais com indivíduos positivados	51

5.1.5	Nível de IgG total em relação à exposição prévia ao SARS-CoV-2	52
5.1.6	Nível de IgG total em relação às vacinas anti-SARS-CoV-2.....	53
5.1.7	Nível de IgG total em relação às doses vacinais anti-SARS-CoV-2	55
5.1.8	Produção de IgG subclasse.....	56
5.1.9	Níveis de subclasse de IgG em relação à sorologia para anticorpos anti-SARS-CoV-2	57
5.1.10	Correlação entre subclasses de IgG.....	58
5.2	PADRÃO DA IMUNIDADE CELULAR DOS PROFISSIONAIS DA SAÚDE. ...	59
5.2.1	Nível de citocinas nas duas coletas	59
5.2.2	Nível de citocinas em relação à IgG total	60
5.2.3	Nível de citocinas em relação ao anticorpo IgM	61
5.2.4	Nível de citocinas em relação à sorologia para anticorpos anti-SARS-CoV-2.....	63
5.2.5	Nível de citocinas em relação às atividades laborais	64
5.2.6	Nível de citocinas em relação ao contato dos profissionais com indivíduos positivados	65
5.2.7	Nível de citocinas em relação à exposição prévia ao SARS-CoV-2	67
5.2.8	Nível de citocinas em relação às vacinas anti-SARS-CoV-2	69
5.2.9	Nível de citocinas em relação às doses vacinais anti-SARS-CoV-2	71
6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÃO.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86
	ANEXO A – CEP.....	95
	ANEXO B – TCLE.....	97
	ANEXO C – Comorbidades.....	101
	ANEXO D – Profissionais da Saúde.....	102
	ANEXO E – Formulário de Pesquisa.....	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 O SARS-CoV-2

Os coronavírus são uma grande família de RNA vírus que causam doenças que variam do resfriado comum às doenças mais graves com intenso comprometimento pulmonar, tendo período de incubação de aproximadamente cinco a seis dias (BENVENUTO *et al.*, 2020; HARRISON; LIN; WANG, 2020). Os coronavírus são zoonóticos, o que significa que são transmitidos entre animais e pessoas. Vários coronavírus que circulam em animais não infectam humanos, porém mutações, mais frequentes nos vírus de ácido ribonucleico (RNA), podem mudar o padrão de circulação (BENVENUTO *et al.*, 2020).

O Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), causador da COVID-19 (do inglês, *Corona Virus Disease-19*), é um membro do gênero *Betacoronavírus*, do subgênero *Sarbecovirus*, que foi descoberta em 2019 na província de Wuhan, China (WU *et al.*, 2020). Para o SARS-CoV-2, há indícios na árvore filogenética que sugerem que o coronavírus do tipo SARS derivados de morcego (Bat-SARS-Like-CoV) é geneticamente mais semelhante ao SARS-CoV-2 sustentando a hipótese de que a cadeia de transmissão começou no morcego e chegou ao humano (BENVENUTO *et al.*, 2020). Outra hipótese zoonótica envolve os pangolins, estes são animais mamíferos que a carne é consumida em alguns países do oriente e abrigam grande variedade de vírus, incluindo os coronavírus. Os coronavírus isolados de pangolins demonstraram semelhança genética ao SARS-CoV-2, sugerindo a recombinação viral do pangolin-CoV com o Bat-SARS-Like-CoV. Esses dados sugerem a participação na cadeia de transmissão, a partir do potencial dos pangolins de atuarem como hospedeiro intermediário do SARS-CoV-2 (DHAMA *et al.*, 2020). Não é a primeira vez que os coronavírus sofrem mutações e causam doenças graves em humanos. Infecções com gravidade semelhante, como a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) e a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV) foram descritas nas últimas décadas (*Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy, 2020*).

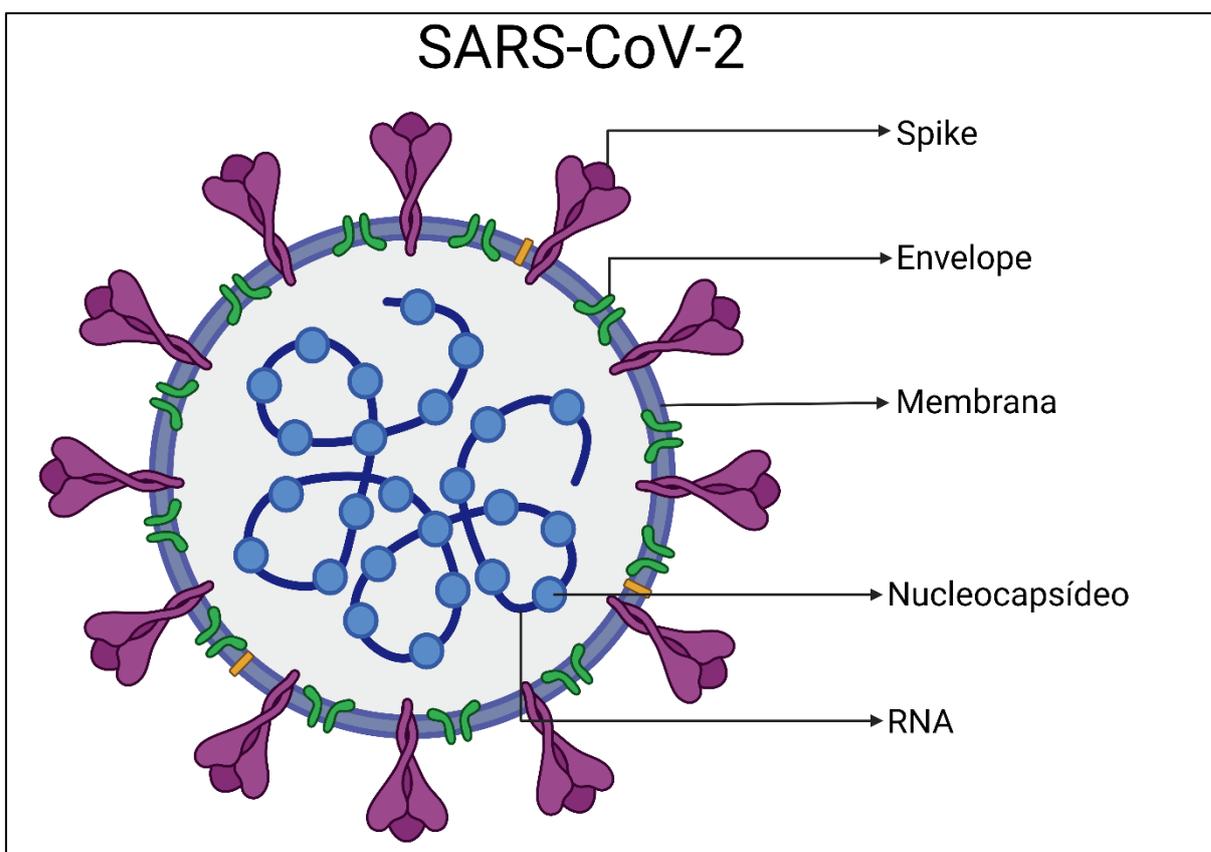
A pandemia pelo SARS-CoV-2 representa hoje o maior desafio de saúde da humanidade. Os boletins diários das autoridades de saúde de diversos países e o consolidado da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam a presença global da doença e que em 22 de junho de 2022 apresentava cerca de 537 milhões de indivíduos contaminados e cerca de 6,3 milhões de mortes (WHO₃, 2022). Destes números indicados pela OMS há cerca de 31,7 milhões de indivíduos contaminados e cerca de 669 mil mortes referentes à população brasileira (WHO₁, 2022).

O contágio pelo SARS-CoV-2 ocorre principalmente através de gotículas respiratórias, mas aerossol, contato direto com superfícies contaminadas e transmissão fecal-oral também foram relatados como possíveis meios de transmissão (HARRISON; LIN; WANG, 2020). A transmissão direta por gotículas respiratórias é reforçada pela replicação produtiva do SARS-CoV-2 tanto no trato respiratório superior quanto no trato respiratório inferior, em sua maioria ocorrendo em ambientes internos (HARRISON; LIN; WANG, 2020; BULFONE *et al.*, 2021). Compreender a importância e as formas de transmissão para a atual pandemia de COVID-19 é essencial para que as autoridades de saúde pública tomem as medidas de controle de doenças mais abrangentes e eficazes, que incluem o uso de máscaras e isolamento físico (HARRISON; LIN; WANG, 2020).

1.2 ESTRUTURA DO SARS-CoV-2

Como o SARS-CoV-2 não possui maquinaria própria para replicação, ele explora a maquinaria da célula hospedeira para sua própria replicação e disseminação. A base da fisiopatologia da COVID-19 envolve as interações vírus-hospedeiro, o conhecimento acerca do assunto é de grande importância. Os coronavírus codificam quatro proteínas estruturais (Figura 1) principais: proteínas das espículas virais (S de “*Spike*”), membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídeos (N), além de codificar proteínas não estruturais (NSPs), como nsp1-15.

Figura 1 – Estrutura esquemática do SARS-CoV-2



Fonte: Da Autora, 2022.

A estrutura viral é formada principalmente pelas proteínas estruturais, como as proteínas spike (S), membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídeo (N). Essa figura foi criada no programa "BioRender Customer Service".

A proteína estrutural M é a mais abundante no vírus e responsável por dar forma ao envelope viral. Ela se liga ao nucleocapsídeo e organiza a montagem do vírion. A proteína E desempenha papel multifuncional na patogênese, montagem e liberação do vírus, pois esse pequeno polipeptídeo atua como uma viroporina e sua inativação ou ausência pode conferir virulência alternativa devido as alterações na morfologia e no tropismo. Também auxilia na secreção de vírions maduros das células hospedeiras. A proteína N possui diversas funções, como na formação de complexos com o genoma viral, facilitando a interação da proteína M e aumentando a eficiência da transcrição do vírus. Além disso, pode interferir na sinalização celular, assim como na resposta antiviral, atuando como antagonista do interferon (IFN) (DHAMA *et al.*, 2020; KIRTIPAL; BHARADWAJ; KANG, 2020).

As proteínas S são responsáveis por mediar a entrada dos coronavírus em células humanas pela ligação dessa proteína em moléculas de superfícies expressas em diversos órgãos e tecidos humanos, incluindo os tecidos do trato gastrointestinal, respiratório e placentários, além de órgãos como rins e coração (LI₁ *et al.*, 2003; VALDES *et al.*, 2006; TROUGAKOS *et al.*, 2021). As proteínas S são compostas por duas subunidades funcionais (Fig. 1). A primeira subunidade S1 consiste no domínio N-terminal (NTD) e no domínio de ligação ao receptor (RBD), e sua função é ligar ao receptor na célula hospedeira. A segunda subunidade S2 contém mais domínios, como o peptídeo de fusão, a repetição do heptada 1 e 2 (HRs), a hélice central, o domínio conector e transmembranar, e a cauda citoplasmática, e sua função é fundir as membranas dos vírus e células hospedeiras, quando ativada (WANG₂ *et al.*, 2020).

Dentre as proteínas humanas receptoras expressas estão diversas moléculas que servem para ancorar, catalisar e unir a partícula viral com a célula hospedeira. São elas enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2), serina protease transmembrana celular 2 (TMPRSS2), cisteína proteases endossômicas / lisossomais catepsina B e L (CatB/L), furinas e proteína dipeptidil peptidase 4 da célula hospedeira (DPP4) (VARGHESE *et al.*, 2020; TROUGAKOS *et al.*, 2021).

O principal receptor da célula hospedeira para o SARS-CoV-2 é o receptor da ECA2. A TMPRSS2, principal protease co-receptora do hospedeiro, forma um complexo com ECA2 na superfície da célula hospedeira, facilitando assim o direcionamento viral e a entrada na célula hospedeira e cliva a proteína S em suas subunidades. Juntamente com a TMPRSS2 há outras proteases que são responsáveis pela iniciação da proteína S, as CatB/L. Furina e outras proteases do hospedeiro também podem estar envolvidas na clivagem da proteína S do SARS-CoV-2, pois ela possui um local de clivagem para a furina. Os coronavírus podem usar a proteína DPP4 para a entrada, de modo que a proteína S no vírus interaja com DPP4 (HOFFMANN *et al.*, 2020; VARGHESE *et al.*, 2020).

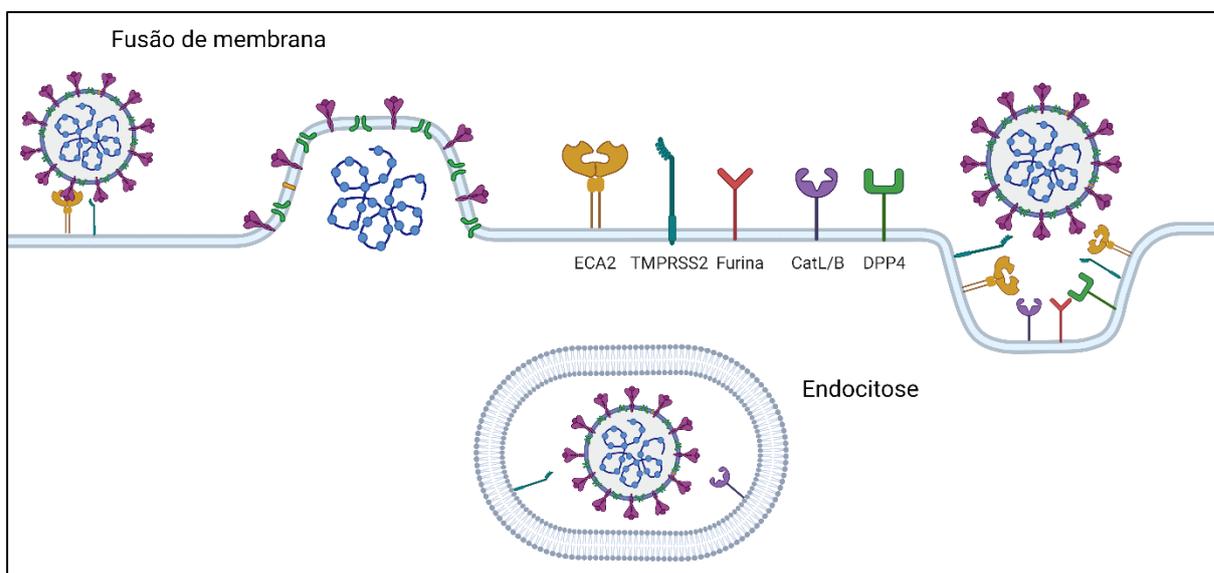
Os vírus podem interagir com exossomos, infectando células a partir deles. A aminopeptidase N presente em mastócitos pode servir como um receptor. Outras proteínas, como a CD9, um exemplo de tetraspanina, estão em toda superfície da membrana exossômica e podem participar de eventos de fusão de coronavírus. Essa interação vírus com exossomos contribui para a infecção de outras células, pois após

a captação do exossomo, seu conteúdo é entregue às células receptoras e promove a suscetibilidade à infecção por vírus (HASSANPOUR *et al.*, 2020).

A interação vírus-célula já foi em parte elucidada. A porção NTD da proteína S viral direciona o receptor ECA2 da célula hospedeira e a porção RBD facilita a ligação com o receptor. Após a ligação do receptor através da porção S1, a porção S2 com seus vários peptídeos de fusão e duas HRs conservadas, promovem o direcionamento e fusão do vírus através da membrana celular, além de rompimento da membrana da célula hospedeira. A proteína S viral é clivada por várias proteases do hospedeiro, como a TMPRSS2 e a CatL presente no endossomo durante a entrada viral, permitindo que a infecção ocorra pela via endossômica (VARGHESE *et al.*, 2020; WANG₂ *et al.*, 2020) (Fig. 2).

Após a liberação do genoma do coronavírus no citoplasma da célula hospedeira, eles utilizam a maquinaria da célula para replicar seu RNA genômico de sentido negativo, flanqueados por regiões não traduzidas 5' e 3' que contêm estruturas de RNA secundárias. Na extremidade 5', há a presença de dois grandes quadros de leitura aberta (ORFs; ORF1a e ORF1b). ORF1a e ORF1b codificam cerca de 15 NSPs que compõem o complexo de replicação e transcrição viral que abrange, enzimas de processamento, modificação e revisão de RNA necessárias para manter a integridade do genoma de coronavírus. Já na extremidade 3', encontram-se ORFs que codificam proteínas estruturais, intercaladas por ORFs que codificam proteínas acessórias para formar RNAs mensageiros (mRNAs) subgenômicos. As proteínas acessórias são variáveis, exibem alto nível de conservação. Suas funções ainda não estão completamente elucidadas, apesar de acreditar-se que contribuam para modular as respostas do hospedeiro e são determinantes da patogenicidade viral (DHAMA *et al.*, 2020; ORTIZ-PRADO *et al.*, 2020; V'KOVSKI *et al.*, 2021).

Figura 2 – Interação vírus-célula hospedeira



Fonte: Da Autora, 2022.

A proteína S viral direciona o receptor ECA2 da célula hospedeira e a porção RBD facilita a ligação com o receptor. A proteína S viral é clivada por várias proteases do hospedeiro, como a TMPRSS2 e a CatL presente no endossomo durante a entrada viral, permitindo que a infecção ocorra pela via endossômica. Essa figura foi criada no programa "BioRender Customer Service".

1.3 IMUNIDADE INATA CONTRA O SARS-CoV-2

Para compreender a fisiopatogênese da COVID-19 é necessário entender resposta imune do hospedeiro perante a infecção. As respostas imunes conservadas contra diferentes vírus envolvem duas fases. A fase inicial mediada por componentes da resposta imune inata, visando contenção viral. Já a segunda fase é a resposta imune adaptativa, mais sofisticada e dividida em imunidade humoral e celular, capaz de erradicar o patógeno e gerar memória imunológica. As etapas de entrada e replicação viral do SARS-CoV-2 na célula hospedeira são oportunidades para o sistema imunológico detectar componentes virais. Como por exemplo, durante a interação vírus-célula, as proteínas virais são expostas aos sensores de superfície e sensores citoplasmáticos da célula hospedeira que podem detectar proteínas S, E e M do vírion e ácidos nucleicos.

1.3.1 Receptores de reconhecimento viral

A resposta imunológica inata é desencadeada pelo reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Danos e Patógenos (DAMPs/PAMPs). A identificação desses padrões ocorre por Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), como os Receptores do tipo Toll (TLRs), Receptores do tipo RIG (RLRs) e Receptores do tipo NOD (NLRs). Isso desencadeia uma cascata de sinalização que ativam fatores de transcrição, que leva à secreção de citocinas, como IFNs, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL)-6, entre outras. Essas citocinas induzirão atividade imune nas células hospedeiras, podendo ser atividades antivirais, que subsequentemente induzirão respostas imunes adaptativas, como iremos abordar mais detalhadamente (ORTIZ-PRADO *et al.*, 2020; TRIGGLE, 2021; DIAMOND; KANNEGANTI, 2022; WANG² *et al.*, 2022).

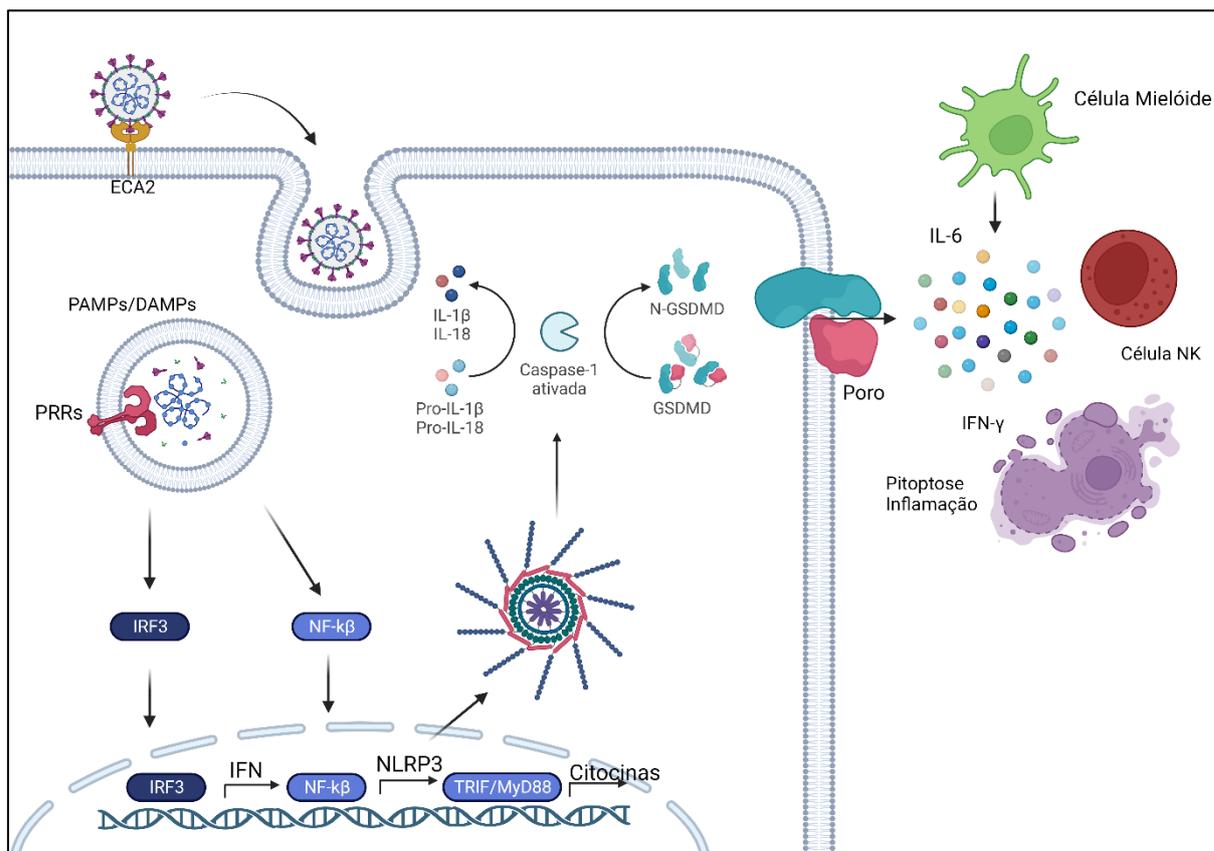
Muitos vírus ativam o sistema imune inato através do reconhecimento de PAMPs por TLRs em células do organismo humano, incluindo células do trato respiratório humano e células imunes inatas, como os monócitos e neutrófilos. Os TLRs geralmente transduzem sinais por meio do Fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) e do Adaptador contendo domínio TIR induzindo IFN- β (TRIF), duas moléculas adaptadoras que resultam na ativação transcricional de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-1 β , de sensores imunes inatos, como NLRP3 (do inglês *Family pirin domain containing 3*), e outros fatores de transcrição, alguns dos quais têm atividade antiviral direta (KAYESH; KOHARA; TSUKIYAMA-KOHARA, 2021; DIAMOND; KANNEGANTI, 2022).

O RNA de fita simples do SARS-CoV-2 também pode ser detectado intracelularmente por RLRs, que incluem Receptores semelhantes a gene I induzíveis por ácido retinóico (RIG-I) e Proteína 5 associada à diferenciação de melanoma (MDA5), uma enzima do receptor RIG-I. Após a ativação de RIG-I e MDA5, estas proteínas translocam para as mitocôndrias, onde formam complexo com a Proteína adaptadora de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS). Este complexo ativa fatores de transcrição, como o fator de transcrição associado ao receptor de TNF (TRAF), responsáveis regulação chave das vias de IFN (ANAEIGOUDARI *et al.*, 2021; DIAMOND; KANNEGANTI, 2022).

O inflamassoma é um complexo macromolecular que consiste em receptores, caspases, domínio de ativação e recrutamento de caspases, conhecido por sua defesa contra patógenos perfurando membranas e liberando citocinas que levam à morte celular na forma de inflamação conhecida como piroptose. Os NLRs também respondem à infecção pelo SARS-CoV-2 e induzem a produção de IFNs tipo I e outras citocinas pró-inflamatórias. Na resposta antiviral, o NLRP3, um tipo de NLRs, é um dos sensores de inflamassoma mais bem caracterizados. Ele é acionado em resposta à antígenos, levando à ativação da caspase-1, produção e liberação de IL-1 β e IL-18 bioativos e clivagem da gasdermina D (GSDMD), que forma poros na membrana plasmática conduzindo a ruptura da mesma e morte celular piroptótica (Fig. 3). A ativação do NLRP3 em resposta ao SARS-CoV-2 pode ocorrer diretamente após a proteína S se ligar à ECA2 nas células hospedeiras ou pelo reconhecimento de ORF3a, ORF8b, a proteína E e RNA viral (DIAMOND; KANNEGANTI, 2022; WANG₂ *et al.*, 2022).

Os DAMPs contendo ácido nucleico, assim como os PAMPs, desempenham um papel central na patologia dos pacientes com COVID-19 grave. A infecção das células hospedeiras leva à liberação de DAMPs que são reconhecidos por PRRs. Essa identificação desencadeia a ativação de MyD88 e algumas quinases, o que resulta na translocação de Fator nuclear- κ B (NF- κ B) para o núcleo, transcrição de mediadores pró-inflamatórios e regulação de processos celulares, como por exemplo apoptose, adesão e angiogênese. DAMPs também podem ativar NLRP3, levando à respostas típicas de inflamassoma, como morte celular por piroptose, recrutamento de células imunes e proliferação celular. Por esses fatores, acredita-se que essas moléculas desencadeiam uma cascata imune inflamatória amplificada caracterizada por um ciclo de ativação das células imunes e perda adicional da integridade do tecido, desempenhando um papel exacerbador na COVID-19 (NAQVI *et al.*, 2022.; PARTHASARATHY *et al.*, 2022) (Fig. 3).

Figura 3 – Imunidade Inata contra o SARS-CoV-2



Fonte: Da Autora, 2022.

Os vírus SARS-CoV-2 se ligam ao receptor ECA2 para entrada na célula. O RNA viral é reconhecido por PRRs, que desencadeia respostas transcricionais e alterações citoplasmáticas que ativam o IRF2, TRIF e MyD88, levando à produção de citocinas. Além desses fatores, há ativação do inflamassoma NLRP3. Isso leva à clivagem do precursor IL-1 β (pro-IL-1 β), pro-IL-18 e gasdermina D, permitindo a secreção de IL-1 β e IL-18, e formação de poros na membrana celular. Essas alterações coletivamente induzem piroptose e inflamação. Essa figura foi criada no programa "BioRender Customer Service".

1.3.2 Evasão da imunidade inata pelo SARS-CoV-2

Apesar do hospedeiro ter desenvolvido estratégias de imunidade inata para combater a invasão de patógenos, o SARS-CoV-2 possui suas próprias maneiras de escapar da defesa do hospedeiro. Pensando nas interações vírus-hospedeiro e na evasão da resposta imune, os Coronavírus organizam estratégias para ocultar PAMPs virais, que podem ser detectados por PRRs. A presença de NSPs no citoplasma celular podem afetar a tradução celular no citoplasma para favorecer mRNAs virais sobre mRNA celular e funcionar como um antagonista. Assim, ele diminui a expressão de interferons tipo I e III e de outras proteínas hospedeiras da resposta imune

inata. Essa diminuição da expressão pode ser devido ao favorecimento do mRNA viral, citado anteriormente, ou então do impedimento fosforilação de fatores de transcrição, como STAT e IRF, o que leva à diminuição da produção de IFN. Os NSPs também visam a via NF- κ B, através da regulação da fosforilação de NF- κ B e da translocação nuclear. Estes são considerados antagonistas do inflamassoma NLRP3, por reprimir a atividade da caspase-1 e a secreção de IL-1 β (MIN *et al.*, 2021; V'KOVSKI *et al.*, 2021; WANG₂ *et al.*, 2022).

As proteínas ORFs e estruturais do SARS-CoV demonstraram interferir em vários níveis da via de sinalização do IFN- γ celular, inibindo assim de forma eficiente respostas imunes inatas. A interferência pode ocorrer na inibição da translocação e fosforilação de fatores de transcrição, como IRF3 e STAT, ou então pela repressão à expressão de IFN- γ por associação com translocases da membrana externa 70 (TOM70) ou da fosforilação e translocação de IRF3 através da interação com RIG-I e MDA5. A interação entre ORF8 e o Complexo principal de histocompatibilidade (MHC) suprime a imunidade inata desencadeando a degradação do MHC-1 dependente do lisossomo. Além disso, a proteína M também pode impedir a indução de IFNs do tipo I através do direcionamento da sinalização RIG-I e MDA5. A proteína N também é considerada fator inibitório da produção de interferon tipo I influenciando a agregação MAVS (V'KOVSKI *et al.*, 2021; WANG₂ *et al.*, 2022).

1.4 IMUNIDADE ADAPTATIVA CONTRA O SARS-CoV-2

A imunidade adaptativa contra o vírus SARS-CoV-2 envolve as respostas imunes celulares e humorais, mediadas pelas células T e B, respectivamente. Nesse sentido, a imunidade adaptativa é responsável pela possível erradicação do vírus e memória imunológica.

1.4.1 Imunidade adaptativa celular

A imunidade mediada por células T auxiliares (CD4⁺) e citotóxicas (CD8⁺) contra o SARS-CoV-2, induzem resposta efetiva devido sua função de produção de

citocinas e à morte de células infectadas. Uma das características iniciais da COVID-19, em relação aos leucócitos, é a notável linfopenia, particularmente células T CD4⁺ e CD8⁺, que se correlaciona com a gravidade da doença, principalmente nos níveis de TCD8⁺ ou no aumento da razão CD4⁺/CD8⁺ (ORTIZ-PRADO *et al.*, 2020; PENG *et al.*, 2020; TRIGGLE *et al.*, 2021). Esta disfunção e depleção dos linfócitos pode ser devido à mecanismos virais. O SARS-CoV-2 pode possivelmente infectar células T através de receptor ECA2 dos linfócitos, além de infectar baço e linfonodos, podendo causar atrofia do baço e necrose do linfonodo, induzindo a linfopenia. Também pode haver o aumento do nível de citocinas, como TNF- α , IL-6 e IL-10 pode promover a diminuição do número de células T (YANG₁ *et al.*, 2020).

Em geral, as células T CD8⁺ possuem funções efetoras citotóxicas antivirais, focando na eliminação de células infectadas por vírus (WEISKOPF *et al.*, 2020). As células T CD8⁺ específicas para o SARS-CoV-2, cerca de 70% das células efetoras deste tipo de linfócito, apresentaram um fenótipo mais efetor com altos níveis de expressão de moléculas citotóxicas (Fig. 4a), como perforina e granzima, e citocinas como IFN- γ e TNF- α . Porém, em casos graves de COVID-19, essas moléculas são reduzidas devido à linfopenia de células T CD8⁺. Células T CD8⁺ funcionais são importantes na eliminação e recuperação viral, pois geram respostas imunes antivirais contra a proteína S (GRIFONI *et al.*, 2020; ZHANG₁ *et al.*, 2020; TOOR *et al.*, 2021).

Após a infecção com o SARS-CoV-2, as células T CD4⁺ podem ser rapidamente diferenciadas e ativadas, por fatores de transcrição e expressão de citocinas e quimiocinas. As células T auxiliares (Th), podem ser divididas em subconjuntos, sendo a resposta de perfil Th1, Th2, Th17 e T regulatória (Treg) de importância durante a infecção pelo SARS-CoV-2 (GRIFFIN *et al.*, 2020; YANG₁ *et al.*, 2020).

As células de padrão imune Th1 que expressam IFN- γ , TNF- α e IL-2 são importantes para resposta contra patógenos intracelulares, como os vírus (Fig. 4a). Suas ações estimulam as respostas citotóxicas e a resposta humoral, e tem sido associado à resolução da doença (DE CANDIA *et al.*, 2021; WEISKOPF *et al.*, 2020; PETRONE *et al.*, 2021). Estas células secretam GM-CSF, o que induz ainda mais monócitos com altos níveis de IL-6 e acelera a inflamação. (WEISKOPF *et al.*, 2020; YANG₁ *et al.*, 2020). Na COVID-19 a resposta de perfil Th1 demonstrou ter relação

com o desenvolvimento de resposta humoral para IgGs. Estudos demonstraram que pacientes deficientes de resposta de células T CD4⁺ efetiva, por conta de falha no desenvolvimento da resposta imune adaptativa de células T, eram deficientes em anticorpos IgG, sendo falha também a resposta de células B. No geral, tornando-os mais propensos à doença grave e ao óbito (GRIFFIN *et al.*, 2020; PETRONE *et al.*, 2021).

Concomitante ao perfil Th1, temos a ação dos perfis Th2 e Th17 durante o curso da COVID-19. O perfil imune Th2, diferenciado pelo fator de transcrição da Proteína de transcrição GATA 3 (GATA3), expressa as citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, e ajudam a proliferação de células B (GRIFFIN *et al.*, 2020; WEISKOPF *et al.* 2020; DE CANDIA *et al.*, 2021). Já o perfil de células Th17 detectada em pacientes com COVID-19, diferenciado pelo fator de transcrição do Receptor órfão relacionado ao ácido retinóico receptor γ t (ROR γ t), produzem as citocinas inflamatórias IL-17 e IL-22, que por sua vez recruta monócitos/macrófagos e neutrófilos para o local da infecção, mediando o dano tecidual. Também há a estimulação de citocinas, que interferem na ativação de Th1 (GRIFFIN *et al.*, 2020; WEISKOPF *et al.* 2020; YANG₁ *et al.* 2020; PETRONE *et al.*, 2021) (Fig. 4b).

Células Treg podem expressar CD25 e o fator de transcrição FOXP3 (do inglês *forkhead box P3*) e desempenham papel fundamental no controle anti-inflamatório da resposta imunológica, via produção de IL-10, IL-35 e Fator de crescimento transformador (TGF)- β (DE CANDIA *et al.*, 2021). Na COVID-19, foram descritos dois perfis de comportamento da Treg. O primeiro onde ocorre o aumento das células Treg, na doença leve e grave, e da expressão de CD25, na doença grave, pode indicar ativação funcional de Treg (TAN *et al.* 2020). Em contrapartida, o segundo demonstra que a redução de Treg em pacientes graves pode ser devido a hiperativação de células T efectoras. Este fato pode ter impacto no estímulo à inflamação sistêmica em pacientes graves com a COVID-19 (TOOR *et al.*, 2020; DE CANDIA *et al.*, 2021).

A COVID-19 pode levar à falha da função das células T CD4⁺ e T CD8⁺, além de promover suas ativações excessivas, ocasionando possível exaustão das células T e diminuindo a imunidade antiviral (ZHENG₂ *et al.*, 2020; ZHENG₃ *et al.*, 2020). Estudos demonstraram essa possível exaustão através da análise de marcadores de expressão de memória efectora relacionado à exaustão que apresentaram

significativamente maior no grupo de pacientes, como Proteína de morte celular programada 1 (PD-1) e CD57, Imunoglobulina de células T e domínio de mucina contendo-3 (TIM-3), Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) e Imunoglobulina de células T e domínio ITIM (TIGIT) (DE BIASI *et al.*, 2020, DIAO *et al.*, 2020; ZHENG₂ *et al.*, 2020) (Fig. 4b).

As citocinas são um grupo de moléculas sinalizadoras polipeptídicas responsáveis por regular um grande número de processos biológicos via receptores de superfície celular e são produzidas majoritariamente pelos linfócitos T (BARTEE; MCFADDEN, 2013). O aumento na concentração de citocinas é comumente observado no sangue de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2.

A IL-6 foi identificada como uma importante citocina envolvida no prognóstico da COVID-19. Tem sido relatado que a IL-6 possui efeitos regenerativos e anti-inflamatórios mediados pelo processo de sinalização convencional, embora também exerça efeitos pró-inflamatórios mediados por trans-sinalização, como no caso de infecções virais (COSTELA-RUIZ *et al.*, 2020). Na COVID-19, a IL-6 pode ser produzida e liberada por vários mecanismos diferentes, mais comumente através de cascatas de sinalização TLR e RLR. O TLR7 reconhece o RNA viral e, em seguida, recruta a MyD88, ativando fatores de transcrição, para o núcleo para transcrever mRNAs de muitas citocinas, incluindo IL-6. Outra via de produção é através da ligação viral à ECA2, onde a expressão da angiotensina II é aumentada e o acúmulo desse peptídeo induz a produção de citocinas, como o TNF- α e formas de receptores solúveis de IL-6. Esta interleucina possui diversas ações imunológicas e biológicas, incluindo direção da diferenciação de células imunológicas, produção de imunoglobulinas, respostas sentinela a patógenos invasores (JORDAN, 2021; WANG₂ *et al.*, 2022). Observou-se que podem danificar a capacidade das células T em relação às células dendríticas, comprometendo a viabilidade dessas células e a eliminação de patógenos pelo macrófago. Também foi demonstrado que uma alta expressão de IL-6 em pacientes com COVID-19 pode acelerar o processo inflamatório, contribuindo para a tempestade de citocinas e piorando o prognóstico, associada a danos cardíacos nesses pacientes (COSTELA-RUIZ *et al.*, 2020).

Outras citocinas como IFN- γ e TNF- α são produzidas e liberadas pelos estímulos da sinalização de PRRs, através da ativação de fatores de transcrição responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias. Em relação ao SARS-CoV-2, a combinação de TNF- α e IFN- γ contribui para a patogênese da doença, ao induzir sinalização do Transdutor de sinal e do ativador de transcrição (STAT)1 e Fator regulador de Interferon (IRF)1 e levar à ativação da caspase-8 para conduzir a morte celular por PANoptose (ORTIZ-PRADO *et al.*, 2020; DIAMOND; KANNEGANTI, 2022). A PANoptose é uma via de morte celular inflamatória programada dependente de PANoptossomas, complexos contendo caspase(s) com ou sem componentes do inflamassoma e proteínas contendo um motivo de interação homotípica. Esta via de morte celular ocorre através da ativação coletiva de piroptose, apoptose e necroptose (CHRISTGEN *et al.*, 2020).

O IFN- γ participa de inúmeras funções imunológicas e processos inflamatórios. Promove a ativação de macrófagos e apresentação de antígenos, principalmente na resposta antiviral. É difícil classificar o IFN- γ como uma citocina pró ou anti-inflamatória, dada a sua complexa e variada função. Níveis séricos de IFN- γ eram mais altos em pacientes com COVID-19 do que em indivíduos saudáveis e propuseram que a elevação desta e de outras citocinas poderia resultar da ativação de células de perfil Th1 e Th2. Os níveis dessa citocina eram mais baixos em linfócitos T CD4⁺ nos pacientes com sintomas mais graves, sugerindo que a infecção pode afetar inicialmente as células T, reduzindo a produção de IFN- γ (COSTELA-RUIZ *et al.*, 2020).

O TNF- α tem sido relacionado a respostas pró-inflamatórias e é produzido por vários tipos celulares, como monócitos, macrófagos, células T, entre outros. Está envolvido na regulação de processos inflamatórios, doenças infecciosas e tumores malignos. Foi observado que os níveis séricos de TNF- α estão elevados em pacientes com COVID-19 e são mais elevados com doença mais grave, tendo sido relacionado anteriormente a um prognóstico ruim em pacientes com SARS-CoV e MERS (COSTELA-RUIZ *et al.*, 2020).

A citocina anti-inflamatória IL-10 desempenha papel crítico na resolução da inflamação periférica. A IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF α e IL-6 citadas acima, em vários tipos de células e previne a maturação

das células dendríticas bloqueando a IL-12. No entanto, a IL-10 pode ter efeitos imunostimuladores, incluindo a estimulação da produção de IFN- γ pelas células T CD8⁺ (COSTELA-RUIZ *et al.*, 2020). O aumento de IL-6 junto com interleucina-10 antecipa a progressão clínica da COVID-19. Dados demonstraram que a IL-10 poderia aumentar a expressão de ECA2 na linha celular Calu-3, derivada do pulmão, e células endoteliais *in vitro*. Já em pacientes foi descrito maior aumento em paciente graves, tendo fortes correlações com os níveis de IL-6 e proteína C reativa. Níveis elevados de IL-10 podem representar uma reação para conter a inflamação, como um mecanismo de *feedback* negativo (HAN *et al.*, 2020; LAING *et al.*, 2020; ALBINI *et al.*, 2021).

As citocinas, principalmente pró-inflamatórias, podem ser liberadas por células infectadas ou células do sistema imune, através da ativação de PRRs. Em sua função fisiológica, a liberação de citocinas em quantidade normal é importante para facilitar o reparo tecidual e defender o corpo da invasão do patógeno. Entretanto, a liberação de uma grande quantidade de citocinas ao mesmo tempo é uma situação prejudicial, conhecida como tempestade de citocinas, que causa danos teciduais em diversos órgãos (Fig. 4b). Já foi elucidado que outros vírus da família do Coronavírus, como o SARS-CoV e o MERS-CoV, apresentam grande alteração do nível de citocinas e quimiocinas em casos graves, incluindo, IL-6, IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-12, CXCL8, CXCL9 e CXCL10. Há forte correlação entre o aumento dos fatores pró-inflamatórios, dano tecidual e inflamação grave, levando à tempestade de citocinas (JORDAN, 2021; WANG₂ *et al.*, 2022).

O reconhecimento de antígenos do SARS-CoV-2 por células T pré-existentes e reatividade cruzadas geradas durante a infecção anterior com coronavírus humano pode contribuir para a presença frequente de células T reativas ao SARS-CoV-2 em pacientes com a COVID-19 (MATEUS *et al.*, 2020; PENG *et al.*, 2020; TRIGGLE *et al.*, 2021).

1.4.2 Imunidade adaptativa humoral

Sob estimulação por antígenos as células B dos centros germinativos podem proliferar e se diferenciar em plasmócitos, produzindo e secretando anticorpos específicos para a neutralização viral. Após a infecção inicial com o SARS-CoV-2, as respostas iniciais são realizadas pela Imunoglobulina M (IgM) e Imunoglobulina A (IgA), mas não está claro se podem modificar o curso da doença. As respostas de Imunoglobulina G (IgG) são subseqüentes e espera-se que forneçam imunidade ao vírus, além de indução de respostas IgG anti-SARS-CoV-2 de alta afinidade com o desenvolvimento de células B de memória. Ao contrário das células T, os anticorpos podem resultar em uma imunidade esterilizante rápida, por não precisar da apresentação do antígeno e reinício da resposta de memória antes que a eliminação do vírus possa ser realizada (JORDAN, 2021) (Fig. 4a).

Indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 produzem anticorpos IgG direcionados às proteínas virais N, S e à porção específica RBD, que são de particular relevância por sua alta probabilidade de ser neutralizante. Os níveis de anticorpos IgM e IgG em pacientes com COVID-19 estão relacionados ao diagnóstico sorológico e à previsão de prognóstico (ZHENG₁ *et al.*, 2022). Aparentemente, a quantidade de anticorpos em amostras de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 é dependente do número de RNA viral presente: quanto menor a carga viral, menor o nível de anticorpos presentes e a gravidade da evolução clínica (ALVIN *et al.*, 2021). Dados indicaram uma possível concentração mais baixa de anticorpos anti-SARS-CoV-2 em pacientes assintomáticos, com rápida queda, enquanto nos sintomáticos leves, há um ritmo de queda mais lento, mas com produção mais contínua. Pacientes graves têm altos níveis de anticorpos, especialmente IgG (FIGUEIREDO-CAMPOS *et al.*, 2020; WANG₁ *et al.*, 2020; ALVIN *et al.*, 2021).

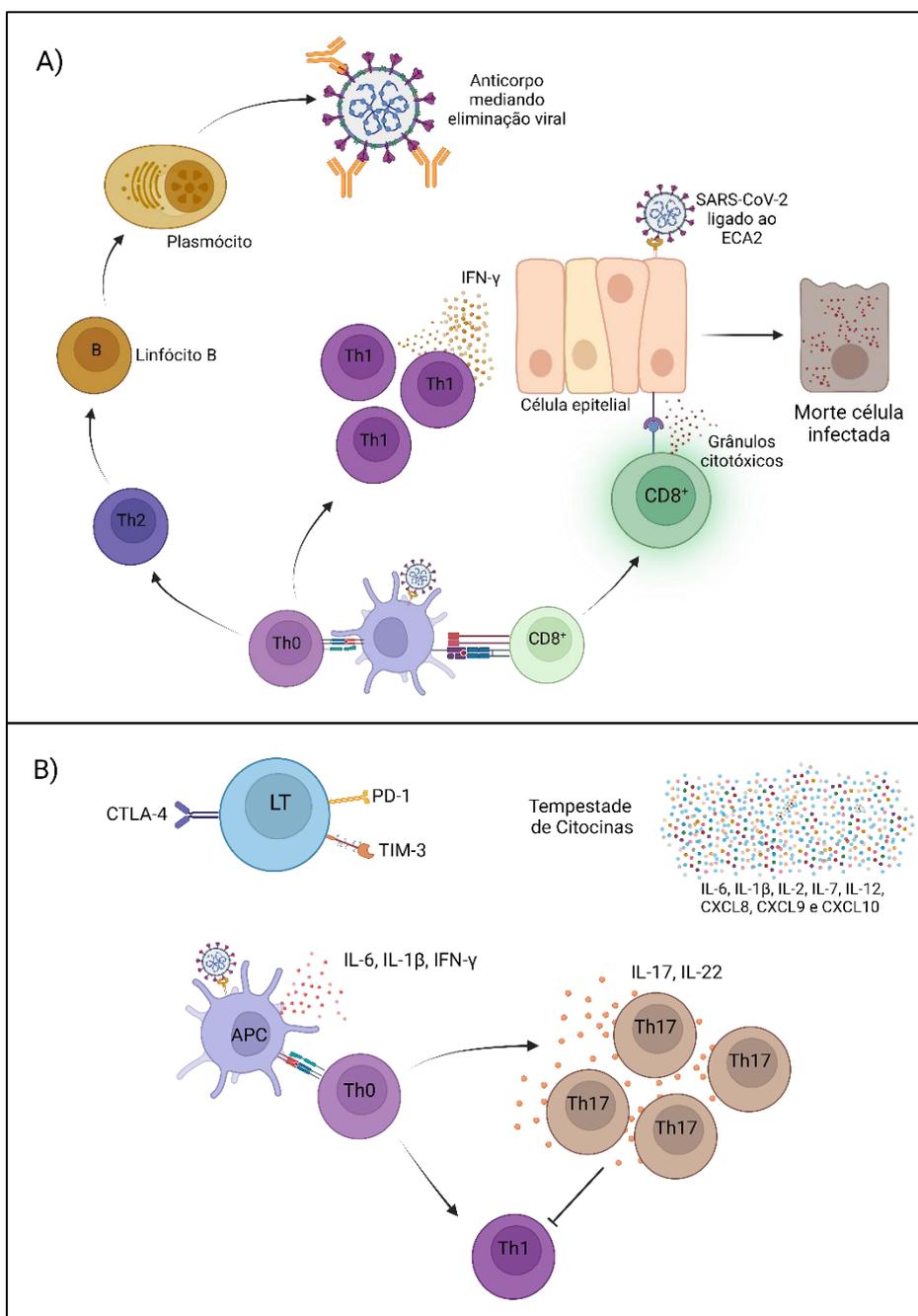
A natureza dos anticorpos direcionados ao SARS-CoV-2 é alvo de estudos. Artigos recentes mostraram que os anticorpos que se ligam ao RBD são críticos para a imunidade protetora de longo prazo e estão associados à melhor sobrevida do paciente, pois previnem a ligação da proteína S ao receptor ECA2. Esses estudos chegam à conclusão de que a quantificação de anticorpos para epítomos específicos oferece uma avaliação mais precisa da imunidade esterilizante (BARNES *et al.*, 2020; SECCHI *et al.*, 2020; JORDAN, 2021). Ainda pouco se sabe

sobre a variação e função dos isótipos de IgG na infecção pelo SARS-CoV-2. Em estudos que quantificaram isótipos de IgG, foi possível observar que IgG3 exibiu a maior reatividade, seguida de IgG1, enquanto IgG2 e IgG4 não apresentou ou apresentou pouca reatividade aos antígenos virais (AMANAT *et al.*, 2020; WHITCOMBE *et al.*, 2021).

Assim como na imunidade celular, pode haver uma certa reação imunológica cruzada entre o SARS-CoV-2, o SARS-CoV e o MERS-CoV, o que pode fornecer proteção imunológica temporária. Estudo relevante, desenvolvidos na China, mostrou que pode haver um anticorpo anti-Coronavírus pré-existente reconhecendo o SARS-CoV-2 em indivíduos não infectados. Já outro estudo indicou que anticorpos anti-SARS-CoV-2 podem apresentar reatividade cruzada não neutralizante com a proteína Hemaglutinina, do vírus influenza, por exemplo. Portanto, identificar epítomos conservados visando anticorpos neutralizantes (NAbs) pode ajudar no desenvolvimento de uma vacina universal que protege contra os coronavírus atuais e futuros (MURUGAVELU *et al.*, 2021; ZHENG₁ *et al.*, 2021).

Apesar destas informações, ainda existem preocupações e mais estudos precisam ser realizados para esclarecer algumas questões. Questões essas acerca da relação da resposta humoral com a reinfecção pelo SARS-CoV-2, do tempo de permanência do anticorpo e se o desaparecimento do anticorpo se correlaciona com o desaparecimento da memória específica ao vírus.

Figura 4 – Imunidade Adaptativa contra SARS-CoV-2



Fonte: Da Autora, 2022.

Em A) no ambiente imunológico normal, as células epiteliais infectadas degradam as partículas virais e as apresentam às células T citotóxicas, que liberam grânulos citotóxicos e eliminam células infectadas. As células T auxiliares reconhecem os antígenos apresentados via APC polarizam principalmente para Th1, levando à liberação de IFN- γ para eliminar o vírus e Th2 para desencadear respostas imunes humorais e secreção de anticorpos contra o vírus SARS-CoV-2. B) As células T podem estar esgotadas e podem superexpressar marcadores de exaustão, incluindo PD-1. Em casos graves de COVID-19, a produção de citocinas, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α , é aumentada levando à geração de tempestade de citocinas, que induz mais resultados desfavoráveis e pode eventualmente levar à linfopenia. Já o perfil de células Th17 produzem as citocinas, podendo levar ao dano tecidual e à interferência na ativação de Th1. Essa figura foi criada no programa "BioRender Customer Service".

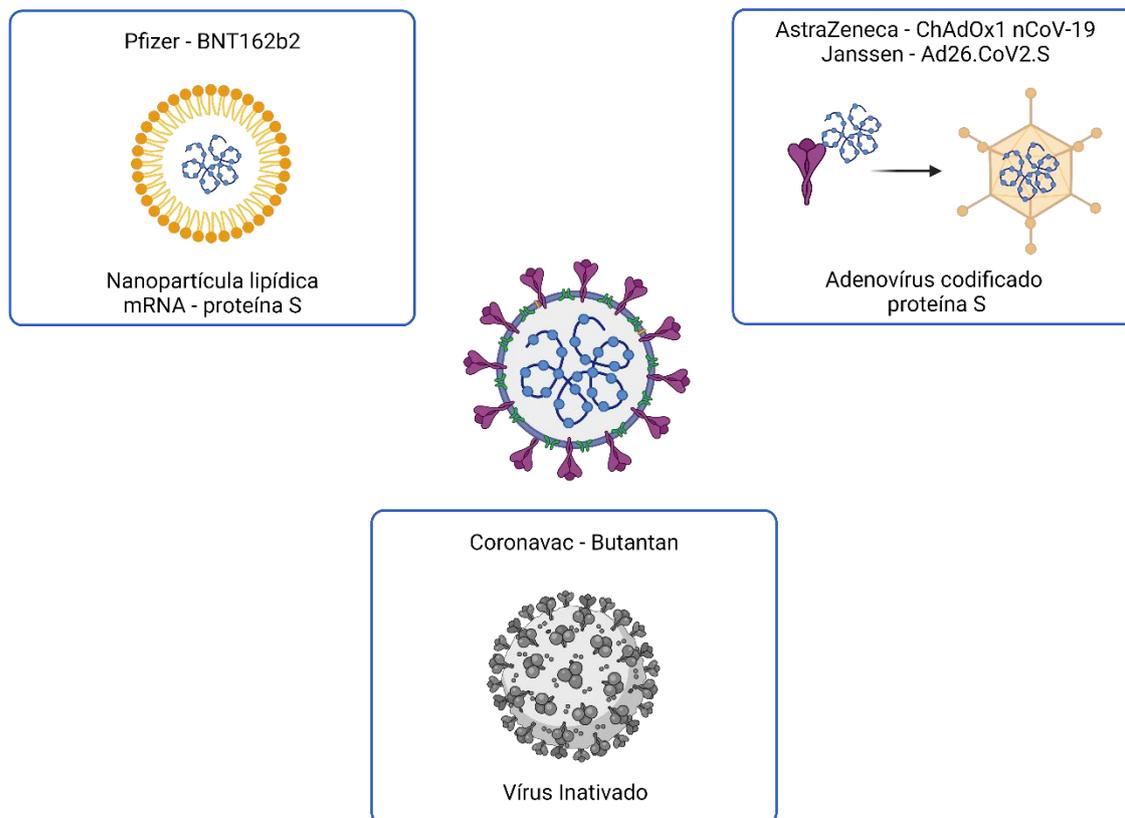
1.5 RESPOSTAS VACINAIS CONTRA O SARS-CoV-2

Com conhecimentos sobre a interação vírus-hospedeiro podemos começar a compreender a ação da vacina anti-SARS-CoV-2 no organismo do hospedeiro. Sabemos que a entrada do vírus na célula ocorre através da ligação proteína S à ECA2, por isso é necessário impedir que essa ligação ocorra. A vacinação é uma estratégia eficaz para induzir a produção de NAbs que podem limitar a infecção, a replicação e a transmissão.

As vacinas atuais anti-SARS-CoV-2 são funcionais através de mecanismos, como redução da infecção inicial, redução da replicação viral, redução do número e infecciosidade das partículas virais e redução dos sintomas. O efeito cumulativo desses mecanismos pode contribuir para a redução da transmissão viral, como iremos abordar nessa seção.

No Brasil hoje, existem quatro vacinas aprovadas para uso. A Pfizer é indicada para a imunização em indivíduos com idade igual ou superior a cinco anos. É composta de mRNA de cadeia simples, não replicante, formulado em nanopartículas lipídicas. O RNA não replicante entra nas células para permitir a expressão do antígeno S, induzindo imunidade celular e produção de anticorpos neutralizantes contra o antígeno S (Wyeth Indústria Farmacêutica Ltda, 2022). A CoronaVac é uma vacina adsorvida covid-19 (inativada) é indicada para indivíduos acima de seis anos. Com base nos ensaios clínicos completos da vacina, infere-se que a vacina pode ter potencial imune para produzir anticorpos neutralizantes (Instituto Butantan, 2022). A Janssen é uma vacina indicada para indivíduos acima de 18 anos. Composta por um vetor de adenovírus humano recombinante não replicante, que codifica a proteína S de comprimento total (JANSSEN, 2022). Já a vacina Covid-19 (recombinante), AstraZeneca, é indicada para a imunização ativa de indivíduos a partir de 18 anos. É composta por um único vetor adenovírus recombinante de chimpanzé, deficiente para replicação (ChAdOx1), que expressa a proteína S (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos / Fiocruz, 2022). Ambas as vacinas expressam a proteína S transitoriamente, estimulando a resposta humoral e celular específica anti-S (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos / Fiocruz, 2022; JANSSEN, 2022) (Fig. 5).

Figura 5 – Vacinas anti-SARS-CoV-2 administradas no Brasil.



Fonte: Da Autora, 2022.

A Pfizer é composta de mRNA de cadeia simples, não replicante, formulado em nanopartículas lipídicas. A CoronaVac é uma vacina com vírus inativado. A Janssen é composta por um vetor de adenovírus humano recombinante não replicante, que codifica a proteína S de comprimento total. A AstraZeneca é composta por um único vetor adenovírus recombinante de chimpanzé, deficiente para replicação, que expressa a proteína S. Essa figura foi criada no programa “BioRender Customer Service”.

De todas as vacinas para o SARS-CoV-2 atualmente aprovadas para uso no Brasil espera-se que induzam NAb na circulação e nas superfícies de mucosas que revestem o epitélio do trato respiratório, porém essa geração pode ser limitada. Estudos mostraram que algumas vacinas, como a Ad26.COVID.2.S da Johnson & Johnson-Janssen, não induziu anticorpos neutralizantes IgA ou IgG na saliva (NAHASS *et al.*, 2021), já outras como a BNT162b2 da BioNtech, Pfizer e mRNA-1273 da Moderna induziu NAb de IgA e IgG na saliva de pacientes vacinados (KETAS *et al.*, 2021; MOHAMED *et al.*, 2021; NAHASS *et al.*, 2021). A quantidade e qualidade do nível de produção de NAb na mucosa junto com o mecanismo da vacina são os fatores que possivelmente influenciam se essas vacinas induzem imunidade esterilizante, ainda precisando ser mais bem determinado.

Além de concentrações suficientes de NAbs, a imunidade induzida por vacina deve induzir a produção de anticorpos não neutralizantes e células imunes adaptativas de memória, para o SARS-CoV-2 não conseguir infectar as células e proliferar. Nos participantes imunizados com duas doses de BNT162b1, as concentrações séricas médias de IgG, marcadores de atividade de células T CD8⁺ e marcadores de atividade de células T CD4⁺ mediadas por Th1 aumentaram (SAHIN *et al.*, 2020), com resultados semelhantes em pacientes administrados com duas doses de mRNA-1273 (ANDERSON *et al.*, 2020). Esses dados sugerem que as vacinas atualmente aprovadas geram resposta imune que conseqüentemente podem reduzir a carga viral em indivíduos infectados, limitando a replicação viral na mucosa.

A infecção e a replicação do SARS-CoV-2 levam aos sintomas característicos da COVID-19. Esses sintomas podem impactar diretamente na disseminação do vírus. Como já é conhecido, uma das ações mais importantes da vacina é a eficácia em casos de infecções sintomáticas graves. A diminuição da sintomatologia diminui a possibilidade de transmissão, assim como reduz a carga viral (MOSTAGHIMI *et al.*, 2021).

Com a imunidade induzida pela vacinação bloqueando a infecção e a replicação intra-hospedeiro, irá possivelmente diminuir a taxa de transmissão inter-hospedeiro devido à pequena carga viral. Um estudo demonstrou que em pessoas vacinadas e positivas para COVID-19, a carga viral era 2 a 4 vezes menor do que em pessoas não vacinadas (CALLAWAY *et al.*, 2021). Outro estudo, avaliando a quantidade de RNA viral presente em swabs nasais, mostrou que a carga viral do SARS-CoV-2 em indivíduos COVID-19 positivos e vacinados é 1,6 a 20 vezes menor do que a carga viral presente em infectados e não vacinados (LEVINE-TIEFENBRUN *et al.*, 2021). Esses fatos devem-se à imunidade direcionada pela vacinação por meio da indução de anticorpos que podem revestir o vírus, que, por meio de impedimento estérico ou fixação do complemento, pode impedir que os vírions infectem hospedeiros suscetíveis, reduzindo a disseminação viral através da redução do número de partículas infecciosas e a infectividade das partículas virais na mucosa do trato respiratório (MOSTAGHIMI *et al.*, 2021).

Profissionais envolvidos no manejo dos pacientes com suspeita ou confirmação de infecção pelo SARS-CoV-2, bem como cientistas e técnicos de

laboratórios envolvidos nas pesquisas da COVID-19, estão entre os grupos mais expostos ao contágio, e o desenvolvimento de doença sintomática por estes indivíduos gera, além do impacto em sua saúde, fragilização do sistema de saúde como um todo (VINCENT; SLUTSKY, 2020). Este risco ocupacional tem sido apontado por diversos grupos de pesquisa, com a proposição de diversas estratégias para minimizar sua ocorrência (BASILE *et al.*, 2020; HUH, 2020; KOH, 2020; MALHOTRA *et al.*, 2020; ZHANG₂ *et al.*, 2020). Os efeitos deletérios deste risco são potencializados pelos efeitos do estresse deste manejo sobre a saúde destes profissionais (LAI *et al.*, 2020; XIANG *et al.*, 2020).

Contudo, devido à grande demanda por diagnósticos, no Brasil, apenas pacientes sintomáticos com agravamento de sintomas estão sendo testados para o SARS-CoV-2, levando a uma subnotificação de casos. Por consequência, apenas no caso da manifestação e agravamento de sintomas que sugiram a COVID-19 profissionais de saúde e cientistas serão avaliados quanto à infecção pelo SARS-CoV-2 e, potencialmente, incluídos em estudos de avaliação da dinâmica da resposta imune. Neste sentido, consideramos urgente a avaliação dos profissionais de saúde envolvidos no combate à COVID-19, mesmo na atual política de testagem de casos suspeitos, já que, alternativamente, a presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2 pode apontar prévia exposição, auxiliando na determinação da quantidade de profissionais anteriormente infectados que se mantiveram assintomáticos (LI₃ *et al.*, 2020; BROBERG *et al.*, 2022), bem a determinação do padrão da produção de citocinas durante a pandemia podem permitir a avaliação prospectiva da resposta imune destes profissionais.

Ainda é necessário estudos da resposta imune durante a COVID-19, principalmente em pacientes não graves ou assintomáticos. Profissionais de saúde da atenção aos pacientes e pesquisadores estão na linha de frente do combate a COVID-19, mas as características da resposta imune e sua dinâmica durante a pandemia ainda não tem sido completamente avaliada. A análise da produção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 e a determinação da intensidade e da natureza da resposta inflamatória durante o curso da infecção poderão ser úteis na prospecção de biomarcadores de evolução e prognóstico e apontar mais claramente a proporção de indivíduos infectados, mas assintomáticos e as repercussões desta infecção no

médio prazo sobre a resposta imune. Este tema tem preocupado a comunidade e levando a criação de um conjunto de recomendações partindo das sociedades médicas especializadas em todo o mundo, como o uso de máscaras e álcool em gel, além do distanciamento social.

2 JUSTIFICATIVA

Dados atualizados em tempo real pela Johns Hopkins University and Medicine mostram que até 22/06/2022, 540.963.088 pessoas foram infectadas pelo SARS-CoV-2 em todo mundo e 6.323.007 evoluíram para o óbito. Profissionais de saúde estão na linha de frente do atendimento dos pacientes com COVID-19 e da pesquisa dos mecanismos da doença, de tratamentos e profilaxia, maximizando o possível contágio com o SARS-CoV-2. Identificar a prevalência da infecção, as características da resposta imune de profissionais de saúde atuantes nas diversas frentes de combate à COVID-19, provenientes da infecção ou vacinação, é crucial para delinear estratégias que visem minimizar o impacto neste grupo e determinar sua posição na cadeia epidemiológica de transmissão do SARS-CoV-2.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a prevalência da infecção pelo SARS-CoV-2, além do padrão da resposta imune humoral e celular em profissionais envolvidos no manejo dos pacientes com suspeita ou confirmação de infecção pelo SARS-CoV-2, bem como cientistas e técnicos de laboratórios envolvidos nas pesquisas da COVID-19. Assim, com a sorologia de anticorpos anti-SARS-CoV-2, indicando provável infecção prévia, conseguir determinar sua posição e atuação na cadeia epidemiológica de transmissão do SARS-CoV-2.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar, em profissionais de saúde e pesquisadores, a presença de anticorpos anti-SARS-Cov-2 no sangue periférico ao longo da pandemia da COVID-19.
- 2) Determinar as alterações na resposta imune celular e humoral anti-SARS-Cov-2 ao longo da pandemia da COVID-19, com análise em tempos distintos.
- 3) Correlacionar os dados acima com a apresentação clínica da infecção e com o desfecho, através de dados ocupacionais e de pré-exposição à COVID-19 e/ou vacinação, por formulário de pesquisa.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), protocolado com número 31484220.0.0000.8667 (ANEXO A). Todos os voluntários foram informados sobre os riscos e benefícios deste estudo e assinaram o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO B) após esclarecimento.

4.2 POPULAÇÃO ALVO

Profissionais de saúde envolvidos no manejo de pacientes, manipulação de amostras suspeitas de COVID-19 ou pesquisa científica relacionada às amostras de pacientes potencialmente infectados ou diagnosticados com a infecção pelo SARS-CoV-2, no Hospital Regional e Hospital de Clínicas-UFTM, na macrorregião de Uberaba, Minas Gerais (MG), Brasil.

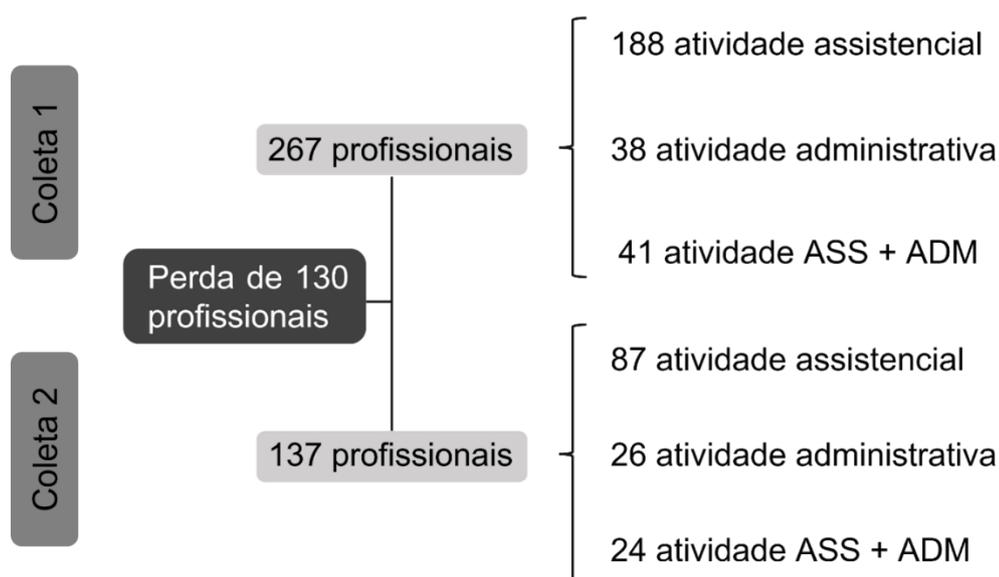
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS PARTICIPANTES

Serão incluídos profissionais de saúde que estejam envolvidos no manejo de pacientes, manipulação de amostras suspeitas de COVID-19 ou pesquisa científica relacionada às amostras de pacientes potencialmente infectados ou diagnosticados com a infecção pelo SARS-CoV-2, estabelecidos pelo MS-Br, podendo possuir comorbidades indicadas no Anexo C. Serão excluídos profissionais de saúde portadores de imunodeficiência, de doenças autoimune ou tumores.

4.4 COLETA DE DADOS E AMOSTRAS

Profissionais da saúde do Hospital de Clínicas da UFTM e Hospital Regional, em Uberaba-MG, foram recrutados para pesquisa. Sendo divididos em profissionais que trabalham com atividades assistências, administrativas ou ambas (Organograma 1 e Anexo D). Foram obtidos o consentimento livre e esclarecido, amostra biológica e coleta de dados ocupacionais e de pré-exposição à COVID-19 e/ou vacinação, através de formulário de pesquisa (ANEXO E), em dois tempos distintos, com diferença mínima de 6 meses entre as coletas de cada doador.

Organograma 1 – Atividade laboral de acordo com tempo de coleta



Fonte: Da Autora, 2022.

Número de profissionais que desempenham cada atividade laboral: assistencial, administrativa ou ambas. Dividido em primeira e segunda coleta, com diferença de 6 meses entre as coletas.

4.4.1 Coleta de dados

Os voluntários após assinar o TCLE foram submetidos nos dois momentos de coleta à um formulário de pesquisa com diversas perguntas, presente no ANEXO E. O formulário foi aplicado através da plataforma Google Forms.

4.4.2 Coleta de amostras

Juntamente com a coleta de dados foram coletadas amostras de sangue periférico, através de punção venosa em tubo a vácuo com Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) ou com gel separador. A utilização do anticoagulante EDTA e a obtenção do plasma para dosagem de anticorpos foi decidida pelo fato de possuir maior concentração de alguns componentes, por conter fibrinogênio e outros fatores de coagulação, tem maior viscosidade e teor de proteína total. Já a utilização do gel separador e a obtenção do soro foi decidida pelo fato de possuir níveis séricos de algumas proteínas mais elevados e o gel separador minimizam a adsorção de alguns analitos. Após a indicação desses fatores, também é necessário pensar que a degradação de elementos do sangue, como proteínas, inicia após o momento da coleta, e os anticorpos são mais resistentes à essa degradação o que as citocinas (BOWEN; REMALEY, 2014; WHO₂, 2002).

Uma segunda amostra de sangue periférico foi coletada em um período maior que seis meses após a primeira coleta. Todas as amostras foram centrifugadas e o soro/plasma armazenados à -80°C até o momento das análises por Ensaio imunoenzimático (ELISA/EIE). A utilização desse ensaio é indicada para vigilância em saúde pública, fins epidemiológicos e pesquisa científica. Além de que, os testes de anticorpos podem ser produzidos para detectar diferentes alvos virais, sendo assim, testes específicos podem ser necessários para avaliar os anticorpos originados de infecções anteriores ou da vacinação (CDC, 2022).

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS

Foram dosados IgG total e suas subclasses, IgG1 e IgG3, além de IgM. Todas as imunoglobulinas foram quantificadas através do kit de EIE COVID-19 IgG Bio-Manguinhos (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos/FIOCRUZ), baseados na reatividade contra a proteína N do vírus, utilizando plasma. A IgG foi determinada de acordo com a bula do kit. As IgG subclasses (IgG1/IgG3) e IgM foram realizadas de forma adaptada, através de padronização utilizando curva padrão. Resultados foram expressos em Índice de ELISA, através do cálculo da

densidade óptica, obtida pelo Leitor de ELISA, dividido pelo Cut-Off, obtido pelo cálculo presente na bula do kit.

Para a dosagem de IgG total foram inseridas amostras de plasma e os controles diluídos com o reagente diluente do kit (1:100), por 30 minutos à 37°C. As placas foram lavadas com o tampão de lavagem do kit. O anticorpo secundário conjugado com a enzima peroxidase foi diluído em reagente diluente do kit (1:100), incubado por uma hora à 37°C. Seguindo a lavagem foi utilizado Tetrametilbenzidina (TMB), a solução reveladora do kit, por 10 minutos no escuro e a reação de revelação bloqueada com o ácido sulfúrico (2M) do kit.

A dosagem das subclasses iniciou-se com a diluição dos plasmas e controles com o reagente diluente do kit (1:10), por 30 minutos à 37°C. As lavagens entre as etapas foram feitas com o tampão de lavagem presente no kit. O anticorpo secundário específico para cada subclasse e a enzima Estreptavidina-Biotina foram diluídos com o reagente diluente do kit (1:50), por uma hora a 37°C. Seguindo a lavagem foi utilizado TMB, a solução reveladora do kit, por 30 minutos no escuro e a reação de revelação bloqueada com o ácido sulfúrico (2M) do kit.

A quantificação de IgM iniciou também com a diluição dos plasmas e controles com o reagente diluente do kit (1:100), mantendo incubado por 30 minutos à 37°C. O anticorpo secundário conjugado foi diluído com o reagente diluente do kit (1:2000), incubado por uma hora à 37°C. Após a inserção da solução com anticorpo primeiro e secundário, houve lavagem entre as etapas com o tampão de lavagem do kit. A reação foi revelada com o substrato TMB, por 5 minutos no escuro e a reação de revelação bloqueada com o ácido sulfúrico (2M) do kit.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

As citocinas foram quantificadas em soro de acordo com a bula do kit comercial de ELISA de cada fabricante: IFN- γ (*BD BIOSCIENCES*, EUA), TNF- α , IL-6 e IL-10 (*R&D Systems*). Resultados foram expressos em pg/mL, através do cálculo da densidade óptica, obtida pelo Leitor de ELISA, levando em consideração a curva padrão.

Para ensaios quantitativos de IFN- γ , as placas de micro poços foram sensibilizadas com 50 μ L/poço de solução de anticorpo de captura diluído em *coating* carbonato, de Carbonato de sódio e Bicarbonato de sódio, (1:250) e incubadas durante a noite a 4°C. No dia seguinte, a placa de ELISA foi bloqueada com 150 μ L/poço de solução PBS 1x + Albumina de soro bovino (BSA) 2%, por quatro horas a 4°C. Amostras de soro, 50 μ L cada, de diluição 1:2 foram usadas para os ensaios de ELISA, assim como curva padrão iniciando a diluição em 1:2. As diluições das amostras e curva foram preparadas em PBS+BSA 2%, incubadas durante a noite a 4°C. Anticorpos secundários e enzima Estreptavidina-Biotina foram usados em diluições de 1:250 por quatro horas em temperatura ambiente, no escuro. Após cada etapa realizada as placas foram lavadas com solução de Tampão fosfato-salino (PBS) 1x + Tween 0,5%. A reação ELISA foi desenvolvida com substrato TMB, para reação colorimétrica, e bloqueada com ácido sulfúrico (1M).

Para ensaios quantitativos de TNF- α , IL-6 e IL-10, as placas de micro poços foram sensibilizadas com 50 μ L/poço de solução de anticorpo de captura diluído em PBS 1x (1:120) e incubadas durante a noite a 4°C. No dia seguinte, a placa de ELISA foi bloqueada com 150 μ L/poço de solução PBS 1x + Albumina de soro bovino (BSA) 1%, por quatro horas a 4°C. Amostras de soro, 50 μ L cada, de diluição 1:2 foram usadas para os ensaios de ELISA, assim como curva padrão iniciando a diluição em 1:2. As diluições das amostras e curva foram preparadas em PBS+BSA 1%, incubadas durante a noite a 4°C. Anticorpos secundários e enzima Estreptavidina-Biotina foram usados em diluições diferentes para cada citocina, por quatro horas em temperatura ambiente, no escuro. A diluição utilizada para TNF- α foi de 1:40, para IL-6 foi 1:180 e IL-10 de 1:60. Após cada etapa realizada as placas foram lavadas com solução de Tampão fosfato-salino (PBS) 1x + Tween 0,5%. A reação ELISA foi desenvolvida com substrato TMB, para reação colorimétrica por 20 minutos, e bloqueada com ácido sulfúrico (1M).

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística foi realizada utilizando os programas Excel (Microsoft Office 365, versão 2204, ano 2022) e GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc,

versão 8.0.2, ano 2019). Os testes utilizados foram teste de Wilcoxon (pareados não paramétricos), teste-t, Mann Whitney, teste Kruskal-Wallis (múltiplas comparações), teste qui-quadrado, além do teste de concordância *Kappa*. A correlação de subclasses foi definida pelo teste de Correlação. Testes foram considerados significantes para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 PADRÃO DA IMUNIDADE HUMORAL DOS PROFISSIONAIS DA SAÚDE.

5.1.1 Dados clínico-epidemiológicos

Neste estudo, levamos em consideração que na dosagem de anticorpos um resultado negativo não exclui a infecção por SARS-CoV-2, mas o resultado positivo pode indicar fortemente a positividade para infecção anterior pelo Coronavírus. Por isso, realizamos 2 avaliações da positividade de profissionais de saúde para a COVID-19, utilizando metodologia de determinação de anticorpos anti-Sars-CoV-2, baseados na reatividade contra a proteína N do vírus. Além de quantificar anticorpos, também aplicamos o formulário de pesquisa em ambas as coletas, e através das informações obtidas por ele, relacionamos os produtos da imunidade dosados e informações teóricas. A primeira coleta foi realizada entre dezembro de 2020 e março de 2021, período no qual a grande maioria dos nossos voluntários não haviam sido vacinados. Essa avaliação contou a participação de 267 profissionais alocados em 2 hospitais envolvidos no combate à COVID-19 em Uberaba-MG: Hospital de Clínicas-UFTM e Hospital Regional.

Em relação à positividade na sorologia para anticorpos IgG anti-proteína N do SARS-CoV-2, 36,7% dos voluntários apresentaram teste positivo, 58,8% teste negativo e 4,5% resultado indeterminado (zona cinza). Não houve diferenças na proporção dos resultados em relação ao sexo dos voluntários, idade, IMC ou presença de comorbidades ou tipagem sanguínea para sistema ABO.

Em relação ao tipo de atividade laboral desenvolvida pelos profissionais, houve um aumento de resultados positivos naqueles que desenvolviam atividades assistenciais, 44,7%, em relação aos que desempenhavam atividades administrativas, 5,3%, com um percentual intermediário naqueles que desempenhavam ambas as atividades, 29,3% ($p < 0,0001$, teste de Qui-quadrado). Neste sentido, houve uma tendência de maior positividade naqueles profissionais que

atendiam diretamente os pacientes com a COVID-19 internados (43,2% vs 30,6%, $p = 0,06$, teste de Qui-quadrado). Não houve diferença na proporção de testes positivos entre profissionais que tiveram contato ou não com colegas de trabalho afastados por COVID-19.

Em relação aos resultados da sorologia e o autorrelato de COVID-19 prévia ou exame realizado anteriormente (PCR, teste rápido para antígeno ou anticorpo e sorologia), observamos uma concordância fraca tanto em relação ao relato do resultado de testes anteriores para COVID-19 quanto de desenvolvimento prévio da doença ($\kappa=0,38$ e $\kappa=0,53$, respectivamente). Em relação à vacinação, que para os profissionais de saúde estava em seus primeiros estágios quando da primeira avaliação, 71 indivíduos haviam recebido a primeira dose e nenhum participante havia sido imunizado com 2 doses. Não houve diferença na proporção de testes positivos entre vacinados e não vacinados ($p = 0,14$), neste primeiro momento todos os participantes que foram imunizados receberam a Coronavac.

Uma segunda avaliação foi realizada a partir de agosto de 2021, com um intervalo de 6 a 8 meses entre as coletas. Esta segunda avaliação contou com a participação de 137 voluntários, todos estes avaliados anteriormente. Na segunda avaliação, apenas 18 (13,3%) dos profissionais apresentaram sorologia para anticorpos IgG anti-proteína N do SARS-CoV-2 (utilizando a mesma metodologia e kit diagnóstico da primeira avaliação), sendo que 9 destes já estavam positivos previamente. Trinta e três profissionais previamente positivos para a COVID-19 negataram o teste e dois apresentaram o segundo exame com resultado indeterminado. Todos esses resultados estão na tabela 1.

Tabela 1 - Dados clínico-epidemiológicos

	IgG anti-Sars-Cov2 - Primeira coleta				IgG anti-Sars-Cov2 - Segunda coleta			
	Positiva (%)	Negativa (%)	Indeterminada (%)	Total	Positiva (%)	Negativa (%)	Indeterminada (%)	Total
Casuística	98 (36,7%)	157 (58,8%)	12 (4,5%)	267	18 (13,1%)	116 (84,7%)	3 (2,2%)	137
	Positiva (%)	Negativa (%)	Indeterminada (%)	Valor de p	Positiva (%)	Negativa (%)	Indeterminada (%)	Valor de p
Sexo								
Masculino	28 (31,1%)	58 (64,4%)	4 (4,4%)	0,388	7 (16,7%)	34 (80,9%)	1 (2,4%)	0,71
Feminino	70 (39,6%)	99 (56,9%)	8 (4,5%)		11 (11,6%)	82 (86,3%)	2 (2,1%)	
IMC								
Abaixo do peso	0	1 (100%)	0	0,912	0	0	0	0,001
Peso Normal	12 (33,3%)	21 (58,3%)	3 (8,3%)		4 (8,7%)	41 (89,1%)	1 (2,2%)	
Sobrepeso	20 (37,7%)	30 (56,6%)	3 (5,7%)		4 (8,3%)	42 (87,5%)	2 (4,2%)	
Obesidade	12 (40%)	17 (56,7%)	1 (3,3%)		10 (33,3%)	20 (66,7%)	0 (0%)	
Não informado	54 (39,7%)	78 (57,4%)	4 (2,9%)		0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	
Comorbidades								
Sim	33 (34,7%)	60 (63,2%)	2 (2,1%)	0,012	9 (18,4%)	40 (81,6%)	0 (0%)	0,485
Não	65 (38,9%)	94 (56,3%)	8 (4,8%)		9 (10,5%)	74 (86%)	3 (3,5%)	
Não relatada	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)		0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	

Tipagem ABO

A	20 (31,7%)	38 (60,3%)	5 (7,9%)		6 (11,8%)	44 (86,3%)	1 (1,9%)	
B	8 (42,1%)	10 (52,6%)	1 (5,3%)		3 (16,7%)	15 (83,3%)	0 (0%)	
AB	1 (12,5%)	7 (87,5%)	0 (0%)	0,525	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	0,955
O	19 (33,3%)	36 (63,2%)	2 (3,5%)		7 (14,3%)	40 (81,6%)	2 (4,1%)	
Não sabe/Não relatou	50 (41,7%)	66 (55%)	4 (3,3%)		2 (13,3%)	13 (86,7%)	0 (0%)	

Atividade no serviço de saúde

Assistencial (Ass)	84 (44,7%)	95 (50,5%)	9 (4,8%)		9 (10,3%)	76 (87,4%)	2 (2,3%)	
Administrativa (Adm)	2 (5,3%)	35 (92,1%)	1 (2,6%)	0,001*	5 (19,2%)	21 (80,8%)	0 (0%)	0,611
Ass + Adm	12 (29,3%)	27 (65,8%)	2 (4,9%)		4 (16,7%)	19 (79,2%)	1 (4,1%)	

Contato com indivíduos com COVID-19 confirmada ou suspeita**Pacientes internados**

Sim	60 (43,2%)	72 (51,8%)	7 (5%)		7 (11,7%)	52 (86,7%)	1 (1,6%)	
Não	38 (30,6%)	82 (66,1%)	4 (3,2%)	0,061	11 (14,7%)	62 (82,7%)	2 (2,6%)	0,803

Colaboradores no ambiente de trabalho

Sim	86 (38,4%)	127 (56,7%)	11 (4,9%)		15 (13,3%)	96 (84,9%)	2 (1,8%)	
Não	12 (30,8)	27 (69,2%)	0 (0%)	0,189	3 (13,7%)	18 (81,8%)	1 (4,5%)	0,718

Exame para COVID-19 previamente positivo

Sim	65 (61,9%)	35 (33,3%)	5 (4,7%)	$\kappa=0,38$ (teste de concordância de Kappa)	9 (21,9%)	31 (75,6%)	1 (2,4%)	$\kappa=0,09$ (teste de concordância de Kappa)
Não	30 (25%)	84 (70%)	6 (5%)		9 (13,4%)	56 (83,6%)	2 (3%)	
Não realizado	3 (7,3%)	37 (90,2%)	1 (2,4%)		0 (0%)	28 (100%)	0 (0%)	

Autorelato de COVID-19 prévia

Sim	55 (70,1%)	18 (23,1%)	5 (6,4%)	$\kappa=0,53$ (teste de concordância de Kappa)	9 (29,1%)	21 (67,7%)	1 (3,2%)	$\kappa=0,26$ (teste de concordância de Kappa)
Não	29 (18,7%)	120 (77,4%)	6 (3,9%)		7 (7,6%)	84 (90,3%)	2 (2,1%)	
Suspeita que sim	14 (45,2%)	17 (54,8%)	0 (0%)		2 (16,7%)	10 (83,3%)	0 (0%)	

Vacinação prévia à primeira coleta de amostras

Sim	21 (28,8%)	50 (68,5%)	2 (2,7%)	0,11	7 (14,6%)	40 (83,3%)	1 (2,1%)	0,933
Não	77 (40,3%)	104 (54,4%)	10 (5,2%)		11 (12,4%)	76 (85,4%)	2 (2,2%)	

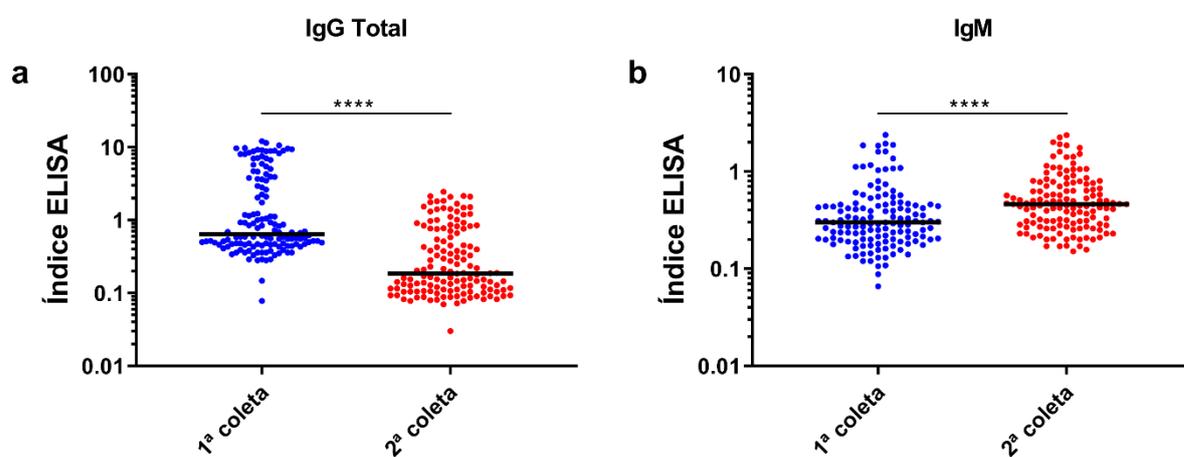
Fonte: Da Autora, 2022.

Avaliações da positividade de profissionais de saúde para COVID-19, utilizando metodologia de determinação de anticorpos anti-Sars-CoV-2 pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana Índice ELISA. Todos considerados significativos para $p < 0,05$ *, teste aplicado qui-quadrado. Teste de concordância de *Kappa*, considerado perfeito próximo de 1.

5.1.2 Produção de IgG total e IgM

Quantificamos a concentração de anticorpos IgG total e IgM no sangue dos voluntários. Constatamos que a concentração de IgG total diminuiu significativamente quando comparados os valores da primeira e segunda coleta (Figura 6a), mas ao analisar IgM foi visto o inverso, um aumento na segunda coleta em relação à primeira coleta (Fig. 6b).

Figura 6 – Nível de IgG total e IgM em duas coletas



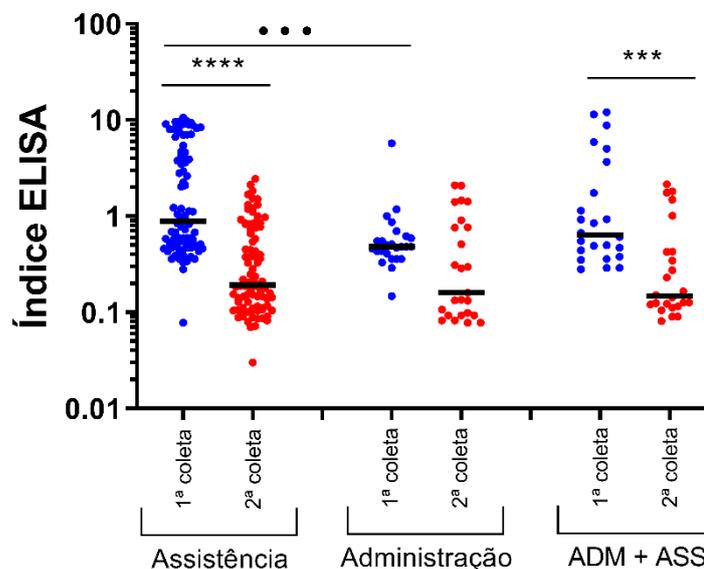
Fonte: Da Autora, 2022.

Nível de IgG total e IgM medidos nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana Índice ELISA. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. **** diferença significativa de $< 0,0001$ entre primeira e segunda coleta. **a)** Nível de IgG total na primeira e segunda coleta. **b)** Nível de IgM na primeira e segunda coleta.

5.1.3 Nível de IgG total em relação às atividades laborais

O nível de IgG total dos profissionais com diferentes atividades laborais apresentou diferenças significantes (Fig. 7). Podemos observar a diminuição significativa desse anticorpo em questão entre a primeira e segunda coleta nos profissionais com atividade relacionada à Assistência e Administrativa + Assistencial. Já ao comparar as primeiras coletas dos três tipos de atividades, vemos diminuição significativa entre os profissionais assistenciais e administrativos.

Figura 7 – Nível de IgG total em diferentes atividades laborais



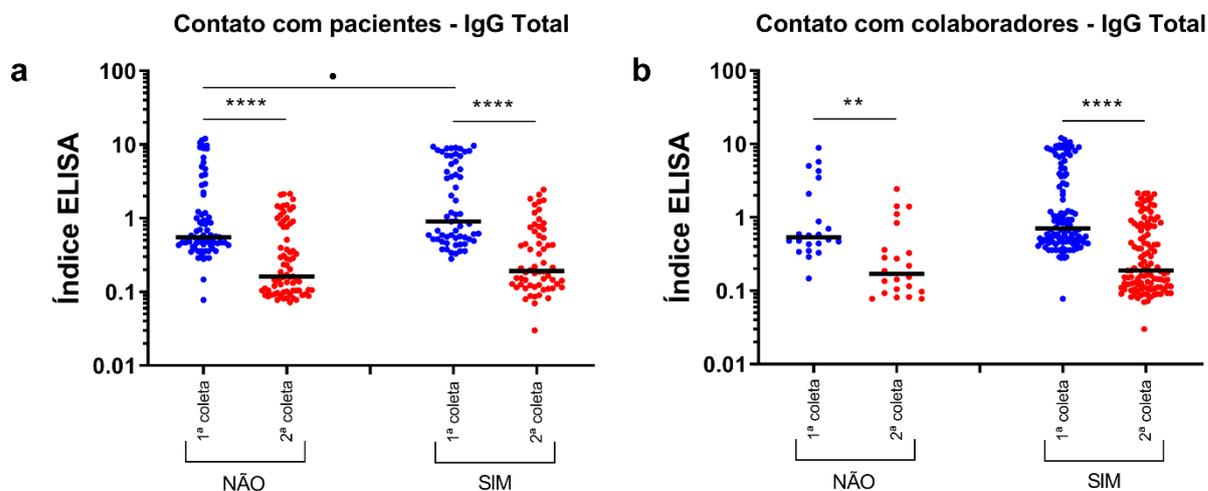
Fonte: Da Autora, 2022.

Nível de IgG total em profissionais com diferentes atividades laborais, medido nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana Índice ELISA. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. *** diferença significativa de 0,0004 entre primeira e segunda coleta em voluntários com atividade Administrativa + Assistencial. **** diferença significativa de $< 0,0001$ entre primeira e segunda coleta em voluntários com atividade Assistencial. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Kruskal-Wallis (múltiplas comparações). *** diferença significativa de 0,0009 entre as primeiras coletas em voluntários com atividade Assistencial e Administrativa.

5.1.4 Nível de IgG total em relação ao contato dos profissionais com indivíduos positivados

Dosamos o nível de IgG total dos profissionais que tiveram contato ou não com pacientes ou colaboradores do hospital positivados (Fig. 8). É possível identificar diferença significativa através da queda de IgG total entre a primeira e segunda coleta de voluntários que tiveram contato ou não com pacientes ou colaboradores positivados (Fig. 8a e b). Entretanto, ao relacionar as primeiras coletas dos indivíduos que não tiveram e tiveram contato com pacientes positivados, observamos aumento estatístico de IgG total naqueles que tiveram contato com esses pacientes (Fig. 8a).

Figura 8 – Nível de IgG total em diferentes classes de indivíduos positivados



Fonte: Da Autora, 2022.

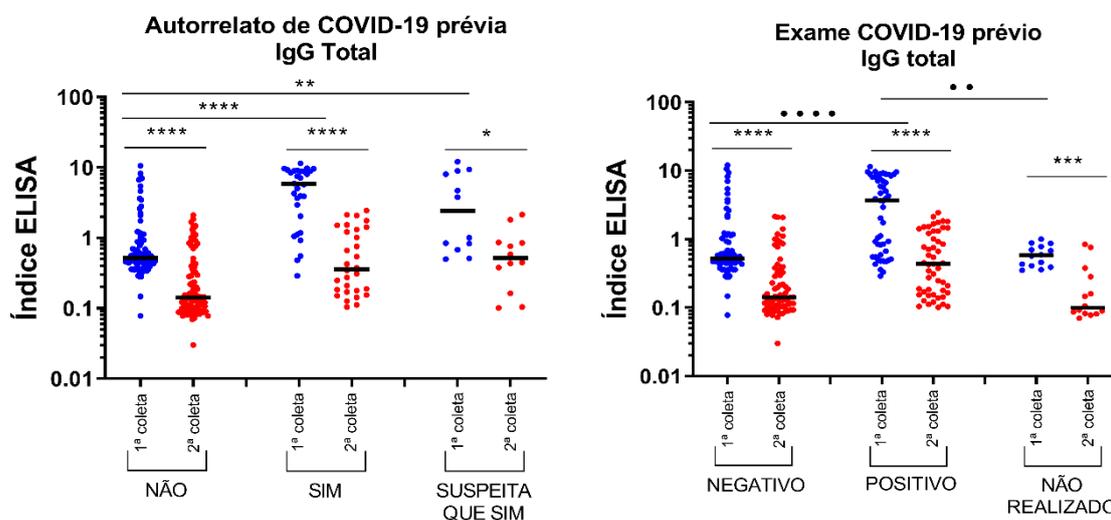
Nível de IgG total em profissionais que fizeram contato com pacientes e colaboradores positivados, medido nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana Índice ELISA. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. **** diferença significativa de $< 0,0001$ entre primeira e segunda coleta em voluntários que não tiveram contato com pacientes positivados. **** diferença significativa de $< 0,0001$ entre primeira e segunda coleta em voluntários que tiveram contato com pacientes ou colaboradores positivados. ** diferença significativa de $0,0011$ entre primeira e segunda coleta em voluntários que não tiveram contato com colaboradores positivados. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Kruskal-Wallis (múltiplas comparações). • diferença significativa de $0,0173$ entre as primeiras coletas em voluntários que não tiveram contato e que tiveram contato com pacientes positivados.

5.1.5 Nível de IgG total em relação à exposição prévia ao SARS-CoV-2

No questionário ao qual os participantes foram submetidos, eles relataram se já haviam tido, não tido ou suspeitavam ter tido exposição prévia ao SARS-CoV-2, assim como se já haviam realizado exames diagnósticos. Ao analisar o nível de IgG total dos profissionais que autorrelatam não ter tido, ter tido ou suspeita que teve exposição prévia ao SARS-CoV-2 em algum momento anterior às coletas, observamos que há diminuição significativa entre a primeira e segunda coleta de todas as condições. Quando comparamos as primeiras coletas das mesmas condições, vimos que há aumento estatístico de IgG total nos indivíduos que autorrelataram ter tido ou que suspeitavam ter tido exposição prévia ao SARS-CoV-2 quando comparados com os que acreditavam não ter tido (Fig. 9a). Já em relação aos exames diagnósticos realizados (informações obtidas no formulário de pesquisa aplicado) houve queda significativa do anticorpo entre a primeira e segunda coleta dos que

foram positivos, negativos ou não realizaram exames. Relacionando somente as primeiras coletas, também vimos a diminuição significativa a de IgG total nos pacientes que foram negativos ou que não realizaram exames, comparado com aqueles positivos em algum exame diagnóstico para a COVID-19 (Fig. 9b).

Figura 9 – Nível de IgG total em autorrelato ou exames para a COVID-19



Fonte: Da Autora, 2022.

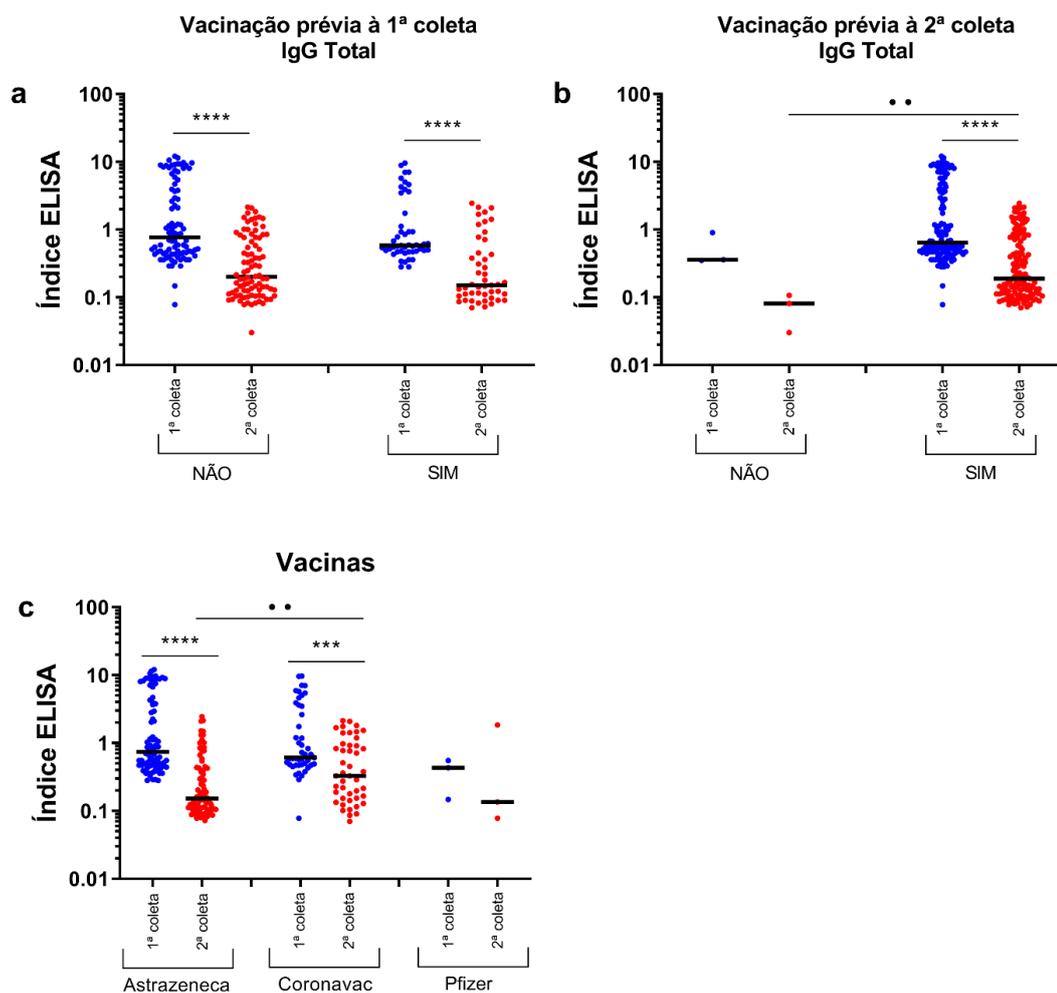
Nível de IgG total em profissionais que autorrelataram infecção por SARS-CoV-2 ou exames confirmatórios, medido nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana Índice ELISA. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. **** diferença significativa de $< 0,0001$ entre primeira e segunda coleta em voluntários que autorrelatam ter tido ou não a COVID-19, assim como os que apresentaram algum exame positivo ou negativo. *** diferença significativa de $0,0001$ entre primeira e segunda coleta em voluntários que apenas suspeitam ter tido a COVID-19 / voluntários que não realizaram nenhum exame diagnóstico. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado t-teste. * diferença significativa de $0,0109$ entre primeira e segunda coleta em voluntários que apenas suspeitam ter tido a COVID-19. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Kruskal-Wallis (múltiplas comparações). **** diferença significativa de $< 0,0001$ entre as primeiras coletas entre voluntários que autorrelataram não ter tido a COVID-19 e ter tido, e entre voluntários que foram positivos e os negativos em algum exame diagnóstico realizado. ** diferença significativa de $0,0025$ entre as primeiras coletas entre voluntários que autorrelataram não ter tido a COVID-19 e os que suspeitam que tiveram, e entre voluntários que foram positivos e os que não realizaram exame diagnóstico.

5.1.6 Nível de IgG total em relação às vacinas anti-SARS-CoV-2

Quantificando o nível de IgG total e cruzando com os dados sobre a vacinação foi possível observar que tanto os profissionais que não tomaram a vacina contra o

SARS-CoV-2, quanto os que tomaram ao menos uma dose, houve diminuição significativa dos níveis entre a primeira e segunda coleta (Fig. 10a). Somente aqueles voluntários que tomaram ao menos uma dose antes da segunda coleta tiveram diminuição significativa de IgG total da primeira para a segunda coleta. Comparando a segunda coleta entre os voluntários que não tomaram e os que tomaram ao menos uma dose antes da segunda coleta, vemos aumento significativo de IgG total naqueles que tomaram a vacina (Fig. 10b). Também analisamos qual vacina foi administrada nos participantes, demonstrou a mesma diminuição significativa de anticorpos entre a primeira e segunda coleta nos vacinados com AstraZeneca ou Coronavac, mas ao comparar as segundas coletas dos indivíduos vacinados com essas vacinas indicou aumento significativo de IgG total naqueles que foram administradas doses da CoronaVac. Os níveis relacionados com a Pfizer não sofreram diferenças significativas (Fig. 10c).

Figura 10 – Nível de IgG total em relação às vacinas anti-SARS-CoV-2



Fonte: Da Autora, 2022.

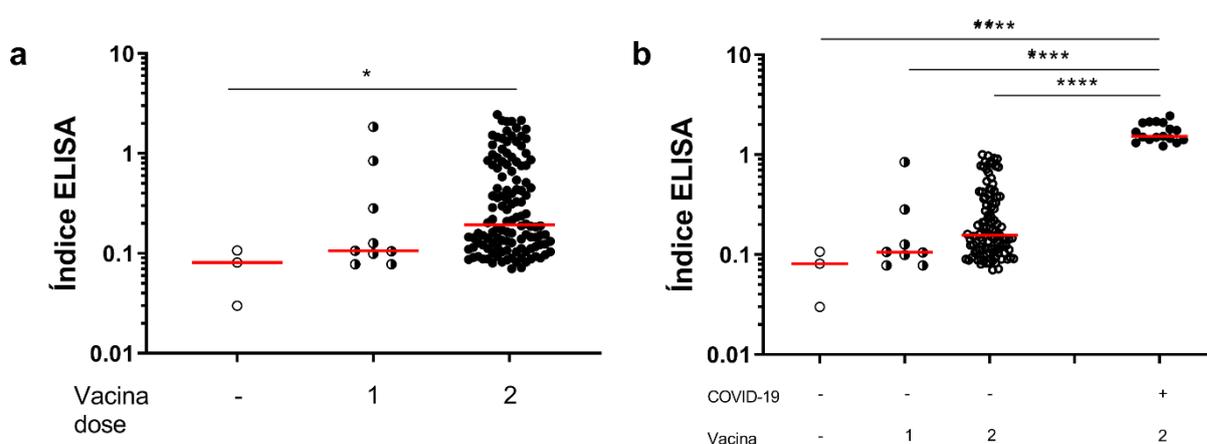
Nível de IgG total em profissionais que tomaram ou não a vacina contra SARS-CoV-2, medido nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana Índice ELISA. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. **** diferença significativa de $< 0,0001$ entre primeira e segunda coleta em voluntários que tomaram ou não ao menos uma dose antes da primeira ou segunda coleta e aqueles que foram administrados doses da AstraZeneca. *** diferença significativa de $0,0005$ entre primeira e segunda coleta em voluntários que receberam doses da CoronaVac. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Mann-Whitney. ** diferença significativa de $0,0073$ entre as segundas coletas entre voluntários que tomaram ou não ao menos uma dose antes da primeira ou segunda coleta. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Kruskal-Wallis (múltiplas comparações). ** diferença significativa de $0,0092$ entre as segundas coletas entre voluntários que receberam doses da AstraZeneca e CoronaVac.

5.1.7 Nível de IgG total em relação às doses vacinais anti-SARS-CoV-2

Ao analisar o nível de IgG total em voluntários que não receberam, receberam uma ou duas doses das vacinas anti-SARS-CoV-2, identificamos o aumento significativo dessa imunoglobulina nos profissionais que receberam duas doses

quando comparado com aos que não receberam nenhuma (Fig. 11a). Já ao correlacionar a infecção por SARS-CoV-2 e a vacinação, nós vemos um aumento significativo de IgG total naqueles pacientes que tiveram a COVID-19 e recebeu duas doses da vacina, quando comparados ao que não tiveram a COVID-19 e não receberam ou receberam uma ou duas doses da vacina (Fig. 11b).

Figura 11 – Nível de IgG total em relação às doses vacinais anti-SARS-CoV-2



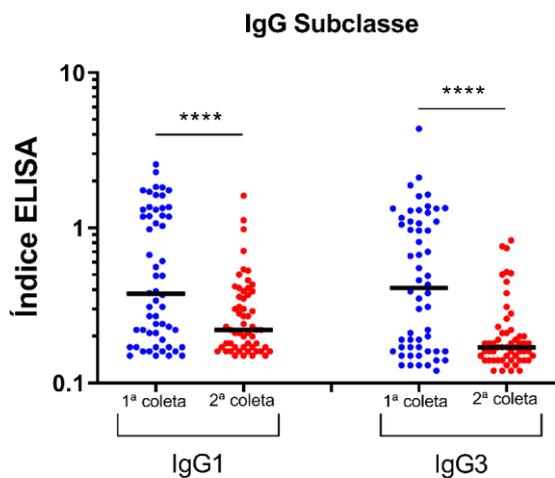
Fonte: Da Autora, 2022.

Nível de IgG total em profissionais não receberam ou receberam uma ou duas doses das vacinas anti-SARS-CoV-2, medido nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana Índice ELISA. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Kruskal-Wallis (múltiplas comparações). * diferença significativa de 0,0371 entre nenhuma e duas doses administradas e entre voluntários que não teve a COVID-19 e recebeu uma dose e voluntários que teve a COVID-19 e recebeu duas doses. **** diferença significativa de $< 0,0001$ entre voluntários que não teve a COVID-19 e recebeu duas doses e voluntário que teve a COVID-19 e recebeu duas doses.

5.1.8 Produção de IgG subclasse

Quantificamos a concentração de subclasses de anticorpos IgG no sangue dos profissionais voluntários. Constatamos que a concentração das subclasses IgG1 e IgG3 diminuíram significativamente na segunda coleta quando comparados aos valores da primeira coleta (Fig. 12).

Figura 12 – Nível de IgG subclasse em duas coletas



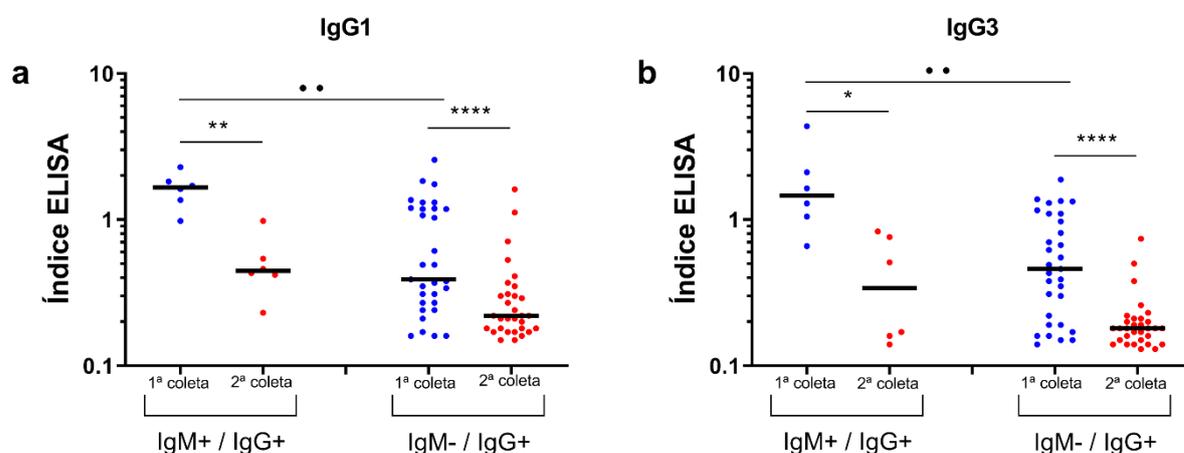
Fonte: Da Autora, 2022.

Níveis de subclasses de IgG (IgG1 e IgG3) medidos nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana Índice ELISA. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. **** diferença significativa de $< 0,001$ entre primeira e segunda coleta.

5.1.9 Níveis de subclasses de IgG em relação à sorologia para anticorpos anti-SARS-CoV-2

Ao analisar o nível das subclasses de IgG em voluntários que foram positivos para IgG total e IgM ou apenas para IgG total, identificamos a diminuição significativa de IgG1 e IgG3 ao comparar entre as duas coletas realizadas, nas duas condições citadas acima. Já ao correlacionar as primeiras coletas, observamos a diminuição significativa de IgG1 e IgG3 na condição de profissionais que apresentaram apenas IgG total positivo, quando comparados com as primeiras coletas de profissionais que apresentaram positividade para IgG total e IgM (Fig.13a e b).

Figura 13 – Níveis de subclasses de IgG em relação a sorologia para anticorpos anti-SARS-CoV-2



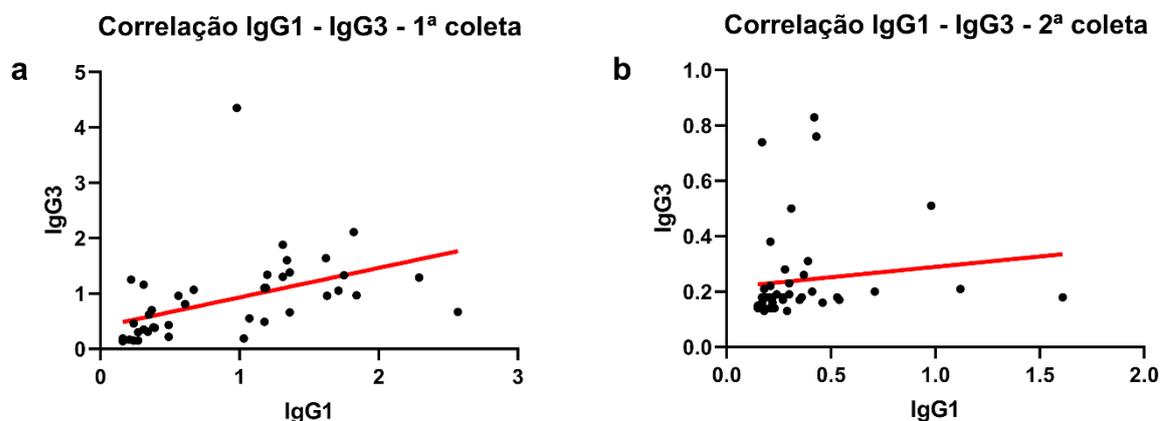
Fonte: Da Autora, 2022.

Níveis de subclasses de IgG (IgG1 e IgG3) em relação à positividade do voluntário para IgG total apenas ou IgG total e IgM, medidos nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana Índice ELISA. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. ** diferença significativa de 0,0017 nos níveis de IgG1, entre primeira e segunda coleta de voluntários positivos para IgG total e IgM. * diferença significativa de 0,0294 nos níveis de IgG3, entre primeira e segunda coleta de voluntários positivos para IgG total e IgM. **** diferença significativa de $< 0,0001$ nos níveis de anticorpos entre primeira e segunda coleta de voluntários positivos apenas para IgG total. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Mann-Whitney. ** diferença significativa de 0,0038 entre as primeiras coletas entre voluntários positivos para IgG total e IgM e apenas para IgG total.

5.1.10 Correlação entre subclasses de IgG

Correlacionamos IgG1 e IgG3 na primeira ($p = < 0,0001$, $r = 0,7104$, teste de correlação de Spearman) e segunda coleta ($p = 0,0029$, $r = 0,4427$, teste de correlação de Spearman) e foi possível identificar a existência de uma correlação significativa entre as subclasses. Como podemos ver, a concentração de IgG1 e IgG3 acompanham-se, mostrando que as concentrações estão positivamente correlacionadas, ou seja, um mesmo padrão para ambas (Fig. 14a e b).

Figura 14 – Correlação entre subclasses de IgG



Fonte: Da Autora, 2022.

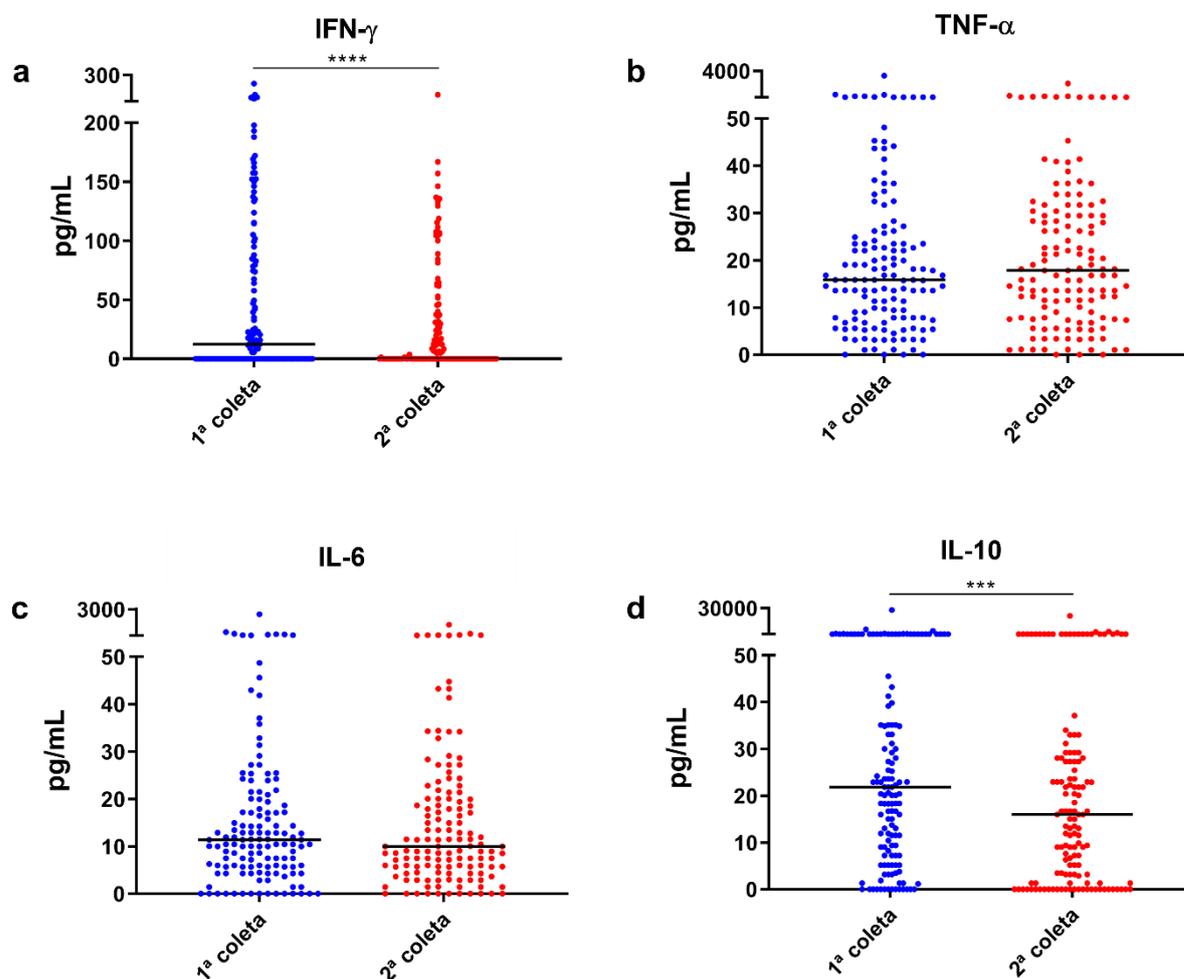
Correlação dos níveis de subclasses de IgG (IgG1 e IgG3), medidos nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana Índice ELISA. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Correlação de Spearman. **** diferença significativa da correlação de IgG1 e IgG3 1ª coleta ($p = < 0,0001$, $r = 0,7104$, teste de correlação de Spearman). ** diferença significativa da correlação de IgG1 e IgG3 2ª coleta ($p = 0,0029$, $r = 0,4427$, teste de correlação de Spearman).

5.2 PADRÃO DA IMUNIDADE CELULAR DOS PROFISSIONAIS DA SAÚDE.

5.2.1 Nível de citocinas nas duas coletas

Ao realizar o método de ELISA para quantificar esses produtos da imunidade celular, notamos diminuição significativa na concentração de IFN- γ e IL-10 quando comparadas a primeira e a segunda coletas (Fig. 15a e d).

Figura 15 – Níveis de citocinas nas duas coletas



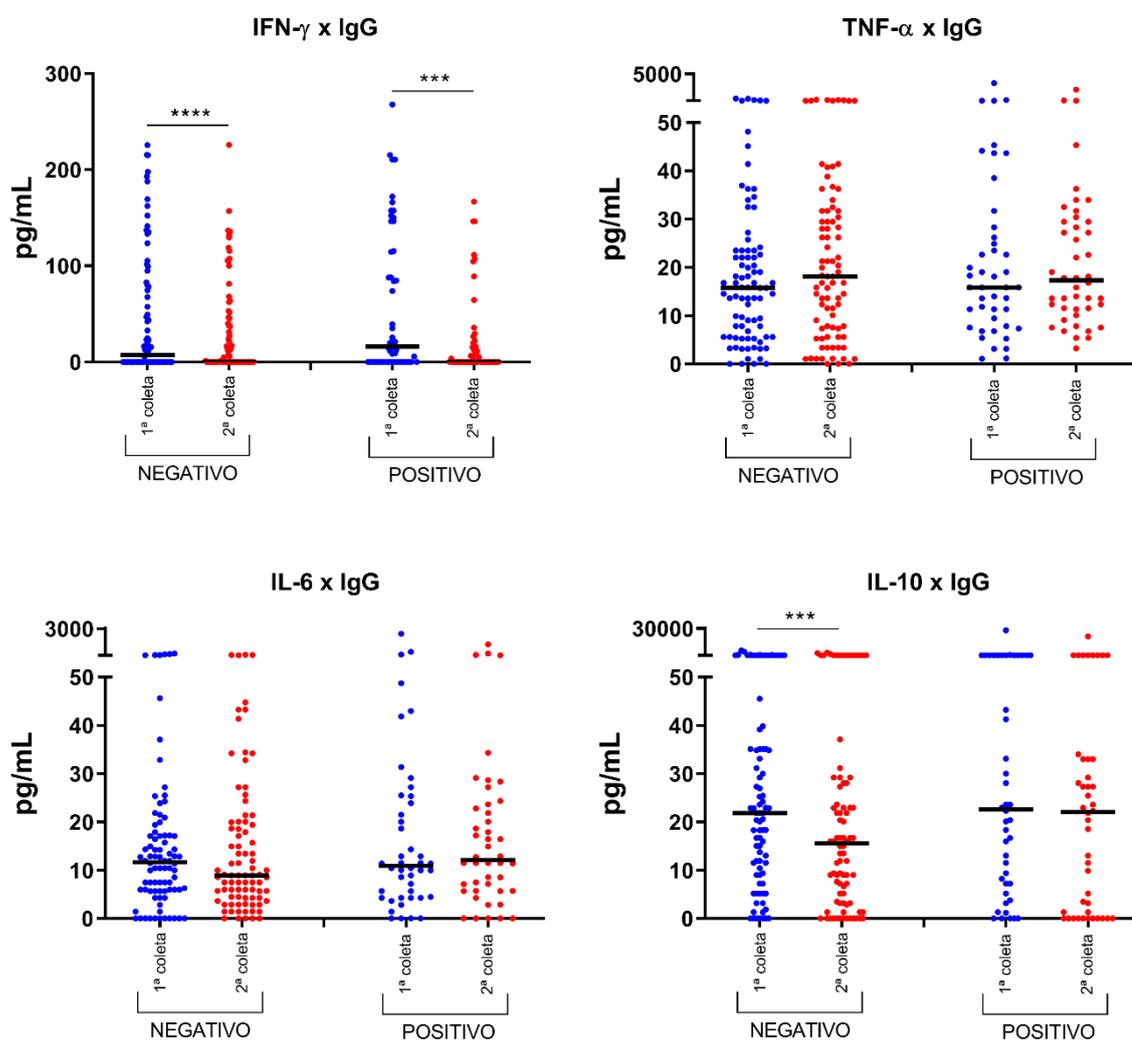
Fonte: Da Autora, 2022.

Produção de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 medidas nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana pg/mL. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. **** diferença significativa de $< 0,0001$ entre primeira e segunda coleta nos níveis de IFN- γ . *** diferença significativa de $0,0004$ entre primeira e segunda coleta nos níveis de IL-10.

5.2.2 Nível de citocinas em relação à IgG total

Dividimos os voluntários em IgG negativo e IgG positivos e analisamos seus níveis de citocinas. O nível de produção de IFN- γ diminuiu significativamente entre a primeira e segunda coleta, naqueles profissionais IgG negativo e positivo (Fig. 16a). Além disso, houve a diminuição significativa de IL-10 entre as coletas dos profissionais IgG negativos (Fig. 16d).

Figura 16 – Níveis de citocinas em relação à IgG total



Fonte: Da Autora, 2022.

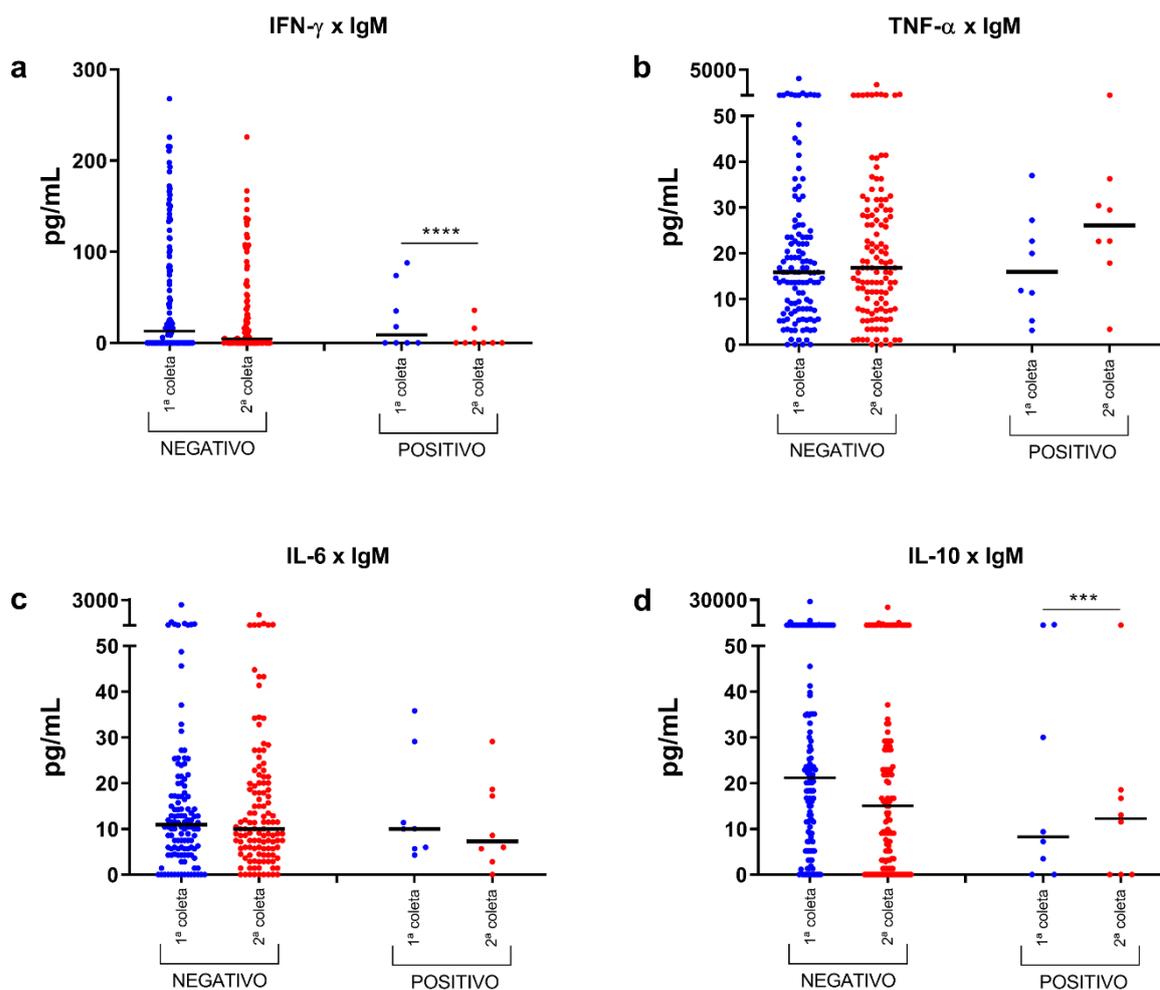
Produção de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 em relação ao anticorpo IgG medidas nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana pg/mL. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. **** diferença significativa de $< 0,0001$ entre primeira e segunda coleta nos níveis de IFN- γ em pacientes IgG negativos. *** diferença significativa de $0,0006$ entre primeira e segunda coleta nos níveis de IFN- γ em pacientes IgG positivos. *** diferença significativa de $0,0003$ entre primeira e segunda coleta nos níveis de IL-10 em pacientes IgG positivos.

5.2.3 Nível de citocinas em relação ao anticorpo IgM

Usando os dados dos níveis de IgM, continuamos analisando os níveis de citocinas em voluntários IgM negativos e IgM positivos. O nível de produção de IFN- γ diminuiu significativamente nos profissionais IgM positivos ao comparar primeira e

segunda coleta (Fig. 17a). Em contrapartida a IL-10 aumentou significativamente entre as coletas dos profissionais IgM positivos (Fig. 17d).

Figura 17 – Níveis de citocinas em relação ao anticorpo IgM



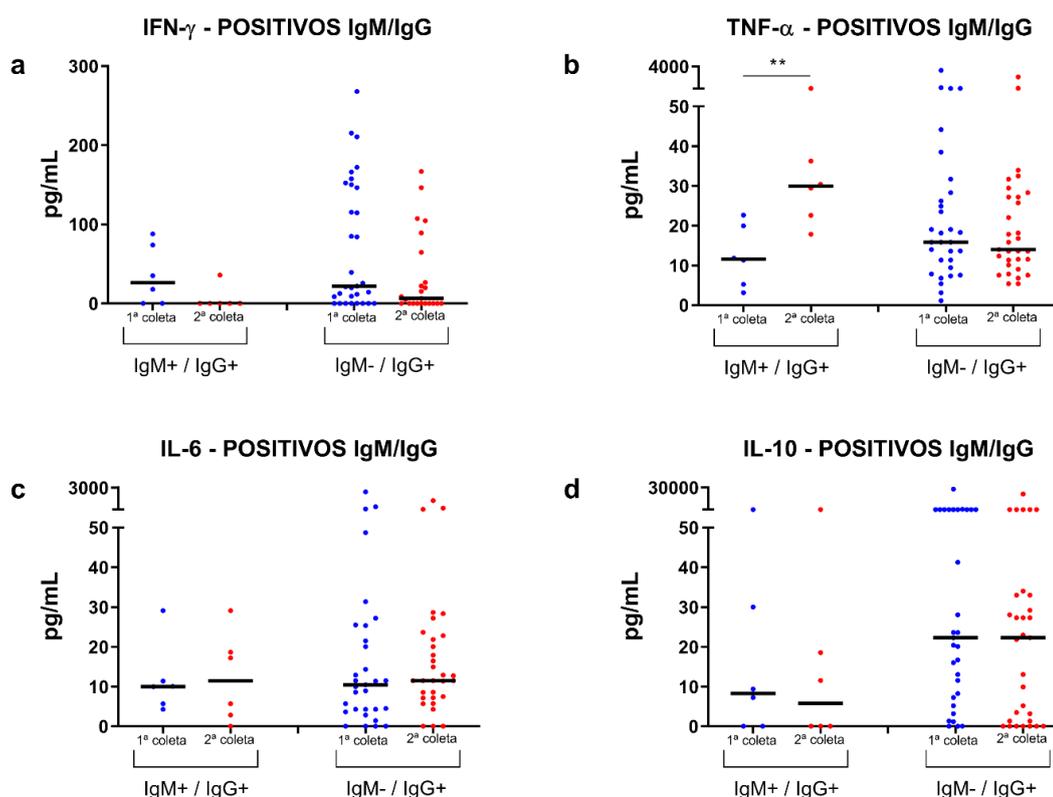
Fonte: Da Autora, 2022.

Produção de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 em relação ao anticorpo IgM medidas nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana pg/mL. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. **** diferença significativa de $< 0,0001$ entre primeira e segunda coleta nos níveis de IFN- γ em pacientes IgM positivos. *** diferença significativa de $0,0003$ entre primeira e segunda coleta nos níveis de IL-10 em pacientes IgM positivos.

5.2.4 Nível de citocinas em relação à sorologia para anticorpos anti-SARS-CoV-2

Com os dados citados anteriormente, foi possível identificar aqueles indivíduos que possuíam altos níveis de IgG total e IgM, mostrando uma positividade quanto à sorologia para anticorpos IgG e IgM anti-proteína N do SARS-CoV-2. Houve a divisão de voluntários em IgM positivo/IgG positivo e IgM negativo/IgG positivo e analisamos seus níveis de citocinas. Apenas o nível de produção de TNF- α aumentou de forma significativa na segunda coleta em relação à primeira, naqueles profissionais IgM positivo/IgG positivo, mas sem mudanças no grupo de profissionais IgM negativo/IgG positivo (Fig. 18b).

Figura 18 – Níveis de citocinas em relação a sorologia para anticorpos anti-SARS-CoV-2



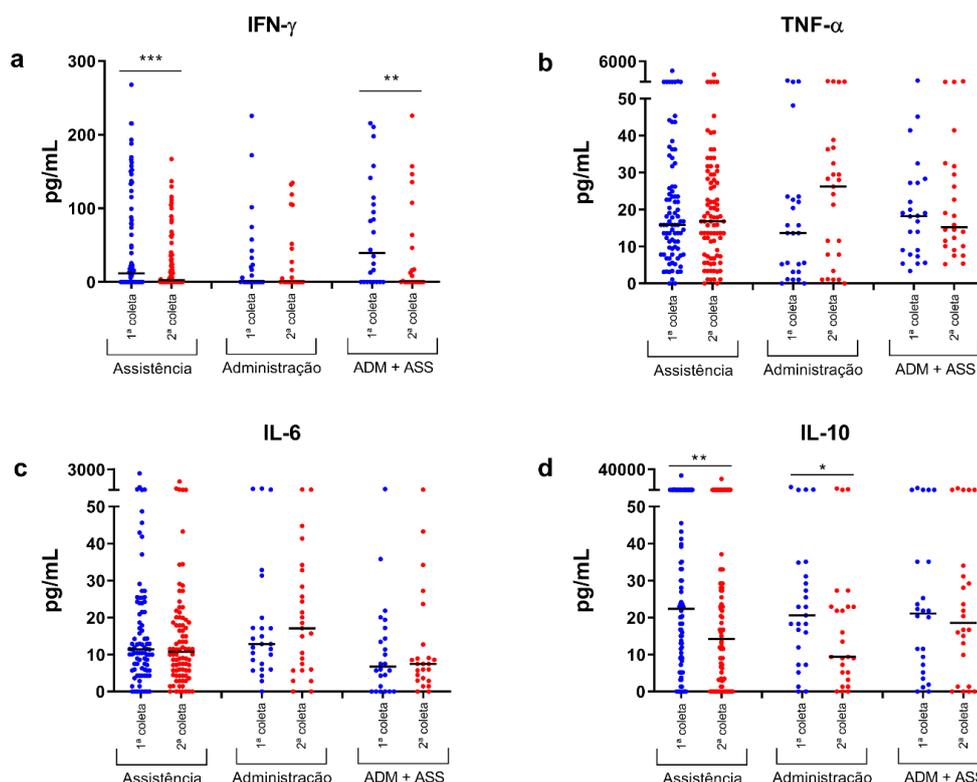
Fonte: Da Autora, 2022.

Produção de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 em relação aos anticorpos IgM e IgG total medidas nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana pg/mL. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. ** diferença significativa de 0,0092 entre primeira e segunda coleta nos níveis de TNF- α em pacientes IgM e IgG positivos.

5.2.5 Nível de citocinas em relação às atividades laborais

O nível de citocinas dos profissionais com diferentes atividades laborais apresentou diferenças significativas. Foi possível observar a diminuição significativa de IFN- γ entre a primeira e segunda coleta nos profissionais com atividade relacionada à Assistência e Administrativa + Assistencial (Fig. 19a). Também houve diminuição significativa da concentração de IL-10 nos profissionais com atividade assistenciais e administrativas (Fig. 19d).

Figura 19 – Nível de citocinas em diferentes atividades laborais



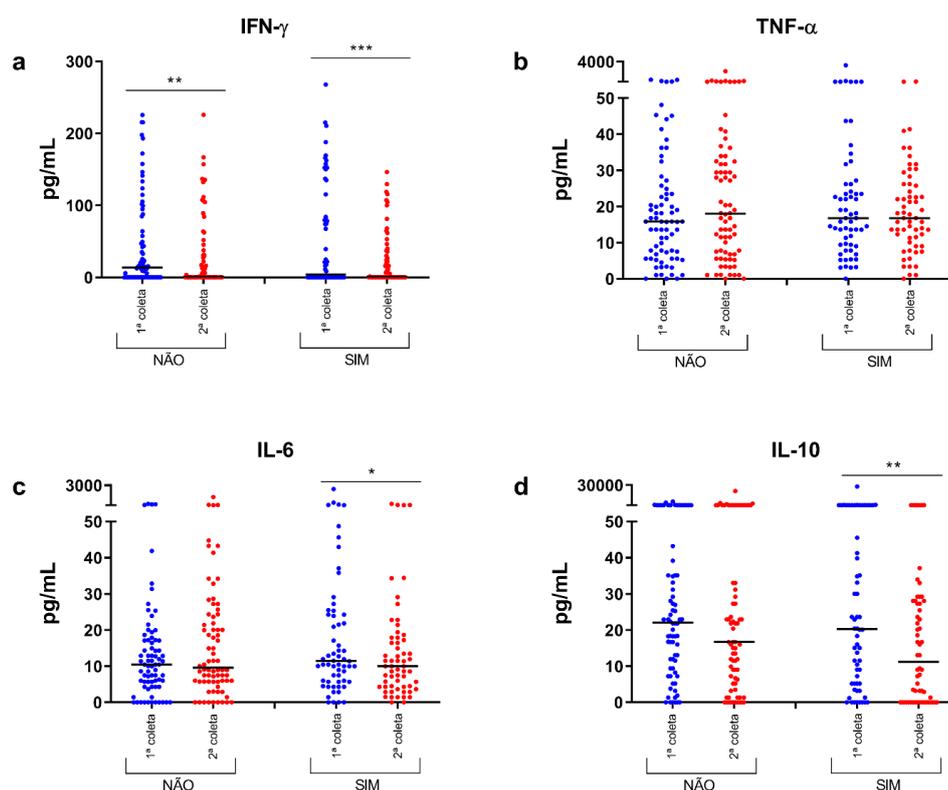
Fonte: Da Autora, 2022.

Nível de citocinas em profissionais com diferentes atividades laborais, medido nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana pg/mL. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. *** diferença significativa de 0,0003 na concentração de IFN- γ entre primeira e segunda coleta em voluntários com atividade Assistencial. ** diferença significativa de 0,0047 na concentração de IFN- γ entre primeira e segunda coleta em voluntários com atividade Administrativa + Assistencial. ** diferença significativa de 0,0035 na concentração de IL-10 entre primeira e segunda coleta em voluntários com atividade Assistencial. * diferença significativa de 0,0113 na concentração de IL-10 entre primeira e segunda coleta em voluntários com atividade Administrativa.

5.2.6 Nível de citocinas em relação ao contato dos profissionais com indivíduos positivados

Analizamos a concentração de citocinas no sangue de profissionais que possuíam contato com pacientes infectados. Foi possível identificar queda significativa de IFN- γ entre a primeira e segunda coleta de voluntários que tiveram contato ou não com pacientes positivados (Fig. 20a). Também houve a diminuição significativa de IL-6 e IL-10 no sangue de profissionais que tiveram contato com pacientes infectados (Fig. 20c e d).

Figura 20 – Nível de citocinas em profissionais da saúde com contato com pacientes positivados

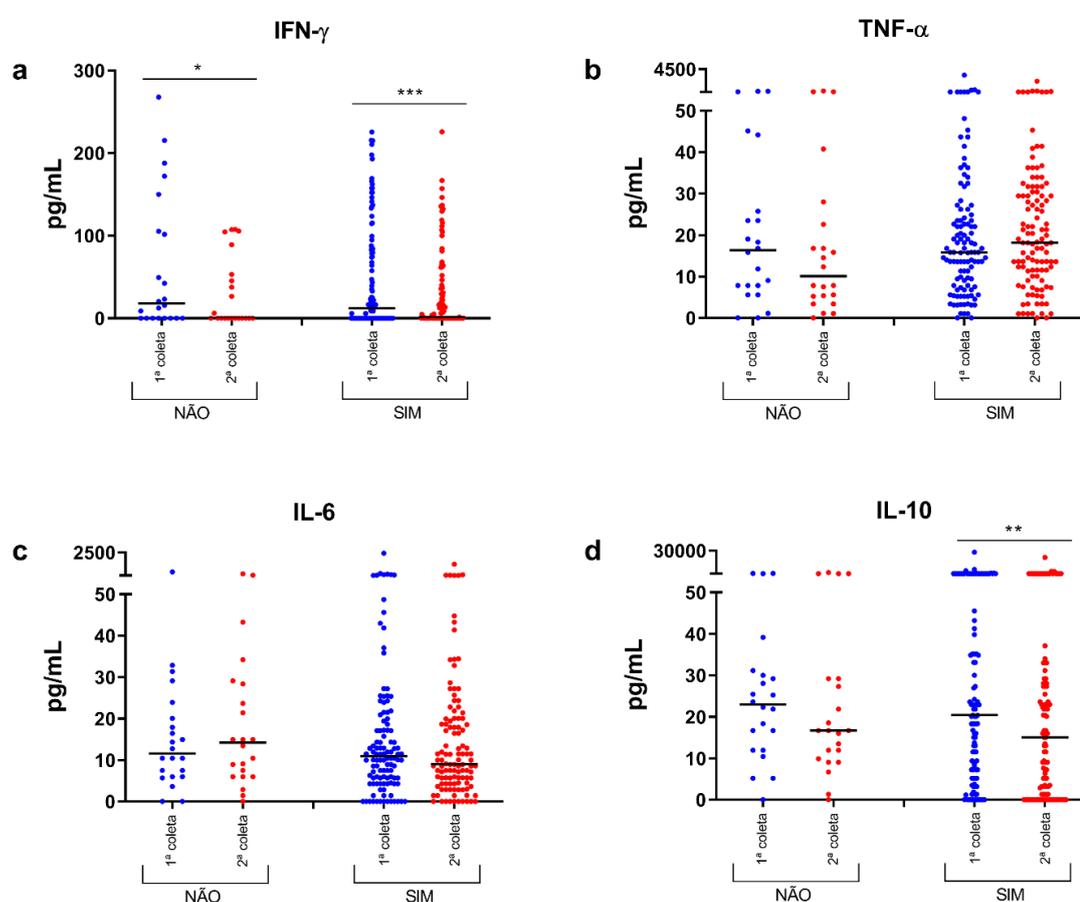


Fonte: Da Autora, 2022.

Nível de citocinas em profissionais com contato com pacientes positivados, medido nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana pg/mL. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. *** diferença significativa de 0,0003 na concentração de IFN- γ entre primeira e segunda coleta em voluntários que tiveram contato com pacientes positivados. ** diferença significativa de 0,0045 na concentração de IFN- γ entre primeira e segunda coleta em voluntários que não contato com pacientes positivados. * diferença significativa de 0,0468 na concentração de IL-6 entre primeira e segunda coleta em voluntários que tiveram contato com pacientes positivados. ** diferença significativa de 0,0016 na concentração de IL-10 entre primeira e segunda coleta em voluntários que tiveram contato com pacientes positivados, respectivamente.

Ao quantificar a produção de IFN- γ , notou-se a diminuição significativa da concentração em voluntários que tiveram ou não contato com colaboradores positivados (Fig. 21a). As concentrações de IL-10 diminuíram significativamente no grupo cujos profissionais tiveram contato com os colaboradores (Fig. 21d).

Figura 21 – Nível de citocinas em profissionais da saúde com contato com colaboradores positivados



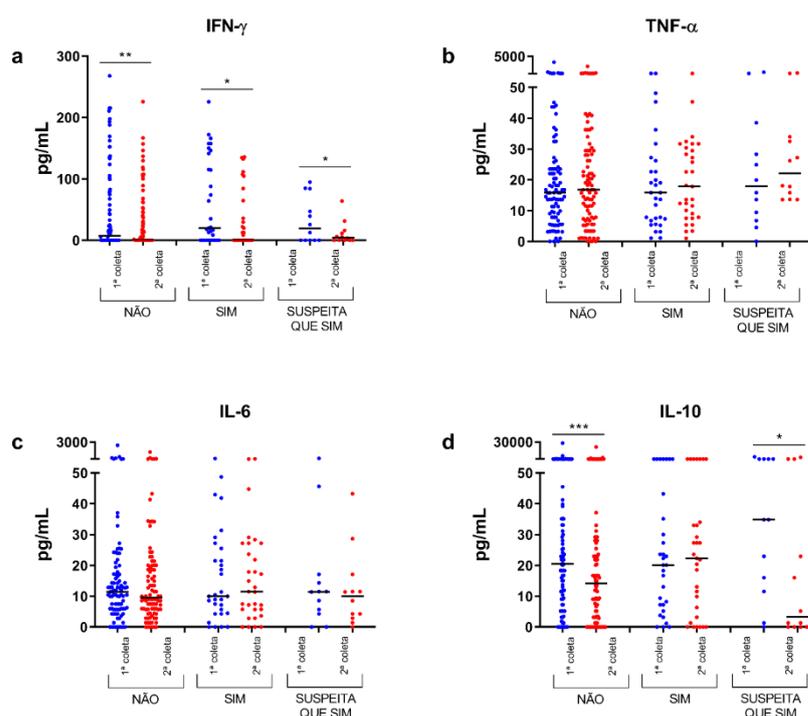
Fonte: Da Autora, 2022.

Nível de citocinas em profissionais com contato com colaboradores positivados, medido nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana pg/mL. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. * diferença significativa de 0,0166 na concentração de IFN- γ entre primeira e segunda coleta em voluntários que não contato com colaboradores positivados. *** diferença significativa de 0,0002 na concentração de IFN- γ entre primeira e segunda coleta em voluntários que tiveram contato com colaboradores positivados. ** diferença significativa de 0,0013 na concentração de IL-10 entre primeira e segunda coleta, em voluntários que tiveram contato com positivados.

5.2.7 Nível de citocinas em relação em relação à exposição prévia ao SARS-CoV-2

Os profissionais que autorrelatam não ter tido, ter tido ou suspeita que teve exposição prévia ao SARS-CoV-2 em algum momento anterior às coletas apresentaram uma diminuição significativa dos níveis de IFN- γ entre a primeira e segunda coleta de todas essas condições (Fig. 22a). Uma diminuição significativa de IL-10 também foi vista entre a primeira e segunda coleta dos voluntários que autorrelataram não ter tido exposição prévia ao SARS-CoV-2 ou dos que suspeitavam (Fig. 22d).

Figura 22 – Nível de citocinas em relação ao autorrelato de positividade para a COVID-19

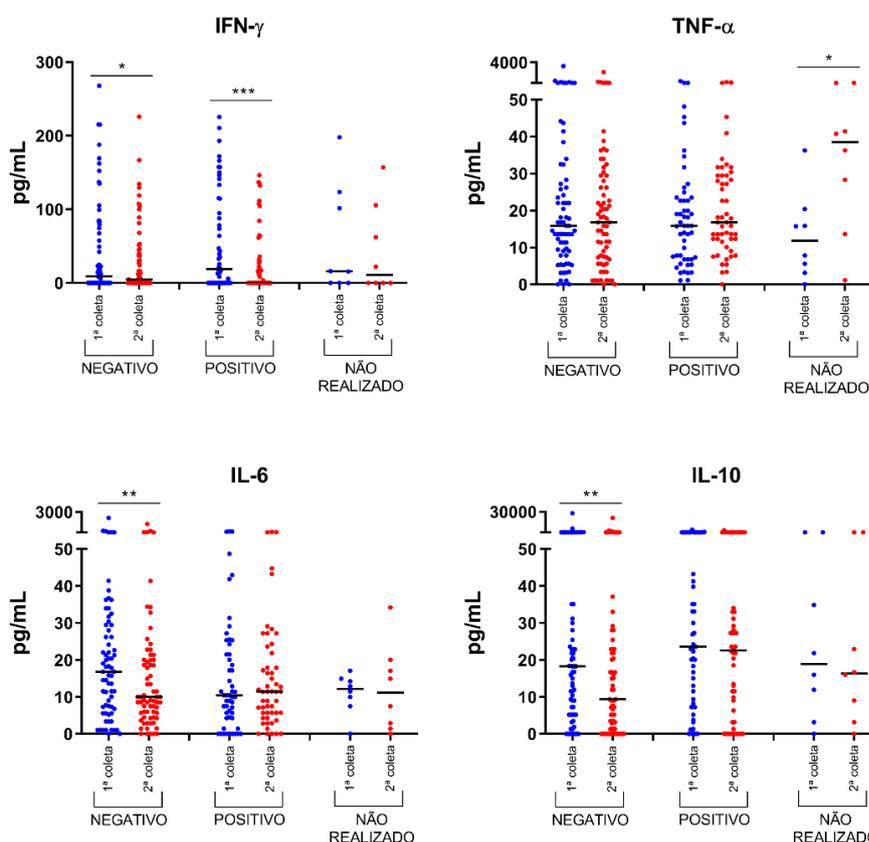


Fonte: Da Autora, 2022.

Nível de citocinas em profissionais que autorrelataram infecção por SARS-CoV-2, medido nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana pg/mL. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. ** diferença significativa de 0,0016 na concentração de IFN- γ entre primeira e segunda coleta em voluntários que autorrelatam não infecção da COVID-19. * diferença significativa de 0,0269 na concentração de IFN- γ entre primeira e segunda coleta em voluntários que autorrelatam infecção. * diferença significativa de 0,0391 na concentração de IFN- γ entre primeira e segunda coleta em voluntários que autorrelatam suspeita de infecção prévia. *** diferença significativa de 0,0004 na concentração de IL-10 entre primeira e segunda coleta, em voluntários que autorrelatam não ter sido infectado. * diferença significativa de 0,0186 na concentração de IL-10 entre primeira e segunda coleta, em voluntários que autorrelatam suspeita de infecção prévia.

Com nossos dados demonstrados anteriormente, pode-se pensar no risco ocupacional existente na profissão dos voluntários, e por isso, é comum eles terem realizados diversos exames diagnósticos para a COVID-19. Observamos a queda significativa do IFN- γ entre a primeira e segunda coleta dos que foram positivos ou negativos (Fig. 23a). O aumento é visto na concentração de TNF- α nos voluntários que não haviam realizado exames diagnósticos prévios à pesquisa (Fig. 23b). Entretanto, nota-se um padrão de diminuição de IL-6 e IL-10 entre as coletas nos voluntários que apresentaram exames prévios negativos (Fig. 23c e d).

Figura 23 – Nível de citocinas em relação aos exames diagnósticos para a COVID-19 realizados previamente



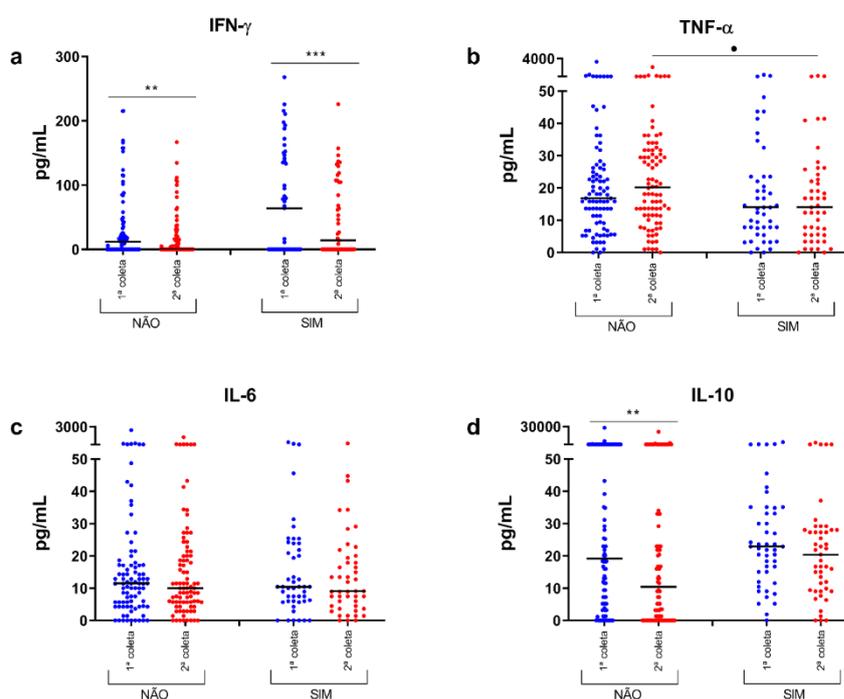
Fonte: Da Autora, 2022.

Nível de citocinas em profissionais que realizaram exame diagnóstico para a COVID-19 prévio à pesquisa, medido nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana pg/mL. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. *** diferença significativa de 0,0001 na concentração de IFN- γ entre primeira e segunda coleta em voluntários que tiveram resultado positivo um ou mais exames. * diferença significativa de 0,0421 na concentração de IFN- γ entre primeira e segunda coleta em voluntários que tiveram resultado negativo em um ou mais exames. * diferença significativa de 0,0201 na concentração de TNF- α entre primeira e segunda coleta, em voluntários que não realizaram nenhum exame prévio. ** diferença significativa de 0,0046 na concentração de IL-6 entre primeira e segunda coleta, em voluntários que tiveram resultado negativo em um ou mais exames. ** diferença significativa de 0,0059 na concentração de IL-10 entre primeira e segunda coleta, em voluntários que tiveram resultado negativo em um ou mais exames.

5.2.8 Nível de citocinas em relação às vacinas anti-SARS-CoV-2

Quantificamos as citocinas e cruzamos os resultados com os dados de vacinação contra o SARS-CoV-2. Ao dosar IFN- γ foi possível observar que tanto os profissionais que não tomaram a vacina contra o SARS-CoV-2, quanto os que tomaram ao menos uma dose, houve diminuição significativa dos níveis entre a primeira e segunda coleta (Fig. 24a). Além disso, foi observado uma diminuição significativa de IL-10 na segunda coleta dos voluntários que não haviam tomado vacina (Fig. 24d). Comparando a segunda coleta de TNF- α entre os voluntários que não tomaram e os que tomaram ao menos uma dose antes da segunda coleta, vimos aumento significativo da citocina naqueles que tomaram a vacina (Fig. 24b).

Figura 24 – Nível de citocinas em relação à vacinação antes da primeira coleta

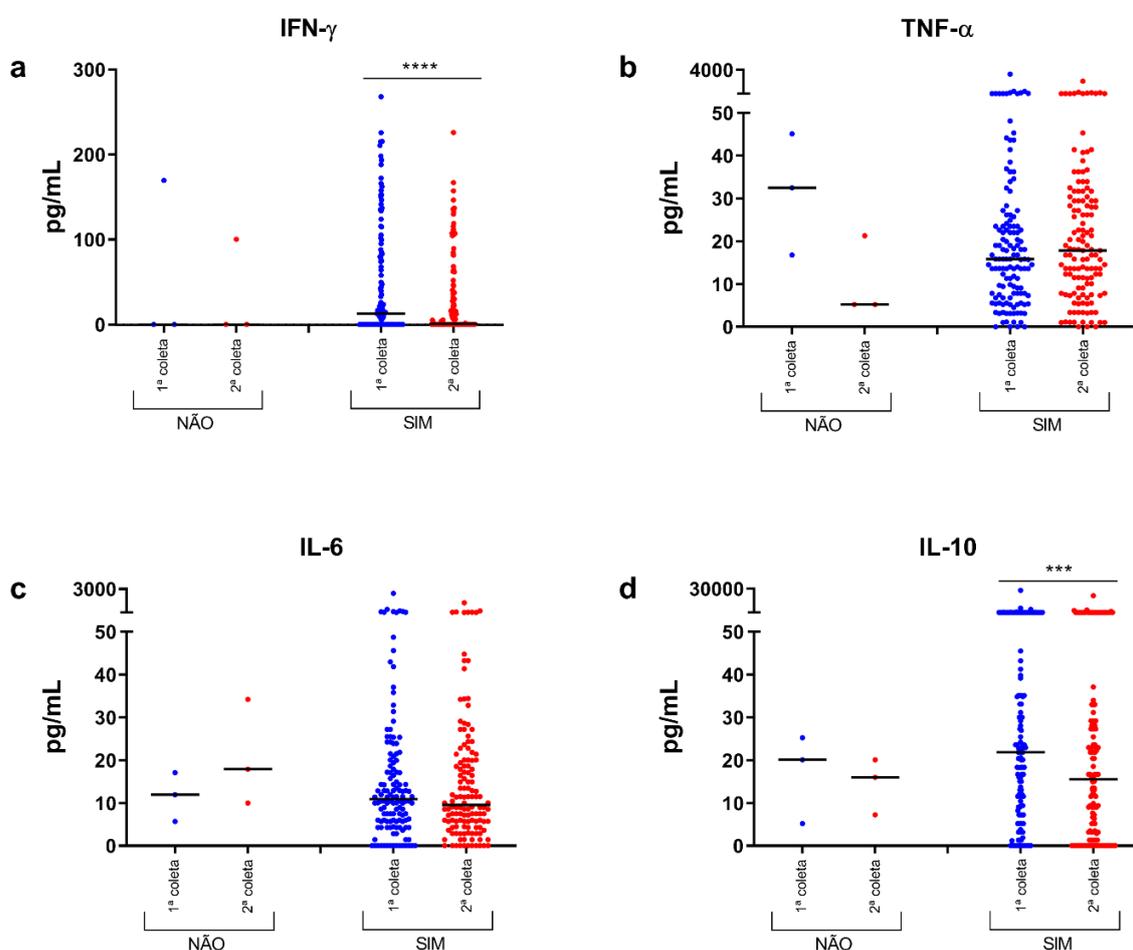


Fonte: Da Autora, 2022.

Nível de citocinas em profissionais que receberam ao menos uma dose antes da primeira coleta da pesquisa, medido nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana pg/mL. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. ** diferença significativa de 0,0035 na concentração de IFN- γ entre primeira e segunda coleta em voluntários que não receberam a vacina. *** diferença significativa de 0,0003 na concentração de IFN- γ entre primeira e segunda coleta em voluntários que receberam a vacina. ** diferença significativa de 0,0026 na concentração de de IL-10 entre primeira e segunda coleta, em voluntários que não receberam a vacina. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Mann-Whitney. • diferença significativa de 0,0208 entre as segundas coletas entre voluntários que receberam ou não a vacina.

Avaliamos a mudança nos níveis de citocinas comparando primeira e segunda coleta de indivíduos que tomaram uma ou mais doses da vacina antes da segunda coleta. Nesse sentido, foi observado uma diminuição significativa de IFN- γ e IL-10, entre a primeira e segunda coleta, nos profissionais que tomaram ao menos uma dose antes da segunda coleta (Fig. 25a e d).

Figura 25 – Nível de citocinas em relação à vacinação antes da segunda coleta



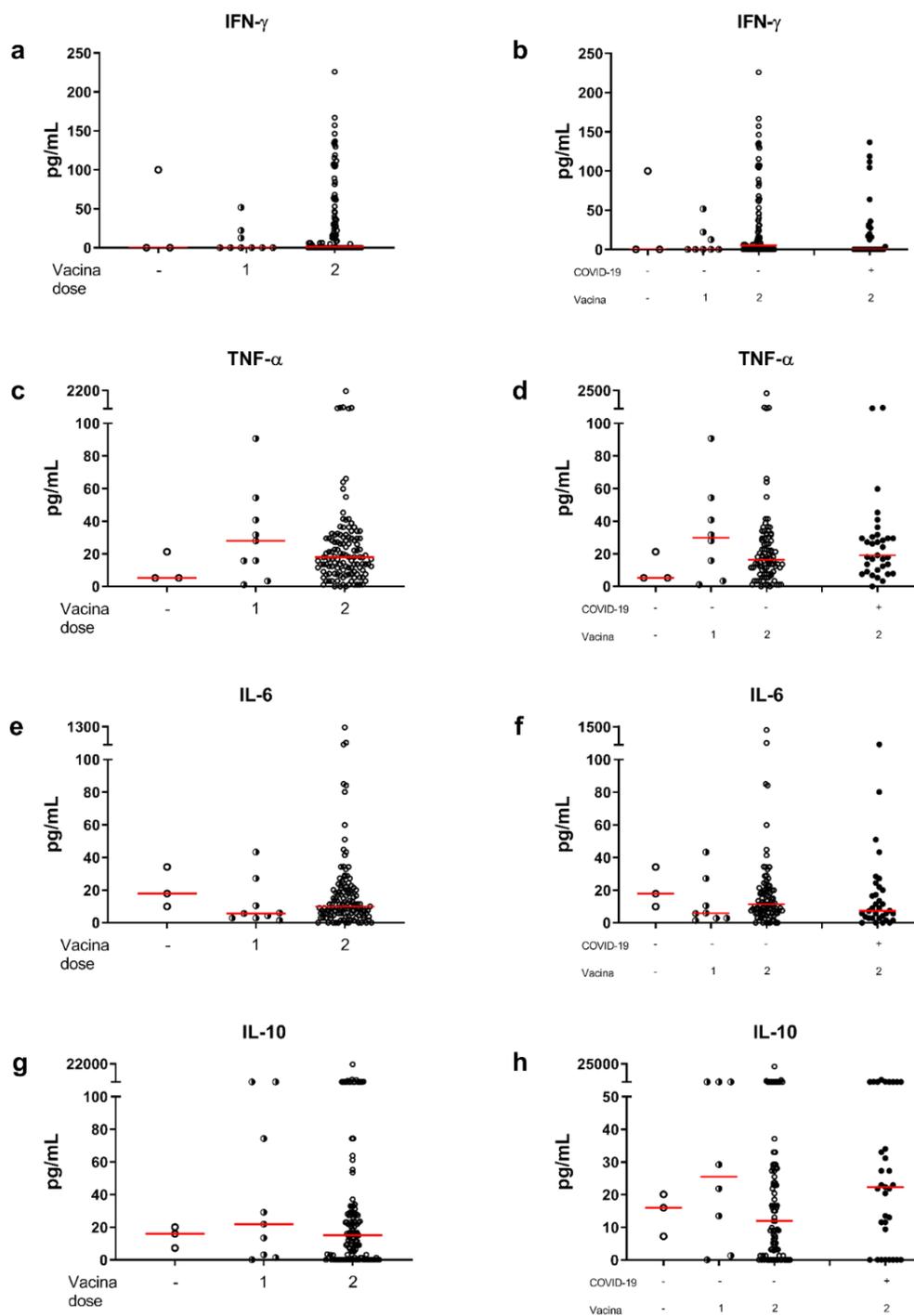
Fonte: Da Autora, 2022.

Nível de citocinas em profissionais que realizaram exame diagnóstico para a COVID-19 prévia à pesquisa, medido nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana pg/mL. Todos considerados significativos para $p < 0,05$, teste aplicado Wilcoxon. **** diferença significativa de $< 0,0001$ na concentração de IFN- γ entre primeira e segunda coleta em voluntários que não receberam a vacina. *** diferença significativa de $0,0005$ na concentração de IL-10 entre primeira e segunda coleta em voluntários que receberam a vacina.

5.2.9 Nível de citocinas em relação às doses vacinais anti-SARS-CoV-2

Analizamos o nível de citocinas de duas formas referentes à vacinação. A primeira em voluntários que não receberam dose da vacina, receberam uma ou duas doses das vacinas anti-SARS-CoV-2, e a segunda correlacionando a infecção pelo SARS-CoV-2 e a vacinação. Em nenhuma das condições analisadas, para nenhuma das citocinas foi vista diferença significativa na produção desses componentes (Fig. 26).

Figura 26 – Nível de citocinas em relação às doses vacinais anti-SARS-CoV-2



Fonte: Da Autora, 2022.

Nível de citocinas em profissionais que não receberam ou receberam uma ou duas doses das vacinas anti-SARS-CoV-2, medido nas amostras das duas coletas pelo método de ELISA. Os resultados foram expressos em mediana pg/mL. Teste aplicado Kruskal-Wallis (múltiplas comparações).

6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a imunidade humoral e celular anti-SARS-CoV-2 nos profissionais da saúde, do município de Uberaba-MG. Nossos resultados apontam a relação da modulação da resposta imune em casos de voluntários positivados ou não para a COVID-19. Nesta discussão iremos nos ater ao fato de ser um vírus novo e ainda ser necessário elucidar muitas questões acerca de sua interação com o hospedeiro, principalmente, em torno de pacientes assintomáticos. A sorologia para anticorpos anti-proteína N do SARS-CoV-2 foi realizada no plasma e os grupos separados de acordo com a positividade na sorologia. É importante salientar que a dosagem de anticorpos não serve, isoladamente, para determinar se o indivíduo foi infectado, imunizado ou ambos. Ainda, levamos em consideração que na dosagem de anticorpos um resultado negativo não exclui a infecção por SARS-CoV-2, mas o resultado positivo pode indicar fortemente a positividade para infecção anterior pelo Coronavírus.

Em nosso estudo a maioria dos voluntários apresentaram a sorologia de IgG total teste negativo, seguida por positivo e indeterminado. Em contrapartida, estudos feitos pelos grupos de pesquisa do Plebani, na Itália (2020) e do Müller, na Alemanha (2021), em profissionais da saúde que trabalhavam em atendimento direto à pacientes, mostrou um menor índice de positividade em relação ao total de profissionais testados. Os resultados encontrados em nossos estudos demonstram que os profissionais da saúde possuem maior índices de positividade na sorologia, e se dá ao fato de ser um serviço essencial, que está em contato direto com o público e continuou os atendimentos desde o início da pandemia. Quando comparado com os dados dos artigos apresentados a menor porcentagem pode ser devido ao índice de desenvolvimento dos países, onde possuem melhor condições de trabalho.

Não houve diferenças na proporção desses resultados em relação ao sexo dos voluntários, idade, presença de comorbidades assim como em outro trabalho realizado em pacientes e profissionais da saúde (CERVIA *et al.*, 2021). Porém, neste trabalho citado foram dosados títulos específicos de IgG anti-proteína-S, o que nos leva a ver a necessidade de realizar novos estudos envolvendo anticorpos contra

diferentes proteínas. Devemos levar em consideração que na grande maioria dos casos, os profissionais de saúde incluídos nos estudos, gozam de bom estado geral. Já quando comparamos as pessoas obesas com as de peso normal, vemos que as obesas possuem maior índice de anticorpos IgG, demonstrando uma tendência desses indivíduos a apresentarem conseqüentemente doença sintomática e com maior carga viral. Assim como, na literatura há artigos falando do mau prognóstico que pessoas obesas tem perante pessoas com níveis de IMC inferiores, tendo maior índices de gravidade e mortalidade na doença COVID-19 (ANDERSON; FERRANTE; BALDWIN, 2021; PRANATA *et al.*, 2021).

Ao contrário dos nossos achados, dois grupos de estudos de Wuhan indicaram que pacientes femininas de grupo sanguíneo A possuem maior risco de infecção, o que pode ser devido às diferenças no nível hormonal e sistema imune (FAN *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2021), enquanto pacientes de grupo sanguíneo O possuem menor risco (ZHAO *et al.*, 2021). A menor suscetibilidade do grupo sanguíneo O e a maior do grupo sanguíneo A para COVID-19 podem estar ligadas à presença de anticorpos naturais anti-grupo sanguíneo, particularmente anticorpo anti-A, no sangue. O fato de não termos encontrado diferenças em nossos resultados demonstra a necessidade de mais estudos, para melhor compreensão das particularidades do grupo ABO perante a COVID-19.

O tipo de atividade laboral realizada pelos profissionais pode ser um indicativo do risco ocupacional envolvido no dia a dia dos voluntários. Um estudo realizado em hospital e universidade da Suécia pode ser correlacionado com os achados de nosso trabalho. No estudo de David Nygren e colaboradores (2021), os autores analisaram a positividade para o SARS-CoV-2 dividido em três grupos: 1) profissionais de saúde nas unidades COVID-19, podendo ser comparado aos nossos profissionais assistenciais; 2) profissionais de saúde nas unidades não COVID-19, em comparação com nossos profissionais administrativos-assistenciais; 3) funcionários não profissionais da Universidade, como nossos profissionais administrativos. Assim como em nosso estudo, o maior índice de positividade foi em profissionais com maior contato com pacientes positivos, 22% em comparação com nossos 44,7%. Entretanto, em relação aos profissionais em ambas as atividades ou somente administrativa, os índices obtiveram valor próximo de 5% e 6%, respectivamente, em contrapartida aos

29,3% e 5,3% de nosso estudo. De qualquer forma, podemos analisar em ambos os estudos que houve uma tendência de maior positividade naqueles profissionais que atendiam diretamente os pacientes com COVID-19 internados, demonstrando a que há risco ocupacional relativo ao tipo de atividade laboral realizada pelos profissionais. Não foram encontrados estudos sobre a diferença na proporção de testes positivos entre profissionais que tiveram contato ou não com colegas de trabalho afastados por COVID-19.

O profissionais da saúde voluntários em nosso estudo fizeram autorrelato de exposição prévia ao SARS-CoV-2 e de realização de exames de diagnóstico para COVID-19, fator importante para ser levado em consideração na hora da dosagem de anticorpos, devido à frequente exposição à pacientes possivelmente infectados. Observamos uma surpreendente concordância fraca tanto em relação ao relato do resultado de testes anteriores para a COVID-19 quanto de desenvolvimento prévio da doença. A maior interação com os pacientes leva à um alto risco ocupacional, com maior índice de positividade nos exames, porém essa concordância fraca, pode indicar meios corretos e um bom preparo dos profissionais para lidar com pacientes.

Estudo encontrado na literatura, analisou amostras antes e após a primeira dose vacinal, e relatou que o nível de IgG foi maior após a vacinação (TAUZIN *et al.*, 2021). Já em nosso estudo, a quantidade de IgG em indivíduos vacinados e não vacinados não foram dosadas nos mesmos pacientes, como Tauzin e colaboradores realizaram. Isso pode explicar o porquê de nossos dados não terem apresentado diferença significativa no valor da IgG, representando indivíduos com diferenças em sua resposta imune.

Na segunda avaliação realizada com a participação de 137 voluntários, todos estes avaliados anteriormente, o índice de profissionais que apresentou sorologia positiva para a COVID-19 caiu, sendo que nove desses voluntários já estavam anteriormente positivos. Trinta e três profissionais previamente positivos para a COVID-19 negativaram o teste. Em estudo feito com diferença de 4 meses, indicou que os níveis de anticorpos diminuiriam entre as coletas das amostras (GUDBJARTSSON *et al.*, 2020). O fato analisado em nosso estudo, de queda do índice de sorologia positiva, pode ocorrer por conta de a quantidade de anticorpos ser relacionada com a carga viral, ou seja, menor concentração em pacientes

assintomáticos e leves. Ainda não foram totalmente elucidados os mecanismos de memória humoral e a variação do caráter e duração destas respostas (IBARRONDO *et al.*, 2020; ALVIN *et al.*, 2021; JORDAN, 2021). Outro fator que podemos indicar é o fato do surgimento de NAbs por infecção natural que impedem a reinfecção e NAbs induzidos por vacinação, impedindo até mesmo uma infecção primária (MOSTAGHIMI *et al.*, 2021).

A resposta humoral é inicialmente estimulada por antígenos. Os plasmócitos produzem e secretam anticorpos específicos para controlar a replicação viral (MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2010). Devido à essa característica, as imunoglobulinas podem ser dosadas nas duas coletas para avaliar o padrão de resposta da imunidade humoral no sangue dos profissionais da saúde contra o SARS-CoV-2. Ao analisar a imunidade humoral dos profissionais de saúde foi constatado queda da concentração de anticorpos IgG total e aumento de IgM no sangue dos voluntários.

Um estudo já mencionado anteriormente indicou ligeira queda de IgG e queda substancial de IgM, não sendo detectados após dois meses (GUDBJARTSSON *et al.*, 2020). Em contrapartida, outro estudo realizado no período de 3 meses, mostrou o nível de IgM foi relativamente baixo na primeira semana e aumentou gradativamente até a quinta semana, seguido de uma diminuição contínua, já o nível de IgG total foi superior ao de IgM durante a primeira semana e aumentou continuamente até a 5ª semana, manteve platô até a 7ª semana e depois diminuiu gradualmente a partir da 8ª semana, mas ainda estava consideravelmente elevado no final do período de observação (LI₂ *et al.*, 2020). Em casos de queda de anticorpos IgG e IgM, podem ser explicados pela diminuição da resposta imune ao decorrer do tempo e menor frequência do SARS-CoV-2 desafiando o sistema imune dos indivíduos, devido a desaceleração da pandemia e vacinação. Em ambos os artigos citados anteriormente, a IgM decaiu no decorrer das semanas, o que foi contrário aos nossos achados onde a IgM aumentou. Ao comparar o tempo de coletas com os dados das semanas epidemiológicas da cidade de Uberaba, vimos que a segunda coleta aconteceu em semanas que houve mais casos notificados do que nas semanas da primeira coleta, podendo ser um fator que influenciou esse aumento de IgM (OBSERVATÓRIO COVID-19 UBERABA, 2022). Entretanto, não se sabe ao certo o porquê desse ocorrido, sendo necessários novos estudos.

Quisemos analisar o risco ocupacional que determinadas atividades laborais oferecem aos profissionais da saúde, então comparamos as duas coletas e entre os tipos de atividades exercidas. Com isso, vimos que o nível de IgG total dos profissionais com diferentes atividades laborais apresentou diminuição tendenciosa entre as coletas nos profissionais de todas as atividades, o que é corroborado pelos estudos de Gaebler e Gallais, ambos de 2021. Pode-se imaginar que o declínio do nível de IgG representa uma contração da resposta imune, e assim como mostrado no estudo de Gallais (2021), os anticorpos anti-N ao contrário do anti-RBD há declínio acentuado. Já ao comparar as primeiras coletas dos três tipos de atividades, vemos diminuição significativa entre os profissionais assistenciais e administrativos. O estudo de David Nygren e colaboradores (2021), mostra que assim como em nosso estudo, o maior índice de positividade foi em profissionais com maior contato com pacientes positivos, da área assistencial, quando comparados com profissionais em atividades administrativas. Esses dados indicam que o trabalho assistencial de contato direto com pacientes revela ter elevado risco ocupacional para os profissionais da saúde.

O nível de IgG total pode ser avaliado em voluntários que tiveram contato ou não com pacientes ou colaboradores do hospital positivados, pois aqueles que contactaram indivíduos positivos possuem maior chances de infectar-se. É possível identificar a queda no nível de IgG total entre as coletas de voluntários que tiveram contato ou não com pacientes ou colaboradores positivados, podendo ser devido à contração da resposta imune. Esses achados e a hipótese são consistentes com os achados de outras publicações onde indicaram queda de IgG total no decorrer do tempo (GUDBJARTSSON *et al.*, 2020; GAEBLER *et al.*, 2021; GALLAIS *et al.*, 2021; LUMLEY *et al.*, 2021; YAMAYOSHI *et al.*, 2021). Como dito anteriormente, voluntários que tiveram contato com indivíduos positivados possuem maior chances de infectar-se, foi o que foi visto em nosso trabalho ao comparar indivíduos que não tiveram e tiveram contato com pacientes positivados. Entretanto, não há trabalhos na literatura que fizeram essa comparação, porém Gallais e colaboradores, em 2021, demonstraram que 65,9% de seus profissionais da saúde voluntários, haviam tido contato anterior com individuo positivo para a COVID-19, mas não fizeram a comparação dos níveis de IgG total com aqueles que não haviam tido contato.

Nosso trabalho trouxe a análise de IgG total entre primeira e segunda coleta dos profissionais que autorrelatam COVID-19 prévia, ou dos profissionais que realizaram ou não exames diagnósticos, e foi observada a típica queda de IgG total, já descrita anteriormente demonstrando a corroboração em diversos trabalhos (GUDBJARTSSON *et al.*, 2020; GAEBLER *et al.*, 2021; GALLAIS *et al.*, 2021; LUMLEY *et al.*, 2021; YAMAYOSHI *et al.*, 2021). Gallais (2021) mostrou que 87,8% dos profissionais haviam ao menos um exame anterior de PCR positivo para o SARS-CoV-2, e 97,4% apresentaram sintomas para a COVID-19. Outro estudo, indicou que 21% dos pacientes haviam ao menos um exame anterior de PCR positivo para o SARS-CoV-2, e 61% apresentaram sintomas para a COVID-19 (LUMLEY *et al.*, 2021). Nosso estudo trouxe resultados que correlacionaram os níveis de IgG total entre os autorrelatos de COVID-19 prévia e exame para diagnóstico da COVID-19 prévio e não foi encontrado estudos sobre essas diferenças analisadas. Todos esses resultados encontrados indicam, fortemente, que um exame positivo para COVID-19 é seguido pelo aumento da resposta de anticorpos, assim como a afirmação de COVID-19 prévia.

Atualmente, a vacinação contra o SARS-CoV-2 é um dos meios de combate ao avanço da pandemia, por isso esse assunto está em foco nas pesquisas feitas acerca do assunto. Quantificamos o nível de IgG total e cruzando com os dados sobre a vacinação foi possível observar que independente da vacinação houve diminuição dos níveis de IgG entre a primeira e segunda coleta. Dois artigos, possuem dados que vão de encontro aos nossos achados. Os autores descobriram que os títulos de anticorpos IgG plasmáticos contra proteína S sobem no início, logo após a imunização, e depois decaem de forma acelerada após 4 meses (CHEMAITELLY *et al.*, 2021; TURNER *et al.*, 2021). Fato este, que pode confirmar a diminuição entre as coletas de nosso estudo, porém há a permanência em baixos níveis. As células B do centro germinativo antígeno-específico persistem por pelo menos um ano, mesmo que em níveis muito baixos (TURNER *et al.*, 2021).

Conhecer sobre a imunidade induzida nos diferentes tipos de vacinas anti-SARS-CoV-2 é importante para saber como limitar a infecção, a replicação e a transmissão. Por isso, analisamos qual vacina foi administrada, nos profissionais da saúde, e vimos a diminuição de anticorpo entre a primeira e segunda coleta nos

vacinados com AstraZeneca ou Coronavac, sem mudanças na Pfizer. Podemos atribuir esse dado ao tipo de imunidade induzida por cada vacina e o anticorpo pesquisado através do método de ELISA, por exemplo, a vacinação com AstraZeneca e Pfizer induziram a produção de anticorpos anti-S, já a Coronavac possui todo o vírus inativado em sua composição; o teste utilizado para detecção foi baseado na reatividade contra a proteína N do vírus. Esses dados vão contra os achados da pesquisa de Sadarangani, Marchant e Kollmann (2021), onde em seu artigo demonstrou que em todas as vacinas citadas aqui, o aumento dos níveis de IgG ocorrem de forma robusta a partir da segunda dose.

Os NAbs podem levar à cura esterilizante são produzidos em maior escala após completar o esquema vacinal e naqueles pacientes anteriormente infectados (LEVI *et al.*, 2021; STEENSELS *et al.*, 2021). Em nosso estudo o aumento do nível de IgG total em voluntários que receberam duas doses da vacina anti-SARS-CoV-2 e sendo proeminente em pacientes foram infectados pelo vírus anteriormente à vacinação, pode ser explicado pela produção maciça de NAbs. Nossos dados foram corroborados por estudos encontrados na literatura, onde indicam a maior concentração de IgG total nos grupos vacinados, com duas doses, e anteriormente infectados em comparação aos não vacinados ou aos vacinados com uma dose/duas doses e não infectados anteriormente (CALLEGARO *et al.*, 2021; LEVI *et al.*, 2021; STEENSELS *et al.*, 2021; TAUZIN *et al.*, 2021).

Ainda pouco se sabe sobre a variação e função dos isotipos de IgG na infecção pelo SARS-CoV-2. Estudos sobre métodos sorológicos que quantificaram isotipos de IgG, foi possível observar que IgG3 apresentou grande reatividade à antígenos seguida de IgG1 (AMANAT *et al.*, 2020; WHITCOMBE *et al.*, 2021). Ao contrário desses estudos, nossos dados indicaram que ao correlacionar IgG1 e IgG3 nos momentos das duas coletas as concentrações estão positivamente correlacionadas, ou seja, um mesmo padrão para ambas. Ao correlacionar IgG1 com a IgG3 era esperado uma diferença de padrão, já que a IgG3 tem uma afinidade mais forte para ativar os receptores Fc, mas uma meia-vida mais curta que a IgG1. Ainda há muitas incógnitas em relação aos correlatos de proteção para a infecção por SARS-CoV-2, já que não sabemos o padrão de resposta imune por células B de memória. Além dessas análises, vimos que a concentração das subclasses IgG1 e IgG3 diminuíram

na segunda coleta quando comparados aos valores da primeira coleta em voluntários que foram positivos para IgG total e IgM ou apenas para IgG total; e ao correlacionar as primeiras coletas, observamos a diminuição de IgG1 e IgG3 na condição de profissionais que apresentaram apenas IgG total positivo, quando comparados com as primeiras coletas de profissionais que apresentaram positividade para IgG total e IgM. Como podemos observar, os estudos visaram diferentes tipos de avaliações, não conseguindo chegar à conclusão sobre a variação e função dos isotipos de IgG na infecção pelo SARS-CoV-2. Sendo assim, é necessário realizar mais estudos na área.

Para definir funcionalmente a resposta imune celular antiviral presente nos indivíduos, projetamos um ensaio no qual o nível de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 foram testadas diretamente no sangue total. Levando em consideração que a produção dessas citocinas é realizada predominantemente pelos Linfócitos T auxiliares e citotóxicos (COSTELA-Ruiz *et al.*, 2020). Onde o aumento de todas essas citocinas está associado a lesões epiteliais e endoteliais graves no SARS-CoV e MERS-CoV (CHIEN *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2014), além de apresentarem concentrações plasmáticas aumentadas em casos graves de COVID-19, podendo indicar mau prognóstico (LUO *et al.*, 2020).

Ao realizar o método de ELISA para quantificar essas citocinas, notamos tendência de diminuição nas citocinas em geral, porém são diminuições que não podem ser interpretadas isoladamente apenas com a apresentação deste resultado. Estudo de Liu e colaboradores (2020), usou grupo de voluntários diferentes do nosso, dosou citocinas em pacientes leves positivos para a COVID-19, que é o grupo que podemos relacionar melhor com o nosso, não teve flutuações nos níveis dessas citocinas no decorrer dos 16 dias em que foram dosadas.

Após definir a resposta celular geral, quisemos identificar a cinética das citocinas perante a sorologia de anticorpos anti-SARS-CoV-2. O primeiro passo foi dividir os voluntários em IgG negativo e IgG positivos. Nosso grupo de pesquisa foi em direção ao segundo passo e realizou a dosagem de citocinas usando os dados dos níveis de IgM, em voluntários IgM negativos e IgM positivos. O terceiro passo de nosso estudo em relação às citocinas e a sorologia de anticorpos anti-SARS-CoV-2, foi identificar aqueles indivíduos que possuíam altos níveis de IgG total e IgM,

mostrando uma positividade quanto à infecção pelo SARS-CoV-2. Não sabemos o porquê de ocorrer o padrão de manter os níveis ou diferenciar em algumas dosagens, mas podemos concluir que existe correlação entre as respostas imunes humorais e celulares ao COVID-19, como iremos ver para cada citocina. Mais estudos precisam ser realizados acerca do assunto.

O IFN- γ atua estimulando a resposta T_{H1}, e possui papel crucial na resposta antiviral como ativador de macrófagos e produtor de IgG pelos linfócitos B (BRANDÃO *et al.*, 2020). Nossos resultados demonstraram queda no nível de IFN- γ entre a primeira e segunda coleta, naqueles profissionais IgG negativo e positivo, e em profissionais IgM positivos. O baixo nível em indivíduos IgG negativos pode ser explicado pela queda de produção de IgG, já que o IFN- γ está em baixos níveis e com isso há menor produção de IgG. Apenas um estudo analisou a concentração de IFN- γ nos tempos de 0 a 90 dias, não relatando diferenças nos níveis entre os pacientes a COVID-19 positivos e negativos (PETRONE *et al.*, 2021).

O TNF ativa a expressão endotelial de moléculas de adesão que, junto com as quimiocinas, é responsável pelos infiltrados de neutrófilos e monócitos. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que influencia respostas imune antígeno específicas e reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação (Abbas, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S., 2019; VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C., 2001). Na imunopatologia da COVID-19 se caracteriza por elevação de IL-6 e TNF- α . Essas citocinas são produtos de ativação do TLR4, que é ativado através da ligação da proteína-S (BRANDÃO *et al.*, 2020). E nosso estudo não houve diferenças nos níveis de TNF- α e IL-6 ao correlacionar com IgM e IgG separadamente. Estudos na literatura não encontrou diferença de TNF- α e IL-6 para os saudáveis (YANG₂ *et al.*, 2021) e entre os pacientes a COVID-19 positivos e negativos (PETRONE *et al.*, 2021). A síntese exagerada e excessiva de TNF- α e IL-6 desempenham um papel proeminente na lesão de órgãos vitais, induzindo a morte celular inflamatória e leva a uma tempestade de citocinas de resposta inflamatória sistêmica grave aguda (HAN *et al.*, 2020; KARKI *et al.*, 2020).

Ao identificar aqueles indivíduos que possuíam altos níveis de IgG total e IgM, mostrando uma positividade quanto à infecção pelo SARS-CoV-2, podemos ver que somente o nível de TNF- α aumentou naqueles profissionais positivos para a COVID-

19, demais condições e citocinas tiveram tendência à diminuição. Esse padrão pode ser explicado pela ativação do fator de transcrição NF- κ B, através do reconhecimento do vírus pelos PRRs (DIAMOND; KANNEGANTI, 2022).

A dosagem de IL-10 quando relacionada com IgG total houve uma queda nos pacientes negativos, podendo ser devido ao estado saudável dos voluntários nos momentos das coletas. Petrone e colaboradores (2021) não encontraram diferença nos níveis de IL-10 entre os pacientes COVID-19 positivos e negativos. Já ao correlacionar com IgM a IL-10 aumentou em casos de indivíduos positivos. Um estudo de Albini e colaboradores (2020) demonstrou o aumento de IL-10 em casos graves da COVID-19, mas não em casos leves. Níveis elevados de IL-10 em pacientes infectados podem ser responsáveis pelo mecanismo anti-inflamatório ou imunoinibitório, criando um feedback negativo da inflamação sistêmica e local, estimulado pelo rápido acúmulo de citocinas pró-inflamatórias (HUANG *et al.*, 2021; LU *et al.*, 2021). No entanto, à medida que a produção endógena de IL-10 aumenta, ela pode funcionar como um agente imunoativador/pró-inflamatório que estimula a produção de outros mediadores da tempestade de citocinas (LU *et al.*, 2021).

Os profissionais da saúde enfrentam diariamente diversos riscos ocupacionais, por desempenhar diferentes tipos de atividades laborais, sendo elas assistenciais, administrativas ou ambas, e estar em constante contato com outros indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 durante as suas jornadas de trabalho. Desses profissionais a maioria autorrelataram não ter tido a COVID-19 prévia, seguido pelos que tiveram e em terceiro os que suspeitavam. Devido ao possível contato diário com vírus é normal realizarem exames de diagnóstico frequentes, grande parcela dos voluntários foram testados positivamente, seguido dos testados negativamente e a menor parcela de profissionais que não foram testados. Pensando em analisar se esses fatores citados influenciam na imunidade celular dos voluntários dosamos o nível IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 nessas condições. Assim vimos, de forma geral, a tendência de diminuição das citocinas IFN- γ IL-10 e entre a primeira e a segunda coleta, o aumento de TNF- α na maioria das situações e na IL-6 não seguiu padrão. Não foi encontrada literatura semelhante para que pudéssemos averiguar nossos resultados e entender o porquê as citocinas comportaram-se dessa forma, já que na segunda coleta a maioria dos voluntários já estavam imunizados através de vacinas,

esperando que tivessem criado um padrão de resposta imune, assim como vimos com os anticorpos, onde houve a diminuição de IgG total na segunda coleta de todas as situações analisadas.

Como sabemos, a vacinação contra o SARS-CoV-2 está acontecendo de forma acelerada e é necessário compreender sua interação com a resposta imune celular. Para tal feito, começamos quantificando as citocinas e cruzamos os resultados com os dados de vacinação contra o SARS-CoV-2 antes da primeira coleta e antes da segunda coleta. Em todos os resultados, sendo significativos ou não, observamos uma tendência de diminuição das citocinas IFN- γ , IL-6 e IL-10. Já o aumento de TNF- α pode ser explicado pela ativação do fator de transcrição NF- κ B, através do reconhecimento do vírus pelos PRRs (DIAMOND; KANNEGANTI, 2022). Estudo de PAYNE e colaboradores (2021), apresentou o contrário de nossos resultados. Ao analisar pré-vacina, 4 semanas após primeira dose, 12 semanas após primeira dose e 4 semanas após a segunda dose, eles viram uma tendência de aumento ao dosar IFN- γ , tanto em indivíduos não infectados quanto em infectados.

Analisamos o nível de citocinas referentes à vacinação. Nos voluntários que não foram vacinados ou foram vacinados com uma ou duas doses, para nenhuma das citocinas foi vista diferença significativa na produção desses componentes. É esperado que haja o aumento de citocinas pró-inflamatórias devido à estimulação da imunidade pela vacinação, assim como é visto no estudo onde comparou os níveis de IFN- γ no dia da primeira dose e após a segunda dose e reparou que houve seu aumento (MALIPIERO *et al.*, 2021), mas em nosso trabalho nenhuma das citocinas modificaram suas concentrações, mostrando a necessidade de mais trabalhos que abordam essas questões, para melhor compreensão do comportamento da resposta imune celular na vacinação para COVID-19.

A resposta imune humoral combinada com infecção prévia torna-se robusta. Contudo, nossos dados não indicaram diferença entre doses vacinais combinadas ou não com infecção em relação aos níveis de citocinas. Não sabemos a causa que manteve os níveis. Ao contrário dos achados, um estudo mostrou que ao relacionarmos doses vacinais e citocinas foi visto aumento de IFN- γ naqueles indivíduos com infecção prévia e esquema vacinal completo, indicando que há a estimulação de células T produtoras de IFN- γ (ZOLLNER *et al.*, 2021). Já em outro

estudo, apenas indivíduos não infectados previamente apresentaram uma indução robusta da maioria das citocinas analisadas IL-6, IL-10 e TNF- α , mas IFN- γ mostrou também em infectados (LOZANO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2022). A relação que encontramos em nosso trabalho e na literatura de citocinas em pessoas vacinadas indica a importância da vacinação. A vacinação combinada com infecção anterior traz robustez à resposta imune, assim como o esquema vacinal completo em pessoas não infectadas.

7 CONCLUSÃO

Nossos dados apontam significativo índice de prevalência de anticorpos anti-SARS-CoV-2 em profissionais envolvidos no manejo dos pacientes com suspeita ou confirmação de infecção pelo SARS-CoV-2, bem como cientistas e técnicos de laboratórios envolvidos nas pesquisas da COVID-19. Conseguimos identificar um certo padrão da resposta imune humoral e celular. A resposta imune dos indivíduos perante a COVID-19 não é tão duradoura quanto em outros tipos de doenças, mas ela pode tornar-se mais robusta através do esquema completo de vacinação que mimetiza a infecção pelo SARS-CoV-2, ou pela combinação de vacinação e infecção anterior. Apesar desses achados, ainda são necessários mais estudos envolvendo profissionais da saúde para compreender melhor o mecanismo da imunidade que gerou as respostas encontradas no presente estudo.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 9ª ed. Elsevier, 2019.

ALBINI, A. et al. Preliminary Evidence for IL-10-Induced ACE2 mRNA Expression in Lung-Derived and Endothelial Cells: Implications for SARS-Cov-2 ARDS Pathogenesis. **Frontiers in immunology**, p. 3921, 2021.

ALVIN, E. A. et al. Sensor Surface Design with NanoMaterials: A New Platform in the Diagnosis of COVID-19. In: **Biotechnology to Combat COVID-19**. IntechOpen, 2021.

AMANAT, F. et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. **Nature medicine**, v. 26, n. 7, p. 1033-1036, 2020.

ANAEIGOUDARI, A. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: The Role of the Main Components of the Innate Immune System. **Inflammation**, v. 44, n. 6, p. 2151-2169, 2021.

ANDERSON, E. J. et al. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in older adults. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 25, p. 2427-2438, 2020.

ANDERSON, M. R.; FERRANTE, A. W.; BALDWIN, M. R. Body Mass Index and Risk for Intubation or Death in SARS-CoV-2 Infection. **Annals of Internal Medicine**, v. 174, n. 6, p. 886, 2021.

BARNES, C. O. et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. **Nature**, v. 588, n. 7839, p. 682-687, 2020.

BARTEE, E.; MCFADDEN, G. Cytokine synergy: an underappreciated contributor to innate anti-viral immunity. **Cytokine**, v. 63, n. 3, p. 237-240, 2013.

BASILE, C. et al. Recommendations for the prevention, mitigation and containment of the emerging SARS-CoV-2 (COVID-19) pandemic in haemodialysis centres. **Nephrol Dial Transplant**, 2020.

BENVENUTO, D. et al. The 2019-new coronavirus epidemic: Evidence for virus evolution. **J Med Virol**, v. 92, n. 4, p. 455-459, 2020.

BOWEN, R. A. R.; REMALEY, A. T. Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. **Biochemia medica**, v. 24, n. 1, p. 31-44, 2014.

BRANDÃO, S. C. S. et al. Severe COVID-19: understanding the role of immunity, endothelium, and coagulation in clinical practice. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 19, 2020

BROBERG, E. et al. Considerations for the use of antibody tests for SARS-COV-2—
first update. Disponível em:

<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Considerations-for-the-use-of-antibody-tests-for-SARS-CoV2-first-update.pdf>. Acessado em: 11 jun. 2022.

BULFONE, T. C. et al. Outdoor transmission of SARS-CoV-2 and other respiratory viruses: a systematic review. **The Journal of infectious diseases**, v. 223, n. 4, p. 550-561, 2021.

CALLAWAY, E. et al. Delta coronavirus variant: scientists brace for impact. **Nature**, v. 595, n. 7865, p. 17-18, 2021.

CALLEGARO, A. et al. Antibody response to SARS-CoV-2 vaccination is extremely vivacious in subjects with previous SARS-CoV-2 infection. **Journal of medical virology**, v. 93, n. 7, p. 4612-4615, 2021.

CDC. Overview of testing for SARS-CoV-2, the virus that causes COVID-19. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/testing-overview.html#print>. Acessado em: 11 jun. 2022.

CERVIA, C. et al. Systemic and mucosal antibody responses specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 147, n. 2, p. 545-557. e9, 2021.

CHEMAITELLY, H. et al. Waning of BNT162b2 vaccine protection against SARS-CoV-2 infection in Qatar. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 24, p. e83, 2021.

CHIEN, J. et al. Temporal changes in cytokine/chemokine profiles and pulmonary involvement in severe acute respiratory syndrome. **Respirology**, v. 11, n. 6, p. 715-722, 2006.

CHRISTGEN, S. et al. Identification of the PANoptosome: a molecular platform triggering pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis). **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 237, 2020.

CHU, H. et al. Productive replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus in monocyte-derived dendritic cells modulates innate immune response. **Virology**, v. 454, p. 197-205, 2014.

Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of, V. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nat Microbiol**, v. 5, n. 4, p. 536-544, 2020.

COSTELA-RUIZ, V. J. et al. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 54, p. 62-75, 2020.

DE BIASI, S. et al. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2020.

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

DIAMOND, M. S.; KANNEGANTI, T.D. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. **Nature immunology**, p. 1-12, 2022.

DIAO, B. et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in immunology**, p. 827, 2020.

DHAMA, K. et al. Coronavirus disease 2019–COVID-19. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 4, p. e00028-20, 2020.

FAN, Q. et al. Association between ABO blood group system and COVID-19 susceptibility in Wuhan. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 404, 2020.

FIGUEIREDO-CAMPOS, P. et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in COVID-19 patients and healthy volunteers. **medRxiv**, 2020.

GAEBLER, C. et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. **Nature**, v. 591, n. 7851, p. 639-644, 2021.

GALLAIS, F. et al. Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection. **EBioMedicine**, v. 71, p. 103561, 2021.

GRIFFIN, D. E. et al. Are T cells helpful for COVID-19: the relationship between response and risk. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 12, p. 6222-6224, 2020.

GRIFONI, A. et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. **Cell**, v. 181, n. 7, p. 1489-1501. e15, 2020.

GUDBJARTSSON, D. F. et al. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 18, p. 1724-1734, 2020.

HAN, H. et al. Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. **Emerg Microbes Infect**, v. 9 n. 1, p. 1123–1130, 2020.

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. **Trends in immunology**, v. 41, n. 12, p. 1100-1115, 2020.

HASSANPOUR, M. et al. The role of extracellular vesicles in COVID-19 virus infection. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, p. 104422, 2020.

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

HUANG, F. et al. IL-10 served as an indicator in severe COVID-19 patients. **Journal of Medical Virology**, 2021.

HUH, S. How to train the health personnel for protecting themselves from novel coronavirus (COVID-19) infection during their patient or suspected case care. **J Educ Eval Health Prof**, v. 17, p. 10, 2020.

IBARRONDO, F. J. et al. Rapid decay of anti-SARS-CoV-2 antibodies in persons with mild Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 11, p. 1085-1087, 2020.

Instituto Butantan. Dizeres de Texto de Bula – Profissional Da Saúde. Disponível em: https://vacinacovid.butantan.gov.br/assets/arquivos/Bulas_Anvisa/2022.02.01-%20Bula%20profissional%20da%20sa%C3%BAde.pdf. Acessado em: 19 mai. 2022.

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos / Fiocruz. Vacina COVID-19 (Recombinante). Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/bulas-saiba-mais-sobre-as-vacinas-autorizadas-para-uso-emergencial/bula-vacina-covid-19-recombinante_vps_001_21-01-2021.pdf. Acessado em: 19 mai. 2022.

JANSSEN. Identificação do Medicamento. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/bulas-e-rotulos/bulas-uso-emergencial/vacinas/janssen-bula-profissional.pdf>. Acessado em: 19 mai. 2022.

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

JHU. COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU). Disponível em: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Acessado em: 22 jun. 2022.

KARKI, R. et al. COVID-19 cytokines and the hyperactive immune response: Synergism of TNF- α and IFN- γ in triggering inflammation, tissue damage, and death. **BioRxiv**, 2020

KAYESH, M. E. H.; KOHARA, M.; TSUKIYAMA-KOHARA, K. An Overview of Recent Insights into the Response of TLR to SARS-CoV-2 Infection and the Potential of TLR Agonists as SARS-CoV-2 Vaccine Adjuvants. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 2302, 2021.

KETAS, T. J. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 mRNA vaccines are detectable in saliva. **Pathogens and Immunity**, v. 6, n. 1, p. 116, 2021.

KIRTIPAL, N.; BHARADWAJ, S.; KANG, S. G. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, p. 104502, 2020.

KOH, D. Occupational risks for COVID-19 infection. **Occup Med (Lond)**, v. 70, n. 1, p. 3-5, 2020.

LAI, J. et al. Factors Associated With Mental Health Outcomes Among Health Care Workers Exposed to Coronavirus Disease 2019. **JAMA Netw Open**, v. 3, n. 3, p. e203976, 2020.

LAING, A. G. et al. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. **Nature medicine**, v. 26, n. 10, p. 1623-1635, 2020.

LEVI, R. et al. One dose of SARS-CoV-2 vaccine exponentially increases antibodies in individuals who have recovered from symptomatic COVID-19. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, n. 12, 2021.

LEVINE-TIEFENBRUN, M. et al. Initial report of decreased SARS-CoV-2 viral load after inoculation with the BNT162b2 vaccine. **Nature medicine**, v. 27, n. 5, p. 790-792, 2021.

LI₁, W. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. **Nature**, v. 426, n. 6965, p. 450-4, 2003.

LI₂, K. et al. Dynamic changes in anti-SARS-CoV-2 antibodies during SARS-CoV-2 infection and recovery from COVID-19. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2020.

LI₃, Z. et al. Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. **J Med Virol**, 2020.

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

LOZANO-RODRÍGUEZ, R. et al. Cellular and humoral functional responses after BNT162b2 mRNA vaccination differ longitudinally between naive and subjects recovered from COVID-19. **Cell reports**, v. 38, n. 2, p. 110235, 2022.

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

LUMLEY, S. F. et al. The duration, dynamics, and determinants of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) antibody responses in individual healthcare workers. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 3, p. e699-e709, 2021.

LUO, X. et al. T cell immunobiology and cytokine storm of COVID-19. **Scandinavian journal of immunology**, v. 93, n. 3, p. e12989, 2021.

MALIPIERO, G. et al. Assessment of humoral and cellular immunity induced by the BNT162b2 SARS-CoV-2 vaccine in healthcare workers, elderly people, and immunosuppressed patients with autoimmune disease. **Immunologic Research**, v. 69, n. 6, p. 576-583, 2021.

MALHOTRA, N. et al. COVID-19 in intensive care. Some necessary steps for health care workers. **Monaldi Arch Chest Dis**, v. 90, n. 1, 2020.

MATEUS, J. et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. **Science**, v. 370, n. 6512, p. 89-94, 2020.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Immune system-part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 50, p. 552-580, 2010.

MIN, Y. et al. Immune evasion of SARS-CoV-2 from interferon antiviral system. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 4217-4225, 2021.

MOHAMED, S. S. et al. A mucosal antibody response is induced by intra-muscular SARS-CoV-2 mRNA vaccination. **medRxiv**, 2021.

MOSTAGHIMI, D. et al. Prevention of host-to-host transmission by SARS-CoV-2 vaccines. **The Lancet Infectious Diseases**, 2021.

MÜLLER, K. et al. Sars-cov-2 seroprevalence among health care workers—a voluntary screening study in a regional medical center in southern germany. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 8, p. 3910, 2021.

MURUGAVELU, P. et al. Non-neutralizing SARS CoV-2 directed polyclonal antibodies demonstrate cross-reactivity with the HA glycans of influenza virus. **International immunopharmacology**, v. 99, p. 108020, 2021.

NAHASS, G. R. et al. Intramuscular SARS-CoV-2 vaccines elicit varying degrees of plasma and salivary antibody responses as compared to natural infection. **medRxiv**, 2021.

NAQVI, I. et al. DAMPs/PAMPs induce monocytic TLR activation and tolerance in COVID-19 patients; nucleic acid binding scavengers can counteract such TLR agonists. **Biomaterials**, v. 283, p. 121393, 2022.

NYGREN, D. et al. Association between SARS-CoV-2 and exposure risks in health care workers and university employees—a cross-sectional study. **Infectious Diseases**, v. 53, n. 6, p. 460-468, 2021.

ORTIZ-PRADO, E. et al. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 98, n. 1, p. 115094, 2020.

PARTHASARATHY, U. et al. The impact of DAMP-mediated inflammation in severe COVID-19 and related disorders. **Biochemical pharmacology**, v. 195, p. 114847, 2022.

PAYNE, R. P. et al. Immunogenicity of standard and extended dosing intervals of BNT162b2 mRNA vaccine. **Cell**, v. 184, n. 23, p. 5699-5714. e11, 2021.

PENG, Y. et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. **Nature immunology**, v. 21, n. 11, p. 1336-1345, 2020.

PETRONE, L. et al. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. **Clinical microbiology and infection**, v. 27, n. 2, p. 286. e7-286. e13, 2021.

PLEBANI, M. et al. SARS-CoV-2 serosurvey in health care workers of the Veneto Region. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 58, n. 12, p. 2107-2111, 2020.

PRANATA, R. et al. Body mass index and outcome in patients with COVID-19: a dose–response meta-analysis. **Diabetes & metabolism**, v. 47, n. 2, p. 101178, 2021.

SADARANGANI, M.; MARCHANT, A.; KOLLMANN, T. R. Immunological mechanisms of vaccine-induced protection against COVID-19 in humans. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 8, p. 475-484, 2021.

SAHIN, U. et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. **Nature**, v. 586, n. 7830, p. 594-599, 2020.

SECCHI, M. et al. COVID-19 survival associates with the immunoglobulin response to the SARS-CoV-2 spike receptor binding domain. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 12, p. 6366-6378, 2020.

STEENSELS, D. et al. Comparison of SARS-CoV-2 antibody response following vaccination with BNT162b2 and mRNA-1273. **Jama**, v. 326, n. 15, p. 1533-1535, 2021.
TAN, M. et al. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. **Immunology**, v. 160, n. 3, p. 261-268, 2020.

TAUZIN, A. et al. A single dose of the SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2 elicits Fc-mediated antibody effector functions and T cell responses. **Cell host & microbe**, v. 29, n. 7, p. 1137-1150. e6, 2021.

TOOR, S. M. et al. T-cell responses and therapies against SARS-CoV-2 infection. **Immunology**, v. 162, n. 1, p. 30-43, 2021.

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

TROUGAKOS, I. P. et al. Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications. **Journal of Biomedical Science**, v. 28, n. 1, p. 1-18, 2021.

TURNER, J. S. et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses. **Nature**, v. 596, n. 7870, p. 109-113, 2021.

V'KOVSKI, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nat Rev Microbiol**, v. 19, p. 155–170, 2021.

VALDES, G. et al. Distribution of angiotensin-(1-7) and ACE2 in human placentas of normal and pathological pregnancies. **Placenta**, v. 27, n. 2-3, p. 200-7, 2006.

VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citokines: a review. **Rev. bras. alerg. Immunopatol**, v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.

VARGHESE, P. M. et al. Host-pathogen interaction in COVID-19: Pathogenesis, potential therapeutics and vaccination strategies. **Immunobiology**, p. 152008, 2020.

VINCENT, J.L., SLUTSKY A.S. Coronavirus: just imagine. **Crit Care**, v. 24, n. 1, p. 90, 2020.

WANG, M. et al. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, 2020.

WANG₁, Y. et al. Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 10, p. 5235-5244, 2020.

WANG₂, Y. et al. The effects of SARS-CoV-2 infection on modulating innate immunity and strategies of combating inflammatory response for COVID-19 therapy. **Journal of Biomedical Science**, v. 29, n. 1, p. 1-19, 2022.

WEISKOPF, D. et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2–specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. **Science immunology**, v. 5, n. 48, p. eabd2071, 2020.

WHITCOMBE, A. L. et al. Comprehensive analysis of SARS-CoV-2 antibody dynamics in New Zealand. **Clinical & translational immunology**, v. 10, n. 3, p. e1261, 2021.

WHO₁. Brazil. Disponível em: <https://covid19.who.int/region/amro/country/br>. Acessado em: 22 jun. 2022.

WHO₂. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/65957/WHO_DIL_LAB_99.1_REV.2.pdf. Acessado em: 22 ago. 2022.

WHO₃. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acessado em: 22 jun. 2022.

WU, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265-269, 2020.

Wyeth Indústria Farmacêutica Ltda. Comirnaty® vacina covid-19. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/detalhe/1924271?nomeProduto=COMIRNAT> Y. Acessado em: 19 mai. 2022.

XIANG, Y.T. et al. Timely mental health care for the 2019 novel coronavirus outbreak is urgently needed. **Lancet Psychiatry**, v. 7, n. 3, p. 228-229, 2020.

YAMAYOSHI, S. et al. Antibody titers against SARS-CoV-2 decline, but do not disappear for several months. **EClinicalMedicine**, v. 32, p. 100734, 2021.

YANG₁, L. et al. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2020.

YANG₂, Y. et al. Serological investigation of asymptomatic cases of SARS-CoV-2 infection reveals weak and declining antibody responses. **Emerging Microbes & Infections**, v. 10, n. 1, p. 905-912, 2021.

ZHAO, J. et al. Relationship between the ABO blood group and the coronavirus disease 2019 (COVID-19) susceptibility. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 2, p. 328-331, 2021.

ZHANG₁, J. et al. Single-cell landscape of immunological responses in patients with COVID-19. **Nature immunology**, v. 21, n. 9, p. 1107-1118, 2020.

ZHANG₂, Z., et al. Protecting healthcare personnel from 2019-nCoV infection risks: lessons and suggestions. **Front Med**, 2020.

ZHENG₁, J. et al. Characterization of SARS-CoV-2-specific humoral immunity and its potential applications and therapeutic prospects. **Cellular & Molecular Immunology**, p. 1-8, 2021.

ZHENG₂, H. et al. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. **Cellular & molecular immunology**, v. 17, n. 5, p. 541-543, 2020.

ZHENG₃, M. et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. **Cellular & molecular immunology**, v. 17, n. 5, p. 533-535, 2020.

ZOLLNER, A. et al. B and T cell response to SARS-CoV-2 vaccination in health care professionals with and without previous COVID-19. **EBioMedicine**, v. 70, p. 103539, 2021.

ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa

UFTM - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO TRIÂNGULO
MINEIRO - HC/UFTM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da resposta imune celular e humoral de profissionais de saúde envolvidos no enfrentamento da COVID-19 no município de Uberaba-MG.

Pesquisador: MARCOS VINICIUS DA SILVA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 31484220.0.0000.8667

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.291.695

Apresentação do Projeto:

Segundo o(s) pesquisador(es), o problema/tema sob investigação está relacionado o enfrentamento da pandemia provocada pelo COVID-19, uma infecção com importante taxa de mortalidade. O referido problema/tema se contextualiza na "atuação dos profissionais de saúde, desde o atendimento primário até as unidades de terapia intensiva, passando pelos laboratórios para diagnósticos e pesquisa científica. Estes profissionais estão em posição de maior exposição ao SARS-Cov-2 e a avaliação correta dos índices de contaminação e as características clínica e de desenvolvimento de imunidade dos profissionais de saúde precisam ser investigadas".

Objetivo da Pesquisa:

Segundo os pesquisadores os objetivos da pesquisa são:

- Avaliar, em profissionais de saúde e pesquisadores, a presença de anticorpos anti-SARS132 Cov-2 no sangue periférico ao longo da pandemia da COVID-19;
- Determinar as alterações na resposta imune celular e humoral anti-SARS-Cov-2 ao longo da pandemia da COVID-19 e;
- Correlacionar os dados acima com a apresentação clínica da infecção e com o desfecho.

Endereço: R. Benjamin Constant, 16

Bairro: Nossa Srª da Abadia

CEP: 38.025-470

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3318-5319

E-mail: cep.hctm@ebserh.gov.br

**UFTM - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO TRIÂNGULO
MINEIRO - HC/UFTM**



Continuação do Parecer: 4.291.695

caráter temporário visando reduzir a exposição pessoal e interações presenciais entre as pessoas, o CEP/HC/UFTM recomenda que os projetos de pesquisa relacionados ou não ao COVID-19, iniciem e/ou continuem suas atividades de coleta de dados primários e/ou intervenções SOMENTE após seguirem as recomendações que preservem o isolamento social, especialmente dos grupos de risco, e contenção da doença. Orientamos aos pesquisadores frente aos prazos previstos no projeto que o cronograma seja readequado e enviado ao CEP quando do início do projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1551577.pdf	12/09/2020 16:00:22		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1551577.pdf	12/09/2020 15:43:19		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	12/09/2020 15:42:57	MARCOS VINICIUS DA SILVA	Aceito
Outros	RESPOSTA_AS_RECOMENDACOES_DO_CEP.pdf	12/09/2020 15:42:20	MARCOS VINICIUS DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Resposta_imune_ao_SARS_CoV_2_em_profissionais_de_saude.pdf	12/09/2020 15:39:57	MARCOS VINICIUS DA SILVA	Aceito
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_DO_PESQUISADOR_RESPONSAVEL.pdf	22/07/2020 12:41:28	MARCOS VINICIUS DA SILVA	Aceito
Outros	Anuencia_Regional.pdf	22/07/2020 12:31:25	MARCOS VINICIUS DA SILVA	Aceito
Outros	Declaracao_GEP.pdf	22/07/2020 12:30:33	MARCOS VINICIUS DA SILVA	Aceito
Outros	HC_UFTM.pdf	22/07/2020 12:29:42	MARCOS VINICIUS DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	06/05/2020 11:59:22	MARCOS VINICIUS DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: R. Benjamin Constant, 16
 Bairro: Nossa Srª da Abadia CEP: 38.025-470
 UF: MG Município: UBERABA
 Telefone: (34)3318-5319 E-mail: cep.hctm@ebserh.gov.br

ANEXO B – TCLE



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Pós graduação em Medicina Tropical e Infectologia
 Av. Getúlio Guaritá SN, - Bairro Nossa Senhora da Abadia
 CEP: 38025-440 – Uberaba/MG Telefone: (0**34) 3318-5289
 E-mail: marcos.silva@uftm.edu.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “Análise da resposta imune celular e humoral em profissionais de saúde envolvidos no enfrentamento da COVID-19 no município de Uberaba-MG”, coordenado por mim Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva. O objetivo dessa pesquisa avaliar, em profissionais de saúde, a presença de anticorpos anti-SARS-Cov-2 e outros parâmetros imunológicos ao longo da pandemia da COVID-19. Gostaria de contar com sua participação, uma vez que estes resultados são fundamentais para melhor tratar os pacientes e prospectar futuros alvos terapêuticos.

Caso aceite participar dessa pesquisa serão necessárias as coletas de 2 (duas) amostras de sangue periférico, através de punção venosa, a primeira na data de assinatura deste termo e outra 6 (seis) meses depois. Isso poderá ser realizado em sua residência ou unidade hospitalar, por membro da equipe da pesquisa devidamente capacitado, com tempo estimado de cinco minutos. O profissional responsável lhe explicará os objetivos desta pesquisa, como a sua amostra será coletada, a importância da sua participação, assim como todos os termos descritos no Termo de Consentimento. Você terá o tempo necessário para ler e assinar o termo de consentimento, caso aceite participar da pesquisa. Caso concorde, a assinatura do presente termo de consentimento ocorrerá imediatamente antes da coleta de material biológico.

Os riscos previstos de sua participação nessa pesquisa são riscos são o de perda de confidencialidade e de pequeno sangramento local no momento da coleta de sangue. Como medidas para minimizar estes riscos serão tomadas as seguintes providências: identificação de todos os participantes por números e coleta de sangue realizada por profissional habilitado e treinado. Caso sinta desconforto e deseje cancelar a sua participação basta entrar em contato por telefone ou e-mail descritos ao final deste termo e solicitar o cancelamento da sua participação. Neste caso, todos os seus dados serão excluídos do projeto e você não terá nenhum prejuízo por isso.

DATA	RUBRICA DO PARTICIPANTE	RUBRICA DO PESQUISADOR



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Pós graduação em Medicina Tropical e Infectologia
 Av. Getúlio Guaritá SN, - Bairro Nossa Senhora da Abadia
 CEP: 38025-440 – Uberaba/MG Telefone: (0**34) 3318-5289
 E-mail: marcos.silva@uftm.edu.br

Como benefício direto de sua participação na pesquisa espera-se apontar a prevalência da aquisição da COVID-19, como ela se desenvolve e quais fatores do sistema imune estão associados com sua recuperação ou piora; bem como divulgar para toda a sociedade e comunidade científica estes resultados.

Sua participação é voluntária, e em decorrência dela você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você não terá nenhum gasto por participar nesse estudo, pois qualquer gasto que você tenha por causa dessa pesquisa lhe será ressarcido.

Você pode recusar a participar do estudo, ou se retirar a qualquer momento, para isso basta dizer ao pesquisador que lhe entregou este documento. Em qualquer momento, você pode obter quaisquer informações sobre a sua participação nesta pesquisa, diretamente com os pesquisadores ou por contato com o CEP/HC-UFTM.

Sua identidade não será revelada para ninguém, ela será de conhecimento somente dos pesquisadores da pesquisa, seus dados serão publicados em conjunto sem o risco de você ser identificado, mantendo o seu sigilo e privacidade. Você tem direito a requerer indenização diante de eventuais danos que você sofra em decorrência dessa pesquisa.

Quanto à divulgação dos resultados, o relatório final será encaminhado à superintendência do HC-UFTM e para a direção do Hospital Regional José de Alencar para conhecimento e utilização dos dados nas ações de gestão que se fizerem pertinentes. Realizaremos os testes sorológicos, para IgM e IgG para COVID-19, após coletar uma grande quantidade de amostras, para otimizar os processos técnico-laboratoriais. Desta forma, estes resultados serão obtidos e as análises de suas amostras serão concluídas apenas semanas ou meses depois da coleta, não tendo intenção de diagnóstico precoce/imediato, sendo, neste momento, encaminhados para você, ficando os pesquisadores à disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que eventualmente surgirem.

Os dados obtidos a partir da sua participação (material biológico, dados de prontuários eletrônicos e físicos) serão utilizados somente para os objetivos dessa pesquisa e serão destruídos ou descartados após 5 anos do fim da pesquisa. Em relação aos dados derivados de prontuários, serão obtidos dados de exames laboratoriais, como análises

DATA	RUBRICA DO PARTICIPANTE	RUBRICA DO PESQUISADOR



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Pós graduação em Medicina Tropical e Infectologia
 Av. Getúlio Guaritá SN, - Bairro Nossa Senhora da Abadia
 CEP: 38025-440 – Uberaba/MG Telefone: (0**34) 3318-5289
 E-mail: marcos.silva@uftm.edu.br

hematológicas, análises bioquímicas, enzimáticas, níveis de saturação de oxigênio, exames de imagem como Raio X, tomografia e ressonância magnética de tórax, solicitados para acompanhamento da evolução clínica e índices de gravidade, apenas na eventualidade de desenvolvimento de COVID-19 sintomática durante a realização deste estudo. Caso haja interesse, por parte dos pesquisadores, em utilizar seus dados em outro projeto de pesquisa, você será novamente contatado para decidir se participa ou não dessa nova pesquisa e se concordar deverá assinar novo TCLE. Os dados obtidos e/ou material biológico coletado no estudo mencionado serão utilizados somente para as finalidades descritas no protocolo. Após ter sido analisado, o material biológico será armazenado no laboratório de imunologia por um período de 5 anos após a conclusão do estudo, para eventuais necessidades de contraprovas. Após este período, todo o material biológico será submetido a inativação microbiana, acondicionados em sacos autoclaváveis para serem submetidos a autoclavagem. Posteriormente, o material será acondicionado em sacos especiais de lixo infectante (sacos brancos) de acordo com a classificação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA RDC, N° 306 de 07 de dezembro de 2004.

Contato

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva.
 Endereço: Av. Getúlio Guaritá SN, - Bairro Nossa Senhora da Abadia
 E-mail: marcos.silva@uftm.edu.br
 Telefone/Celular: (034) 3118-5289 /988393947

*Dúvidas ou denúncia em relação a esta pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (CEP/HC-UFTM), pelo e-mail: cep.hctm@ebserh.gov.br, pelo telefone (34) 3318-5319, ou diretamente no endereço Rua Benjamim Constant, 16, Bairro Nossa Senhora da Abadia – Uberaba – MG – de segunda a sexta-feira, das 07h às 12h e das 13h às 16h.

DATA	RUBRICA DO PARTICIPANTE	RUBRICA DO PESQUISADOR



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Pós graduação em Medicina Tropical e Infectologia
 Av. Getúlio Guaritá SN, - Bairro Nossa Senhora da Abadia
 CEP: 38025-440 – Uberaba/MG Telefone: (0**34) 3318-5289
 E-mail: marcos.silva@uftm.edu.br

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima referente a pesquisa “Análise da resposta imune celular e humoral em profissionais de saúde envolvidos no enfrentamento da COVID-19 no município de Uberaba-MG”, coordenado pelo Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva. Compreendi para que serve a pesquisa e quais procedimentos serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios da pesquisa. Entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará o(a) minha atuação como profissional de saúde. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro para participar da pesquisa. Concordo em participar da pesquisa, “Análise da resposta imune celular e humoral em profissionais de saúde envolvidos no enfrentamento da COVID-19 no município de Uberaba-MG”, e receberei uma via assinada deste documento.

Uberaba, ____ / ____ / _____

 NOME/ ASSINATURA DO VOLUNTÁRIO

marcos vinicius da silva
 Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva (0xx34) 33185299
 PESQUISADOR RESPONSÁVEL

 Anna Victória Bernardes e Borges (34) 99795-2605
 PESQUISADOR ASSISTENTE

DATA	RUBRICA DO PARTICIPANTE	RUBRICA DO PESQUISADOR

ANEXO C – Comorbidades

Comorbidade	Frequência dos voluntários
Anemia megaloblástica	0,37%
Arritmia	0,37%
Asma	2,25%
Cardiopatia	0,37%
Diabetes	3,75%
Ectasia da aorta ascendente	0,37%
Hipertensão	13,86%
Insuficiência mitral	0,37%
Insuficiência renal	0,37%
Linfangioleiomiomatose pulmonar	0,37%
Microadenoma hipófise	0,37%
Sobrepeso/obesidade	19,85%
Vasculite	0,37%
Não	63,30%
Não relatou	1,50%

Fonte: da Autora, 2022

Tabela 2 – Comorbidades

Tabela demonstrativa da frequência das comorbidades dos profissionais voluntários no tempo 0.

ANEXO D – Profissionais da Saúde

SETOR	ATIVIDADE LABORAL	Nº DE PROFISSIONAIS
ADMINISTRATIVO	ASSISTÊNCIA	0
	ADMINISTRAÇÃO	4
	ADM + ASS	0
AUDITORIA	ASSISTÊNCIA	0
	ADMINISTRAÇÃO	0
	ADM + ASS	1
BLOCO CIRÚRGICO	ASSISTÊNCIA	4
	ADMINISTRAÇÃO	0
	ADM + ASS	1
CENTRO DE TERAPIA INTENSIVA	ASSISTÊNCIA	49
	ADMINISTRAÇÃO	1
	ADM + ASS	5
CLÍNICA MÉDICA	ASSISTÊNCIA	1
	ADMINISTRAÇÃO	0
	ADM + ASS	0
DOENÇAS INFECTOPARASITÁRIAS	ASSISTÊNCIA	1
	ADMINISTRAÇÃO	0
	ADM + ASS	0
ENDOCRINOLOGIA	ASSISTÊNCIA	1
	ADMINISTRAÇÃO	0
	ADM + ASS	0
ENFERMARIA	ASSISTÊNCIA	2
	ADMINISTRAÇÃO	0
	ADM + ASS	1
GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA	ASSISTÊNCIA	1
	ADMINISTRAÇÃO	0
	ADM + ASS	2
FARMÁCIA	ASSISTÊNCIA	0
	ADMINISTRAÇÃO	0
	ADM + ASS	1
HEMODINÂMICA	ASSISTÊNCIA	8
	ADMINISTRAÇÃO	0
	ADM + ASS	5
LABORATÓRIO CENTRAL	ASSISTÊNCIA	21
	ADMINISTRAÇÃO	3
	ADM + ASS	6

LABORATÓRIO DE PESQUISA	ASSISTÊNCIA	8
	ADMINISTRAÇÃO	6
	ADM + ASS	3
LIMPEZA	ASSISTÊNCIA	0
	ADMINISTRAÇÃO	2
	ADM + ASS	0
NEUROLOGIA	ASSISTÊNCIA	17
	ADMINISTRAÇÃO	0
	ADM + ASS	4
NÚCLEO INTERNO DE REGULÇÃO	ASSISTÊNCIA	0
	ADMINISTRAÇÃO	16
	ADM + ASS	1
NUTRIÇÃO CLÍNICA	ASSISTÊNCIA	1
	ADMINISTRAÇÃO	0
	ADM + ASS	0
OFTALMOLOGIA	ASSISTÊNCIA	1
	ADMINISTRAÇÃO	0
	ADM + ASS	0
ORTOPEDIA	ASSISTÊNCIA	0
	ADMINISTRAÇÃO	0
	ADM + ASS	2
PATOLOGIA	ASSISTÊNCIA	1
	ADMINISTRAÇÃO	0
	ADM + ASS	1
PEDIATRIA	ASSISTÊNCIA	6
	ADMINISTRAÇÃO	0
	ADM + ASS	0
PRONTO ATENDIMENTO	ASSISTÊNCIA	44
	ADMINISTRAÇÃO	0
	ADM + ASS	5
UNIDADE DE DIAGNÓSTICO POR IMAGEM	ASSISTÊNCIA	20
	ADMINISTRAÇÃO	6
	ADM + ASS	3
SEM INFORMÇÃO	-	2
TOTAL		267

Fonte: da Autora, 2022

Tabela 3 – Profissionais da Saúde

Tabela demonstrativa do número de profissionais voluntários em cada setor no tempo 0.

ANEXO E – Formulário de Pesquisa

11/05/2022 12:15

Pesquisa: Análise da resposta imune celular e humoral em profissionais de saúde envolvidos no enfrentamento da COVID-1...

Pesquisa: Análise da resposta imune celular e humoral em profissionais de saúde envolvidos no enfrentamento da COVID-19 no município de Uberaba-MG.

A leitura e preenchimento do formulário demora em torno de 15 minutos, referente à segunda coleta do projeto de pesquisa: Análise da resposta imune celular e humoral em profissionais de saúde envolvidos no enfrentamento da COVID-19 no município de Uberaba-MG.

***Obrigatório**

1. E-mail *

2. Estou de acordo em comparecer para a segunda coleta: *

Marcar apenas uma oval.

Sim

Contato dos responsáveis pela pesquisa

Pesquisador Responsável:
Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva.
Endereço: Av. Getúlio Guaritá SN, - Bairro Nossa Senhora da Abadia

E-mail: marcos.silva@uftm.edu.br
Telefone/Celular: (034) 3118-5289 /988393947

Pesquisador Assistente:
Ms. Anna Victória Bernardes e Borges
E-mail: annab.borges@outlook.com
Celular: (034) 997952605

Formulário de pesquisa

3. Nome completo: *

11/05/2022 12:15 Pesquisa: Análise da resposta imune celular e humoral em profissionais de saúde envolvidos no enfrentamento da COVID-1...

4. E-mail *

5. Data de nascimento: *

6. Tipo sanguíneo: *

7. Altura em cm *

8. Peso em kg *

9. Telefone de contato: *

10. Profissão: *

11. Hospital(is) em que você trabalha: *

11/05/2022 12:15

Pesquisa: Análise da resposta imune celular e humoral em profissionais de saúde envolvidos no enfrentamento da COVID-1...

12. Setor(es) em que você trabalha: *

13. Caso esteja cursando residência, qual a especialidade? Especificar se Médica ou Multiprofissional.

14. Horário de trabalho: *

Formulário de pesquisa

15. Tipo de atividade hospitalar: *

Marcar apenas uma oval.

- Administrativa
- Assistencial
- Administrativa + Assistencial

16. Trabalha em outro(s) local(is) além de hospitais? *

Marque todas que se aplicam.

- Clínica
- Consultório
- Não trabalho em outro local
- Outro: _____

11/05/2022 12:15

Pesquisa: Análise da resposta imune celular e humoral em profissionais de saúde envolvidos no enfrentamento da COVID-1...

17. Quais vacinas você já foi imunizado previamente?

Marque todas que se aplicam.

- BCG
- Tétano
- Poliomelite
- Difteria
- Coqueluche
- Meningocócica
- Pneumocócica
- Sarampo
- Rubéola
- Caxumba
- Hepatite B
- Hepatite A
- Febre Amarela
- HPV
- Varicela
- Dengue

Formulário de pesquisa

18. Realizou exame(s) para diagnóstico de COVID-19 após a primeira coleta? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não

11/05/2022 12:15

Pesquisa: Análise da resposta imune celular e humoral em profissionais de saúde envolvidos no enfrentamento da COVID-1...

19. Quantas vezes? *

Marque todas que se aplicam.

	0	1	2	3	4	5+
Exame do Swab - PCR	<input type="checkbox"/>					
Sorologia em laboratório	<input type="checkbox"/>					
Sorologia por teste rápido	<input type="checkbox"/>					
Busca de antígeno por teste rápido	<input type="checkbox"/>					

20. Quais foram os resultados dos exames? *

Marque todas que se aplicam.

	Positivo	Negativo	Não realizado
Exame do Swab - PCR	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sorologia em laboratório	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sorologia por teste rápido	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Busca de antígeno por teste rápido	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

21. Teve COVID-19 após a primeira coleta? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não
- Suspeito que sim

22. Se teve COVID-19, quanto tempo ficou afastado do trabalho no hospital?

11/05/2022 12:15

Pesquisa: Análise da resposta imune celular e humoral em profissionais de saúde envolvidos no enfrentamento da COVID-1...

23. Se teve COVID-19, precisou de internação?

Marcar apenas uma oval.

Sim

Não

Formulário de pesquisa

24. Alguma pessoa de sua convivência próxima teve COVID-19? *

Marcar apenas uma oval.

Sim

Não

Suspeito que sim

25. Caso essa pessoa tenha sido um familiar, teve a forma leve, moderada ou grave da COVID-19?

Marcar apenas uma oval.

Leve

Moderada

Grave

26. Teve contato, no trabalho, com alguém diagnosticado com COVID-19? *

Marcar apenas uma oval.

Sim

Não

11/05/2022 12:15

Pesquisa: Análise da resposta imune celular e humoral em profissionais de saúde envolvidos no enfrentamento da COVID-1...

27. Se sim, paciente e/ou colega de trabalho?

Marque todas que se aplicam.

- Paciente
 Colega de trabalho

28. Em sua atividade diária no hospital, tem contato direto com pacientes com diagnóstico de COVID-19? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim, trabalho diretamente com pacientes com COVID-19
 Sim, mas apenas até serem diagnosticados
 Não trabalho com pacientes com COVID-19
 Trabalho no manejo de amostras ou material biológico de pacientes com suspeita de COVID-19

29. É portador de algumas das condições à seguir (marque todas que forem pertinentes)?

Marque todas que se aplicam.

- Diabetes tipo 1 ou 2
 Hipertensão
 Sobrepeso/obesidade
 Malignidades
 Outro: _____

30. Faz uso de medicamento regularmente? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

11/05/2022 12:15

Pesquisa: Análise da resposta imune celular e humoral em profissionais de saúde envolvidos no enfrentamento da COVID-1...

31. Se sim, quais e há quanto tempo (estimado)?

Formulário de pesquisa

32. Já foi vacinado contra SARS-CoV-2? *

Marcar apenas uma oval.

Sim

Não

33. Se sim, quantas doses?

Marcar apenas uma oval.

1

2

Única

34. Caso a resposta para as perguntas anteriores sejam afirmativas, qual foi a vacina tomada?

35. Caso a resposta para as perguntas anteriores sejam afirmativas, quando ocorreu a vacinação de ambas as doses?

11/05/2022 12:15

Pesquisa: Análise da resposta imune celular e humoral em profissionais de saúde envolvidos no enfrentamento da COVID-1...

36. Foram observados efeitos adversos?

Marcar apenas uma oval.

Sim

Não

37. Os efeitos adversos foram observados após quantos dias da vacinação?

38. Quais foram os efeitos adversos?

Marque todas que se aplicam.

Cefaleia

Mialgia

Dores articulares

Febre

Náusea

Diarréia

Inapetência

Hipotensão

Taquicardia

Sudorese

Calafrios

Outro: _____

39. Quanto tempo duraram os sintomas?

11/05/2022 12:15 Pesquisa: Análise da resposta imune celular e humoral em profissionais de saúde envolvidos no enfrentamento da COVID-1...

40. Necessitou ser medicado por conta desta reação? Se sim, com quais medicamentos?

Este conteúdo não foi criado nem aprovado pelo Google.

Google Formulários