

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

JÉSSICA FERNANDA CORRÊA CORDEIRO

Níveis plasmáticos de HLA-G solúvel em pacientes
com covid-19

RIBEIRÃO PRETO

2022

JÉSSICA FERNANDA CORRÊA CORDEIRO

Níveis plasmáticos de HLA-G solúvel em pacientes com
covid-19

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa
de Pós-Graduação em Enfermagem Fundamental.

Linha de pesquisa: O cuidar de adulto e idosos

Orientador: Ana Paula Morais Fernandes

RIBEIRÃO PRETO

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Cordeiro, Jéssica Fernanda Corrêa
Níveis plasmáticos de HLA- G solúvel em pacientes com covid-19. Ribeirão Preto, 2022.
122 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem Fundamental.
Orientador: Ana Paula Morais Fernandes

1. SARS-CoV-2. 2. COVID-19. 3. HLA-G.

CORDEIRO, Jéssica Fernanda Corrêa

Níveis plasmáticos de HLA-G solúvel em pacientes com covid-19

Tese apresentada à Escola de Enfermagem de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa
de Pós-Graduação em Enfermagem Fundamental.

Aprovado em / /

Presidente

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Comissão Julgadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

À minha amada e abençoada família

*Ao meu amado esposo **André**, obrigada por todo apoio, incentivo, amor e por estar ao meu lado sempre. Você é um companheiro maravilhoso.*

*Aos meus queridos pais, **Joana e Sebastião**
Meus exemplos de seres humanos, de amor, carinho, confiança e apoio incondicional. Vocês são as pessoas mais sábias que conheço. Quanto orgulho eu tenho de vocês. Obrigada por tanto!*

*A minha linda irmã, **Daniella**
Por toda paciência, ajuda e sempre estar presente em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser presença constante em minha vida, sempre iluminando o meu caminho. A

Ele toda honra e toda a glória.

Em especial, a minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ana Paula Morais Fernandes, por ter me acolhido, aceitado a me orientar, e contribuir para o meu crescimento e desenvolvimento acadêmico e pessoal.

Ao Prof. Dr. Carlos Arterio Sorgi, por ter me acolhido em seu laboratório, pelo conhecimento e contribuições valiosas nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi, pelo conhecimento e sugestões nesse trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa GeBIL- Grupo de estudos em Biotecnologia e Imunoquímica de Lipídios, por todo o auxílio e dedicação na construção desse trabalho. Em especial à Diana por toda a ajuda, paciência e conhecimento compartilhado. Também à Talita, ao Pedro, ao Jonatas pelas contribuições e auxílio.

À Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por todas as oportunidades ofertadas. Em especial à Flávia, da pós-graduação por toda disponibilidade, carinho e acesso para ajudar nessa caminhada. Também à Edilaine e a Prof^a. Dr^a. Denise de Andrade que me ajudaram nessa trajetória.

*À Prof^ª. Dr^ª. Marta Angélica Iossi, pela amizade, ajuda e por tornar a minha caminhada
mais leve com o seu jeito humano de ser.*

*Ao SESMT da Fundação Santa Lydia, pela oportunidade. Em especial, aos meus colegas de
trabalho Mailson, Carlos, Nairton e Lígia por terem me acolhido e me incentivarem nessa
caminhada.*

*A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta tese fica
aqui o meu muito obrigada...*

APOIO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

"Ao Rei eterno, o Deus único, imortal e invistível, sejam honra e glória para todo o sempre.

Amém."

Timóteo 1:17

"Resiliência é a capacidade de o indivíduo lidar com problemas, adaptar-se a mudanças e

superar obstáculos."

Diogo Hanry

"Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o

Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar."

Josué 1:9

RESUMO

CORDEIRO, J. F. C. **Níveis plasmáticos de HLA-G solúvel em pacientes com covid-19.** 2022. 122f. Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Aspectos da biologia da HLA-G, como as funções altamente imunoinibitórias são fundamentais para a compreensão da relevância dessa molécula em condições fisiológicas e patológicas, e podem auxiliar a projetar estratégias diagnósticas e terapêuticas em várias áreas da saúde humana. A covid-19 é uma doença viral que acomete o mundo. Por se tratar de uma doença viral, as moléculas de HLA-G solúveis (sHLA-G) são consideradas potentes imunomoduladores, e sua expressão desregulada têm sido implicadas em várias condições patológicas. O objetivo deste estudo foi quantificar os níveis plasmáticos de sHLA-G em pacientes com covid-19. Este é um estudo observacional, descritivo, do tipo transversal. O estudo foi conduzido na cidade de Ribeirão Preto. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *GraphPad Prism* versão 9. A análise de distribuição dos dados foi realizada pelo teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* e a análise comparativa das variáveis entre os grupos foi realizada por meio de testes não paramétricos de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis*. Incluímos nesse estudo 262 indivíduos. Dentre os que apresentaram covid-19, 60 estavam em cuidados domiciliares e 129 eram pacientes hospitalizados. Como grupo controle saudável, foram incluídos 73 indivíduos. A mediana da idade foi 55 anos para o grupo com covid-19, já para o grupo controle foi de 33,5 anos. A maioria dos pacientes do grupo hospitalar era do sexo masculino (67,4%). Em relação ao gênero não houve diferenças estatisticamente significantes nos níveis plasmáticos de sHLA-G entre os grupos domiciliar e hospitalar. No entanto, ao classificar os pacientes de covid-19 de acordo com o seu estado de gravidade clínica, observamos que todos os tipos de gravidade clínica apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle saudável (controle vs leve: $p=0,0004$; controle vs moderado: $p=0,0011$; controle vs grave: $p<0,0001$ e controle vs crítico: $p<0,0001$), sendo que as concentrações de sHLA-G foram gradativamente aumentando nos pacientes com covid-19 de leve a grave. Contraditariamente, os níveis de sHLA-G estavam significativamente menores entre pacientes com covid-19 crítico quando comparados aos com covid-19 grave ($p=0,02$). A partir do perfil plasmático de sHLA-G por gravidade, estratificamos os pacientes pelos desfechos clínicos de resolatividade da doença (com alta hospitalar) e óbito; e observamos maior concentração de sHLA-G no grupo de pacientes que morreram em relação ao controle saudável ($p<0,0001$), assim como comparado àqueles que tiveram a resolução da doença e receberam alta hospitalar ($p=0,0166$). Nossos resultados revelam que os níveis de sHLA-G, importante molécula de “checkpoint” imuno inibitória, estão maiores no início da infecção, e vai gradualmente crescendo conforme a gravidade clínica da doença progride, entretanto, quando os parâmetros clínicos avançam para a covid-19 crítica, os níveis de HLA-G caem, sugerindo a exaustão, após a superexpressão deste inibidor de controle imunológico. Estes dados destacam a importância da molécula HLA-G no contexto de infecções virais, como SARS-CoV-2, revelando sua potencial capacidade de interações para planejamento de terapias para gerenciar a infecção, progressão e prognóstico da covid-19.

Palavras-chave: SARS-CoV-2. COVID-19. HLA-G.

ABSTRACT

CORDEIRO, J. F. C. **Plasma levels of soluble HLA-G in patients with covid-19.** 2022. 122p. Thesis - Ribeirão Preto College of Nursing, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Aspects of the biology of HLA-G, such as the highly immunoinhibitory functions, are fundamental for understanding the relevance of this molecule in physiological and pathological conditions and can help design diagnostic and therapeutic strategies in various areas of human health. Covid-19 is a viral disease that affects the world. As it is a viral disease, soluble HLA-G molecules (sHLA-G) are considered potent immunomodulators, and their unregulated expression has been implicated in several pathological conditions. The aim of this study was to quantify the plasma levels of sHLA-G in patients with covid-19. This is an observational, descriptive, cross-sectional study. The study was conducted in the city of Ribeirão Preto. Statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism version 9 program. Data distribution analysis was performed using the Shapiro-Wilk normality test and the comparative analysis of variables between groups was performed using nonparametric Mann tests. -Whitney and Kruskal-Wallis. We included 262 individuals in this study. Among those who had covid-19, 60 were in home care and 129 were hospitalized patients. As a healthy control group, 73 subjects were included. The median age was 55 years for the group with covid-19, while for the control group it was 33.5 years. Most patients in the hospital group were male (67.4%). Regarding gender, there were no statistically significant differences in sHLA-G plasma levels between the home and hospital groups. However, when classifying covid-19 patients according to their clinical severity status, we observed that all types of clinical severity showed statistically significant differences from the healthy control (control vs mild: $p=0.0004$; control moderate vs moderate: $p=0.0011$; control vs severe: $p<0.0001$ and control vs critical: $p<0.0001$), with sHLA-G concentrations gradually increasing in patients with mild to moderate COVID-19. serious. Contradictingly, sHLA-G levels were significantly lower among patients with critical covid-19 compared to those with severe covid-19 ($p=0.02$). Based on the sHLA-G plasma profile by severity, we stratified patients by clinical outcomes of disease resolution (with hospital discharge) and death; and we observed a higher concentration of sHLA-G in the group of patients who died in relation to the healthy control ($p<0.0001$), as well as in those who had the disease resolution and were discharged from the hospital ($p=0.0166$). Our results reveal that the levels of sHLA-G, an important immunoinhibitory checkpoint molecule, are higher at the beginning of the infection, and gradually increase as the clinical severity of the disease progresses, however, when the clinical parameters advance towards covid-19. 19 critical, HLA-G levels drop, suggesting exhaustion, following overexpression of this immune control inhibitor. These data highlight the importance of the HLA-G molecule in the context of viral infections, such as SARS-CoV-2, revealing its potential interactions for planning therapies to manage the infection, progression, and prognosis of covid-19.

Keywords: SARS-CoV-2. COVID-19. HLA-G.

RESUMEN

CORDEIRO, J. F. C. Niveles plasmáticos de HLA-G soluble en pacientes con covid-19. 2022. 122h.— Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Aspectos de la biología de HLA-G, como las funciones altamente inmunoinhibidoras, son fundamentales para comprender la relevancia de esta molécula en condiciones fisiológicas y patológicas, y pueden ayudar a diseñar estrategias diagnósticas y terapéuticas en diversas áreas de la salud humana. El Covid-19 es una enfermedad viral que afecta al mundo. Al tratarse de una enfermedad viral, las moléculas HLA-G solubles (sHLA-G) se consideran potentes inmunomoduladores y su expresión no regulada se ha implicado en varias condiciones patológicas. El objetivo de este estudio fue cuantificar los niveles plasmáticos de sHLA-G en pacientes con covid-19. Se trata de un estudio observacional, descriptivo, transversal. El estudio fue realizado en la ciudad de Ribeirão Preto. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism, versión 9. El análisis de distribución de datos se realizó con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y el análisis comparativo de variables entre grupos se realizó con las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. Se incluyeron 262 personas en este estudio. Entre los que tenían covid-19, 60 estaban en atención domiciliaria y 129 eran pacientes hospitalizados. Como grupo de control sano, se incluyeron 73 sujetos. La mediana de edad fue de 55 años para el grupo con covid-19, mientras que para el grupo control fue de 33,5 años. La mayoría de los pacientes del grupo hospitalario eran hombres (67,4%). En cuanto al sexo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles plasmáticos de sHLA-G entre los grupos domiciliario y hospitalario. Sin embargo, al clasificar a los pacientes de covid-19 según su estado de gravedad clínica, observamos que todos los tipos de gravedad clínica mostraron diferencias estadísticamente significativas con el control sano (control vs leve: $p=0,0004$; control moderado vs moderado: $p=0,0011$; control vs grave: $p<0,0001$ y control vs crítico: $p<0,0001$), con concentraciones de sHLA-G aumentando gradualmente en pacientes con COVID-19 de leve a moderado. Contradictoriamente, los niveles de sHLA-G fueron significativamente más bajos entre los pacientes con covid-19 crítico en comparación con aquellos con covid-19 grave ($p = 0.02$). Con base en el perfil plasmático de sHLA-G por gravedad, estratificamos a los pacientes por resultados clínicos de resolución de la enfermedad (con alta hospitalaria) y muerte; y observamos una mayor concentración de sHLA-G en el grupo de pacientes que fallecieron en relación al control sano ($p<0,0001$), así como en los que tuvieron resuelta la enfermedad y fueron dados de alta del hospital ($p=0,0166$). Nuestros resultados revelan que los niveles de sHLA-G, una importante molécula de punto de control inmunoinhibidor, son más altos al comienzo de la infección y aumentan gradualmente a medida que avanza la gravedad clínica de la enfermedad, sin embargo, cuando los parámetros clínicos avanzan hacia covid-19. 19, los niveles críticos de HLA-G caen, lo que sugiere agotamiento, luego de la sobreexpresión de este inhibidor del control inmunológico. Estos datos destacan la importancia de la molécula HLA-G en el contexto de infecciones virales, como el SARS-CoV-2, revelando sus potenciales interacciones para planificar terapias para el manejo de la infección, progresión y pronóstico de covid-19.

Palabras clave: SARS-CoV-2. COVID-19. HLA-G.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos participantes do estudo.....47

Tabela 2 - Caracterização demográfica, clínica e laboratorial dos grupos controle e de pacientes com covid-19, Brasil, 2022.....52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do MHC humano.	16
Figura 2 - Isoformas do HLA-G produzidas por splicing alternativo do RNA mensageiro (mRNA) primário.....	18
Figura 3 - Estrutura do SARS-CoV-2.....	22
Figura 4 - Localização e Organização do Complexo HLA no Cromossomo 6.....	31
Figura 5 - Estrutura das Moléculas HLA Classe I e Classe II.....	31
Figura 6 - Características das isoformas HLA-G e os principais locais responsáveis por padrões de transcrição fisiológicos ou truncados.....	34
Figura 8 - Quantificação da molécula sHLA-G (ng/mL) no sangue. (A) Do grupo controle sem hipertensão (n=66), controle com hipertensão (n=7) e grupos de pacientes com covid-19 sem hipertensão (n=113) e com hipertensão (n=76). (B) Do grupo controle sem diabetes mellitus (n=70), controle com diabetes mellitus (n=3) e grupos de pacientes com covid-19 sem diabetes mellitus (n=136) e com diabetes mellitus (n=53). (C) Do grupo controle sem doença cardiovascular (n=66), controle com doença cardiovascular (n=7) e grupos de pacientes com covid-19 sem doença cardiovascular (n=170) e com doença cardiovascular (n=19). (D) Do grupo controle não tabagista (n=64), controle tabagista (n=9) e grupos de pacientes com covid-19 não tabagista (n=151) e tabagista (n=38). (E) Do grupo controle IMC <30 (n=63), com IMC >30 (n=10) e grupos de pacientes com covid-19 IMC <30 (n=117) e IMC >30 (n=72).....	55
Figura 9 - (A) Perfil plasmático do sHLA-G (ng/mL) no grupo controle (n=73), pacientes leves (n=39), moderados (n=56), graves (n=32) e críticos (n=62) com covid-19. (B) Quantificação da molécula sHLA-G (ng/mL) no sangue do grupo controle (n=73), pacientes que receberam alta (n=132) e pacientes que morreram (n=57) pela COVID-19. (C) Análise longitudinal da concentração plasmática de sHLA-G (ng/mL) no momento da admissão hospitalar (n=10) vs alta (n=10); e admissão (n=31) vs óbito (n=31) pela covid-19.....	56
Figura 10 - Quantificação da molécula sHLA-G (ng/mL) no sangue no grupo controle (n=73) e pacientes hospitalizados com covid-19. (A) Que não utilizaram Glicocorticóide (n=26) e que utilizaram Glicocorticóide (n=103). (B) Que não utilizaram Azitromicina (n=43) e que utilizaram Azitromicina (n=86). (C) Que não utilizaram Ceftriaxona (n=45) e que utilizaram Ceftriaxona (n=84). (D) Que não utilizaram Oseltamivir (n=77) e que utilizaram Oseltamivir (n=52). (E) Que não utilizaram Cloroquina/Hidroxiclороquina (n=101) e que utilizaram Cloroquina/Hidroxiclороquina (n=28).	57
Figura 11 - Matriz de correlação entre a molécula de sHLA-G e os parâmetros clínicos e imunológicos da covid-19.	59

Figura 12 - Análise multivariada de regressão logística binomial tendo como desfecho a gravidade (**A**) e a mortalidade (**C**) pela covid-19 (controle n=73, leve n=39, moderado n=56, grave n=32 e crítico n=62). Curvas características de operação do receptor (ROC) das concentrações de sHLA-G para prever a gravidade e a mortalidade entre pacientes com covid-19. A área sob a curva (AUC) e os valores de p para diferenças significativas entre pacientes com covid-19 e o desfecho gravidade e mortalidade. (**B, D**).....60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus 2
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
CoV	Coronavírus
covid-19	Doença do Coronavírus 2019
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
DC	Doença Cardiovascular
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
INR	Razão Normalizada Internacional
MERS-CoV	Síndrome Respiratória Oriente Médio do coronavírus
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NK	Células <i>Natural-Killer</i>

OR	<i>Odds Ratio</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação de Polimerização em Cadeia
PrCR	Proteína C reativa
RNA	Ácido Ribonucleico
RNL	Razão Neutrófilo Linfócito
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UBS	Unidade Básica de Saúde
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	SARS-CoV-2 e covid-19.....	20
2.1.1	Origem do vírus	20
2.1.2	O agente viral e epidemiologia	21
2.1.3	Resposta imune contra a covid-19 e mecanismo de evasão viral 23	
2.1.4	Tratamento farmacológico	26
2.1.5	Vacinação	28
2.2	Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC)	30
2.2.1	Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G)	32
2.2.2	HLA-G e as células imunes	34
2.2.3	HLA-G e as doenças infecciosas	36
2.2.4	HLA-G e a covid-19	37
2.3	O avanço do conhecimento científico e a atuação da enfermagem	38
3	JUSTIFICATIVA	40
4	OBJETIVO.....	43
4.1	Objetivos Específicos	43
5	MATERIAL E MÉTODOS	45
5.1	Delineamento do estudo	45
5.2	Local do estudo	45
5.3	Aspectos éticos	45
5.4	Participantes do estudo.....	46
5.5	Critério de elegibilidade.....	47
5.6	Coleta de amostra.....	48
5.7	Quantificação dos níveis plasmáticos de HLA-G solúvel	48
5.8	Dosagem de Citocinas plasmáticas por <i>Cytometric Bead Array</i> - CBA.....	49
5.9	Análise estatística	49
6	RESULTADOS	51
6.1	Características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais dos participantes do estudo	51
6.2	Níveis plasmáticos da molécula sHLA-G	54
7	DISCUSSÃO	62

8	CONCLUSÃO.....	68
9	REFERÊNCIAS.....	70
	APÊNDICES.....	83
	Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	84
	Apêndice B - Questionário Clínico	89
	ANEXO.....	101
	Anexo A - Aprovação comitê de ética	102

1. INTRODUÇÃO

O novo coronavírus, causador da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), é o agente etiológico da covid-19. SARS-CoV-2, pertence à grande família *Coronaviridae* (TUFAN; GÜLER; MATUCCI-CERINIC, 2020), foi identificado em 2019 na cidade de Wuhan, província de Hubei na China (GRALINSKI; MENACHERY, 2020). Em março de 2020, a covid-19 foi considerada uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS), presente em mais de 180 países (JIANG et al., 2020).

O SARS-CoV-2 é um vírus de ácido ribonucleico (RNA) de fita positiva envelopada, o seu tamanho varia de 60 nm a 140 nm de diâmetro, e tem em sua superfície projeções de espigões que, vistos ao microscópio eletrônico, assemelham-se a uma coroa, por esse motivo o nome coronavírus (CoVs). Os primeiros casos reportados em humanos foram em 2002, quando um novo coronavírus do gênero β , com origem em morcegos infectou seres humanos, na China. Esse vírus, designado como coronavírus da SARS-CoV, afetou 8422 pessoas principalmente na China e Hong Kong, e causou 916 mortes, apresentando uma taxa de mortalidade de 11%. Já em 2012, o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), também de origem em morcego, surgiu na Arábia Saudita, tendo como hospedeiros intermediários os dromedários (semelhante aos camelos), e afetou 2494 pessoas, causando 858 mortes com uma taxa de mortalidade de 34% (SINGHAL et al., 2020).

Com a rápida disseminação SARS-CoV-2 por todo o mundo, no dia 11 de março de 2020, o diretor-geral da OMS, caracterizou a situação como pandemia (BRASIL, 2020). Desde o início da pandemia até maio de 2022, segundo a OMS houveram 515.192.979 casos confirmados de covid-19, incluindo 6.254.140 mortes pelo mundo (WHO, 2022). Já no Brasil foram 30.574.245 casos da doença confirmados e 664.192 óbitos acumulados (BRASIL, 2022).

As manifestações clínicas das pessoas infectadas pelo SARS-CoV-2 é ampla, abrangendo infecção assintomática, doença leve do trato respiratório superior e pneumonia viral grave com insuficiência respiratória e até morte (DONG et al., 2020; RIZZO et al., 2020; OMS, 2022a). Os sintomas típicos causados pelo SARS-CoV-2 podem incluir fadiga, febre, tosse seca, mal-estar, dor de garganta, perda de paladar

e/ou olfato e, ainda em alguns casos, falta de ar, diarreia e sinais característicos de pneumonia viral (CHEN et al., 2020; SHOAIB et al., 2021).

No caso do coronavírus (covid-19) assintomática, com a resposta imune inata mais rápida, o paciente tende a ser assintomático para a doença. Quando ocorre de forma leve, em que não há necessidade de hospitalização, percebe-se que após a ativação da resposta imune adaptativa, as células T e os anticorpos reagem de forma mais rápida, controlando a infecção (ORAN; TOPOL, 2020; SETTE; CROTTY, 2021). Na presença de células T e anticorpos específicos, ocorre um controle mais eficiente da doença (GRIFONI et al., 2020). As respostas antivirais efetivas do hospedeiro contra o SARS-CoV-2, tanto na imunidade inata e/ou adaptativa, inclui a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, a ativação de células TCD4+ e TCD8+, essenciais para o controle da replicação viral, limitando a disseminação de vírus, a inflamação prolongada e a manutenção de células infectadas (LI et al., 2020; GUSEV et al., 2022). Em pacientes com covid-19, o nível de células T auxiliares (CD3+, CD4+), células T supressoras citotóxicas (CD3+, CD8+) e células T reguladoras estão abaixo do nível normal. As células T reguladoras são responsáveis pela manutenção da homeostase do sistema imunológico conferindo a supressão da ativação, proliferação e função pró-inflamatória da maioria dos linfócitos, incluindo células TCD4+, células TCD8+, células *natural-killer* (NK) e células B. Tem sido observado que o SARS-CoV-2 parece ser responsável pela desregulação da homeostase imunológica, com indução de citocinas e quimiocinas inflamatórias, causando uma resposta inflamatória excessiva, na qual piora o prognóstico do paciente com a covid-19 (TUFAN; GÜLER; MATUCCI-CERINIC, 2020; GUSEV et al., 2022). Em adição, existe a heterogeneidade na imunidade adaptativa em diferentes pessoas, que é um fator importante na covid-19. As respostas imunológicas diferem de pessoa para pessoa, devido diferenças genéticas individuais. O grande número de alelos do gene *HLA* (*Human Leukocyte Antigen*) (polimorfismo gênico), no Complexo Principal de Histocompatibilidade, é o exemplo mais apropriado para o alto grau de diversidade na resposta imunológica, sendo considerado uma estratégia evolutiva dos seres humanos (SETTE; CROTTY, 2021).

Os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH ou MHC - *Major Histocompatibility Complex*), incluem, na espécie humana, a denominação de sistema HLA. Esses genes têm sido agrupados em três (03) regiões, didaticamente

subdivididas em classe I, II e III, de acordo com as suas localizações no braço curto do cromossomo 6 (DONADI, 2000; FERNANDES et al., 2003).

Na região de classe I estão os loci HLA-A, B, C, E, F, G, H, J, K e L. Os genes HLA-A, B e C codificam as moléculas de histocompatibilidade (HLA) presentes em praticamente todas as células nucleadas, por esse motivo são consideradas moléculas clássicas, de classe Ia. Já os genes HLA-E, F e G codificam moléculas que são restritas a alguns tipos teciduais, sendo consideradas moléculas não-clássicas, de classe Ib. As moléculas HLA de classe Ia são caracterizadas por seu alto grau de polimorfismo, e as moléculas de classe Ib são caracterizadas pelo limitado polimorfismo (DONADI, 2000; FERNANDES et al., 2003; HUNT; LANGAT, 2009).

Na região de classe II estão presentes os genes HLA-DRA, DRB1-9, DQA1,2, DQB1,3, DOA, DOB, DMA, DMB, DPA1,2, DPB1,2, TAP1,2, LMP2,7, MICA-E. Os genes de maior importância clínica nessa classe são os HLA-DR, DP e DQ. Eles codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade classe II, cuja atuação está envolvida na apresentação de peptídeos aos linfócitos T (DONADI, 2000).

A região classe III contém genes que codificam alguns componentes do sistema de complemento, dentre os quais C4A, C4B e fator B (Figura 1). Nessa classe também encontramos genes para as enzimas 21-hidroxilase (21B e 21A), para a proteína Hsp 70-relacionada ao choque térmico, bem para os fatores de necrose tumoral α e β (DONADI, 2000).

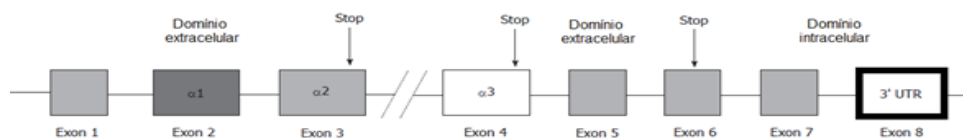


Figura 1 - Mapa do MHC humano. Fonte: Klein & Sato, 2000.

As moléculas de histocompatibilidade são glicoproteínas de superfície e apresentam três porções em comum: uma citosólica, responsável pela transdução de sinais intracelulares; uma transmembranosa, que mantém a molécula acoplada à camada bilipídica; e uma extracelular, responsável pela apresentação de peptídeos às células T (DONADI, 2000).

Notadamente, as moléculas HLA de classe I são heterodímeros, compostas por uma cadeia pesada α , contendo os domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$. Essa cadeia α

apresenta uma associação não covalente com a β 2-microglobulina. Os domínios α 1 e α 2 são responsáveis pelo grande polimorfismo dessas moléculas, enquanto o domínio α 3 é basicamente não polimórfico e apresenta homologia estrutural com as cadeias pesadas das imunoglobulinas. Dentre as inúmeras funções dessa classe de moléculas, certamente a apresentação de peptídeos endógenos e virais aos linfócitos T CD8 é de extrema importância (DONADI, 2000; HUNT et al., 2005).

Descrito pela primeira vez em 1987, a molécula HLA-G foi descoberta na interface materno-fetal, sendo sua expressão restrita à população de trofoblastos, conferindo uma tolerância imunológica materna ao feto, semiallogênico (GERAGHTY, KOLLER et al, 1987; FERNANDES et al., 2003; HUNT et al., 2005; MOODLEY; BOBAT, 2011; ZHU et al., 2012). Sua expressão fisiológica tem sido detectada em tecidos imunoprivilegiados como placenta, córnea e timo. A expressão não fisiológica tem sido descrita em condições inflamatórias, infecção viral e tumores (GONZÁLEZ et al., 2012).

Assim, como os genes *HLA* clássicos (HLA-A, -B, -C), o gene *HLA-G* apresenta 7 íntrons e 8 éxons que codificam uma cadeia pesada associada, de maneira não covalente, a 2-microglobulina. O éxon 1 codifica o peptídeo sinal, os éxons 2, 3 e 4 codificam os domínios extracelulares 1, 2 e 3, respectivamente. O éxon 5 codifica o domínio transmembrana, e os outros éxons codificam o domínio citoplasmático da cadeia pesada. Contudo, a presença de um códon de parada no início do éxon 6 do gene *HLA-G* reduz a 6 aminoácidos o domínio citoplasmático da proteína (HUNT et al., 2005; DONADI et al., 2011; GONZÁLEZ et al., 2012).

A molécula HLA-G apresenta sete isoformas proteicas, HLA-G1 a HLA-G7, geradas por edição alternativa do transcrito primário (Figura 2). As quatro primeiras são isoformas de membrana: HLA-G1 é a forma completa com estrutura de molécula *HLA* clássica associada a 2-microglobulina, transportando um peptídeo de sequência comum; HLA-G2 é desprovida do domínio 2 codificada pelo éxon 3; HLA-G3 não possui os domínios 2 e 3 codificados pelos éxon 3 e 4; HLA-G4 perdeu o domínio 3 codificado pelo éxon 4 (HUNT et al., 2005; DONADI et al., 2011; GONZÁLEZ et al., 2012).

As três últimas isoformas são solúveis: HLA-G5 e HLA-G6 possuem os mesmos domínios extraglobulares que HLA-G1 e HLA-G2, respectivamente, sendo geradas por transcritos que conservaram o íntron 4, havendo bloqueio da tradução do domínio transmembrana (éxon 5). A região 5' do íntron, em fase de leitura do

éxon 4, é traduzida até um códon de parada que confere às isoformas HLA-G5 e HLA-G6 uma cauda de 21 aminoácidos específicos implicados na sua solubilidade. A outra forma solúvel, HLA-G7, apresenta estrutura limitada ao domínio 1, conservando 2 aminoácidos específicos do íntron 2. Os transcritos alternativos são todos desprovidos do éxon 7 (HUNT et al., 2005; DONADI et al., 2011).

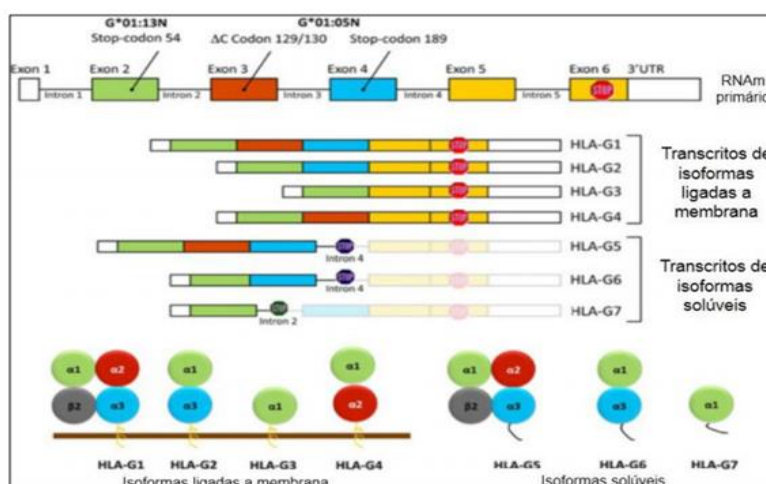


Figura 2 - Isoformas do HLA-G produzidas por splicing alternativo do RNA mensageiro (mRNA) primário. Fonte: Donadi et al., 2011.

A HLA-G é uma molécula imunossupressora que age tanto na imunidade inata quanto adaptativa, proporcionando inibição contra a citotoxicidade das células NK e linfócitos T citotóxicos (CD8+). Essa característica confere a HLA-G um efeito modulador benéfico em algumas situações como à gestação, doenças autoimunes e inflamatórias, e efeitos negativos em outras como no câncer e em infecções virais (MOODLEY; BOBAT, 2011; SVENDSEN et al., 2013). Evidências apontam para a afinidade da HLA-G em ligar-se aos receptores ILT-2 e ILT-4, que também interagem com outras moléculas HLA de classe I e com o receptor KIR2DL4, que é específico para a HLA-G (CAROSELLA et al., 1999; HUNT et al., 2005; BHALLA et al., 2006; GONZÁLEZ et al., 2012). O receptor ILT-2 é expresso em subconjuntos de células imunocompetentes, tais como NK, linfócitos T, monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Já o receptor ILT-4 é encontrado em todos os monócitos, macrófagos e células dendríticas. Por fim, o receptor KIR2DL4 é expresso por células NK e linfócitos TCD8+ (CAROSELLA et al., 1999; HUNT et al., 2005; BHALLA et al., 2006; GONZÁLEZ et al., 2012).

Por ser uma molécula imunossupressora, o aumento da HLA-G resulta em uma redução da resposta imune, e o nível de sua expressão é modulado geneticamente (DONADI et al., 2011).

Assim, o HLA-G foi considerado uma molécula de *checkpoint* imunológico (ARNS et al., 2020). Sua expressão fisiológica tem sido detectada em tecidos imunoprivilegiados como placenta, córnea e timo. Por outro lado, sua expressão não fisiológica tem sido descrita em condições inflamatórias, infecção viral e tumores em vários tecidos (DIAS et al., 2018; AL-BAYATEE; AD, 2021). Como uma molécula imunossupressora, o HLA-G age tanto na imunidade inata quanto adaptativa, proporcionando inibição contra a citotoxicidade das células NK e linfócitos T citotóxicos (CD8+), respectivamente. O provável mecanismo de tolerância é que a molécula HLA-G possa inibir a lesão celular mediada pelos linfócitos TCD8+, que reconhecem células que expressam moléculas clássicas do MHC de classe I, e inibir o reconhecimento e ataque das células NK, pois a molécula HLA-G se liga aos dois principais receptores inibidores da célula NK, o KIR1 e o KIR2, evitando a ação citotóxica desta célula, em diversas condições fisiológicas ou patológicas, como infecções virais (ALMEIDA et al., 2018).

Aspectos da biologia da HLA-G, como as funções altamente imunoinibitórias são fundamentais para a compreensão da relevância dessa molécula em condições fisiológicas e patológicas, e podem auxiliar a projetar estratégias diagnósticas e terapêuticas em várias áreas da saúde humana (OLIVEIRA et al., 2018). A covid-19, é uma doença viral que acomete o mundo e, apesar de ser bastante investigada, ainda necessita de maiores compreensões. Por se tratar de uma doença viral, as moléculas de HLA-G solúveis (sHLA-G) são consideradas potentes imunomoduladores, e sua expressão desregulada tem sido implicada em várias condições patológicas. Portanto, estudos acerca de marcadores imunológicos como HLA-G que, reconhecidamente, participam das respostas contra infecções virais, devem ser realizados e priorizados para corroborar conhecimentos para melhor entendimento dos mecanismos imunológicos no contexto da covid-19.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 SARS-CoV-2 e covid-19

2.1.1 Origem do vírus

No leste da Ásia e no Oriente Médio, os coronavírus foram responsáveis por surtos de doenças nos últimos anos (RODRIGUEZ-MORALES et al., 2020). As infecções por coronavírus (CoV) foram relatadas em diversos animais, como em bovinos, suínos, cavalos, camelos, roedores, gatos, cães, morcegos, furões, martas, coelhos e vários outros mamíferos selvagens e espécies de aves (KAHN; MCINTOSH, 2005; FEHR; PERLMAN, 2015). Em humanos os CoV foram identificados pela primeira vez em 1960; no entanto, somente em 2002 com o surgimento da SARS-CoV (coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave), começou um maior interesse da comunidade científica em pesquisar este vírus (DROSTEN et al., 2003; KSI AZEK et al., 2003; PEIRIS et al., 2003). Estudos apontam que os morcegos são considerados os hospedeiros naturais e potenciais reservatórios do SARS-CoV (LI et al., 2005; CUI; LI; SHI, 2019). Após as epidemias de SARS-CoV de 2003 e 2005, um vírus análogo surgiu na região do Oriente Médio e foi chamado de MERS-CoV (coronavirus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio) (ZAKI et al., 2012). Na transmissão de MERS-CoV, os dromedários, animais que se assemelham aos camelos, foram os responsáveis por hospedar o vírus (ALAGAILI et al., 2014); no entanto, a sua origem também foi traçada a partir de morcegos (ITHETE et al., 2013). Todos esses CoV humanos altamente patogênicos, SARS-CoV e MERS-CoV, ainda merecem atenção, pois tem um alto risco de transmissão de humano para humano nos dias atuais (MALIK et al., 2020).

Em 2019, na cidade de Wuhan, província de Hubei na China, foi identificado um novo coronavírus, o coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) (GRALINSKI; MENACHERY, 2020). Posteriormente, descobriu-se que o grupo primário de pacientes estavam conectados ao Mercado de Frutos do Mar de Huanan, em Wuhan no sul da China, e foi definido que a transmissão ocorreu pelo contato com o pangolin, animal silvestre vendido neste mercado (HUI et al., 2020). Em fevereiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou a

denominação oficial para a doença como covid-19, causada pelo SARS-CoV-2 (BRASIL, 2020).

2.1.2 O agente viral e epidemiologia

Com a rápida disseminação do SARS-CoV-2 por todo o mundo, em março de 2020, o diretor-geral da OMS caracterizou a situação como pandemia (BRASIL, 2020). Desde o início da pandemia até maio de 2022, segundo a OMS houveram 515.192.979 casos confirmados de covid-19, incluindo 6.254.140 mortes pelo mundo (WHO, 2022). Já no Brasil foram 30.574.245 casos da doença confirmados e 664.192 óbitos acumulados (BRASIL, 2022).

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita positiva e envelopado. O seu genoma contém menos de 30.000 nucleotídeos e 29 diferentes proteínas virais, destacando a glicoproteína de pico que permite a entrada do vírus na célula hospedeira pela ligação ao receptor celular e à fusão da membrana reconhecida como proteína S, onde ocorre a ligação do vírus com a célula-alvo, que interage com os receptores celulares e a proteína N, do nucleocapsídeo viral que regula o processo de replicação viral. A proteína S entra em contato com o receptor celular proteico e se liga à enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), que está presente principalmente nas células pulmonares (Figura 3). Para ganhar o interior das células hospedeiras, o SARS-CoV-2 depende de uma serina protease chamada TMPRSS2, que tem a capacidade de clivar e ativar a proteína S, deixando que o vírus se ligue ao receptor da ECA2 (CHAN et al., 2020; UZUNIAN, 2020; ZHOU et al., 2020). Essa atuação da serina protease favorece a aderência do vírus à membrana plasmática celular e permite sua entrada no interior da célula, ou seja, nos endossomos (HOFFMANN et al., 2020). Após adesão, ocorre a fusão da membrana lipídica do envelope do vírus com a membrana plasmática celular, e o vírus entra na célula. Após a penetração, a replicação viral é realizada nos endossomos celulares, graças às enzimas replicases já existentes no vírus (CHAN et al., 2020; UZUNIAN, 2020; ZHOU et al., 2020).

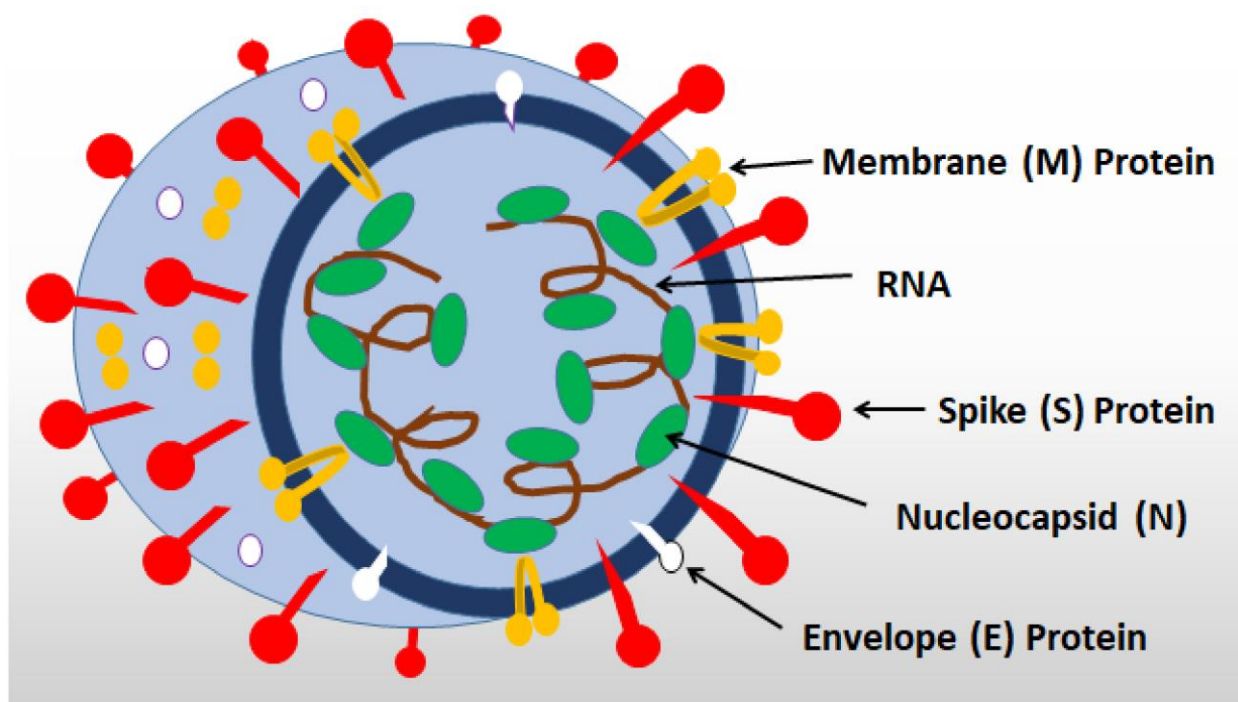


Figura 3 - Estrutura do SARS-CoV-2. Fonte: GUSEV et al., 2022.

O SARS-CoV-2, como muitos vírus respiratórios, é transmitido principalmente na via aérea por gotícula (exposição a gotículas respiratórias expelidas por uma pessoa infectada), por aerossol (transmissão do vírus por meio de gotículas respiratórias menores) e por contato (transmissão do vírus por meio do contato direto ou indireto a partir de uma pessoa infectada ou fonte contaminada, respectivamente). Importante destacar que o contato próximo facilita a transmissão do vírus. Assim, a recomendação é o distanciamento de pelo menos 1 metro entre uma pessoa da outra (PROMPETCHARA; KETLOY; PALAGA, 2020; OMS, 2022a). O período de incubação viral varia geralmente entre 2 a 14 dias (PROMPETCHARA; KETLOY; PALAGA, 2020).

O espectro da resposta clínica das pessoas infectadas por SARS-CoV-2 é amplo, abrangendo infecção assintomática, doença leve do trato respiratório superior e pneumonia viral grave com insuficiência respiratória e até morte (DONG et al., 2020; RIZZO et al., 2020; OMS, 2022a). Os sintomas típicos causados pelo SARS-CoV-2 podem incluir fadiga, febre, tosse seca, mal-estar, dor de garganta, perda de paladar e/ou olfato e, ainda, em alguns casos, falta de ar, diarreia e sinais característicos de pneumonia viral (CHEN et al., 2020; SHOAIB et al., 2021).

Por se tratar de um vírus de RNA, o SARS-CoV-2 tem uma taxa evolutiva e de replicação maior do que os vírus de DNA. Neste sentido, ocorrem erros de replicações mediados pelo RNA polimerase ou transcriptase reversa, por isso verifica-se uma ampla gama e frequência de mutações do vírus e patogenias (BAKHSHANDEH et al., 2021). O genoma do SARS-CoV-2 tem mostrado alterações, as mais conhecidas são a variante ômicron e a delta. As mutações mais significativas que alteraram a virulência e a patogenicidade aconteceram na proteína S (JIANG et al., 2021). Variações prejudiciais em nsp12, na proteína N, também foram observadas (UĞUREL; ATA; BALIK, 2020; SEYEDALINAGHI et al., 2021). A disseminação de novas mutações na proteína S pode fortemente reduzir a eficácia da resposta imune às vacinas (HARVEY et al., 2021). Estudo que analisou prováveis mutações futuras do vírus, no domínio da proteína S, e mostrou que as mutações tornarão o SARS-CoV-2 potencialmente ainda mais infeccioso (CHEN et al., 2020).

2.1.3 Resposta imune contra a covid-19 e mecanismo de evasão viral

De forma simplificada a resposta imunológica inclui a imunidade inata e a imunidade adaptativa. A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra microorganismos, e os seus principais componentes são: barreiras físicas e químicas, tais como células epiteliais e suco gástrico; células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos); células NK; e proteínas sanguíneas, o sistema complemento e outros mediadores da inflamação. Já a imunidade adaptativa depende da ativação dos linfócitos, suas características são: especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo. As células apresentadoras de antígenos (APC) também desempenham papel fundamental na ativação da resposta adaptativa, apresentando os antígenos, via MHC, para os linfócitos T. A resposta adaptativa celular inclui os linfócitos T e B, os linfócitos B são responsáveis pela imunidade humoral, com a produção de anticorpos. Os linfócitos T durante o processo de maturação, expressam receptor de células T e co-receptores como o CD4 (que organizam outras células da resposta imune para a destruição de microorganismos, assim como para a ativação dos Linfócito B) e o co-receptor CD8 (que estão envolvidos principalmente nas respostas antivirais, assim como na atividade antitumoral). Ainda, o LTCD4+ é constituído de duas subpopulações principais: as células Th1 e Th2. A resposta Th1 (celular e pró-inflamatória) está relacionada com a defesa contra

protozoários, bactérias intracelulares e vírus, enquanto a resposta Th2 (humoral) é mais efetiva contra os helmintos e bactérias extracelulares (MACHADO et al., 2004; ABBAS, 2018).

A imunidade tem um papel essencial em diferentes infecções, as respostas imunes adaptativas são importantes para o controle e eliminação de quase todas as infecções virais que causam doenças em humanos, como as causadas pelo SARS-CoV-2. O vírus para ser patogênico a humanos precisa ter um mecanismo de evasão imune, que é uma estratégia para fazer com que o sistema imune não o ataque no início da infecção, ou seja, com a imunidade inata. No caso do SARS-CoV-2, o vírus evita o desencadeamento de respostas imunes inatas precoces, como a ação de interferons do tipo 1 (IFN-1), que induz a própria célula infectada, e células próximas, a produzir proteínas que impedem a replicação do vírus (MURPHY; WEAVER, 2016; ABBAS, 2018; SETTE; CROTTY, 2021).

Quando não ocorre a resposta imune inata, o vírus continua a sua replicação de forma inabalável, destaca-se que as respostas imunes adaptativas não são iniciadas até que ocorram os alarmes imunes inatos (ARUNACHALAM et al., 2020; BLANCO-MELO et al., 2020; SETTE; CROTTY, 2021). Quando isso acontece, o vírus alcança grande vantagem na sua replicação no trato respiratório superior e inferior, resultando em condições graves da doença. Esses fatores podem ser ampliados em idosos que têm uma quantidade de células T virgens menor (MODERBACHER et al., 2020; ZHANG et al., 2020a). Quando não ocorre a resposta imune adaptativa, o sistema imunológico inato tenta preencher esse vazio deixado pelos linfócitos T, buscando controlar o vírus com uma resposta imune inata em constante expansão. No entanto, essa solução acaba sendo insustentável, pois uma resposta inata maciça resulta em imunopatologia pulmonar excessiva, agravando ainda mais a doença (KURI-CERVANTES et al., 2020; MAGLEBY et al., 2020; SETTE; CROTTY, 2021).

No caso da covid-19 que apresenta a resposta imune inata mais rápida, o paciente tende a ser assintomático para a doença, ou apresenta a forma leve, em que não há necessidade de hospitalização. Desta forma, percebe-se que as células T e os anticorpos após serem ativados pela imunidade inata, reagem de forma eficiente controlando a infecção (ORAN; TOPOL, 2020; SETTE; CROTTY, 2021). Em adição, existe a heterogeneidade da imunidade adaptativa em diferentes pessoas que é um fator importante na covid-19. A resposta imunológica em

humanos difere de pessoa para pessoa, com isso o grande número de alelos do gene *HLA* é o exemplo mais adequado, e esta diversidade na resposta imunológica é uma estratégia evolutiva dos seres humanos. Assim, não há cenário em que 100% das pessoas respondam a uma infecção viral de maneira idêntica, pois diversos fatores podem influenciar as respostas imunológicas (ONNO et al., 2000a; SETTE; CROTTY, 2021).

Muitos outros fatores que influenciam a progressão e desfecho da covid-19 também têm sido documentados. Um dos fatores que influenciam a resposta imunológica é a idade da pessoa infectada. O número de células T virgens em idosos, que pode ser ativado e garantir a diversidade de reconhecimento do antígeno, diminui significativamente. Assim, as escassas células T CD8 + virgens foram associadas ao risco de covid-19 grave (MATHEW et al., 2020; MODERBACHER et al., 2020).

Em relação ao gênero, os homens apresentam mais agravamento da doença em relação às mulheres (BUNDERS; ALTFELD, 2020; SHROCK et al., 2020; DAN et al., 2021). Estudos não observaram diferenças nas respostas de células T comparando homens e mulheres (PENG et al., 2020; DAN et al., 2021). No entanto, pessoas com covid-19 grave apresentaram autoanticorpos anti-IFN-1, sendo a grande maioria do sexo masculino. Assim, a disfunção do IFN-1 pode estar relacionada ao sexo masculino e a covid-19 na sua forma grave (BASTARD et al., 2020; PAIRO-CASTINEIRA et al., 2021). Além disso, as diferenças dos hormônios sexuais também podem ser um determinante de infecções virais, pois o estrogênio tem efeitos imunoestimulantes, enquanto a testosterona tem efeitos imunossupressores (PRADHAN; OLSSON, 2020).

Pessoas com obesidade também apresentaram a resposta imunológica contra a covid-19 deficiente, sendo mais um fator de risco para a doença. Isso porque a expressão da ECA2 no tecido adiposo é maior do que no tecido pulmonar, o que significa que o tecido adiposo pode ser vulnerável à infecção por covid-19 (SANCHIS-GOMAR et al., 2020). Essa resposta indica que pessoas obesas tem um pior prognóstico das complicações associadas ao vírus, incluindo insuficiência respiratória e de múltiplos órgãos e, por consequência, maior mortalidade (CAI et al., 2020; PETRILLI et al., 2020; SANCHIS-GOMAR et al., 2020).

O diabetes está associado ao aumento da incidência e gravidade do covid-19. Há evidências do efeito do diabetes na entrada viral na célula e na resposta

inflamatória à infecção (SINGH et al., 2020). Estudos mostraram que pacientes com Diabetes Mellitus do tipo 2 (DM2) tem maiores chances de evoluírem para formas graves, e serem hospitalizados (BHATRAJU et al., 2020; CHEN et al., 2020; YANG et al., 2020).

Em relação aos fumantes, o tabagismo aumenta a expressão da ECA2, conhecido como receptor do SARS-CoV-2 para infecção nas células-alvo (BRAKE et al., 2020). Assim, os fumantes, ex-fumantes e pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) são um grupo de risco para o agravamento da covid-19 (BRAKE et al., 2020; TAY et al., 2020).

Em síntese, a patogênese da covid-19 é bastante complexa e envolve diversos mecanismos. O SARS-CoV-2 tem um alto nível de variabilidade genética, e um grande proteoma. Ele pode infectar células-alvo no trato respiratório superior, epitélio dos alvéolos e dos intestinos. Também inibe os efeitos protetores precoces dos IFN I e III e outros mecanismos de defesa antivirais inatas (GAN et al., 2021; GUSEV et al., 2022).

Outra propriedade dos fatores de patogenicidade do SARS-CoV-2 é sua atuação em grande parte dos processos de desenvolvimento do estresse celular pró-inflamatório em diversos tipos de células (GUSEV et al., 2022). Essas vias de estresse celular, que são influenciadas pelo vírus (GUSEV et al., 2021), inclui a formação de inflamassomas, estresse oxidativo (DE LAS HERAS et al., 2020; SUHAIL et al., 2020), resposta de RNA não codificantes, autofagia, expressão de fatores de transcrição universais de estresse celular (por exemplo, NF- κ B) (RODRIGUES et al., 2021; TOLDO et al., 2021) e a formação de um fenótipo secretor associado a redes de citocinas. Todos esses mecanismos favorecem o vírus, formando padrões anormais de inflamação (CHAUHAN et al., 2021; SHABAN et al., 2021; GUSEV et al., 2022).

2.1.4 Tratamento farmacológico

Em relação ao tratamento farmacológico para a covid-19, existem muitas pesquisas sobre o assunto desde o início da doença. No entanto, ainda não há consenso para o tratamento padronizado, e recomendado com evidências. Ao longo da pandemia por covid-19, muitas medicações foram utilizadas em pacientes, mesmo sem evidências, ou com resultados questionáveis para o uso.

Em maio de 2020 um grupo de especialistas se reuniu para propor as recomendações para a terapêutica farmacológica da covid-19 no Brasil, os pesquisadores elaboraram 11 recomendações, sendo elas (FALAVIGNA et al., 2020): contra o uso rotineiro de hidroxicloroquina ou cloroquina; do uso da combinação de hidroxicloroquina ou cloroquina mais azitromicina; desaconselhando o uso de oseltamivir para o tratamento de covid-19 em pacientes sem suspeita de coinfeção por influenza; contra o uso rotineiro de lopinavir/ritonavir, de corticosteróides, de tocilizumabe, de profilaxia de tromboembolismo venoso, de doses terapêuticas de heparina, de antibióticos profiláticos em pacientes com diagnóstico suspeito ou confirmado de covid-19, também houve fraca recomendação para o uso de tratamento empírico com oseltamivir em pacientes com síndrome respiratória aguda grave ou síndrome gripal com fatores de risco para complicações quando o diagnóstico de influenza não pode ser descartado e uma recomendação não classificada para o uso de antibióticos em pacientes com covid-19 com suspeita de coinfeção bacteriana (FALAVIGNA et al., 2020).

Observou-se nessas recomendações que nenhum tratamento farmacológico foi eficaz ou seguro para justificar o seu uso em pacientes com covid-19 (FALAVIGNA et al., 2020).

Diversas pesquisas recentes sobre a terapêutica farmacológica utilizadas na covid-19 foram publicadas. Um estudo revelou que o momento do início de seu uso é fundamental, e destacou que o Remdesivir deve ser administrado logo após o início dos sintomas da covid-19 (BARTOLI et al., 2021). Agentes imunomoduladores, como tocilizumab, anakinra e esteróides, foram recomendados na vigência de pneumonia e resposta hiperinflamatória pulmonar. A heparina também foi recomendada para o enfrentamento da coagulopatia relacionada à covid-19 (BARTOLI et al., 2021).

O estudo desenvolvido pela *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, que teve como objetivo prover recomendações para o manejo de adultos com covid-19, não recomendou o uso de hidroxicloroquina, ivermectina, azitromicina, colchicina e interferon β -1. Os autores recomendaram o uso de anticorpos monoclonais e remdesivir em pacientes ambulatoriais com covid-19 leve a moderado. Adicionalmente, foi recomendado que antibióticos não devem ser prescritos rotineiramente em pacientes com covid-19; e tocilizumabe e corticosteroóides foram recomendados para pacientes graves. Não houve

evidências para a recomendação do uso de favipiravir e profilaxia antifúngica (BARTOLI et al., 2021).

Uma meta-análise realizada para investigar três novos antivirais orais - molnupiravir, fluvoxamina e Paxlovid para tratamento da covid-19, mostrou que esses medicamentos são eficazes na redução das taxas da mortalidade e hospitalização. Esses medicamentos orais também não aumentaram a ocorrência de eventos adversos. Ressalta-se que estes medicamentos permanecem sendo investigados; contudo, trazem uma esperança para o tratamento inovador e promissor para a covid-19 (WEN et al., 2022).

Apesar dos diversos estudos, muito ainda precisa ser investigado e aprimorado para obter-se consenso na comunidade científica em relação ao tratamento para a covid-19 no Brasil e no mundo.

2.1.5 Vacinação

Com a pandemia da covid-19, devido a alta transmissibilidade, muitas pessoas morreram e sofreram com as consequências da doença, gerando um importante impacto humanitário e econômico. Em março de 2022, existiam 147 vacinas em desenvolvimento na fase clínica, e 195 em desenvolvimento na fase pré-clínica contra a covid-19 (OMS, 2022b). O primeiro imunizante aprovado globalmente foi o da Pfizer/BioNTech e a primeira dose aplicada aconteceu no Reino Unido, ainda em 2020 (OMS, 2022a). Após a primeira vacina aplicada, muitas outras vacinas foram aprovadas no mundo, e têm sido utilizadas para a imunização de toda população que, segundo a OMS, até maio de 2022, um total de 11.682.304.018 doses de vacina foram administradas pelo mundo e no Brasil foram 434.019.486 doses (OMS, 2022a).

No Brasil, foram aprovadas pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) 4 tipos de vacinas, sendo elas conhecidas como: CoronaVac, Pfizer, Janssen e AstraZeneca.

A CoronaVac foi desenvolvida pela *Sinovac Life Sciences*, Pequim, China. É uma vacina que funciona com vírus inativado, mais estáveis, fáceis de transportar e de armazenar, que produzem poucos eventos adversos (BUTANTAN, 2022). A Pfizer é produzida pelo laboratório norte-americano Pfizer, em parceria com o laboratório alemão BioNTech. A vacina Pfizer-BioNTech covid-19 (BNT162b2) é uma

nanopartícula lipídica formulada, de mRNA modificado com nucleosídeo que codifica a glicoproteína de pico de pré-fusão do SARS-CoV-2, assim, induz a imunidade celular e produção de anticorpos neutralizantes contra o antígeno SPIKE (S) (OLIVER, 2020). A vacina Ad26.COV2.S, produzida pela indústria farmacêutica Johnson & Johnson, conhecida como Janssen, foi produzida por um vetor de adenovírus recombinante. A técnica cria um vetor de adenovírus implementado no organismo humano saudável. O vetor entrega o adenovírus carregado do gene produtor da proteína SPIKE às células apresentadoras de antígenos (BOS et al., 2020; SADOFF et al., 2021). A vacina ChAdOx nCoV-19, mais conhecida pelo nome de seus desenvolvedores e produtores da Universidade de Oxford e a farmacêutica AstraZeneca - Oxford–AstraZeneca, é produzida utilizando o modelo de vetor viral. Essa vacina é composta por um único vetor adenovírus recombinante de chimpanzé, deficiente para replicação, que expressa a glicoproteína S do SARS-CoV-2. Após a administração, essa glicoproteína é expressa no local estimulando a produção de anticorpos neutralizantes e a resposta imune celular (KNOLL; WONODI, 2021).

Sobre as vacinas aprovadas pela Anvisa no Brasil, revisões da literatura concluíram que as quatro vacinas possuem eficácia comprovada no combate ao desenvolvimento da covid-19, como também no agravamento do quadro clínico da doença. Destaca-se que mesmo com a utilização de diferentes tecnologias para a produção das vacinas, os dados sobre sua eficácia e segurança são, no geral, extremamente positivos para o enfrentamento da pandemia da covid-19 (BEE et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2022; DE SÁ VILELA FILHO et al., 2022).

Outras revisões avaliando as vacinas disponíveis no mundo, concluíram que todas as vacinas parecem ser ferramentas seguras e eficazes para prevenir a covid-19 grave, hospitalização e morte contra todas as variantes de preocupação, mas a qualidade das evidências varia muito dependendo das vacinas consideradas. Importante ressaltar que os benefícios da vacinação contra a covid-19 superam os riscos, apesar dos raros efeitos adversos graves (FIOLET et al., 2021). Uma meta-análise também concluiu que as vacinas de covid-19 são altamente protetoras contra doenças relacionadas ao SARS-CoV-2 (ZHENG et al., 2022). Atualmente, percebe-se um aumento do número de casos da infecção por SARS-CoV-2 e suas variantes; no entanto, a hospitalização e mortalidade estão reduzindo significativamente, tal cenário tem sido influenciado pelo avanço da vacinação no Brasil e no mundo (OMS, 2022a; WHO, 2022).

2.2 Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC)

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) tem como função codificar proteínas de superfície que reconhecem e apresentam antígenos próprios ou externos para o sistema imune adaptativo. Assim, moléculas do MHC apresentam o antígeno para os linfócitos T (ABBAS, 2018). Foi na década de 40 que Gorer e Snell identificaram os genes que codificam as glicoproteínas MHC, esses estudos também fizeram compreender melhor sobre a rejeição de enxertos (GORER, 1937; SNELL, 1948), entendendo que a rejeição seria um evento imunológico. A região gênica do MHC é a mais polimórfica do genoma humano. O polimorfismo está localizado principalmente no sulco de ligação ao peptídeo, onde afeta o antígeno na apresentação e confere vantagem seletiva à população (DONADI, 2000; KLEIN; SATO, 2000; FRENET; SCARADAVOU, 2019). Em humanos, as moléculas MHC e seus respectivos genes codificadores são conhecidos como antígenos leucocitários humanos (HLA) (ABBAS, 2018).

Os genes do complexo HLA estão localizados na região 6p21.3 do braço curto do cromossomo 6 (Figura 4) e contém >240 genes de diversas funções. Muitos desses genes codificam proteínas do sistema imunológico. A família de genes MHC é dividida em três subgrupos ou classes, denominadas I, II e III. Os genes HLA estão intimamente ligados uns aos outros. A classe I é composta por uma cadeia α polimórfica combinada com um β -globulina monomórfica e são expressos em quase todas as células nucleadas. Elas apresentam peptídeos processados para os linfócitos TCD8+. As moléculas HLA classe II são compostas por duas cadeias polimórficas (α e β) (Figura 5) e são expressas constitutivamente apenas em células apresentadoras de antígenos profissionais (como macrófagos, células dendríticas e linfócito B; bem como linfócitos T ativados e células epiteliais do timo). Apresentam peptídeos derivados da degradação de proteínas para células TCD4+ (DONADI, 2000; KLEIN; SATO, 2000; FRENET; SCARADAVOU, 2019).

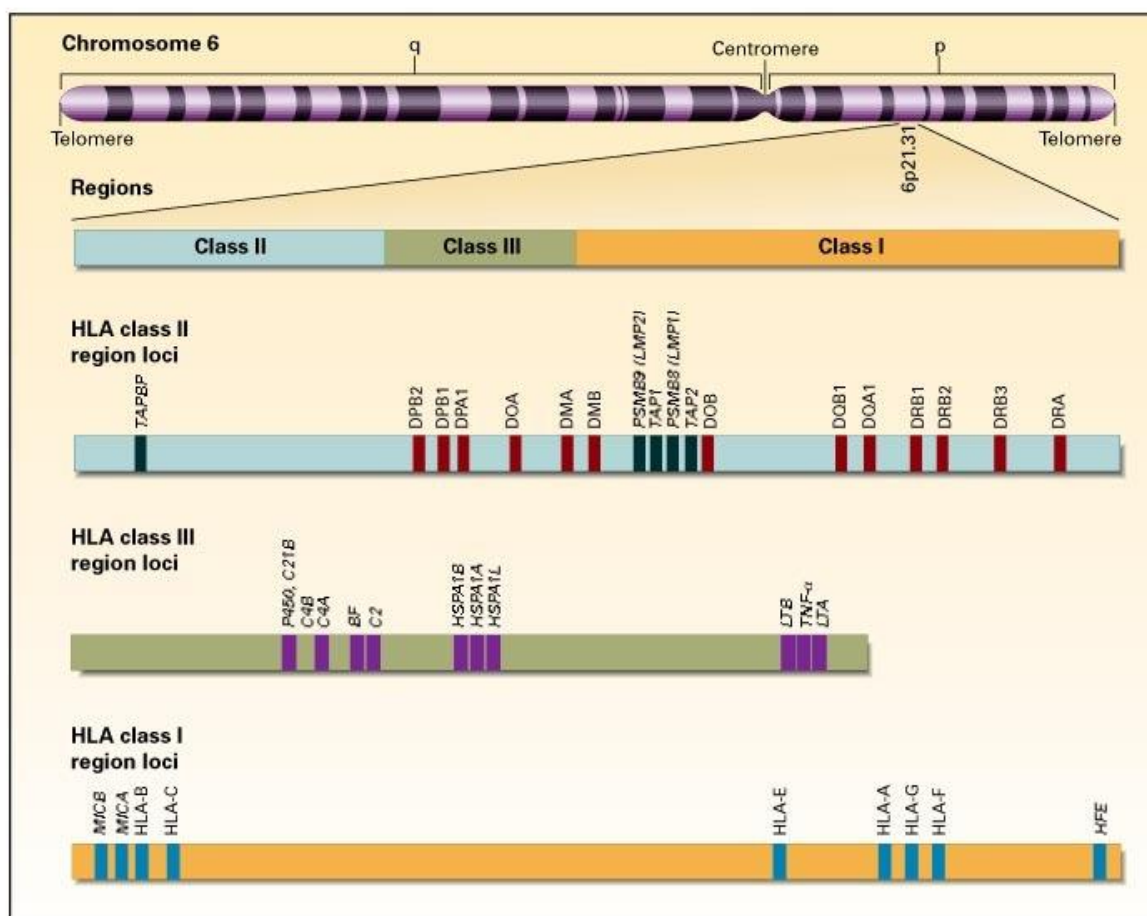


Figura 4 - Localização e Organização do Complexo HLA no Cromossomo 6. Fonte: KLEIN; SATO, 2000.

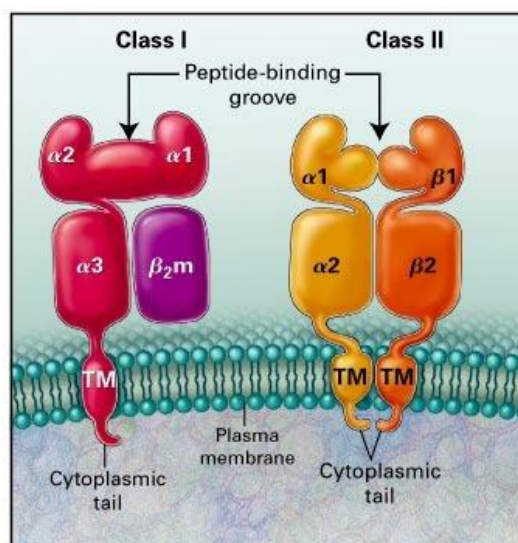


Figura 5 - Estrutura das Moléculas HLA Classe I e Classe II. Fonte: KLEIN; SATO, 2000.

As moléculas de classe I, ainda são subdivididas em clássicas e não clássicas. As clássicas HLA-A, -B e -C apresentam os peptídeos aos linfócitos T, já as não clássicas HLA-E, -F e -G estão associadas com a modulação da resposta imune. A molécula HLA-G é a mais investigada (DONADI et al., 2011).

2.2.1 Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G)

A molécula de HLA-G, inicialmente descoberta na interface materno-fetal, foi descrita pela primeira vez em 1987 (GERAGHTY; KOLLER; ORR, 1987). É uma molécula conhecida a princípio para a proteção do feto contra a destruição do sistema imunológico da mãe. Ela pode ser ligada a membrana ou solúvel, tem forte ligação com os receptores inibitórios nas células imunes, inibindo as funções efectoras e induzindo a inibição imunológica. Assim, a função do HLA-G pode ser benéfica, quando sua expressão ocorre por um feto ou por um transplante, para proteger da rejeição, ou pode ser deletéria quando expressa por um tumor ou células infectadas por vírus, que as protege da imunidade antitumoral ou antiviral, respectivamente (CAROSELLA et al., 2015).

O HLA-G possui um baixo polimorfismo quando comparamos com as outras moléculas do MHC de classe I. Devido a esse baixo polimorfismo observa-se que o HLA-G não participa do processo de ativação dos linfócitos TCD8+, mas ele está envolvido com a imunorregulação (FAVIER; LEMAOULT; CAROSELLA, 2007; ABBAS, 2018; AL-BAYATEE; AD, 2021).

Algumas propriedades da molécula HLA-G que pertence à classe I não clássica que diferem de outras moléculas HLA (-A, -B e -C) de classe I clássica, apresentam diferenças em: variabilidade limitada de proteínas; presença de várias isoformas ligadas à membrana e solúveis, geradas por *splicing* alternativo do transcrito primário, estrutura molecular única, apresentando uma cauda citoplasmática reduzida, modulação da resposta imune e expressão tecidual restrita. Essas características biológicas podem ser afetadas pelos sítios polimórficos e pela variabilidade de nucleotídeos na região codificadora (DONADI et al., 2011; POSCH; HURLEY, 2011; ABBAS, 2018). A regulação do gene HLA-G é única, ele é o menos análogo das moléculas não clássicas de classe I, a HLA-E e HLA-F (GOBIN; VAN DEN ELSEN, 2000). Embora menos polimórfico que os genes clássicos da classe I,

o HLA-G é o mais polimórfico dos genes da classe I não clássicos (SULLIVAN et al., 2006).

A molécula de HLA-G é expressa em trofoblastos, que tem como função contribuir para a formação da placenta, também é descrita a expressão fisiológica do HLA-G em tecidos imunoprivilegiados de adultos, como o timo (LEFEBVRE et al., 2000), córnea (LEFEBVRE et al., 2000) em células endoteliais e eritróides (MENIER et al., 2004), e ilhotas β do pâncreas (CIRULLI et al., 2006). No entanto, outros tipos de células também são capazes de expressar HLA-G, como células epiteliais brônquicas (CIRULLI et al., 2006), células mesenquimais (IVANOVA-TODOROVA et al., 2009), células de linhagem monocítica (ONNO et al., 2000b; LE FRIEC et al., 2004; MOUCHET et al., 2021), e por mastócitos em regiões de fibrose de órgãos como fígado, pulmão e rim (MOUCHET et al., 2021). A expressão não fisiológica do HLA-G pode ocorrer em doenças inflamatórias, na infecção viral, cânceres e transplantes (POSCH; HURLEY, 2011; CAROSELLA et al., 2015; FRENET; SCARADAVOU, 2019; BORTOLOTTI et al., 2021).

O HLA-G possui sete isoformas, sendo quatro ligadas à membrana (HLA-G1, G2, G3 e G4) e três solúveis (G5, G6 e G7). O HLA-G solúvel (sHLA-G) pode ser detectável no soro ou plasma (REBMANN et al., 2003).

Donadi (2011) e colaboradores ilustraram na figura 6, as principais características das isoformas HLA-G e os principais locais responsáveis por padrões de transcrição fisiológicos ou truncados. Isoformas de HLA-G são produzidas por *splicing* alternativo do mRNA primário. Os domínios de cadeia pesada HLA-G ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, porção transmembranar e cauda citoplasmática) são codificados pelo gene *HLA-G* (cromossomo 6), e a molécula de $\beta 2$ -microglobulina leve é codificada por um gene no cromossomo 15. O transcrito primário pode ser dividido em 7 isoformas, HLA-G1 a -G7. HLA-G1 é a molécula HLA-G de comprimento total, HLA-G2 não possui o exon 3, HLA-G3 não possui os éxons 3 e 4 e HLA-G4 não possui o exon 4. HLA-G1 a -G4 são moléculas ligadas à membrana devido a presença da cauda transmembrana e citoplasmática codificada pelos éxons 5 e 6. HLA-G5 é semelhante ao HLA-G1, mas retém o íntron 4, HLA-G6 não possui o exon 3, mas retém o íntron 4, e HLA-G7 não possui o exon 3, mas retém o íntron 2. HLA-G5 e -G6 são formas solúveis devido presença do íntron 4, que contém um códon de parada prematuro no exon 4 (sinal de parada azul), impedindo a tradução da cauda

transmembrana e citoplasmática. O HLA-G7 é solúvel devido à presença do íntron 2, que apresenta um códon de parada prematuro (sinal de parada verde) (Figura 6).

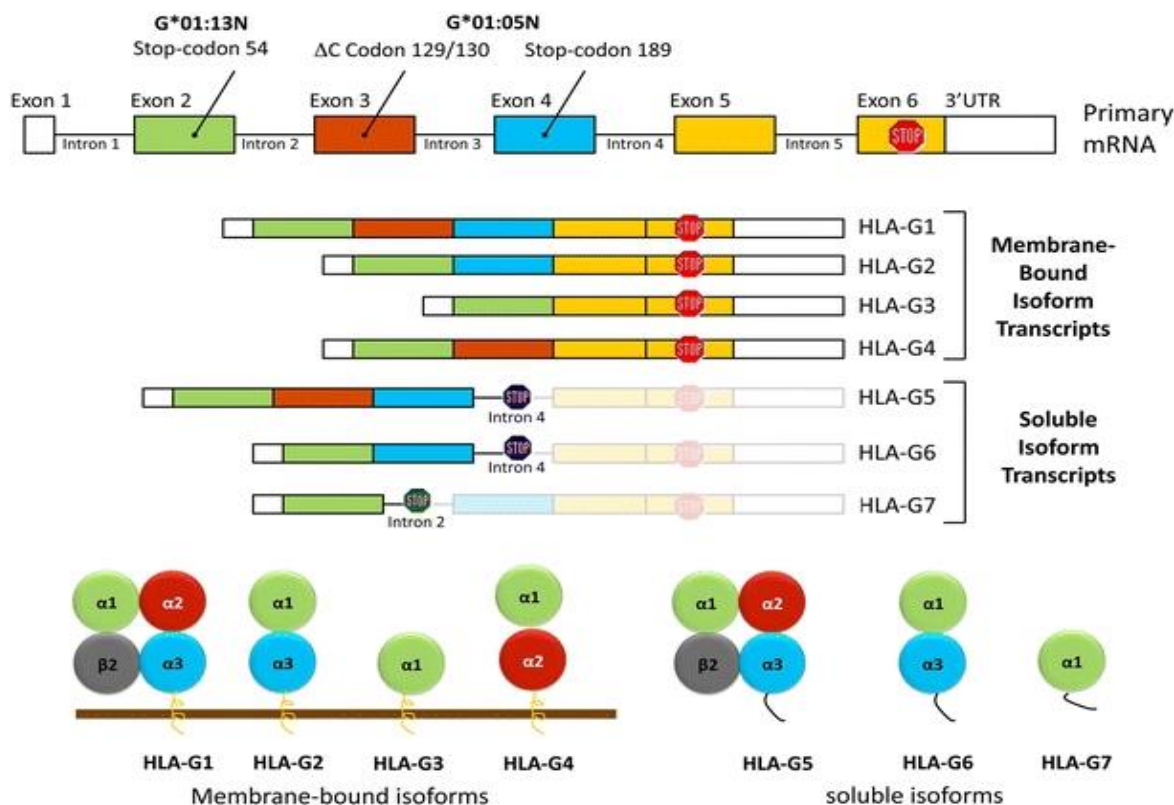


Figura 6 - Características das isoformas HLA-G e os principais locais responsáveis por padrões de transcrição fisiológicos ou truncados. Fonte: DONADI, 2011.

2.2.2 HLA-G e as células imunes

Em várias doenças infecciosas ocorre a expressão de HLA-G, tanto na forma ligada à membrana quanto na forma solúvel, desempenhando vários efeitos imunomoduladores. O HLA-G pode ser secretado por células TCD4+ aloespecíficas após reações alogênicas, ou seja, depois de um transplante, concluindo que o HLA-G pode controlar a rejeição de aloenxertos, assim ele inibe a proliferação alogênica de células TCD4+ (LILA et al., 2001). O HLA-G solúvel (sHLA-G) inibi a proliferação de células TCD4+, e pode induzir apoptose em células TCD8+ e células NK (CONTINI et al., 2003), afeta a resposta dos linfócitos T nas células dendríticas (LE FRIEC et al., 2003), e inibe a proliferação de células B (NAJI et al., 2014). O HLA-G foi considerada uma molécula envolvida no ajuste das respostas imunes. Desta forma, um novo nome foi dado a essas interações intercelulares que ligam ao

receptor e que bloqueiam as respostas imunes: pontos de controle imunológicos, conhecido como *checkpoints* imunológicos (CAROSELLA et al., 2015).

As células que expressam HLA-G, como os linfócitos T, são células com funções imunológicas de efetuação de respostas antivirais, seja pela produção de citocinas ou eliminando diretamente células infectadas (NEGRINI et al., 2017; CONTINI et al., 2020).

As células NK são linfócitos de defesa do sistema imune que tem a função de reconhecer as células estranhas ao organismo, células infectadas por vírus ou com algum tipo de alteração que possa levar ao surgimento de um câncer, e participam ativamente do mecanismo de vigilância imunológica (ABBAS, 2018).

Os monócitos são células do sangue que têm como função defender o organismo de antígenos estranhos tais como bactérias ou vírus, além de remover partículas estranhas e destruir células tumorais (ABBAS, 2018). Números elevados de monócitos HLA-G+ foram encontrados no sangue periférico de indivíduos infectados pelo HIV. A expressão de HLA-G pode ser causada diretamente pela infecção pelo HIV ou indiretamente relacionada ao aumento dos níveis de IL-10, que é conhecido por induzir a expressão de HLA-G em monócitos. Ao diminuir a capacidade de apresentação de antígeno do monócito, a expressão aumentada de HLA-G pode ser uma das estratégias utilizadas pelo HIV para escapar da vigilância imunológica (CONTINI et al., 2020; LOZANO et al., 2002).

As células dendríticas são um tipo de célula apresentadora de antígeno (APC), ou seja, responsáveis por identificar e processar os antígenos, e, em seguida, os apresentar para as células de defesa responsáveis pelo combate da infecção. Quando o sistema imune se sente ameaçado, essas células são ativadas com o objetivo de identificar o agente infeccioso e promover a sua eliminação (ABBAS, 2018). A célula dendrítica monocitóide expressa altos níveis de HLA-G que podem ser encontradas no sangue periférico de indivíduos receptores de transplante de fígado estáveis e tolerantes (CASTELLANETA et al., 2011).

Os mastócitos são células derivadas da medula óssea que circulam de forma imatura e se tornam maduras após a migração para um sítio tecidual. Os mastócitos têm sido vistos como efetores de doenças alérgicas mediadas por IgE e defesa do hospedeiro contra parasitas (DA SILVA; JAMUR; OLIVER, 2014). Tem sido relatado que os mastócitos infiltrados no fígado de pacientes infectados com o vírus da hepatite C (HCV) expressam HLA-G e secretam HLA-G na forma solúvel. O número

de mastócitos HLA-G⁺ está significativamente associado às áreas de tecido conjuntivo e fibrose hepática (AMIOT et al., 2014; AMIOT; VU; SAMSON, 2015). Em resumo, esses dados suportam a suposição de que as células imunes HLA-G⁺ estão implicadas na patogênese de diferentes doenças (CONTINI et al., 2020).

2.2.3 HLA-G e as doenças infecciosas

A expressão do HLA-G pode estar associada à suscetibilidade a diferentes doenças (CONTINI et al., 2020; RASHIDI et al., 2022). Sua expressão tem sido descrita em várias doenças infecciosas causadas por agentes bacterianos, virais ou parasitários (AMIOT; VU; SAMSON, 2014; MORANDI et al., 2016; SABBAGH et al., 2018).

Em infecções virais, a superexpressão de HLA-G pode levar à indução de um ambiente tolerogênico e à inibição da resposta imune. Os vírus desenvolveram várias estratégias para desorganizar a vigilância e as respostas imunes do hospedeiro, bem como, vários mecanismos para impedir o reconhecimento das células NK, induzindo a expressão de moléculas HLA-G (ONNO et al., 2000a; LOZANO et al., 2002), que podem suprimir a função de várias células imunes (LEGAL et al., 1999; LILA et al., 2001; PARK et al., 2004).

Algumas infecções virais crônicas como HIV, citomegalovírus, hepatite C e hepatite B, o HLA-G está implicado no mecanismo de desenvolvimento da patologia (LOUZADA-JUNIOR; FREITAS, 2012; CONTINI et al., 2020; RASHIDI et al., 2022). Na infecção pelo HIV, propriedades imunossupressoras da molécula HLA-G podem estar envolvidas na persistência e progressão da infecção. Vários polimorfismos do HLA-G influenciam na susceptibilidade à infecção pelo HIV, visto que a expressão da HLA-G, na superfície de monócitos e células T, está aumentada em pessoas vivendo com HIV (LOZANO et al., 2002; CELSI et al., 2013). Quanto ao citomegalovírus, um estudo apresentou que o vírus seria capaz de induzir a expressão de HLA-G por alguns subconjuntos de linfócitos que seriam capazes de mediar à inibição da função de células que expressam ligantes para HLA-G como um mecanismo de evasão imune (ALBAYATI et al., 2017). Em relação à hepatite C, pesquisas evidenciaram aumento de sHLA-G em pacientes com hepatite C crônica, quando comparados a indivíduos controles saudáveis. No entanto, esse aumento foi acompanhado de elevação dos níveis de Interleucina-10 (IL-10) e Interferon-gama

(IFN- γ) (WENG et al., 2011; KHORRAMI et al., 2015). Já para o vírus da hepatite B, estudos observaram que o sHLA-G pode ter um papel crucial no desfecho da infecção, podendo ser utilizado como um biomarcador (ESKANDARI et al., 2017; LAARIBI et al., 2017; MICHEL WOLF et al., 2020). Em adição, diversos estudos demonstram a expressão do HLA-G em contexto patológico, incluindo cânceres (SHIH, 2007; SHEU; SHIH, 2010; AMIOT et al., 2011), doenças autoimunes (RIZZO et al., 2014) e doenças inflamatórias (BARICORDI et al., 2008). Esta molécula também foi expressa em doenças infecciosas, incluindo parasitárias e bacterianas (CATAMO et al., 2014; DIAS et al., 2015; SABBAGH et al., 2018).

2.2.4 HLA-G e a covid-19

Covid-19, causada pelo SARS-CoV-2, foi definida como uma pandemia, e vem sendo bastante investigada. Por se tratar de uma doença viral, as moléculas solúveis de HLA-G (sHLA-G) têm sido consideradas potentes imunomoduladores, e sua expressão desregulada tem sido implicada em várias condições patogênicas da doença.

Em um estudo preliminar realizado com um único paciente crítico na China no início da pandemia em 2020, analisou a relação entre o HLA-G e suas expressões de receptores de células imunes periféricas durante a infecção por covid-19. Mostrou que no início da doença os níveis de HLA-G estavam aumentados, e quando o teste do covid-19 deu positivo os níveis de HLA-G diminuíram e aumentaram novamente quando o teste negativou (ZHANG et al., 2020b). Assim, a expressão de HLA-G em células imunes periféricas, como células T, células B e monócitos, segue um padrão alto-baixo-alto, que pode refletir os três estágios de infecção, replicação e eliminação do SARS-CoV-2. Outra investigação realizada na Itália, observou que os níveis de sHLA-G de pacientes com covid-19 estavam significativamente maiores comparados com os controles (BORTOLOTTI et al., 2021). Na admissão hospitalar, os níveis plasmáticos de sHLA-G foram significativamente maiores em pacientes com covid-19 com insuficiência respiratória, e melhora clínica da covid-19 foi associada ao aumento dos níveis plasmáticos de sHLA-G. Concluindo que níveis aumentados de sHLA-G no sangue podem representar um novo e promissor biomarcador na covid-19 (BORTOLOTTI et al., 2021). Ainda na Itália, estudo com um paciente apresentando uma fístula aortoentérica atípica, revelou em análise histológica do

intestino uma isquemia sustentada e liponecrose da parede duodenal, com trombose de vasos sanguíneos intramurais, e endotelite de vasos sanguíneos e neoangiogênese, com presença positiva para SARS-CoV-2 e HLA-G (TRAINA et al., 2021).

Ramzannezhad et al., (2022) mostraram que pacientes com covid-19 grave apresentaram número significativamente menor de células imunoinibitórias em relação aos pacientes com covid-19 moderada. Assim, o aumento da quantidade de células imunomoduladoras LTCD4+/HLA-G+ e CD14+HLA-G+ pode reduzir a gravidade da doença em pacientes com covid-19 (RAMZANNEZHAD et al., 2022).

Outro estudo realizado em hospitais em Bagdá, também corrobora com os achados de estudos anteriores, verificou que os níveis de sHLA-G foram significativamente aumentados em pacientes com covid-19 grave em comparação com os controles (AL-BAYATEE; AD'HIAH, 2021). Posteriormente esses autores mostraram que os níveis de sHLA-G não apresentaram diferenças significantes quando avaliado em relação ao polimorfismo gênico de 14pb (Ins/Del), e que os níveis de sHLA-G foram regulados positivamente em pacientes com covid-19, independentemente da gravidade da doença (AD'HIAH; AL-BAYATEE, 2022).

Esses são os estudos que avaliaram os níveis de sHLA-G em pacientes com covid-19 até o momento. Entretanto, outros estudos acerca de marcadores imunológicos como HLA-G, que reconhecidamente, participam das respostas contra infecções virais, devem ser realizados e priorizados para corroborar conhecimentos para melhor entendimento dos mecanismos imunológicos no contexto da covid-19.

2.3 O avanço do conhecimento científico e a atuação da enfermagem

A atuação da enfermagem é ampla em todo o mundo, existem muitas áreas em que a enfermagem está presente. Na pesquisa clínica, a enfermagem tem adquirido conhecimentos clínicos e científicos, avançando em pesquisas e corroborando com a melhora da qualidade de vida dos indivíduos.

A pandemia por covid-19 exigiu que a enfermagem estivesse preparada para o cuidado com excelência, apresentando um papel importante no combate à doença, atuando na linha de frente junto com a equipe de saúde e produzindo novas práticas, respostas e conhecimentos por meio de pesquisas científicas. Os avanços tecnológicos, o conhecimento sobre as respostas imunológicas à infecção pelo

SARS-CoV-2, e o papel do HLA-G, são ferramentas essenciais para que a enfermagem protagonize suas práticas assistenciais.

3 JUSTIFICATIVA

A covid-19, causada pelo SARS-CoV-2, é uma pandemia que tem definido políticas mundiais, sanitárias, econômicas e humanistas. Considerada uma catástrofe global, em pouquíssimo tempo dizimou milhões de pessoas. Apesar de termos a vacina, sua cobertura global ainda se configura como um problema; ademais, as novas mutações virais ainda são desafios, e ainda não existe um tratamento definitivo para esta doença.

Estudos acerca de marcadores imunológicos como HLA-G que, reconhecidamente, participam das respostas contra infecções virais, devem ser realizados e priorizados para corroborar conhecimentos para melhor entendimento dos mecanismos imunológicos da covid-19.

Alguns questionamentos motivaram a realização deste estudo: Como se apresentam os níveis plasmáticos de sHLA-G nas diferentes características demográficas, comorbidades, gravidade e desfechos clínicos da covid-19 na população brasileira? Será que há uma correlação entre os níveis plasmáticos de sHLA-G e os parâmetros clínicos e imunológicos na doença? e esses níveis plasmáticos de sHLA-G estão associados com a gravidade e mortalidade dos pacientes com covid-19?

O presente estudo mostra-se importante devido poucos trabalhos que abordam a expressão de sHLA-G em indivíduos com covid-19, e nenhum realizado em nossa população. O estudo também contribui para a busca de conhecimentos e tecnologias em saúde que possam ser aplicadas nas intervenções aos pacientes com covid-19. Aspectos da biologia do HLA-G, como as funções altamente inibitórias são fundamentais para a compreensão da relevância dessa molécula em condições fisiológicas e patológicas, e podem auxiliar a projetar estratégias diagnósticas e terapêuticas em várias áreas da saúde humana, incluindo o contexto da covid-19 (DE OLIVEIRA et al., 2018). De fato, moléculas HLA-G são poderosas na tolerância imunológica e podem inibir/suprimir as funções das células imunológicas durante a infecção por SARS-CoV-2, promovendo a subversão do vírus. Dosar formas solúveis dessas moléculas no plasma de pacientes pode ajudar na identificação, seguimento e prognóstico de casos críticos, como também o desenvolvimento de novas terapias para covid-19 (ZIDI, 2020; RASHIDI et al., 2022).

Com o intuito de melhor compreender o papel da HLA-G na covid-19 na população brasileira, este estudo pretende quantificar os níveis plasmáticos de HLA-G solúvel (sHLA-G) em pacientes com covid-19.

4 OBJETIVO

Quantificar os níveis plasmáticos de HLA-G solúvel (sHLA-G) em pacientes com covid-19.

4.1 Objetivos Específicos

- Descrever os aspectos sociodemográficos e clínicos dos pacientes com covid-19;
- Caracterizar e comparar as variáveis clínicas e laboratoriais dos grupos de controle saudável e de pacientes com covid-19;
- Quantificar os níveis plasmáticos de sHLA-G de controles e pacientes com covid-19;
- Comparar os níveis plasmáticos de sHLA-G com as características demográficas, comorbidades, gravidades clínica, óbito e tratamento farmacológico dos pacientes com covid-19;
- Correlacionar os níveis plasmáticos de sHLA-G e os parâmetros clínicos e imunológicos da covid-19;
- Analisar os níveis plasmáticos de sHLA-G associados com a gravidade e mortalidade dos pacientes com covid-19.

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo observacional, descritivo, do tipo transversal realizado em indivíduos com covid-19.

5.2 Local do estudo

Este estudo está vinculado a um macroprojeto intitulado “Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em covid-19 grave: busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes infectados por SARS-CoV-2”, para enfrentamento da covid-19, coordenado pela Profa Dra Lucia Faccioli. O projeto foi conduzido na cidade de Ribeirão Preto, os participantes do grupo controle foram provenientes da comunidade da Universidade de São Paulo (USP) - Campus Ribeirão Preto. Já os participantes com covid-19 foram oriundos de suas residências, e de hospitais privado e filantrópico - Hospital São Paulo e Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto. As análises foram realizadas em laboratórios de pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

5.3 Aspectos éticos

Esta pesquisa seguiu a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS), nº 466 de 2012, sobre diretrizes e normas regulamentadoras para pesquisas em seres humanos do Ministério da Saúde (BRASIL, 2013).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, protocolo CAAE nº 30525920.7.0000.5403 (Anexo A).

Os participantes que aceitaram participar da pesquisa foram informados sobre os objetivos e etapas do estudo. Foram entregues duas vias do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Apêndice A), sendo uma via assinada e mantida com o pesquisador e a outra entregue ao participante. O anonimato e o sigilo das

informações foram assegurados e não foi oferecido nenhum tipo de recompensa ou remuneração aos participantes da pesquisa.

5.4 Participantes do estudo

A amostra estudada foi coletada e estratificada conforme os grupos abaixo descritos:

Grupo controle: 73 participantes, provenientes da comunidade USP-Campus Ribeirão Preto, com teste molecular de reação de polimerização em cadeia (PCR), pós-swab nasofaríngeo, negativo para SARS-CoV-2, autodeclarados saudáveis e assintomáticos.

Grupo domiciliar: 60 participantes assintomáticos ou oligossintomáticos e com resultado positivo para o teste molecular (PCR) de SARS-CoV-2, pós-swab. Estes participantes foram provenientes de buscas domiciliares após consulta de relatórios da Vigilância Epidemiológica de Ribeirão Preto e/ou sistema Hygia para identificação dos casos testados positivos, realizados via Unidades Básicas de Saúde (UBS) de Ribeirão Preto.

Grupo hospitalar: 129 participantes atendidos em hospital privado e filantrópico da mesma cidade (Hospital São Paulo e Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto), que foram testados e positivados para SARS-CoV-2 como rotina hospitalar de atendimento de indivíduos com síndrome gripal (via swab e PCR). Após avaliação clínica e laboratorial de diagnóstico de covid-19 (realizada pelos médicos responsáveis pelo atendimento), estes pacientes foram classificados conforme a gravidade clínica da doença como pacientes sintomáticos hospitalizados com doença leve, moderada, grave e crítica.

Assim, os participantes foram classificados de acordo com presença ou não da infecção por SARS-CoV-2 e gravidade clínica da covid-19, em grupos Controles saudáveis, Leve, Moderado, Grave e Crítico seguindo critérios e recomendações da OMS (Tabela 1) (GRASSELLI et al., 2020; HADJADJ et al., 2020; WHO INFECTION, 2020; XU et al., 2020; YE et al., 2020).

Tabela 1 - Classificação dos participantes do estudo.

Grupos	Sintomas, sinais e parâmetros clínicos
Controles saudáveis	<ul style="list-style-type: none"> - Negativo para ácido nucleico SARS-CoV-2 - Sem sinais clínicos
Leve	<ul style="list-style-type: none"> - Positivo para ácido nucleico SARS-CoV-2 e / ou teste sorológico - Com ou sem os seguintes sintomas: diarreia, tosse, febre, dor de cabeça, perda do paladar (ageusia)/ cheiro (anosmia), mialgia, náusea e vômito - Saturação de oxigênio 94-99% no ar ambiente
Moderado	<ul style="list-style-type: none"> - Positivo para ácido nucleico SARS-CoV-2 e / ou teste sorológico - Manifestação de sintomas leves de doença, incluindo dispneia - Saturação de oxigênio $\geq 93\%$ no ar ambiente e $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 250-300 mmHg - Não precisa de suportes invasivos: cateter nasal (oxigênio 2-4 L/min) ou reservatório de oxigênio (oxigênio 4-12 L / min)
Grave	<ul style="list-style-type: none"> - Positivo para ácido nucleico SARS-CoV-2 e / ou teste sorológico - Possível admissão em unidades de terapia intensiva - Grave dificuldade respiratória - Saturação de oxigênio $<93\%$ em ar ambiente e $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 250$ mmHg - Não precisa de suportes invasivos: reservatório de oxigênio ou máscara facial sem reinalação (oxigênio 10-15 L/min)
Crítico	<ul style="list-style-type: none"> - Positivo para ácido nucleico SARS-CoV-2 e / ou teste sorológico - Admissão em unidades de terapia intensiva - Síndrome da insuficiência respiratória aguda - Necessita de Determinar Invasiva - $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$ mmHg - Com ou sem um ou mais parâmetros adicionais: necessidade de hemodiálise, sepse, choque séptico e disfunção de órgãos múltiplos

Abreviaturas: FiO_2 , fração inspirada de oxigênio; PaO_2 , pressão parcial de oxigênio.

5.5 Critério de elegibilidade

Critérios de inclusão: Em todos os grupos foram incluídas pessoas do sexo masculino e feminino. Os participantes do grupo controle foram pessoas assintomáticas e saudáveis. Para o grupo domiciliar, os critérios de inclusão foram diagnóstico molecular Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) positivo para SARS-CoV-2, sintomatologia ausente ou leve para covid-19. No grupo hospitalar foram incluídos pacientes atendidos no Hospital São Paulo e Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto em Ribeirão Preto/SP, com infecção de SARS-CoV-2 confirmada por diagnóstico molecular (PCR), e agrupados em moderado, grave e crítico.

Critérios de exclusão: Para os participantes dos grupos com covid-19, domiciliar e hospitalar, o critério de exclusão foi o resultado negativo para o diagnóstico molecular (PCR) para SARS-CoV-2. Para os participantes do grupo controle, o critério de exclusão foi PCR positivo para SARS-CoV-2, presença de doenças crônicas e infecciosas, e gravidez. Essas informações foram obtidas do participante por autodeclaração no momento do convite para a pesquisa, obtidas nas respostas ao questionário para coleta de dados (Apêndice B).

5.6 Coleta de amostra

Foram coletados 4,5 mL de sangue venoso periférico de cada participante em tubos Vacutainer (Beckton & Dickinson, USA) contendo EDTA K3 (0.054mL/tubo) para a obtenção de plasma. As coletas de dados e amostras aconteceram de junho dezembro de 2020.

5.7 Quantificação dos níveis plasmáticos de HLA-G solúvel

A isoforma solúvel de HLA-G foi detectada pela técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). As isoformas de sHLA-G foram capturadas incubando o 60uL de plasma das amostras em uma placa de 96 poços com monocamada de anticorpo monoclonal (MEM-G/9) imobilizado (Exbio, Praga, República Tcheca) por 18 horas a 4 °C. A ligação não específica foi bloqueada usando albumina a 2% em solução salina tamponada de fosfato (PBS) por 30 min. Após lavagem das placas, por 3 vezes com PBS contendo 0,05% de tween 20, as placas foram incubadas por 1h com anticorpo de detecção conjugado com a enzima HRP-anti-b2-microglobulina peroxidase e com o substrato (orto-fenil-n-diaminodihidroxicloreto) (DAKO, Santa Clara, Califórnia). A reação foi terminada pela adição de H₂SO₄ 1N e lida imediatamente a 490 nm no espectrofotometro de ELISA (AgileReader™ ELISA Plate Readers, Avans Biotechnology, Taipei City, Taiwan). Os níveis de sHLA-G foram estimados por uma curva padrão de cinco pontos (12,5–200 ng/mL) usando o sobrenadante da cultura de linha celular que expressa o hibridoma M8-HLA-G5. Todas as amostras de plasma foram testadas em duplicata.

5.8 Dosagem de Citocinas plasmáticas por *Cytometric Bead Array* - CBA

As citocinas e quimiocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF e IL-12p70 foram quantificadas nas amostras de plasma dos pacientes e indivíduos controles pela técnica de *Cytometric Bead Array* com o Kit *Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines Kit* (BD® Biosciences, San Diego, CA, USA), seguindo as orientações descritas pelo fabricante.

5.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *GraphPad Prism* versão 9, adotando nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). A análise de distribuição dos dados foi realizada pelo teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Deste modo, a análise comparativa das variáveis entre os grupos foi realizada por meio de testes não paramétricos de *Mann-Whitney* (para dois grupos) e *Kruskal-Wallis* (para três ou mais grupos).

A matriz de correlação entre a molécula de sHLA-G e os parâmetros clínicos e imunológicos da covid-19 foi construída por meio do teste de *Sperman* (r), considerando a classificação dos coeficientes de correlação, como: $< 0,4$ (correlação fraca), $> 0,4$ a $< 0,5$ (moderada) e $> 0,5$ (forte) (HULLEY et al., 2003).

A Análise de Regressão Logística Binomial foi realizada no *software* Jamovi (Versão 1.6 - 2021) para avaliar a associação de sHLA-G com a gravidade e mortalidade na covid-19.

6. RESULTADOS

6.1 Características sociodemográficas, clínicas e laboratoriais dos participantes do estudo

Incluimos neste estudo 262 indivíduos. Dentre os que apresentaram covid-19, 60 estavam em cuidados domiciliares e 129 eram pacientes hospitalizados. Como grupo controle saudável, foram incluídos 73 indivíduos. As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos grupos estão descritas na Tabela 2. A mediana da idade foi 55 anos para o grupo com covid-19, já para o grupo controle foi de 33,5 anos. A maioria dos pacientes do grupo hospitalar era do sexo masculino (67,4%). Por outro lado, no grupo de pacientes domiciliares, com a forma mais leve da covid-19, a maioria foi do sexo feminino (63,3%). Em relação à presença de comorbidades, observamos que a hipertensão arterial sistêmica (HAS), doença cardiovascular (DC), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), histórico de tabagismo e doença neurológica foram mais frequentes no grupo de pacientes hospitalizados. Quanto aos sintomas apresentados, a dispnéia (59,3%) e a tosse (68,8%) foram os mais presentes entre os pacientes. Já em relação às características hematológicas, observamos diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre o grupo controle e de pacientes, nos dados laboratoriais da hemoglobina, número de neutrófilos, linfócitos, razão neutrófilo linfócito (RNL) e glicemia. A mediana de saturação de oxigênio entre os pacientes hospitalizados foi de $92 \pm 8,4$ PaO₂, sendo que, 20,9% destes fizeram o uso da ventilação mecânica invasiva. Quanto ao tratamento farmacológico, os fármacos mais utilizados nos pacientes hospitalizados foram glicocorticóides (79,4%), azitromicina (66,7%) e ceftriaxona (65,1%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização demográfica, clínica e laboratorial dos grupos controle e de pacientes com covid-19, Brasil, 2022.

	Controle n=73	Pacientes n=189	covid-19		P Value
			Domiciliar n=60	Hospitalar n=129	
Características demográficas					
Idade, mediana ± SD, (IQR)	33,50 ± 11,19 (20-64)	55 ± 19,04 (16-96)	38 ± 13,32 (16-92)	62 ± 16,78 (20-96)	a, c, d <0,0001 b >0,9650
Sexo, Nº (%)					
Masculino	26 (35,6)	109 (57,7)	22 (36,7)	87 (67,4)	a 0,0014 b 0,9001
Feminino	47 (64,4)	80 (42,3)	38 (63,3)	42 (32,6)	c, d <0,0001
Comorbidades ou distúrbios coexistentes, Nº (%)					
Hipertensão Arterial Sistêmica	7 (9,6)	76 (40,2)	6 (10,0)	70 (54,3)	a 0,0025 c, d <0,0001 b 0,9367
Doença cardiovascular	7 (9,6)	19 (10,0)	10 (16,7)	9 (7,0)	a 0,9104 b 0,2238 c 0,5090 d 0,0392
Diabetes <i>mellitus</i>	3 (4,1)	53 (28,0)	8 (13,3)	45 (34,9)	a <0,0001 b 0,0546 c <0,0001 d <0,0021
Histórico de tabagismo	9 (12,3)	38 (20,1)	5 (8,3)	33 (25,6)	a 0,1413 b 0,4550 c 0,0258 d 0,0059
Doença neurológica	-	34 (18,0)	17 (28,3)	17 (13,2)	a 0,0001 b <0,0001 c 0,0012 d 0,0116
IMC (kg/m ³) mediana ± SD, (IQR)	24,5 ± 4,4 (15,4-39,7)	27,9 ± 6,7 (15,8-65,7)	27,2 ± 5,7 (15,8-43,8)	28,3 ± 7,0 (18,4-65,7)	a, c <0,0001 b 0,0502 d 0,5646
Sintomas, Nº (%)					
Dispneia	-	112 (59,3)	23 (38,3)	89 (69,0)	a, b, c, d <0,0001
Febre	-	60 (31,7)	3 (5,0)	57 (44,2)	a, c, d < 0,0001 b 0,0533
Mialgia	-	37 (19,6)	-	37 (28,7)	a, c, d < 0,0001
Diarreia	-	50 (26,5)	26 (43,3)	24 (18,6)	a, b, c < 0,0001 d 0,0003
Tosse	-	130 (68,8)	49 (81,7)	81 (62,8)	a, b, c <0,0001 d 0,0091
Delirium hiperativo	-	12 (6,3)	-	12 (9,3)	a 0,0275 c 0,0072 d 0,0146
Disgeusia	-	55 (29,1)	42 (70,0)	13 (10,1)	a, b, d < 0,0001 c 0,0050
Anosmia	-	59 (31,2)	42 (70,0)	17 (13,2)	a, b, d < 0,0001 c 0,0012
Dados laboratoriais, mediana ± SD, (IQR)					
Eritrócitos x 10 ⁹ /L	4,7 ± 0,5 (3,6-5,9)	4,5 ± 0,8 (1,1-5,8)	4,8 ± 0,5 (3,7-5,9)	4,3 ± 0,8 (1,1-5,7)	a 0,0014 b >0,9999

					c, d < 0,0001
Hemoglobina (g/dL)	14,4 ± 1,4 (10,5-17,4)	13,4 ± 2,4 (6,6-18,2)	14,5 ± 1,2 (12,0-18,2)	12,6 ± 2,5 (4,6-18,2)	a, c, d < 0,0001 b > 0,9999
Leucócitos x 10 ⁹ /L	7,3 ± 2,0 (4,1-13,4)	8,6 ± 4,9 (1,6-43,9)	7,4 ± 2,3 (3,2-13,6)	9,3 ± 5,6 (1,6-43,9)	a 0,0258 b > 0,9999 c 0,0007 d 0,0038
Neutrófilos x 10 ⁹ /L	4,1 ± 1,6 (1,9-9,9)	6,2 ± 4,6 (0,2-37,7)	4,3 ± 2,0 (1,6-11,0)	7,5 ± 4,8 (0,2-37,7)	a, c, d < 0,0001 b > 0,9999
Linfócitos x 10 ⁹ /L	2,3 ± 0,7 (1,0-4,7)	1,3 ± 1,0 (0,1-7,5)	1,3 ± 0,9 (1,2-4,3)	1,0 ± 0,6 (0,1-3,6)	a, b, c < 0,0001 d 0,0002
RNL	1,8 ± 1,3 (1,0-10,3)	5,5 ± 6,8 (0,5-47,5)	3,6 ± 5,9 (0,9-23,0)	6,9 ± 7,6 (0,5-47,5)	a, b, c < 0,0001 d 0,0148
Monócitos x 10 ⁹ /L	0,5 ± 0,2 (0,1-0,9)	0,5 ± 0,3 (0,0-1,6)	0,5 ± 0,2 (0,2-0,9)	0,5 ± 0,4 (0,0-1,6)	a, b, d > 0,9999 c 0,7817
Plaquetas x 10 ⁹ /L	216 ± 48,3 (129-370)	235 ± 98,7 (50-683)	227 ± 68,6 (119-474)	238 ± 109,0 (50-683)	a, b, c > 0,9999 c 0,7150
Glicemia (mg/dL)	88 ± 14,5 (63-149)	114 ± 71,1 (28-479)	90 ± 62,5 (65-479)	130 ± 70,5 (28-409)	a, c, d < 0,0001 b 0,3013
Suporte hospitalar, Nº (%)					
Enfermaria	-	94 (49,7)	-	94 (72,9)	a, c, d < 0,0001
Unidade de Tratamento Intensivo (UTI)	-	35 (18,5)	-	35 (27,1)	a, c, d < 0,0001
Dados de hospitalização, mediana ± SD, (IQR)					
Dias de hospitalização	-	9 ± 7,3 (1-36)	-	9 ± 7,3 (1-36)	-
Suporte Respiratório, Nº (%)					
Cânula nasal de oxigênio	-	60 (31,7)	-	60 (46,5)	a, c, d < 0,0001
Máscara de Oxigênio/ Não invasiva	-	33 (17,5)	-	33 (25,6)	a 0,0001 c, d < 0,0001
Ventilação mecânica invasiva	-	27 (14,3)	-	27 (20,9)	a 0,0007 c < 0,0001 d 0,0001
Saturação de oxigênio mediana ± SD (IQR)	99 ± 1,5 (92-99)	94,0 ± 8,0 (54-99)	98 ± 2,0 (90-99)	92 ± 8,4 (54-99)	a, c, d < 0,0001 b 0,4497
Medicamentos, Nº (%)					
Glicocorticóides	-	103 (54,5)	-	103 (79,4)	a, c, d < 0,0001
Azitromicina	-	86 (45,5)	-	86 (66,7)	a, c, d < 0,0001
Ceftriaxona	-	84 (44,4)	-	84 (65,1)	a, c, d < 0,0001
Oseltamivir	-	52 (27,5)	-	52 (40,3)	a, c, d < 0,0001
Colchicina	-	-	-	-	-
Cloroquina / Hidroxicloroquina	-	28 (14,8)	-	28 (21,7)	a 0,0005 c, d < 0,0001
Anticoagulante	-	9 (4,8)	1 (1,7)	8 (6,2)	a 0,0578 b 0,2682 c 0,0299 d 0,1730
Ivermectina	-	1 (0,5)	-	1 (0,8)	a 0,5335 c 0,4508 d 0,4941

Abreviações: SD: Desvio Padrão; Os dados estão apresentados como intervalo interquartil (IQR), n (%), ou n/N, a: Comparações entre os grupos Controle e todos os pacientes com covid-19; b: Controles e Domiciliares; c: Controles e pacientes hospitalizados; d: Pacientes domiciliares e hospitalizados. Os dados foram comparados usando o teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher para variáveis

categóricas e análise de variância (ANOVA), teste t não paramétrico de *Mann-Whitney* foi usado para variáveis contínuas, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6.2 Níveis plasmáticos da molécula sHLA-G

Quantificamos os níveis plasmáticos da molécula sHLA-G (ng/mL) no sangue periférico dos grupos controle ($n=73$), domiciliar ($n=60$) e hospitalar ($n=129$) com covid-19. Na comparação entre os grupos de controle saudáveis e com covid-19 (domiciliar e hospitalar) houve diferença significativa ($p < 0,0001$); já na comparação entre os grupos com covid-19 domiciliar e hospitalar não obteve diferença ($p > 0,9999$). Em relação ao gênero e idade também não houve diferenças entre os grupos domiciliar e hospitalar ($p > 0,9999$) (Figura 7).

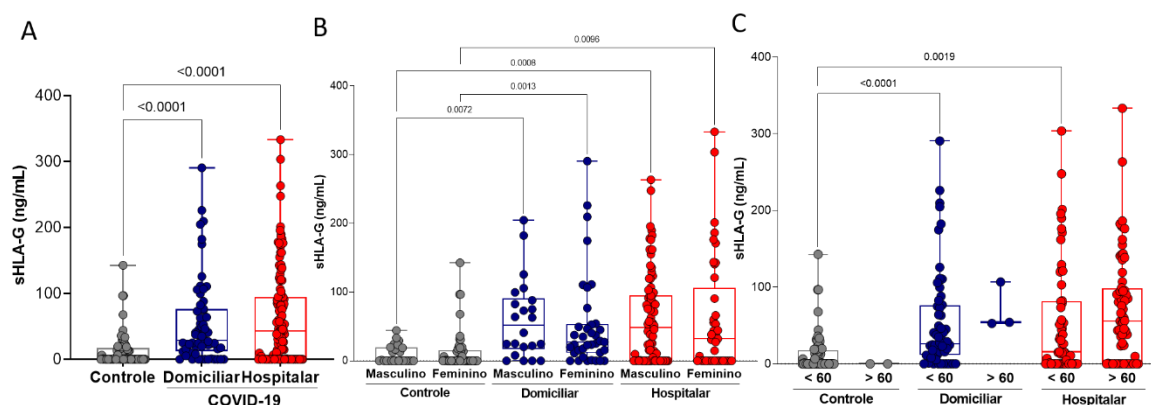


Figura 7 - Quantificação da molécula sHLA-G (ng/mL) no sangue. **(A)** No grupo controle ($n=73$), domiciliar ($n=60$) e hospitalar ($n=129$) com covid-19. **(B)** No grupo controle masculino ($n=26$), controle feminino ($n=47$) e grupos domiciliar masculino ($n=22$), domiciliar feminino ($n=38$), hospitalar masculino ($n=87$) e hospitalar feminino ($n=42$) com covid-19. **(C)** No grupo controle < 60 anos de idade ($n=71$), controle > 60 anos ($n=2$) e grupos domiciliar < 60 anos ($n=57$), domiciliar > 60 anos ($n=3$), hospitalar < 60 anos ($n=59$) e hospitalar > 60 anos ($n=70$) com covid-19. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de múltiplas comparações *Kruskal-Wallis* (não paramétrico), seguido pelo pós-teste de *Dunns* para comparar os pares. Os dados são expressos por mediana com intervalos de Confiança (IC) de 95% e valor mínimo e máximo. Diferença estatística entre os grupos para $p < 0,05$.

Analizamos os níveis de sHLA-G em relação às comorbidades apresentadas pelos participantes do estudo. A concentração de sHLA-G não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos domiciliares e hospitalizados, com e sem hipertensão; com e sem diabetes mellitus tipo 2; com e sem doença cardiovascular; sendo ou não tabagista e com o IMC <30 e >30 ($p > 0,9999$). Observamos diferenças somente quando comparados com o grupo controle (Figura 8).

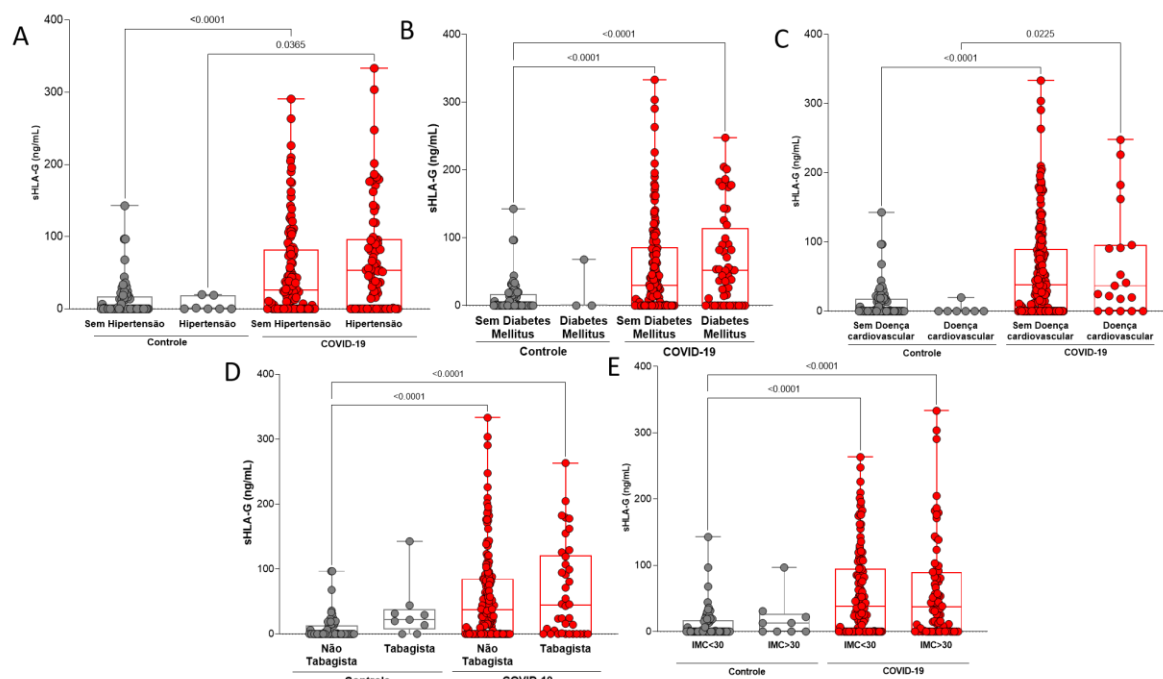


Figura 7 - Quantificação da molécula sHLA-G (ng/mL) no sangue. **(A)** Do grupo controle sem hipertensão (n=66), controle com hipertensão (n=7) e grupos de pacientes com covid-19 sem hipertensão (n=113) e com hipertensão (n=76). **(B)** Do grupo controle sem diabetes mellitus (n=70), controle com diabetes mellitus (n=3) e grupos de pacientes com covid-19 sem diabetes mellitus (n=136) e com diabetes mellitus (n=53). **(C)** Do grupo controle sem doença cardiovascular (n=66), controle com doença cardiovascular (n=7) e grupos de pacientes com covid-19 sem doença cardiovascular (n=170) e com doença cardiovascular (n=19). **(D)** Do grupo controle não tabagista (n=64), controle tabagista (n=9) e grupos de pacientes com covid-19 não tabagista (n=151) e tabagista (n=38). **(E)** Do grupo controle IMC <30 (n=63), com IMC >30 (n=10) e grupos de pacientes com covid-19 IMC <30 (n=117) e IMC >30 (n=72). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de múltiplas comparações *Kruskal-Wallis* (não paramétrico), seguido pelo pós-teste de *Dunns* para comparar os pares. Os dados são expressos por mediana com intervalos de confiança (IC) de 95% e valor mínimo e máximo. Diferença estatística entre os grupos para $p < 0,05$.

Após observarmos que os níveis da molécula sHLA-G (ng/mL) no sangue não foram significativamente diferentes entre os grupos com covid-19, domiciliares e hospitalares ($p < 0,9999$); refletimos sobre a possibilidade desta diferença estar associada às diferentes gravidades da doença. Para avaliar essa hipótese, estratificamos os pacientes com covid-19 em grupos leve (n=39), moderado (n=56), grave (n=32) e crítico (n=62).

Ao avaliarmos o perfil plasmático do sHLA-G, conforme a classificação clínica da covid-19 (Tabela 1), observamos que todos os níveis de gravidade dos pacientes com covid-19 apresentaram diferenças significativas em relação ao controle saudável (controle vs leve: $p = 0,0004$; controle vs moderado: $p = 0,0011$; controle vs grave: $p < 0,0001$ e controle vs crítico: $p < 0,0001$), sendo que as maiores concentrações de sHLA-G foram detectadas nos pacientes com as formas mais graves da covid-19. Observa-se que os níveis plasmáticos de sHLA-G em pacientes

críticos estão significativamente menores em comparação aos de pacientes graves ($p=0,02$) (Figura 9 A).

A partir do perfil plasmático de sHLA-G por gravidade, estratificamos os pacientes pelos desfechos clínicos de resolatividade da doença (com alta hospitalar) e óbito; e analisamos as concentrações de sHLA-G nesses dois grupos. Desta forma, observamos maior concentração de sHLA-G no grupo de pacientes que morreram em relação ao controle saudável ($p<0,0001$), assim como comparado àqueles que tiveram a resolução da doença e receberam alta hospitalar ($p=0,0166$) (Figura 9 B). No entanto, quando analisamos de forma longitudinal, não houve diferenças nos níveis de sHLA-G quando o paciente foi admitido no hospital e quando obteve alta hospitalar ($p=0,9264$) ou morreu ($p=0,1950$) (Figura 9 C).

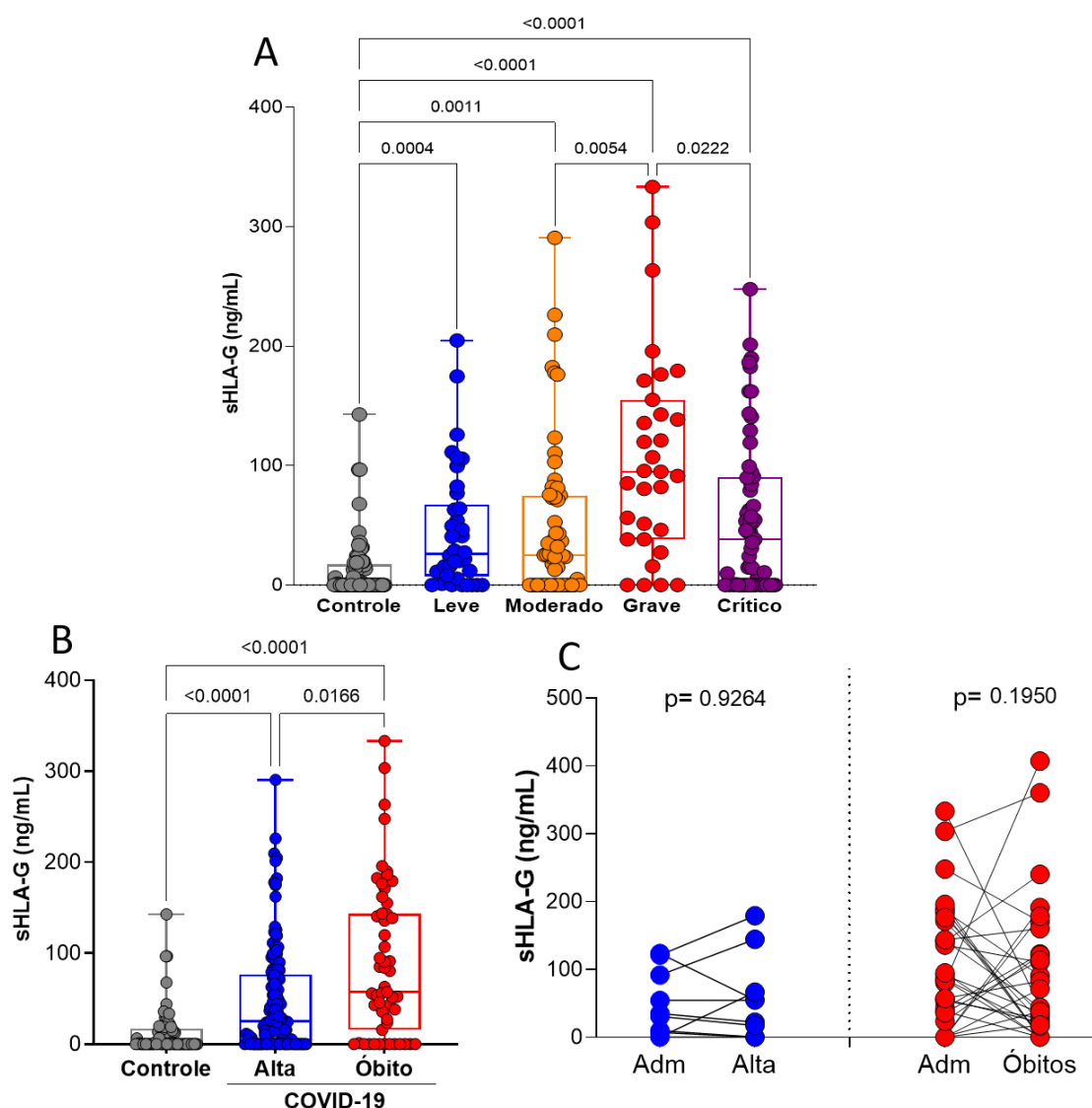


Figura 8 - (A) Perfil plasmático do sHLA-G (ng/mL) no grupo controle ($n=73$), pacientes leves ($n=39$), moderados ($n=56$), graves ($n=32$) e críticos ($n=62$) com covid-19. **(B)** Quantificação da molécula sHLA-G (ng/mL) no sangue do grupo controle ($n=73$), pacientes que receberam alta ($n=132$) e

pacientes que morreram (n=57) pela COVID-19. **(C)** Análise longitudinal da concentração plasmática de sHLA-G (ng/mL) no momento da admissão hospitalar (n=10) vs alta (n=10); e admissão (n=31) vs óbito (n=31) pela covid-19. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de múltiplas comparações *Kruskal-Wallis* (não paramétrico), seguido pelo pós-teste de *Dunns* para comparar os pares. Os dados são expressos por mediana com intervalos de confiança 95% e valor mínimo e máximo. Diferença estatística entre os grupos para $p < 0,05$. A análise estatística longitudinal foi realizada pelo teste de *Mann-Whitney*.

Após verificar o perfil do sHLA-G em relação à gravidade da doença, analisamos os níveis de sHLA-G e os tratamentos farmacológicos adotados para os pacientes hospitalizados com covid-19. Os medicamentos glicocorticóides ($p > 0,999$), azitromicina ($p = 0,990$), oseltamivir ($p = 0,0637$) e cloroquina/hidroxicloroquina ($p = 0,7783$) parecem não interferir nos níveis plasmáticos de sHLA-G, visto que não houveram diferenças entre os grupos de pacientes tratados e não tratados com esses fármacos. Entretanto, os pacientes tratados com ceftriaxona apresentaram maiores níveis plasmáticos de sHLA-G em relação aos que não utilizaram essa medicação ($p = 0,0129$) (Figura 10).

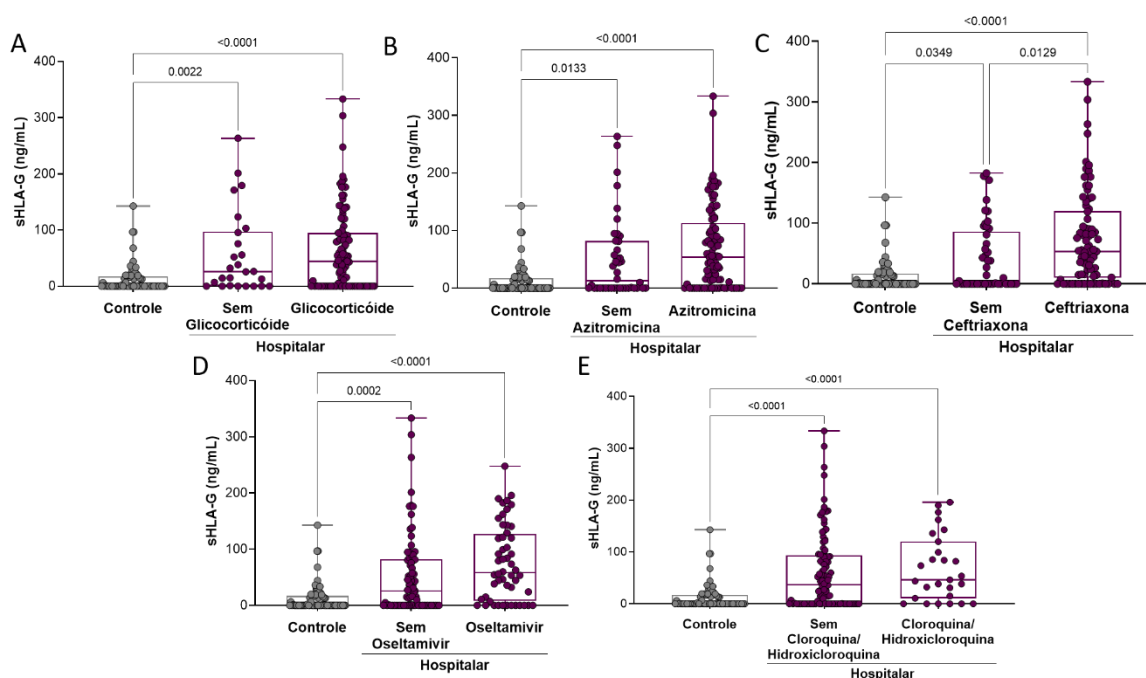


Figura 9 - Quantificação da molécula sHLA-G (ng/mL) no sangue no grupo controle (n=73) e pacientes hospitalizados com covid-19. **(A)** Que não utilizaram Glicocorticoide (n=26) e que utilizaram Glicocorticoide (n=103). **(B)** Que não utilizaram Azitromicina (n=43) e que utilizaram Azitromicina (n=86). **(C)** Que não utilizaram Ceftriaxona (n=45) e que utilizaram Ceftriaxona (n=84). **(D)** Que não utilizaram Oseltamivir (n=77) e que utilizaram Oseltamivir (n=52). **(E)** Que não utilizaram Cloroquina/Hidroxicloroquina (n=101) e que utilizaram Cloroquina/Hidroxicloroquina (n=28). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de múltiplas comparações *Kruskal-Wallis* (não paramétrico), seguido pelo pós-teste de *Dunns* para comparar os pares. Os dados são expressos por mediana com intervalos de Confiança (IC) de 95% e valor mínimo e máximo. Diferença estatística entre os grupos para $p < 0,05$.

Em seguida, analisamos a correlação entre os níveis plasmáticos da molécula sHLA-G com as variáveis idade, índice de massa corporal (IMC), dias de infecção, dias de hospitalização, concentração de O₂ infundido, Razão Normalizada Internacional (INR), total de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, Razão Neutrófilo-Linfócito (RNL), glicemia, proteína C reativa (PrCR), e as citocinas IL-12, TNF-alfa, IL-10, IL-6, IL-1 β , e IL-8. Para a interpretação da magnitude das correlações foi adotada a classificação dos coeficientes de correlação, sendo: <0,4 (correlação fraca), >0,4 a <0,5 (moderada) e > 0,5 (forte) (HULLEY et al, 2003).

Os níveis plasmáticos da molécula sHLA-G apresentaram correlações positivas com idade ($r=0,3$; $p<0,0001$); IMC ($r=0,1$; $p=0,0389$); dias de hospitalização ($r=0,3$; $p<0,0001$); pontuação clínica ($r=0,4$; $p<0,0001$); concentração de O₂ infundido ($r=0,3$; $p<0,0001$); total de leucócitos ($r=0,1$; $p=0,0174$); neutrófilos ($r=0,2$; $p=0,0033$); RNL ($r=0,2$; $p=0,0035$); glicemia ($r=0,3$; $p<0,0001$); IL10 ($r=0,3$; $p<0,0001$); IL6 ($r=0,3$; $p<0,0001$) e IL8 ($r=0,4$; $p<0,0001$) e negativa com linfócitos ($r=-0,2$; $p=0,0033$).

Com relação à pontuação clínica de gravidade dos pacientes, os resultados mostram correlações positivas com idade ($r=0,6$; $p<0,0001$); IMC ($r=0,3$; $p<0,0001$); dias de infecção ($r=0,4$; $p<0,0001$); dias de hospitalização ($r=0,8$; $p<0,0001$); concentração de O₂ infundido ($r=0,9$; $p<0,0001$); total de leucócitos ($r=0,3$; $p<0,0001$); neutrófilos ($r=0,7$; $p<0,0001$); RNL ($r=0,7$; $p<0,0001$); glicemia ($r=0,6$; $p<0,0001$); PrCR ($r=0,3$; $p=0,0012$); TNF-alfa ($r=0,1$; $p=0,0367$); IL-10 ($r=0,7$; $p<0,0001$); IL-6 ($r=0,8$; $p<0,0001$); IL-1 β ($r=0,1$; $p=0,0322$); IL-8 ($r=0,8$; $p<0,0001$), e o sHLA-G ($r=0,4$; $p<0,0001$), e negativa com linfócitos ($r=-0,7$; $p<0,0001$) (Figura 11).

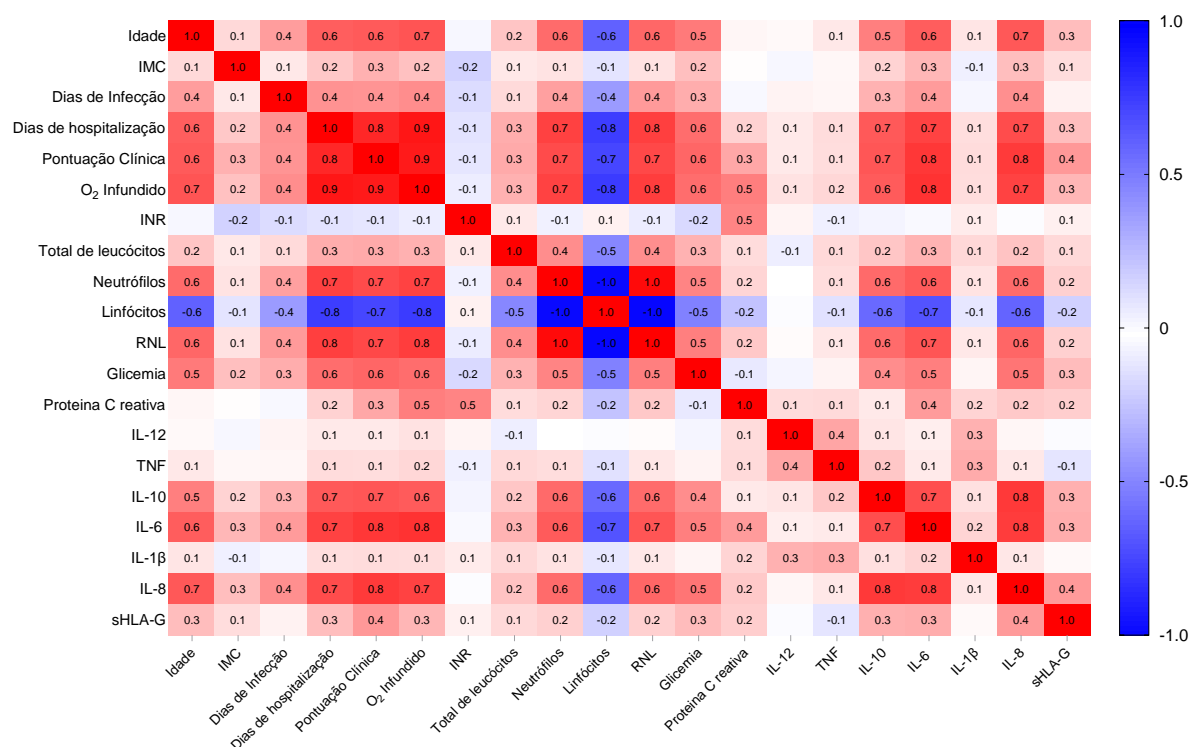


Figura 10 - Matriz de correlação entre a molécula de sHLA-G e os parâmetros clínicos e imunológicos da covid-19. Foi realizado o teste de correlação de Spearman (r), a barra lateral apresenta a escala de cores, o vermelho representa correlações positivas e o azul correlações negativas. A intensidade das cores representa uma maior correlação. Correlações significativas entre o sHLA-G e a pontuação clínica, com $p < 0,05$, estão apresentadas com um asterisco (*).

Na análise multivariada de regressão logística binomial, observamos que o sHLA-G parece não estar associado com a gravidade [OR: 1,0 (% IC 0,99 – 1,00) $p=0,001$] e também não estar associado com a mortalidade [OR: 1,0 (% IC 1,0 – 1,0) $p=0,012$] pela covid-19 na presença das variáveis confundidoras como idade, sexo, comorbidade, glicemia e RNL (Figura 12).

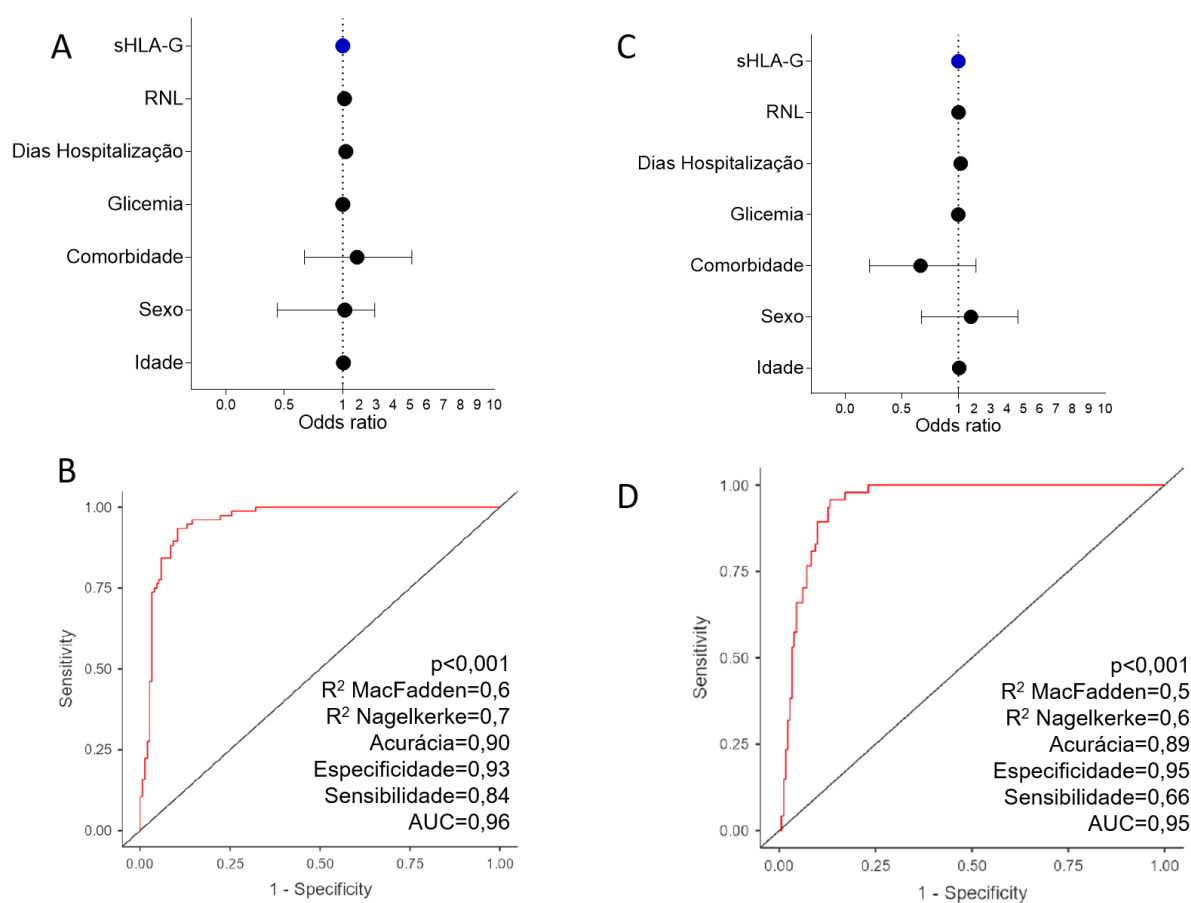


Figura 11 - Análise multivariada de regressão logística binomial tendo como desfecho a gravidade (A) e a mortalidade (C) pela covid-19 (controle n=73, leve n=39, moderado n=56, grave n=32 e crítico n=62). Curvas características de operação do receptor (ROC) das concentrações de sHLA-G para prever a gravidade e a mortalidade entre pacientes com covid-19. A área sob a curva (AUC) e os valores de p para diferenças significativas entre pacientes com covid-19 e o desfecho gravidade e mortalidade. (B, D). RNL: Razão Neutrófilo Linfócito. OD: Odds ratio. IC: Intervalo de confiança.

7. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo referente aos níveis de HLA-G solúveis (sHLA-G) no plasma de indivíduos brasileiros com covid-19. Inicialmente, comparamos os níveis de HLA-G do grupo controle saudável com o grupo de pacientes com covid-19 e mostramos diferenças significantes ($p < 0,0001$). Ao estratificarmos o grupo de pacientes com covid-19, de acordo com a gravidade clínica da doença, observamos que todos os níveis de gravidade dos pacientes com covid-19 apresentaram diferenças significantes em relação ao controle saudável (controle vs leve: $p = 0,0004$; controle vs moderado: $p = 0,0011$; controle vs grave: $p < 0,0001$ e controle vs crítico: $p < 0,0001$), sendo que as concentrações de sHLA-G foram detectadas com aumento gradativo nos pacientes conforme aumento da gravidade clínica da doença. No entanto, contraditoriamente, pacientes com covid-19 crítica apresentaram redução dos níveis de sHLA-G em comparação aos pacientes com covid-19 grave ($p = 0,02$).

Nossos dados corroboram com estudos anteriores (BORTOLOTTI et al., 2021; RAMZANNEZHAD et al., 2022) e sugerem que a infecção pelo SARS-CoV-2, e a maior gravidade clínica da doença, influenciam para maior expressão da imunoinibição por sHLA-G. No entanto, não foram encontradas diferenças estatísticas na quantidade de sHLA-G na comparação dos grupos, em termos de gênero, comorbidades e tratamento farmacológico, também em consonância com outros estudos (BORTOLOTTI et al., 2021; RAMZANNEZHAD et al.; 2022; RASHIDI et al., 2022).

A partir do perfil plasmático de sHLA-G por gravidade, estratificamos os pacientes pelos desfechos clínicos de resolatividade da doença (com alta hospitalar) e óbito; e observamos maior concentração de sHLA-G no grupo de pacientes que morreram em relação ao controle saudável ($p < 0,0001$), assim como comparado àqueles que tiveram a resolução da doença e receberam alta hospitalar ($p = 0,0166$).

O HLA-G é conhecido por ter efeitos supressores no sistema imunológico. Os resultados revelados neste estudo, com aumento dos níveis de sHLA-G na vigência da infecção pelo SARS-CoV-2, e nas maiores gravidades clínicas e morte, sugerem que a presença aumentada de sHLA-G pode estar relacionada ao pior prognóstico da doença.

Outro dado a ser considerado em nossos resultados foi a idade dos pacientes com covid-19. Destaca-se que a mediana de idade dos pacientes em cuidados domiciliares foi de 38 anos e a dos pacientes hospitalizados foi de 62 anos, indicando que a idade mais avançada é um fator de risco para a gravidade da doença, dado que corrobora aos da literatura (AL-BAYATEE; AD, 2021; MUELLER; MCNAMARA; SINCLAIR, 2020; TIAN et al., 2020; BORTOLOTTI et al., 2021). Para testar a hipótese de que os níveis de sHLA-G podem ser afetados pela idade, os grupos de pacientes domiciliares, pacientes hospitalizados e controles foram agrupados em indivíduos com 60 anos ou mais, e a quantidade de sHLA-G foi verificada nesses grupos. Observou-se que pacientes com 60 anos ou mais não apresentaram um aumento significativo nos níveis de sHLA-G em comparação com os grupos controles saudáveis. Nossos resultados sugerem que a idade não teve efeito nos níveis de sHLA-G, estudo anterior apresentou dados diferentes (AL-BAYATEE; AD, 2020). Em relação ao gênero, 67,4% das pessoas pertencentes ao grupo de pacientes hospitalizados eram do sexo masculino, isso pode ser explicado pela maior vulnerabilidade masculina à covid-19, pois os níveis circulantes de ECA2 (receptor para infecção do SARS-CoV-2) em homens são maiores que em mulheres (PATEL; VELKOSKA; BURRELL, 2013; JIN et al., 2020). No entanto, os níveis de sHLA-G não foram afetados pelo gênero.

Além da imunossenescência e senescência celular, que estão associadas ao envelhecimento e podem causar respostas imunológicas ineficientes na covid-19 (ZHOU; BORSA; SIMON, 2021), é importante ressaltar que comorbidades como hipertensão, diabetes mellitus tipo 2, e doenças cardiovasculares, se associam com o avanço da idade e elevam a suscetibilidade à covid-19 (SANYAOLU et al., 2020). No presente estudo, observamos que os pacientes com covid-19 hospitalizados tinham mais comorbidades comparados aos pacientes com covid-19 domiciliares, como no caso da hipertensão arterial, 54,3% dos pacientes hospitalizados tinham hipertensão, sendo que os pacientes em cuidados domiciliares somente 10% tinham a comorbidade. No entanto, os níveis de sHLA-G em pacientes que tinham comorbidades não mostraram diferenças estatisticamente significantes quando comparados aos de pacientes que não tinham comorbidades, nem aos do grupo controle.

O espectro das manifestações clínicas da covid-19 pode ser: assintomático, leve, moderado, grave e crítico, podendo levar a morte (MACHHI et al., 2020; LIN;

YAN, 2021). Nossos resultados mostraram que os níveis de sHLA-G em pacientes com covid-19, quando comparados aos controles saudáveis, apresentaram aumento gradual, estatisticamente significativo, iniciando naqueles com formas leve ($p=0,0004$), moderada ($p=0,0011$), grave ($p=0,0001$) e crítico ($p=0,0001$). E paradoxalmente, apresentou uma redução estatisticamente significativa dos seus níveis em pacientes críticos quando comparados aos pacientes graves ($p=0,02$). Especula-se que este evento pode ocorrer dado a exaustão do sistema imunológico nos pacientes críticos com covid-19.

Estudos têm mostrado que durante as infecções virais ocorre a exaustão das células T, mediante disfunção progressiva destas células decorrente da superexpressão de receptores inibidores de controle imunológico (FENWICK et al., 2019). As células T esgotadas apresentam disfunção e não podem mais responder aos vírus ou eliminá-los. Portanto, além da linfopenia, a disfunção linfocitária também parece ser efetiva na patogênese da covid-19 (MODABBER et al., 2021).

Existem várias vias reguladoras negativas da resposta imune, que envolvem a exaustão das células T. Durante algumas doenças infecciosas virais, as células T CD4+ esgotadas revelam capacidade proliferativa diminuída e falta de resposta multifuncional de citocinas, particularmente produção diminuída de IL-2, o que resulta na progressão da doença viral (MODABBER et al., 2021). Assim, pacientes com covid-19 críticos apresentam várias desregulações nas respostas do sistema imunológico, como linfopenia, tempestade de citocinas e aumento da frequência de linfócitos CD4+ e CD8+ esgotados (ZHENG et al., 2020; MODABBER et al., 2021). Essas características, consequentemente, podem aumentar a taxa de mortalidade nestes pacientes (MODABBER et al., 2021).

Outro estudo mostrou que o número total de células T citotóxicas, NK e CD8+, diminuiu acentuadamente em pacientes com infecção por SARS-CoV-2; e que a função destas células foi esgotada, com o aumento da expressão de NKG2A (receptor inibitório para HLA-G) em pacientes com covid-19 crítico. Por outro lado, em pacientes convalescentes, após a terapia, o número de células T NK e CD8+ foi restaurado e a expressão de NKG2A foi reduzida (ZHENG et al., 2020).

Interessante salientar que o estudo conduzido por Zheng et al. (2020), mostra que na admissão hospitalar, a contagem de neutrófilos foi notavelmente maior nos pacientes com covid-19 grave do que nos casos de covid-19 moderada, enquanto a contagem de linfócitos foi significativamente menor nos casos de covid-19 grave do

que nos casos de covid-19 moderada. Ademais, Ramzannezhad et al. (2022) avaliaram a frequência de linfócitos T CD4+ e monócitos, e mostraram que pacientes com covid-19 crítico tinham uma frequência significativamente menor de linfócitos T CD4+ HLA-G+ e monócitos CD14+ HLA-G+ em comparação aos pacientes com covid-19 moderada e controles saudáveis. Por outro lado, a frequência destas células foi significativamente maior em pacientes com covid-19 moderada em comparação com controles saudáveis. Esses resultados indicam que pacientes com covid-19 moderada têm mais propriedades imunológicas do que pacientes com covid-19 críticos, e esse recurso pode ajudar pacientes com covid-19 moderada a modular as condições inflamatórias (RAMZANNEZHAD et al., 2022). Estes dados podem ser contrastados aos nossos resultados que mostraram que os níveis de sHLA-G em pacientes com covid-19 hospitalizados apresentaram aumento gradual naqueles com formas leve a grave, e uma redução em pacientes críticos.

Especificamente para o sHLA-G, nossos resultados também sugerem a exaustão da resposta imune contra o SARS-CoV-2, na qual os níveis de sHLA-G estão maiores no início da infecção, e vai gradualmente crescendo conforme a gravidade clínica da doença progride, entretanto, quando os parâmetros clínicos avançam para a covid-19 crítica, os níveis de HLA-G caem, sugerindo a exaustão, após a superexpressão deste inibidor de controle imunológico.

A dinâmica da expressão de sHLA-G em diferentes gravidades clínicas da covid-19 pode indicar que o status da infecção por SARS-CoV-2 pode estar envolvido na regulação da expressão de sHLA-G. Nossos resultados revelam que os níveis de sHLA-G, importante molécula de controle imuno-inibitório, aumentam gradativamente na infecção por SARS-CoV-2, durante a progressão da doença, desde covid-19 leve até covid-19 moderada e grave, e reduz na covid-19 crítica. Tais dados reforçam as evidências de que pacientes com covid-19 moderada têm mais propriedades imunomoduladoras do que pacientes com covid-19 crítico, e desta maneira, os pacientes com covid-19 moderada, que apresentam níveis aumentados de sHLA-G, ainda podem modular as condições inflamatórias (RAMZANNEZHAD et al., 2022), e conforme dados revelados por Bortolotti et al. (2022), que mostraram que níveis aumentados de sHLA-G estavam associados com a melhora do status de covid-19. Ainda, os níveis reduzidos de sHLA-G, em pacientes com covid-19 crítica, mostrados neste estudo, corroboram dados apresentados por Zheng et al., (2020) que sugerem exaustão da resposta imune contra SARS-CoV-2 devido redução de

linfócitos citotóxicos hiperexpressando o receptor inibitório para HLA-G (NKG2A) nestes pacientes.

Portanto, em pacientes com covid-19 grave, a expressão de NKG2A induzida por SARS-CoV-2 pode estar correlacionada com a exaustão funcional de linfócitos citotóxicos desde o estágio inicial, o que pode resultar na progressão da doença, e na redução do sHLA-G na fase crítica da doença. Além disso, os receptores de “checkpoint” inibitórios imunes que resultam na exaustão das células NK e T foram demonstrados em infecções crônicas (RAMZANNEZHAD et al., 2022). Por outro lado, é importante ressaltar que os inibidores de “checkpoint”, como HLA-G, ajudam a revigorar respostas esgotadas de células T ou NK no contexto de infecção crônica (BARBER et al., 2006). Em conjunto, esses dados destacam a importância de melhorar a resposta imune no estágio inicial da infecção por SARS-CoV-2.

Esses dados destacam a importância da molécula HLA-G no contexto de infecções virais, como SARS-CoV-2, revelando as perspectivas promissoras para futuras pesquisas sobre essa molécula e sua potencial capacidade de interações para planejamento de terapias para gerenciar a infecção, progressão e prognóstico da covid-19.

No entanto, nosso estudo tem limitações notáveis. Primeiro, este estudo é baseado na análise dos níveis plasmáticos de sHLA-G em pacientes com covid-19, entretanto, as expressões de outros biomarcadores imunológicos no contexto da covid-19, e suas relações, ainda é desconhecido. Em segundo lugar, os resultados foram obtidos pela coleta de amostras no momento da inclusão no estudo, dados longitudinais durante a hospitalização não foram avaliados; assim, a variação da expressão de HLA-G pode estar subestimada. Terceiro, os mecanismos subjacentes envolvidos na dinâmica do HLA-G, como seus receptores e os níveis de citocinas ainda precisam ser explorados. Portanto, coortes mais detalhadas e maiores da doença precisam ser investigadas. Assim, são necessários mais estudos para melhor avaliar o papel das moléculas sHLA-G no contexto da covid-19.

8. CONCLUSÃO

- Este é o primeiro estudo acerca da análise dos níveis plasmáticos de sHLA-G em pacientes com covid-19 brasileiros;
- Ao realizar a análise dos dados sociodemográficos e clínicos dos pacientes com covid-19, observamos que o perfil de pacientes acometidos pela doença e sua gravidade assemelha-se ao encontrado na literatura, consolidando o conhecimento sobre a covid-19;
- Em relação às variáveis clínicas e laboratoriais houve diferença entre o grupo controle saudável e os pacientes com covid-19. Todos os níveis de gravidade dos pacientes com covid-19 apresentaram diferenças significantes em relação ao controle saudável (controle vs leve: $p=0,0004$; controle vs moderado: $p=0,0011$; controle vs grave: $p<0,0001$ e controle vs crítico: $p<0,0001$), sendo que as concentrações de sHLA-G foram gradativamente aumentando nos pacientes com covid-19 leve a grave. Contraditariamente, os níveis de sHLA-G estavam significativamente menores entre pacientes com covid-19 crítico quando comparados aos com covid-19 grave ($p=0,02$);
- Não foi verificada associação estatisticamente significativa entre os níveis plasmáticos de sHLA-G com as características demográficas, comorbidades, e tratamento farmacológico dos pacientes com covid-19;
- Para os desfechos clínicos da doença (com alta hospitalar) e óbito, observamos maior concentração de sHLA-G no grupo de pacientes que morreram em relação ao controle saudável ($p<0,0001$), assim como comparado àqueles que tiveram a resolução da doença e receberam alta hospitalar ($p=0,0166$).

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. **Imunologia celular e molecular 9a edição**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2018.
- AD'HIAH, A. H.; AL-BAYATEE, N. T. HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism and risk of coronavirus disease 2019 (COVID-19) among Iraqi patients. **Human Immunology**, v. 83, n. 6, p. 521-527, 2022.
- AL-BAYATEE, N. T.; AD'HIAH, A. H. Soluble HLA-G is upregulated in serum of patients with severe COVID-19. **Human Immunology**, v. 82, n. 10, p. 726-732, 2021.
- ALAGAILI, A. N. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection in dromedary camels in Saudi Arabia. **MBio**, v. 5, n. 2, p. e00884-14, 2014.
- ALBAYATI, Z. et al. The Influence of Cytomegalovirus on Expression of HLA-G and its Ligand KIR 2 DL 4 by Human Peripheral Blood Leucocyte Subsets. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 86, n. 5, p. 396–407, 2017.
- AMIOT, L. et al. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? **Cellular and molecular life sciences**, v. 68, n. 3, p. 417–431, 2011.
- AMIOT, L. et al. Expression of HLA-G by mast cells is associated with hepatitis C virus-induced liver fibrosis. **Journal of hepatology**, v. 60, n. 2, p. 245–252, 2014.
- AMIOT, L.; VU, N.; SAMSON, M. Immunomodulatory properties of HLA-G in infectious diseases. **Journal of immunology research**, v. 2014, 2014.
- AMIOT, L.; VU, N.; SAMSON, M. Biology of the immunomodulatory molecule HLA-G in human liver diseases. **Journal of hepatology**, v. 62, n. 6, p. 1430–1437, 2015.
- ARNS, T. et al. Structural Modeling and Molecular Dynamics of the Immune Checkpoint Molecule HLA-G. **Frontiers in immunology**, p. 2882, 2020.
- ARUNACHALAM, P. S. et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. **Science**, v. 369, n. 6508, p. 1210–1220, 2020.
- BAKHSHANDEH, B. et al. Mutations in SARS-CoV-2; Consequences in structure, function, and pathogenicity of the virus. **Microbial Pathogenesis**, v. 154, p. 104831, 2021.
- BARBER, D. L. et al. Restoring Function in Exhausted CD8 T Cells during Chronic Viral Infection. **Nature**, v. 439, n. 7077, p. 682–687, fev. 2006.
- BARICORDI, O. R. et al. HLA-G and inflammatory diseases. **Inflammation & Allergy-Drug Targets**, v. 7, n. 2, p. 67–74, 2008.
- BARTOLI, A. et al. COVID-19 Treatment Options: A Difficult Journey between Failed Attempts and Experimental Drugs. **Internal and emergency medicine**, v. 16, n. 2,

p. 281–308, mar. 2021.

BASTARD, P. et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. **Science**, v. 370, n. 6515, p. eabd4585, 2020.

BEE, G. R. et al. Vacinas contra COVID-19 disponíveis no Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 6246–6263, 2022.

BHALLA, A. et al. Comparison of the expression of human leukocyte antigen (HLA)-G and HLA-E in women with normal pregnancy and those with recurrent miscarriage. **Reproduction**, v. 131, n. 3, p. 583-589, 2006.

BHATRAJU, P. K. et al. Covid-19 in critically ill patients in the Seattle region—case series. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 21, p. 2012–2022, 2020.

BLANCO-MELO, D. et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. **Cell**, v. 181, n. 5, p. 1036–1045, 2020.

BORTOLOTTI, Daria et al. Increased sHLA-G Is Associated with Improved COVID-19 Outcome and Reduced Neutrophil Adhesion. **Viruses**, v. 13, n. 9, p. 1855, 2021.

BOS, R. et al. Ad26 vector-based COVID-19 vaccine encoding a prefusion-stabilized SARS-CoV-2 Spike immunogen induces potent humoral and cellular immune responses. **npj Vaccines**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2020.

BRAKE, S. J. et al. Smoking upregulates angiotensin-converting enzyme-2 receptor: a potential adhesion site for novel coronavirus SARS-CoV-2 (Covid-19). **Journal of clinical medicine**, v. 9, n. 3, p. 841, 2020.

BRASIL. Portaria MS/GM nº 188, de 3 de fevereiro de 2020. Declara Emergência em Saúde Pública de importância Nacional (ESPIN) em decorrência da Infecção Humana pelo novo Coronavírus (2019-nCoV). 2020, p. **Diário Oficial da União**, Brasília (DF). Ministério.

BRASIL. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Resolução do Conselho Nacional de Saúde. **Diário Oficial da União**, 2012. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>. Acesso em: 17 mai. 2018.

BUNDERS, M. J.; ALTFELD, M. Implications of sex differences in immunity for SARS-CoV-2 pathogenesis and design of therapeutic interventions. **Immunity**, v. 53, n. 3, p. 487–495, 2020.

BUTANTAN, I. **Entenda como funciona a tecnologia de vírus inativado usada na CoronaVac**. 2022. Disponível em: <<https://butantan.gov.br/covid/butantan-tira-duvida/tira-duvida-noticias/entenda-como-funciona-a-tecnologia-de-virus-inativado-usada-na-coronavac>>. Acesso em: 3 abr. 2022.

CAI, Q. et al. Obesity and COVID-19 severity in a designated hospital in Shenzhen, China. **Diabetes care**, v. 43, n. 7, p. 1392–1398, 2020.

CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. **Immunology today**, v. 20, n. 2, p. 60-62, 1999.

CAROSELLA, E. D. et al. Chapter Two - HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. In: ALT, F. W. (Ed.). **Advances in Immunology**. [s.l.] Academic Press, v. 127, p. 33–144, 2015.

CASTELLANETA, A. et al. HLA-G level on monocytoïd dendritic cells correlates with regulatory T cell Foxp3 expression in liver transplant tolerance. **Transplantation**, v. 91, n. 10, p. 1132, 2011.

CATAMO, E. et al. Non-classical MHC-I human leukocyte antigen (HLA-G) in hepatotropic viral infections and in hepatocellular carcinoma. **Human Immunology**, v. 75, n. 12, p. 1225–1231, 2014.

CELSI, F. et al. HLA-G/C, miRNAs, and their role in HIV infection and replication. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

CHAN, J. F.-W. et al. Genomic Characterization of the 2019 Novel Human-Pathogenic Coronavirus Isolated from a Patient with Atypical Pneumonia after Visiting Wuhan. **Emerging microbes & infections**, v. 9, n. 1, p. 221–236, 2020.

CHAUHAN, N. et al. COVID-19: Fighting the invisible enemy with microRNAs. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 19, n. 2, p. 137–145, 2021.

CHEN, G. et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 5, p. 2620–2629, 2020.

CIRULLI, V. et al. The Class I HLA Repertoire of Pancreatic Islets Comprises the Nonclassical Class Ib Antigen HLA-G. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1214–1222, maio 2006.

CONTINI, P. et al. Soluble HLA-A,-B,-C and-G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. **European journal of immunology**, v. 33, n. 1, p. 125–134, 2003.

CONTINI, P. et al. HLA-G expressing immune cells in immune mediated diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1613, 2020.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, 2019.

DA SILVA, E. Z. M.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Mast cell function: a new vision of an old cell. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 62, n. 10, p. 698–738, 2014.

DAN, J. M. et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. **Science**, v. 371, n. 6529, p. eabf4063, 2021.

DE ALMEIDA, B. S. et al. Genetic association between HLA-G 14-bp polymorphism and diseases: A systematic review and meta-analysis. **Human immunology**, v. 79, n. 10, p. 724–735, 2018.

DE LAS HERAS, N. et al. Implications of oxidative stress and potential role of mitochondrial dysfunction in COVID-19: therapeutic effects of vitamin D. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 897, 2020.

DE OLIVEIRA, M. L. G. et al. Extended HLA-G genetic diversity and ancestry composition in a Brazilian admixed population sample: Implications for HLA-G transcriptional control and for case-control association studies. **Human Immunology**, v. 79, n. 11, p. 790–799, 2018.

DE OLIVEIRA, R. de C. S. et al. Desenvolvimento de vacinas contra a COVID-19: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 1, p. 3473–3492, 2022.

DE SÁ VILELA FILHO, A. et al. Vacinas para Covid-19: Uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 1880–1901, 2022.

DIAS, F. C. et al. The role of HLA-G molecule and HLA-G gene polymorphisms in tumors, viral hepatitis, and parasitic diseases. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 9, 2015.

DIAS, F. C. et al. The genetic diversity within the 1.4 kb HLA-G 5' upstream regulatory region moderately impacts on cellular microenvironment responses. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

DONADI, E. A. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 33, n. 1, p. 7–18, 2000.

DONADI, E. A. et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and molecular life sciences**, v. 68, n. 3, p. 369–395, 2011.

DONG, X. et al. Eleven faces of coronavirus disease 2019. **Allergy**, v. 75, n. 7, p. 1699–1709, 2020.

DROSTEN, C. et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. **New England journal of medicine**, v. 348, n. 20, p. 1967–1976, 2003.

ESKANDARI, E. et al. HLA-G Gene 14-Bp Deletion Variant Protects Iranian Subjects against Chronic Hepatitis B Infection. **International journal of immunogenetics**, v. 44, n. 6, p. 322–327, 2017.

FALAVIGNA, M. et al. Guidelines for the Pharmacological Treatment of COVID-19. The Task-Force/Consensus Guideline of the Brazilian Association of Intensive Care

Medicine, the Brazilian Society of Infectious Diseases and the Brazilian Society of Pulmonology and Tisiology. **Revista Brasileira de terapia intensiva**, v. 32, n. 2, p. 166–196, jun. 2020.

FAVIER, B.; LEMAOULT, J.; CAROSELLA, E. D. Functions of HLA-G in the immune system. **Tissue Antigens**, v. 69, p. 150–152, 2007.

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. **Coronaviruses**, p. 1–23, 2015.

FERNANDES, A. P. M. et al. Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 5, p. 601-611, 2003.

FENWICK, C. et al. T-Cell Exhaustion in HIV Infection. **Immunological reviews**, v. 292, n. 1, p. 149–163, nov. 2019.

FIOLET, T. et al. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: A narrative review. **Clinical Microbiology and Infection**, 2021.

FRENET, E. M.; SCARADAVOU, A. **Human Leukocyte Antigens**. Third Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., p. 191–197, 2019.

GAN, H. H. et al. Structural modeling of the SARS-CoV-2 spike/human ACE2 complex interface can identify high-affinity variants associated with increased transmissibility. **Journal of Molecular Biology**, v. 433, n. 15, p. 167051, 2021.

GERAGHTY, D. E.; KOLLER, B. H.; ORR, H. T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 84, n. 24, p. 9145–9149, 1987.

GOBIN, S. J. P.; VAN DEN ELSEN, P. J. Transcriptional regulation of the MHC class II genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G. **Human immunology**, v. 61, n. 11, p. 1102–1107, 2000.

GONZÁLEZ, Á. et al. The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 49, n. 3, p. 63-84, 2012.

GORER, P. A. The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 44, n. 3, p. 691–697, 1937.

GRALINSKI, L. E.; MENACHERY, V. D. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. **Viruses**, v. 12, n. 2, p. 135, 2020.

GRASSELLI, G. et al. Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. **JAMA**, v. 323, n. 16, p. 1574–1581, 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, 2020.

GUSEV, E. et al. Problems of pathogenesis and pathogenetic therapy of COVID-19 from the perspective of the general theory of pathological systems (General pathological processes). **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 14, p. 7582, 2021.

GUSEV, E. et al. SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1716, 2022.

HADJADJ, J. et al. Impaired Type I Interferon Activity and Inflammatory Responses in Severe COVID-19 Patients. **Science (New York, N.Y.)**, v. 369, n. 6504, p. 718–724, 2020.

HARVEY, W. T. et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 7, p. 409–424, 2021.

HOFFMANN, M. et al. Nafamostat mesylate blocks activation of SARS-CoV-2: new treatment option for COVID-19. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. e00754-20, 2020.

HUI, D. S. et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health—The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. **International journal of infectious diseases**, v. 91, p. 264–266, 2020.

HULLEY, S. B. et al. **Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica**. Porto Alegre: Editora Artmed. 2003.

HUNT, Joan S. et al. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 7, p. 681-693, 2005.

ITHETE, N. L. et al. Close relative of human Middle East respiratory syndrome coronavirus in bat, South Africa. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 10, p. 1697, 2013.

IVANOVA-TODOROVA, E. et al. HLA-G expression is up-regulated by progesterone in mesenchymal stem cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 62, n. 1, p. 25–33, 2009.

JIANG, C. et al. Molecular detection of SARS-CoV-2 being challenged by virus variation and asymptomatic infection. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 11, n. 3, p. 257–264, 2021.

JIANG, S. et al. A distinct name is needed for the new coronavirus. **The Lancet**, v. 395, n. 10228, p. 949, 2020.

JIN, J.-M. et al. Gender Differences in Patients With COVID-19: Focus on Severity

and Mortality. **Frontiers in public health**, v. 8, p. 152, 2020.

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

KHORRAMI, S. et al. The relationship between HLA-G and viral loads in non-responder HCV-infected patients after combined therapy with IFN- α 2 α and ribavirin. **Human Immunology**, v. 76, n. 2–3, p. 181–186, 2015.

KLEIN, J.; SATO, A. The system. First of two parts. **N Engl J Med**, v. 343, p. 702–709, 2000.

KNOLL, M. D.; WONODI, C. Oxford–AstraZeneca COVID-19 vaccine efficacy. **The Lancet**, v. 397, n. 10269, p. 72–74, 2021.

KSIAZEK, T. G. et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **New England journal of medicine**, v. 348, n. 20, p. 1953–1966, 2003.

KURI-CERVANTES, L. et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. **Science immunology**, v. 5, n. 49, p. eabd7114, 2020.

LAARIBI, A. B. et al. Increased Levels of Soluble HLA-G Molecules in Tunisian Patients with Chronic Hepatitis B Infection. **Journal of viral hepatitis**, v. 24, n. 11, p. 1016–1022, nov. 2017.

LE FRIEC, G. et al. Soluble HLA-G inhibits human dendritic cell-triggered allogeneic T-cell proliferation without altering dendritic differentiation and maturation processes. **Human immunology**, v. 64, n. 8, p. 752–761, 2003.

LE FRIEC, G. et al. Capacity of myeloid and plasmacytoid dendritic cells especially at mature stage to express and secrete HLA-G molecules. **Journal of leukocyte biology**, v. 76, n. 6, p. 1125–1133, 2004.

LE GAL, F.-A. et al. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. **International immunology**, v. 11, n. 8, p. 1351–1356, 1999.

LEFEBVRE, S. et al. Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells. **Human immunology**, v. 61, n. 11, p. 1095–1101, 2000.

LI, G. et al. Coronavirus infections and immune responses. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 4, p. 424–432, 2020.

LI, W. et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. **Science**, v. 310, n. 5748, p. 676–679, 2005.

LILA, N. et al. Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4⁺ T cells suppresses the allo-proliferative response: a CD4⁺ T cell regulatory mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 21, p. 12150–12155, 2001.

LIN, A.; YAN, W.-H. Perspective of HLA-G Induced Immunosuppression in SARS-CoV-2 Infection. **Frontiers in immunology**, p. 5192, 2021.

LOUZADA-JUNIOR, P.; FREITAS, M. V. C. O potencial terapêutico da molécula HLA-G. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, p. 2-2, 2012.

LOZANO, J. M. et al. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule. **Aids**, v. 16, n. 3, p. 347–351, 2002.

MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, p. 647–662, 2004.

MACHHI, J. et al. The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. **Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology**, v. 15, n. 3, p. 359–386, 2020.

MAGLEBY, R. et al. Impact of SARS-CoV-2 viral load on risk of intubation and mortality among hospitalized patients with coronavirus disease 2019. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, 2020.

MALIK, Y. S. et al. Emerging novel coronavirus (2019-nCoV)—current scenario, evolutionary perspective based on genome analysis and recent developments. **Veterinary Quarterly**, v. 40, n. 1, p. 68–76, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1727993>>.

MATHEW, D. et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. **Science**, v. 369, n. 6508, p. eabc8511, 2020.

MENIER, C. et al. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. **Blood**, v. 104, n. 10, p. 3153–3160, 2004.

MICHEL WOLF, J. et al. The HLA-G 14-Bp Insertion/Deletion Polymorphism Is Associated with Chronic Hepatitis B in Southern Brazil: A Case-Control Study. **Human immunology**, v. 81, n. 2–3, p. 79–84, 2020.

MODABBER, Z. et al. TIM-3 as a Potential Exhaustion Marker in CD4(+) T Cells of COVID-19 Patients. **Immunity, inflammation and disease**, v. 9, n. 4, p. 1707–1715, 2021.

MODERBACHER, C. R. et al. Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity. **Cell**, v. 183, n. 4, p. 996–1012, 2020.

MORANDI, F. et al. Recent advances in our understanding of HLA-G biology: lessons from a wide spectrum of human diseases. **Journal of immunology research**, v. 2016, 2016.

MOODLEY, S.; BOBAT, R. Expression of HLA-G1 at the placental interface of HIV-1 infected pregnant women and vertical transmission of HIV. **Placenta**, v. 32, n. 10, p. 778-782, 2011.

MOUCHET, N. et al. HLA-G Is Widely Expressed by Mast Cells in Regions of Organ Fibrosis in the Liver, Lung and Kidney. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12490, 2021.

MUELLER, A. L.; MCNAMARA, M. S.; SINCLAIR, D. A. Why Does COVID-19 Disproportionately Affect Older People? **Aging**, v. 12, n. 10, p. 9959–9981, 2020.

MURPHY, K.; WEAVER, C. **Janeway's immunobiology**. [s.l.] Garland science, 2016.

NAJI, A. et al. Binding of HLA-G to ITIM-bearing Ig-like transcript 2 receptor suppresses B cell responses. **The journal of immunology**, v. 192, n. 4, p. 1536–1546, 2014.

NEGRINI, S. et al. Phenotypic alterations involved in CD8+ Treg impairment in systemic sclerosis. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 18, 2017.

OLIVER, Sara E. et al. The advisory committee on immunization practices' interim recommendation for use of Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine—United States, December 2020. **Morbidity and mortality weekly report**, v. 69, n. 50, p. 1922, 2020.

OMS. **Coronavírus**. Disponível em: <[https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/como-e-transmitido#:~:text=A transmissão por contato é,e superfícies contaminados \(fômites\).>](https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/como-e-transmitido#:~:text=A transmissão por contato é,e superfícies contaminados (fômites).>). Acesso em: 04 mai. 2022a.

OMS. **The COVID-19 vaccine tracker and landscape compiles detailed information of each COVID-19 vaccine candidate in development by closely monitoring their progress through the pipeline**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>>. Acesso em: 3 jun. 2022b.

ONNO, M. et al. Modulation of HLA-G antigens expression by human cytomegalovirus: specific induction in activated macrophages harboring human cytomegalovirus infection. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6426–6434, 2000a.

ONNO, M. et al. Modulation of HLA-G antigens expression in myelomonocytic cells. **Human immunology**, v. 61, n. 11, p. 1086–1094, 2000b.

ORAN, D. P.; TOPOL, E. J. Prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection: a narrative review. **Annals of internal medicine**, v. 173, n. 5, p. 362–367, 2020.

PAIRO-CASTINEIRA, E. et al. Genetic mechanisms of critical illness in Covid-19. **Nature**, v. 591, n. 7848, p. 92–98, 2021.

PARK, G. M. et al. Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 313, n. 3, p. 606–611, 2004.

PATEL, S. K.; VELKOSKA, E.; BURRELL, L. M. Emerging Markers in Cardiovascular Disease: Where Does Angiotensin-Converting Enzyme 2 Fit In? **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 40, n. 8, p. 551–559, ago. 2013.

PEIRIS, J. S. M. et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. **The Lancet**, v. 361, n. 9366, p. 1319–1325, 2003.

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.

PETRILLI, C. M. et al. Factors associated with hospitalization and critical illness among 4,103 patients with COVID-19 disease in New York City. **MedRxiv**, 2020.

POSCH, P. E.; HURLEY, C. K. CHAPTER 39 - Histocompatibility: HLA and other systems. In: PORWIT, A.; MCCULLOUGH, J.; ERBER, W. N. (Ed.). **Blood and Bone Marrow Pathology (Second Edition)**. Second Edi ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 641–676, 2011.

PRADHAN, A.; OLSSON, P.-E. Sex differences in severity and mortality from COVID-19: are males more vulnerable? **Biology of sex Differences**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2020.

PROMPETCHARA, E.; KETLOY, C.; PALAGA, T. Immune Responses in COVID-19 and Potential Vaccines: Lessons Learned from SARS and MERS Epidemic. **Asian Pacific journal of allergy and immunology**, v. 38, n. 1, p. 1–9, mar. 2020.

RAMZANNEZHAD, S. et al. The association of decreased HLA-G+ immune cell frequencies with critical COVID-19 patients. **Microbial Pathogenesis**, v. 167, p. 105550, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401022001632>>.

RASHIDI, S. et al. Immunomodulatory Potential of Non-Classical HLA-G in Infections including COVID-19 and Parasitic Diseases. **Biomolecules**, v. 12, n. 2, p. 257, 2022.

REBMANN, V. et al. Detection of HLA-G5 secreting cells. **Human immunology**, v. 64, n. 11, p. 1017–1024, 2003.

RIZZO, Paola et al. COVID-19 in the heart and the lungs: could we “Notch” the inflammatory storm?. **Basic research in cardiology**, v. 115, n. 3, p. 1-8, 2020.

RIZZO, R. et al. HLA-G molecules in autoimmune diseases and infections. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 592, 2014.

RODRIGUES, T. S. et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2

infection and are associated with COVID-19 severity in patients. **Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 3, 2021.

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

SABBAGH, A. et al. The role of HLA-G in parasitic diseases. **Hla**, v. 91, n. 4, p. 255–270, 2018.

SADOFF, J. et al. Interim results of a phase 1–2a trial of Ad26. COV2. S Covid-19 vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 19, p. 1824–1835, 2021.

SANCHIS-GOMAR, F. et al. Obesity and outcomes in COVID-19: when an epidemic and pandemic collide. In: Mayo Clinic Proceedings, 7, **Anais...Elsevier**, 2020.

SANYAOLU, A. et al. Comorbidity and its impact on patients with COVID-19. **SN comprehensive clinical medicine**, v. 2, n. 8, p. 1069–1076, 2020.

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

SEYEDALINAGHI, S. et al. Characterization of SARS-CoV-2 different variants and related morbidity and mortality: a systematic review. **European Journal of Medical Research**, v. 26, n. 1, p. 1–20, 2021.

SHABAN, M. S. et al. Multi-level inhibition of coronavirus replication by chemical ER stress. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1–20, 2021.

SHEU, J.; SHIH, I.-M. HLA-G and immune evasion in cancer cells. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 109, n. 4, p. 248–257, 2010.

SHIH, I.-M. Application of Human Leukocyte Antigen–G Expression in the Diagnosis of Human Cancer. **Human immunology**, v. 68, n. 4, p. 272–276, 2007.

SHOAIB, M. H. et al. A journey from SARS-CoV-2 to COVID-19 and beyond: a comprehensive insight of epidemiology, diagnosis, pathogenesis, and overview of the progress into its therapeutic management. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 72, 2021.

SHROCK, E. et al. Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and correlates of severity. **Science**, v. 370, n. 6520, p. eabd4250, 2020.

SINGH, A. K. et al. Diabetes in COVID-19: Prevalence, pathophysiology, prognosis and practical considerations. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 14, n. 4, p. 303–310, 2020.

SINGHAL, T. A review of coronavirus disease-2019 (COVID-19). **The indian journal of pediatrics**, v. 87, n. 4, p. 281–286, 2020.

SNELL, G. D. Methods for the study of histocompatibility genes. **Journal of genetics**, v. 49, n. 2, p. 87–108, 1948.

SUHAIL, S. et al. Role of oxidative stress on SARS-CoV (SARS) and SARS-CoV-2 (COVID-19) infection: a review. **The protein journal**, v. 39, n. 6, p. 644–656, 2020.

SULLIVAN, L. C. et al. A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity. **Trends in immunology**, v. 27, n. 9, p. 413–420, 2006.

SVENDSEN, Signe Goul et al. The expression and functional activity of membrane-bound human leukocyte antigen-G1 are influenced by the 3'-untranslated region. **Human immunology**, v. 74, n. 7, p. 818–827, 2013.

TAY, M. Z. et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363–374, 2020.

TIAN, W. et al. Predictors of Mortality in Hospitalized COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 10, p. 1875–1883, 2020.

TOLDO, S. et al. Inflammasome formation in the lungs of patients with fatal COVID-19. **Inflammation Research**, v. 70, n. 1, p. 7–10, 2021.

TRAINA, L. et al. COVID-19 Induced Aorto Duodenal Fistula Following Evar in the so Called “Negative” Patient. **Vascular**, p. 17085381211053696, 2021.

TUFAN, A.; GÜLER, A. A.; MATUCCI-CERINIC, M. COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposing antirheumatic drugs. **Turkish journal of medical sciences**, v. 50, n. SI-1, p. 620–632, 2020.

UĞUREL, O. M.; ATA, O.; BALIK, D. An updated analysis of variations in SARS-CoV-2 genome. **Turkish Journal of Biology**, v. 44, n. SI-1, p. 157–167, 2020.

UZUNIAN, A. Coronavirus SARS-CoV-2 and Covid-19. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 56, 2020.

WEN, W. et al. Efficacy and Safety of Three New Oral Antiviral Treatment (Molnupiravir, Fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19 : a Meta-Analysis. **Annals of medicine**, v. 54, n. 1, p. 516–523, dez. 2022.

WENG, P.-J. et al. Elevation of plasma soluble human leukocyte antigen-G in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Human immunology**, v. 72, n. 5, p. 406–411, 2011.

MARSHALL, J. C. et al. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 8, p. e192–e197, 2020.

XU, X.-W. et al. Clinical Findings in a Group of Patients Infected with the 2019 Novel Coronavirus (SARS-Cov-2) Outside of Wuhan, China: Retrospective Case Series. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 368, p. m606–m606, 2020.

- YANG, J. et al. Prevalence of comorbidities in the novel Wuhan coronavirus (COVID-19) infection: a systematic review and meta-analysis. **Int J Infect Dis**, v. 10, n. 10.1016, 2020.
- YE, G. et al. Clinical Characteristics of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Reactivation. **The Journal of infection**, v. 80, n. 5, p. e14–e17, 2020.
- ZAKI, A. M. et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 19, p. 1814–1820, 2012.
- ZHANG, Q. et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. **Science**, v. 370, n. 6515, p. eabd4570, 2020a.
- ZHANG, S. et al. Dynamics of peripheral immune cells and their HLA-G and receptor expressions in a patient suffering from critical COVID-19 pneumonia to convalescence. **Clinical and Translational Immunology**, v. 9, n. 5, p. 1–10, 2020b.
- ZHENG, C. et al. Real-World Effectiveness of COVID-19 Vaccines: A Literature Review and Meta-Analysis. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 114, p. 252–260, 2022.
- ZHENG, M. et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. **Cellular & molecular immunology**, v. 17, n. 5, p. 533-535, 2020.
- ZHOU, D.; BORSA, M.; SIMON, A. K. Hallmarks and detection techniques of cellular senescence and cellular ageing in immune cells. **Aging Cell**, v. 20, n. 2, p. e13316, 2021.
- ZHOU, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, 2020.
- ZHU, X. et al. Expression of human leukocyte antigen-G during normal placentation and in preeclamptic pregnancies. **Hypertension in Pregnancy**, v. 31, n. 2, p. 252-260, 2012.
- ZIDI, I. Puzzling out the COVID-19: therapy targeting HLA-G and HLA-E. **Human Immunology**, v. 81, n. 12, p. 697-701, 2020.

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Nome da Pesquisa: *“Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em COVID-19 grave: busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes infectados por SARS-CoV-2”*

Pesquisadora responsável: Dra. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso, professora e pesquisadora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, onde a pesquisa será feita.

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa chamada ***“Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em COVID-19 grave: busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes infectados por SARS-CoV2”***, que será realizada por um grupo de pesquisadores coordenado pela Professora Dra. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso. O objetivo dessa pesquisa é avaliar como está o sistema de defesa do organismo durante a COVID-19, causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2). Essa pesquisa poderá ajudar a entender a doença e a criar novos tratamentos no futuro. Os avanços na área da saúde ocorrem através de pesquisas como essa e, por isso, sua participação é importante.

Nessa pesquisa vamos precisar de sangue, saliva, de secreção nasal/garganta e/ou pulmonar (material biológico) das pessoas. Essas pessoas serão divididas em 5 grupos:

- **GRUPO 1:** sangue e saliva; grupo de pessoas **CONTROLE NEGATIVO**, que são aquelas que não têm o coronavírus. Precisaremos também de secreção coletada por cotonete da garganta e do nariz, se você não tem exame recente de COVID-19.
- **GRUPO 2:** sangue e saliva; grupo de pessoas **POSITIVO ASSINTOMÁTICO ou LEVE**, que são aquelas que têm resultado positivo para COVID-19 e apresentam sintomas leves ou nenhum sintoma;
- **GRUPO 3:** sangue e saliva; grupo **POSITIVO MODERADO**, que são aquelas pessoas que têm resultado positivo para COVID-19 e precisam de internação **sem** respirador;
- **GRUPO 4:** sangue e fluido aspirado do pulmão; grupo **POSITIVO GRAVE**, que são aquelas pessoas que têm resultado positivo para COVID-19 e precisam de internação UTI **com uso** de respirador.

- **GRUPO 5:** sangue e saliva; grupo **POSITIVO CURADO**, que são aquelas pessoas que **tiveram** resultado positivo para COVID-19 e que não apresentam nenhum sintoma e já passaram da fase de quarentena.

Você poderá entrar em um desses grupos dependendo do resultado para o coronavírus e dos seus sintomas. Você ou um representante poderão assinar este documento para concordar com a sua participação na pesquisa. Para participar da pesquisa você precisa ter mais que 12 anos de idade (para entrar nos grupos 3 ou 4) ou mais que 18 anos para os grupos 1, 2 e 5.

Como será a sua participação na pesquisa? Você ou o seu responsável deverá:

1º) Responder um questionário, presencialmente ou por telefone. Ficar à vontade para responder honestamente as perguntas, porque as respostas serão mantidas em segredo. As perguntas serão sobre dados pessoais (nome, idade), hábitos de vida (fumo, bebida alcoólica, exercícios físicos), doenças existentes e uso de medicamentos. Neste dia nós combinaremos o dia e o lugar para colher o material biológico, **ou** autorizar usar os dados do prontuário médico (quando estiverem internados e impossibilitados de responder perguntas).

2º) Autorizar/doar uma amostra de sangue (16 ml para os participantes do GRUPO 3 ou GRUPO 4 e 28 ml para os GRUPOS 1, 2 e 5). Essa quantidade é igual a duas colheres e meia de sopa ou pouco menos e, se você for dos GRUPOS 1, 2, 3 e 5 um pouco de saliva, que será coletada da sua boca com algodão. Se você for do GRUPO 4, também doará 20 ml de aspirado de fluido pulmonar, que é uma secreção que os médicos/enfermeiros retiram do pulmão de quem está intubado, para melhorar a respiração (essa secreção é retirada de rotina, independentemente da pesquisa e normalmente é descartada no lixo. Neste caso, será doada à pesquisa).

3º) Autorizar coleta, uma única vez, de secreção do nariz e da garganta com um cotonete, para exame de infecção pelo coronavírus, se você for GRUPO 1 e não tiver feito este exame recentemente.

As coletas desses materiais biológicos serão realizadas por um profissional capacitado, usando material esterilizado e descartável.

Quantas vezes você deverá doar estes materiais? Dependerá do grupo que você estiver:

- Se você estiver nos GRUPOS 1, 2 e 5 você doará uma única vez.
- Se você estiver nos GRUPOS 3 e 4, você doará nos seguintes momentos: no dia que estiver internado e receber o diagnóstico POSITIVO para o novo coronavírus, dois dias depois e uma vez por semana até você sair do hospital.

Quais os riscos ao participar da pesquisa?

Você poderá ter algum desconforto, como dor pela picada da agulha, e poderá aparecer uma pequena mancha roxa no local da picada, que deverá desaparecer em poucos dias.

O que será feito com os materiais biológicos colhidos?

As amostras de sangue, de saliva e de aspirado pulmonar serão usadas para estudar as células e as substâncias produzidas pelo sistema de defesa do organismo. Alguns exames de laboratório clínico serão realizados no sangue. Caso algum desses exames apresente resultados que possam indicar algum problema de saúde diferente daquele causado pelo coronavírus, **uma enfermeira ligada à equipe da pesquisa, a Profa. Dra. Ana Paula Moraes Fernandes ou Dra. Angelina Lettiere Viana** entrará em contato com você para entregar o resultado do exame, para orientá-lo e indicar o acompanhamento em uma UBDS do município de Ribeirão Preto/SP. Dessa mesma amostra de sangue, nós iremos separar o DNA e o RNA, que são os materiais genéticos das células que têm as receitas para a produção das substâncias de defesa, e também separar a parte líquida do sangue que se chama soro ou plasma, que contém essas substâncias de defesa.

Que outras informações serão necessárias para a pesquisa?

Caso você seja atendido em algum serviço de saúde (SUS, hospital, convênios), nós precisamos da sua autorização para consultar as informações (exames e outras doenças) que os médicos anotam na sua ficha de atendimento. Essas informações serão importantes para a pesquisa e serão mantidas em segredo.

Se houver sobra do seu material biológico, será muito importante guardá-lo para futuras pesquisas sobre o novo coronavírus, uma vez que muitas coisas ainda precisam ser estudadas sobre a doença causada por ele. Assim, solicitamos também **sua autorização para guardar essa sobra de aspirado de pulmão, assim como material do seu sangue**, que serão células chamadas leucócitos, plasma ou soro (parte líquida do sangue), DNA, RNA e/ou saliva. Esse material será armazenado sob a responsabilidade da Professora Cristina Ribeiro de Barros Cardoso. Todo o material será identificado com código e ficará guardado por no máximo 10 anos e, posteriormente, serão jogados fora. Para cada nova pesquisa a ser feita com esse material e aprovada pelo Comitê de

Ética, **você será consultado para dizer se concorda ou não com o uso do seu material na nova pesquisa.**

Os resultados da pesquisa serão divulgados em congressos e trabalhos científicos, **o seu nome nunca será divulgado, sendo guardado em segredo.** A sua participação é voluntária e **você não terá despesas nem ganhará dinheiro para participar dessa pesquisa.** Para as coletas dos materiais biológicos os pesquisadores irão até você na sua casa ou no hospital. Você poderá tirar dúvidas, conhecer os resultados da pesquisa e terá toda a **liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento** em qualquer fase da pesquisa sem qualquer problema e sem prejudicar seu atendimento no serviço de saúde. Basta avisar a pesquisadora Dra. Cristina ou o Comitê de Ética em Pesquisa em um dos endereços e contatos que aparecem no final desse documento. O Comitê de Ética em Pesquisa é responsável por defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. Como participante da pesquisa você tem o direito de procurar obter indenização por eventuais danos decorrentes da sua participação na pesquisa.

Se ao final da leitura deste documento você estiver sem qualquer dúvida e concordar em participar da pesquisa, você e a pesquisadora deverão assinar esse documento em **duas vias**. Uma das vias será sua e a outra da pesquisadora.

Ribeirão Preto, _____ de 20__.

Profa. Dra. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso
Pesquisadora responsável

Eu, _____, li e concordo em participar dessa pesquisa e concordo com a guarda de material para pesquisas futuras.

Ou

Eu, _____, li e concordo em participar dessa pesquisa, **mas não concordo** com a guarda de material para pesquisas futuras.

Ribeirão Preto, _____ de 20__.

Assinatura do participante da pesquisa ou responsável

Endereços e contatos:**Professora Dra. Cristina Ribeiro de Barros Cardoso**

Endereço: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP; Av. do Café, sem número, bairro Monte Alegre, Campus USP Ribeirão Preto - Bloco S - 2º andar – sala 066-A; CEP 14040-903 - Ribeirão Preto – SP. Telefones: (16) 3315-0257 / (16) 98150-3000; Email: cristina@fcfrp.usp.br

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências

Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Endereço: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Avenida do Café, sem número, bairro Monte Alegre, Campus USP Ribeirão Preto - Bloco H - Sala 116; CEP 14040-903 - Ribeirão Preto – SP - Telefone: (16) 3315-4213; Fax: (16) 3315-4892; Email: cep@fcfrp.usp.br

Apêndice B - Questionário Clínico



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE
RIBEIRÃO PRETO – FCFRP USP

QUESTIONÁRIO CLÍNICO – AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DE
EXPRESSÃO GÊNICA E RESPOSTA HUMORAL EM COVID-19
GRAVE: BUSCA DE POTENCIAIS BIOMARCADORES PARA
EVOLUÇÃO DA DOENÇA EM PACIENTES INFECTADOS POR SARS-CoV2

D

INFORMAÇÕES DE IDENTIFICAÇÃO			
NOME DE REGISTRO:			
NOME SOCIAL:			
RG	CPF	E-MAIL	
TELEFONE	DATA DE NASCIMENTO:	IDADE:	CÓDIGO:
SEXO BIOLÓGICO: () M () F	USUÁRIO SUS? () SIM () NÃO	NÚMERO HYGIA	
LOCAL DE COLETA:	UNIDADE DE SAÚDE		
ÁREA DE SAÚDE	MICROÁREA DE SAÚDE		PRONTUÁRIO MÉDICO:
TIPO SANGÜÍNEO:	ESCOLARIDADE	OCUPAÇÃO:	PRONTUÁRIO DA FAMÍLIA
CONVÊNIO SAÚDE? () SIM () NÃO QUAL:	SINTOMAS DE GRIPE? () SIM () NÃO TEMPO:	DIAGNOSTICADO COM COVID-19? () DETECTÁVEL () NÃO DETECTÁVEL () NÃO TESTADO METODOLOGIA:	
SATURAÇÃO O ₂	FREQ. CARDÍACA	PRESSÃO ARTERIAL x mmHg	TEMPERATURA (°C)
FEBRE NAS ÚLTIMAS 24h? () SIM () NÃO	POSSUI PROBLEMA DE COAGULAÇÃO? () SIM () NÃO () NÃO SEI	RISCO BIOLÓGICO: () SIM () NÃO	POSSUI DIABETES MELLITUS? () SIM () NÃO () NÃO SEI TIPO:
DISPNEIA () SIM () NÃO	TOSSE () SIM () NÃO () SECA () PRODUTIVA	INTENSIDADE DA TOSSE: () MUITA () MODERADA () POUCA	POSSUI HIPERTENSÃO? () SIM () NÃO () NÃO SEI
RAÇA/COR:	NACIONALIDADE:	CORIZA () SIM () NÃO () MUITA () MODERADA () POUCA	DIARREIA () SIM () NÃO () MUITA () MODERADA () POUCA
PERDA DO OLFATO () SIM () NÃO () MUITA () MODERADA () POUCA	PERDA DO PALADAR () SIM () NÃO () MUITA () MODERADA () POUCA	TOMOU VACINA DA GRIPE ESTE ANO? () SIM () NÃO	
DESCOLORAÇÃO NAS MÃOS OU PÉS () SIM () NÃO Descreva: _____	ERUPÇÃO CUTÂNEA () SIM () NÃO Descreva: _____	CONJUNTIVITE () SIM () NÃO Descreva: _____	
ALTURA (EM m)	OBESIDADE: () SIM () NÃO GRAU: _____	PESO CORPORAL:	IMC:
PUÉRPERA () SIM () NÃO TEMPO:	DATA DA ÚLTIMA MENSTRUÇÃO ____/____/____	DEFICIÊNCIA? () OUTRA: _____	
ESTÁ CUMPRINDO QUARENTENA? () SIM () NÃO () GOVERNAMENTAL () IMPOSTA POR RECOMENDAÇÃO MÉDICA		RESIDENTES:	



QUESTIONÁRIO CLÍNICO –

Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em COVID-19 grave:
busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes
infectados por SARS-CoV2

AUTO-REFERIDO DE CONDIÇÕES

ETILISTA/HÁBITO ALCÓOLICO:

() SIM | () NÃO

CERVEJA/ FERMENTADOS:

() TODOS OS DIAS | () 5X/SEMANA | () 3X/SEMANA | () 2X/SEMANA | () 1X SEMANA

DESTILADOS: () Vinho | () Cachaça | () Whisky | () Outros

() TODOS OS DIAS | () 5X/SEMANA | () 3X/SEMANA | () 2X/SEMANA | () 1X SEMANA

FUMANTE:

() SIM | () NÃO

() Cigarro Comum | () Maconha | () Outros: _____

VEZES POR SEMANA

() TODOS OS DIAS | () 5X/SEMANA | () 3X/SEMANA | () 2X/SEMANA | () 1X SEMANA

VEZES POR DIA: () 1 | () 2 | () 3 | () 4 | () 5 | () 6 | () 8 | () 9 | () 10 | () +10

DROGAS ILÍCITAS:

() SIM | () NÃO

() Cocaína | () Crack | () LSD | () Estimulantes | () Alucinógenos | () Outros: _____

—

VEZES POR SEMANA

() TODOS OS DIAS | () 5X/SEMANA | () 3X/SEMANA | () 2X/SEMANA | () 1X SEMANA

VEZES POR DIA: () 1 | () 2 | () 3 | () 4 | () 5 | () 6 | () 8 | () 9 | () 10 | () +10

ATIVIDADE FÍSICA:

() SIM | () NÃO | TIPO DE EXERCÍCIO: _____

VEZES POR SEMANA

() TODOS OS DIAS | () 5X/SEMANA | () 3X/SEMANA | () 2X/SEMANA | () 1X SEMANA

TRATAMENTO PSIQUIÁTRICO/PSICOLÓGICO:

() SIM | () NÃO

ESPECIFIQUE: _____

INTERNAÇÃO:

() SIM | () NÃO

ESPECIFIQUE: _____

MOBILIDADE:

() NORMAL | () ANDA COM APOIO | () CADEIRANTE | () ACAMADO



QUESTIONÁRIO CLÍNICO –
Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em COVID-19 grave:
busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes
infetados por SARS-CoV2

COMORBIDADES (ESPECIFIQUE)	
RISCO BIOLÓGICO	
TUBERCULOSE: () SIM () NÃO () NÃO SABE	
ISTE: () SIM () NÃO () NÃO SABE	
HANSEIASE: () SIM () NÃO () NÃO SABE	
Até quanto tempo:	
TRATAMENTO: () Em andamento () Concluído () Não feito	
Quais remédios utilizados:	
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
CARDIOVASCULAR	
DOENÇA CARDIOVASCULAR CRÔNICA: () SIM () NÃO () NÃO SABE	
QUAIS:	
INFARTO: () SIM () NÃO () NÃO SABE	
Até quanto tempo:	
Quais remédios utilizados:	
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
AVC/DEBRAME: () SIM () NÃO () NÃO SABE	
Até quanto tempo:	
Quais remédios utilizados:	
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
ANEURISMA: () SIM () NÃO () NÃO SABE	
Até quanto tempo:	
Quais remédios utilizados:	
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
PROBLEMAS CIRCULATÓRIOS: () SIM () NÃO () NÃO SABE	
QUAIS:	
Quais remédios utilizados:	
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
HIPERTENSÃO ARTERIAL: () SIM () NÃO () NÃO SABE	
Até quanto tempo:	
TRATAMENTO: () Em andamento () Concluído () Não feito	
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____



QUESTIONÁRIO CLÍNICO –
Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em COVID-19 grave:
busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes
infetados por SARS-CoV2

RESPIRATÓRIO

DPOC: () SIM () NÃO () NÃO SABE

Não quanto tempo:

TRATAMENTO: () Em andamento / () Concluído / () Não feito

Quais remédios utilizados:

NOME: _____ DOSE: _____

POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____

HISTÓRICO DE PNEUMONIA: () SIM () NÃO () NÃO SABE

Não quanto tempo:

TRATAMENTO: () Em andamento / () Concluído / () Não feito

Quais remédios utilizados:

NOME: _____ DOSE: _____

POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____

FIBROSE CÍSTICA COM INFECÇÕES RECORRENTES: () SIM () NÃO () NÃO SABE

Não quanto tempo:

TRATAMENTO: () Em andamento / () Concluído / () Não feito

Quais remédios utilizados:

NOME: _____ DOSE: _____

POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____

GRANULOMAS/CALCIFICAÇÕES: () SIM () NÃO () NÃO SABE

Não quanto tempo:

TRATAMENTO: () Em andamento / () Concluído / () Não feito

Quais remédios utilizados:

NOME: _____ DOSE: _____

POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____

ENFISEMA PULMONAR: () SIM () NÃO () NÃO SABE

Não quanto tempo:

TRATAMENTO: () Em andamento / () Concluído / () Não feito

Quais remédios utilizados:

NOME: _____ DOSE: _____

POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____

BRONQUITE/ASMA/RINITE/SINUSITE: () SIM () NÃO () NÃO SABE

ESPECIFIQUE: _____

Não quanto tempo:

TRATAMENTO: () Em andamento / () Concluído / () Não feito

Quais remédios utilizados:

NOME: _____ DOSE: _____

POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____



QUESTIONÁRIO CLÍNICO –
 Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em COVID-19 grave:
 busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes
 infectados por SARS-CoV2

RENAL	
CÁLCULOS/INSUFICIÊNCIA/HEMATÚRIA/OUTRAS: () SIM () NÃO () NÃO SABE	
ESPECIFIQUE: _____	
Há quanto tempo: _____	
TRATAMENTO: () Em andamento / () Concluído / () Não feito	
Quais remédios utilizados:	
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
IMUNOLÓGICOS	
HIPOTIREOIDISMO: () SIM () NÃO () NÃO SABE	
ESPECIFIQUE: _____	
Há quanto tempo: _____	
TRATAMENTO: () Em andamento / () Concluído / () Não feito	
Quais remédios utilizados:	
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
AUTOIMUNIDADE/ALERGIAS: () SIM () NÃO () NÃO SABE	
ESPECIFIQUE: _____	
Há quanto tempo: _____	
TRATAMENTO: () Em andamento / () Concluído / () Não feito	
Quais remédios utilizados:	
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
IMUNODEFICIÊNCIAS: () SIM () NÃO () NÃO SABE	
ESPECIFIQUE: _____	
Há quanto tempo: _____	
TRATAMENTO: () Em andamento / () Concluído / () Não feito	
Quais remédios utilizados:	
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
TRANSPLANTADO DE ÓRGÃO SÓLIDO OU MEDULA ÓSSEA: () SIM () NÃO () NÃO SABE	
ESPECIFIQUE: _____	
Há quanto tempo: _____	
TRATAMENTO: () Em andamento / () Concluído / () Não feito	
Quais remédios utilizados:	
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____	DOSE: _____
POSOLOGIA: _____	TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____



QUESTIONÁRIO CLÍNICO –
Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em COVID-19 grave:
busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes
infectados por SARS-CoV2

HEPÁTICAS
DOENÇAS HEPÁTICAS: (<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> NÃO SABE <i>(Esteatose, cirrose, hepatite, problemas na vesícula...)</i>
ESPECIFIQUE: _____
<i>Há quanto tempo:</i> _____
TRATAMENTO: (<input type="checkbox"/> Em andamento <input type="checkbox"/> Concluído <input type="checkbox"/> Não feito
<i>Quais remédios utilizados:</i>
NOME: _____ DOSE: _____
POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO _____ PAROU? (<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO) FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____ DOSE: _____
POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO _____ PAROU? (<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO) FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____ DOSE: _____
POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO _____ PAROU? (<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO) FAZ QUANTO TEMPO: _____

METABÓLICO
DOENÇAS METABÓLICAS: (<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> NÃO SABE <i>(Dislipidemias, disfunções hormonais, diabetes...)</i>
ESPECIFIQUE: _____
<i>Há quanto tempo:</i> _____
TRATAMENTO: (<input type="checkbox"/> Em andamento <input type="checkbox"/> Concluído <input type="checkbox"/> Não feito
<i>Quais remédios utilizados:</i>
NOME: _____ DOSE: _____
POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO _____ PAROU? (<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO) FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____ DOSE: _____
POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO _____ PAROU? (<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO) FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____ DOSE: _____
POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO _____ PAROU? (<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO) FAZ QUANTO TEMPO: _____

INFECÇÕES NOS ÚLTIMOS 30 DIAS
INFECÇÕES: (<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> NÃO SABE <i>(Bacterianas, viral, parasitárias...)</i>
ESPECIFIQUE: _____
<i>Há quanto tempo:</i> _____
TRATAMENTO: (<input type="checkbox"/> Em andamento <input type="checkbox"/> Concluído <input type="checkbox"/> Não feito
<i>Quais remédios utilizados:</i>
NOME: _____ DOSE: _____
POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO _____ PAROU? (<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO) FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____ DOSE: _____
POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO _____ PAROU? (<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO) FAZ QUANTO TEMPO: _____

NEUROLÓGICOS
INFECÇÕES: (<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> NÃO SABE <i>(Bacterianas, viral, parasitárias...)</i>
ESPECIFIQUE: _____
<i>Há quanto tempo:</i> _____
TRATAMENTO: (<input type="checkbox"/> Em andamento <input type="checkbox"/> Concluído <input type="checkbox"/> Não feito
<i>Quais remédios utilizados:</i>
NOME: _____ DOSE: _____
POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO _____ PAROU? (<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO) FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____ DOSE: _____
POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO _____ PAROU? (<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO) FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____ DOSE: _____
POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO _____ PAROU? (<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO) FAZ QUANTO TEMPO: _____

Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em COVID-19 grave: busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes infectados por SARS-CoV2

NEURODEGENERATIVOS: () SIM () NÃO () NÃO SABE
(Alzheimer, Parkinson...)
ESPECIFIQUE _____
Há quanto tempo: _____
TRATAMENTO: () Em andamento / () Concluído / () Não feito
Quais remédios utilizados: _____
NOME: _____ DOSE: _____
POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____ DOSE: _____
POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____
NOME: _____ DOSE: _____
POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO: _____ PAROU? () SIM () NÃO FAZ QUANTO TEMPO: _____

QUAL METODOLOGIA PARA DIAGNÓSTICO?	TEMPO DESDE O RESULTADO?	HOUVE INTERNAÇÃO? () SIM () NÃO DIAS:	VOCÊ CONSIDEROU OS SINTOMAS: () LEVE () MODERADO () GRAVE () ASSINTOMÁTICO
FOI RECEITADO CLOROQUINA? () SIM () NÃO	FEZ USO DE CLOROQUINA? () SIM () NÃO – SE SIM, POR QUANTO TEMPO: _____		
FOI RECEITADO HIDROXICLOROQUINA? () SIM () NÃO	FEZ USO DE HIDROXICLOROQUINA? () SIM () NÃO – SE SIM, POR QUANTO TEMPO: _____		
FOI RECEITADO ANTICOAGULANTES? () SIM () NÃO	FEZ USO DE ANTICOAGULANTES? () SIM () NÃO – SE SIM, POR QUANTO TEMPO: _____		

NOME: _____ DOSE: _____
 POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO: _____ PAROU? (SIM | NÃO) FAZ QUANTO TEMPO: _____
 NOME: _____ DOSE: _____
 POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO: _____ PAROU? (SIM | NÃO) FAZ QUANTO TEMPO: _____
 NOME: _____ DOSE: _____
 POSOLOGIA: _____ TEMPO DE USO: _____ PAROU? (SIM | NÃO) FAZ QUANTO TEMPO: _____

[illegible]



QUESTIONÁRIO CLÍNICO –
*Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em COVID-19 grave:
 busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes
 infectados por SARS-CoV2*

OUTROS MEDICAMENTOS DE USO CONTÍNUO

QUAIS? (NOME, DOSE E POSOLOGIA COM VIA DE ADMINISTRAÇÃO)

(Anticoncepcionais, antidepressivos, suplementação vitamínica...)

NOME: _____, DOSE: _____

POSOLOGIA: _____ MOTIVO: _____

NOME: _____, DOSE: _____

POSOLOGIA: _____ MOTIVO: _____

NOME: _____, DOSE: _____

POSOLOGIA: _____ MOTIVO: _____

NOME: _____, DOSE: _____

POSOLOGIA: _____ MOTIVO: _____

NOME: _____, DOSE: _____

POSOLOGIA: _____ MOTIVO: _____

NOME: _____, DOSE: _____

POSOLOGIA: _____ MOTIVO: _____

NOME: _____, DOSE: _____

POSOLOGIA: _____ MOTIVO: _____

FIM DO QUESTIONÁRIO PESSOAL

••

INÍCIO DO QUESTIONÁRIO OBSERVACIONAL

(Não perguntar nada à pessoa, somente observar e anotar)

Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em COVID-19 grave: busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes infectados por SARS-CoV-2

CASA DE ALVENARIA? () SIM () NÃO	POSSUI ANEXOS? () SIM () NÃO	POSSUI PORRO? () SIM () NÃO	QUANTOS COMODOS? _____
SANEAMENTO BÁSICO? () SIM () NÃO	ÁGUA ENCANADA? () SIM () NÃO	COLETA DE LIXO? () SIM () NÃO	BOAS CONDIÇÕES DE LIMPEZA? () SIM () NÃO
POSSUI ELETRICIDADE? () SIM () NÃO	CASA COMPARTILHADA? () SIM () NÃO	POSSUI JANELAS? () SIM () NÃO	POSSUI QUINTAL? () SIM () NÃO
POSSUI BANHEIRO INTERNO? () SIM () NÃO	POSSUI POÇA? () SIM () NÃO	ESGOTO À CÉU ABERTO? () SIM () NÃO	TELHADO COMPARTILHADO? () SIM () NÃO
OUTRAS OBSERVAÇÕES: 			

ENTREVISTA			
APARECE BOA HIGIENE? () SIM () NÃO	APARECE NUTRIÇÃO? () SIM () NÃO QUAL:	POSSUI AUTONOMIA? () SIM () NÃO	APARECE CONHECIMENTO SOBRE O VÍRUS? () SIM () NÃO?
OUTRAS OBSERVAÇÕES:			



(Obter o prontuário na UBS ou os resultados com o paciente)



QUESTIONÁRIO CLÍNICO –
Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em COVID-19 grave:
busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes
infectados por SARS-CoV2

**PERGUNTE AO PACIENTE SE ELE POSSUI OS RESULTADOS DOS ÚLTIMOS EXAMES/
CONSULTAS/ ANOTAÇÕES.**

RESULTADOS INFORMADOS PELO PACIENTE OU DO PRONTUÁRIO

NÚMERO DO PRONTUÁRIO:	DATA DA COLETA	DATA DE ENCAMINHAMENTO AO LABORATÓRIO	DATA DO RESULTADO

HEMOGRAMA				
HEMÁCIAS (HE)	HEMOGLOBINA (HB)		HEMATÓCRITO (HT)	
VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO (VCM)	CONCENTRAÇÃO Hb. CORPUSCULAR MÉDIA (CHCM)		VOLUME DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA (VHCM)	
RDW	OBS. ANISOCITOSE/ANISOCROMIA/POIKILOCITOSE			
PLAQUETAS	VOLUME PLAQUETÁRIO MÉDIO (VPM)		RETICULÓCITOS:	
FIBRINOGÊNIO	TEMPO DE PROTROMBINA		TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA	
TEMPO DE COAGULAÇÃO	TEMPO DE SANGRAMENTO		TEMPO DE TROMBINA	
LEUCÓCITOS TOTAIS:	LEUCÓCITOS DIFERENCIAIS ABSOLUTOS		LEUCÓCITOS DIFERENCIAIS RELATIVOS	
	NEUTRÓFILO		NEUTRÓFILO	
OUTRAS CÉLULAS ATÍPICAS:	LINFÓCITO		LINFÓCITO	
	MONÓCITO		MONÓCITO	
	EOSINÓFILO		EOSINÓFILO	
	BASÓFILO		BASÓFILO	

OUTRAS INFORMAÇÕES:



QUESTIONÁRIO CLÍNICO –
 Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em COVID-19 grave:
 busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes
 infectados por SARS-CoV2

HORMÔNIOS/IMUNOLOGIA					
T3 TOTAL	T4 TOTAL	T3 LIVRE	T4 LIVRE	TSH	ERTROPETINA
VITAMINA D	ANTI-STREPTOLISINA O (ASLO)	PROTEÍNA C REATIVA	FATOR REUMATOIDE	CR	CR
IgG TOTAL	IgM TOTAL	IgE TOTAL	ALDOSTERONA	CORTISONA	MELATONINA
ECA	COTININA	INSULINA	α -1 ANTITRIPSINA	OUTROS	
BIOQUÍMICO					
COLESTEROL TOTAL	HDL	LDL	VLDL	TRIGLICÉRIDES	FOSFATASE ALCALINA
FOSFATASE ÁCIDA TOTAL	AMILASE	DESIDROGENASE LÁTICA	TGO	TGP	GAMA-GT
BILIRRUBINA TOTAL	BILIRRUBINA DIRETA	BILIRRUBINA INDIRETA	CK TOTAL	CKMB ENZIMÁTICO	CKMB MASSA
MIOGLOBINA	TROPONINA	ALBUMINA	HEMOGLOBINA GLICADA	FERRITINA	OUTROS:

OUTRAS INFORMAÇÕES:



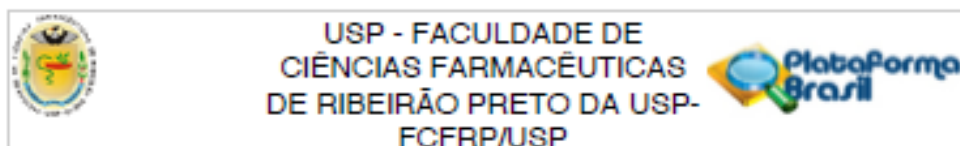
QUESTIONÁRIO CLÍNICO –
Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em COVID-19 grave: busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes infectados por SARS-CoV2

NOME DE REGISTRO/NOME SOCIAL			
PROBLEMA DE COAGULAÇÃO: () SIM () NÃO	RISCO BIOLÓGICO () SIM () NÃO	TELE ASSINADO () SIM () NÃO	CÓDIGO:

COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO				
() SWAB NASO/OROFARÍNGEO		____/____/____ ____hs____min		
() SALIVA		____/____/____ ____hs____min		
() ASPIRADO PULMONAR		____/____/____ ____hs____min		
() SANGUE	() CITRATO () COAGULO () HEPARINA () EDTA	____/____/____ ____hs____min		

OUTRAS INFORMAÇÕES (incluindo jejum e ingestão):

Anexo A - Aprovação comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em COVID-19 grave: busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes infectados por SARS-COV2

Pesquisador: Cristina Ribeiro de Barros Cardoso

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 30525920.7.0000.5403

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.076.158

Apresentação do Projeto:

A presente apreciação trata de solicitação de emenda. Na carta de encaminhamento para justificativa da emenda, a pesquisadora responsável declara que devido a características inerentes à própria pandemia, como a evolução dos quadros graves e o crescente número de pacientes acometidos pela COVID-19 leve no município de Ribeirão Preto, o projeto original foi ampliado. Dentre as principais alterações, destacam-se:

- a inclusão de novos grupos de estudos (especialmente pacientes com sintomas leves ou convalescentes), que serão provenientes de testes realizados via Unidades Básicas de Saúde do município.
- a inclusão de novo centro hospitalar adicional, para coleta de amostras de pacientes com quadros moderados ou graves (Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto)
- a inclusão de novos tipos de amostras coletadas (saliva e aspirado de fluido pulmonar)
- a inclusão de novas metodologias para trabalho das novas amostras, incluindo exames laboratoriais de rotina (bioquímicos e hematológicos), dentre outras.
- a inclusão de novos pesquisadores, para atuarem no projeto, agora maior e ampliado.

Endereço: Avenida do Café s/nº
 Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-903
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3315-4213 Fax: (16)3315-4892 E-mail: cep@fcrp.usp.br



**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-
FCFRP/USP**



Continuação do Parecer: 4.076.158

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com a pesquisadora:

OBJETIVO PRIMÁRIO:

Determinar, por meio da avaliação da resposta imunológica de pacientes infectados por SARS-COV2, potenciais biomarcadores para a evolução grave da COVID-19 e novos alvos terapêuticos.

OBJETIVO SECUNDÁRIO:

- Investigar os perfis de N-glicanas de imunoglobulinas e citocinas pró ou anti-inflamatórias, nos indivíduos infectados com SARS-COV2, nas diferentes apresentações clínicas da COVID-19, em comparação a indivíduos saudáveis.
- Caracterizar as imunoglobulinas plasmáticas e presentes na saliva, das classes IgM, IgG e IgA anti-carboidratos, para determinação da relação entre os padrões de anticorpos anti-carboidratos com o diagnóstico e prognóstico para as diferentes formas clínicas da doença.
- Avaliar perfil e expressão gênica de macrófagos alveolares obtidos de aspirado de fluido pulmonar de pacientes intubados, assim como avaliar perfis lipídicos e proteico do líquido surfactante pulmonar.
- Avaliar, por análise transcriptômica, a expressão gênica de receptores, fatores de transcrição, enzimas esteroidogênicas, enzimas do metabolismo de mediadores lipídicos, citocinas e outros mediadores relacionados à resposta imunológica dos indivíduos infectados com SARS-COV2, nas diferentes apresentações clínicas da COVID-19, em comparação a indivíduos saudáveis.
- Determinar, por espectrometria de massas de alta resolução (LC-MS/MS), o perfil de produção de eicosanoides, hormônios esteroides, endocanabinoides, esfingolipídios/ceramidas e seus derivados metabólitos ativos, como também metabólitos do metabolismo energético celular em plasma de indivíduos infectados nas diferentes apresentações clínicas da COVID-19, em comparação a indivíduos saudáveis.
- Associar os perfis de resposta imunológica e inflamatória determinados com os desfechos clínicos documentados da COVID-19.
- Sequenciar o exoma de indivíduos infectados com SARS-COV2, nas diferentes apresentações clínicas da COVID-19, para identificação de polimorfismos genéticos que predisponem ao desenvolvimento da forma grave da doença e mudanças epigenéticas elencando fatores genéticos de baixo e alto risco à doença.
- Quantificar os níveis plasmáticos de HLA-G solúvel em diferentes condições clínicas de pacientes com Covid-19.
- Produzir ferramentas biotecnológicas que permitam o estudo das relações entre o vírus, seus

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@ctcp.usp.br



**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-
FCFRP/USP**



Continuação do Parecer: 4.076.158

alvos celulares e anticorpos.

- Analisar as experiências positivas e negativas de atendimento à Covid-19 nos serviços de saúde público do município de Ribeirão Preto-SP.
- Relacionar as variáveis sócio-demográficas, clínicas, antropométricas, comportamentais e de risco com os parâmetros imunológicos, bioquímicos, genéticos e metabólicos analisados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com a pesquisadora:

RISCOS:

No momento das coletas de sangue pode haver riscos físicos como dor ou incômodo, formação de hematoma pós-coleção, que serão minimizados por uma escolha boa e criteriosa do local onde será retirado o sangue para que o paciente seja perfurado uma única vez. As amostras para pesquisa dos pacientes hospitalizados serão colhidas apenas quando se fizerem necessárias outras coletas para realização de exames laboratoriais de rotina, para acompanhamento do estado de saúde dos pacientes dos grupos mais graves, G3 e G4.

Acesso aos prontuários:

Será solicitada aos pacientes autorização para acesso aos seus respectivos prontuários médicos hospitalares, de forma que os pesquisadores possam correlacionar informações como idade, sexo, dias de internação, resultados dos seus exames laboratoriais, clínicos e de imagem, com os resultados da pesquisa. Será também solicitado acesso a relatórios da Vigilância Epidemiológica e ao sistema Hygia, para averiguação dos dados dos participantes testados para SARS-COV2 nas UBS do município de Ribeirão Preto.

BENEFÍCIOS:

Não haverá benefícios diretos para os participantes do projeto; mas, futuramente, havendo confirmação das hipóteses deste trabalho e aceitação dos resultados, os pacientes poderão ser beneficiados durante o acompanhamento médico após o tratamento da doença. O estudo busca promover a análise de futuros marcadores que poderão auxiliar as condutas clínicas e terapêuticas para o tratamento da infecção e sequelas provocados pela COVID-19. Sabendo do potencial imunomodulador do sistema imunoendócrino, dos eicosanóides, de anticorpos e dos mediadores derivados de esfingolídeos/ceramidas na resposta imunológica, é plausível supor que o entendimento dessas interações possa ser utilizado como ferramenta futura para o desenvolvimento de novos tratamentos para esta doença. Com a junção dos dados clínicos e

Endereço: Avenida do Café s/nº		CEP: 14.040-903
Bairro: Monte Alegre		
UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO	
Telefone: (16)3315-4213	Fax: (16)3315-4892	E-mail: cep@fcfrp.usp.br



**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-
FCFRP/USP**



Continuação do Parecer: 4.076.158

laboratoriais, esperamos encontrar biomarcadores que possam diferenciar indivíduos saudáveis de assintomáticos portadores do vírus, assim como doentes sintomáticos Hospitalizados não graves de doentes sintomáticos hospitalizados graves. Além disso, dentre os benefícios do estudo está a possibilidade identificarmos determinantes importantes da evolução da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Desenho da pesquisa apresentado pela pesquisadora: Serão selecionados e incluídos homens e mulheres, classificados em grupos controles e doentes, conforme diagnóstico laboratorial e gravidade da COVID-19: - participantes saudáveis da comunidade USP (Campus Ribeirão Preto), - indivíduos com teste molecular positivo para SARS-COV2 realizados via Unidades Básicas de Saúde do município de Ribeirão Preto e que sejam assintomáticos ou apresentem sintomas leves, - além de convalescentes e pacientes provenientes de um hospital privado (Hospital São Paulo) ou outro filantrópico (Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto), da mesma cidade, que serão avaliados clínica e laboratorialmente, para o diagnóstico da doença, pelos médicos responsáveis pelo atendimento. Após esta categorização, os voluntários (100 por grupo) serão divididos em: G1: saudáveis com diagnóstico molecular negativo para SARS-COV2; G2: assintomáticos ou oligossintomáticos com teste positivo para o vírus; G3: sintomáticos hospitalizados moderados com diagnóstico positivo e G4: sintomáticos hospitalizados graves, também com teste molecular positivo para SARS-COV2; G5: convalescentes, testados previamente e confirmados positivos para o vírus, porém na ausência atual de sinais ou sintomas da COVID-19. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado pelos pacientes ou responsáveis e serão colhidos: - amostras de sangue venoso, - saliva - ou aspirado de fluido pulmonar - para processamento laboratorial referente ao presente projeto de pesquisa (alguns participantes controles terão também coleta de swab nasofaríngeo para diagnóstico molecular da infecção pelo vírus. G1, G2, G5: As amostras serão coletadas apenas uma vez, para a pesquisa. G3 e G4: terão sangue, saliva (apenas G3) coletados no momento da admissão no hospital e após 48h, repetindo-se a coleta uma vez a cada 7 dias, até o fim do período de internação. G4: sangue e aspirado de fluido pulmonar (apenas G4) coletados no momento da admissão no hospital e após 48h, repetindo-se a coleta uma vez a cada 7 dias, até o fim do período de internação. As amostras de sangue serão centrifugadas para obtenção de plasma e leucócitos (buffy coat). As células obtidas serão imediatamente congeladas

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcfrp.usp.br



**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-
FCFRP/USP**



Continuação do Parecer: 4.076.158

em Trizol, para posterior extração de RNA e análise transcriptômica de expressão gênica de receptores, fatores de transcrição, enzimas esteroidogênicas, citocinas e outros mediadores relacionados à resposta imunológica. No plasma serão quantificadas citocinas por ensaio multiplex, além de eicosanóides, hormônios esteróides, esfingolípídeos e ceramidas, por espectrometria de massa. Além disso, os perfis de N-glicanas nas Fcs de IgGs e anticorpos anti-carboidratos serão avaliados, para averiguar a correlação dos mesmos com os desfechos clínicos das infecções por SARS-COV2. Novas ferramentas biotecnológicas que permitam o estudo das relações entre o vírus, seus alvos celulares e anticorpos serão produzidas. Com estes resultados em conjunto, espera-se compreender mais profundamente a fisiopatologia da COVID-19, assim como estabelecer marcadores de evolução e morbidade da doença. A pesquisa descreve um número de 500 (quinhentos participantes) divididos em 5 (cinco) grupos com 100 (cem) participantes cada. Dependendo do resultado para o coronavírus e dos seus sintomas, o participante deverá doar sangue, saliva, secreção nasal/garganta e/ou pulmonar e participará de um dos seguintes grupos: - GRUPO 1: sangue e saliva; grupo de pessoas CONTROLE NEGATIVO, que são aquelas que não têm o coronavírus. E secreção coletada por cotonete da garganta e do nariz, se o participante não tem exame recente de COVID-19. - GRUPO 2: sangue e saliva; grupo de pessoas POSITIVO ASSINTOMÁTICO ou LEVE, que são aquelas que têm resultado positivo para COVID-19 e apresentam sintomas leves ou nenhum sintoma; - GRUPO 3: sangue e saliva; grupo POSITIVO MODERADO, que são aquelas pessoas que têm resultado positivo para COVID-19 e precisam de internação sem respirador; - GRUPO 4: sangue e fluido aspirado do pulmão; grupo POSITIVO GRAVE, que são aquelas pessoas que têm resultado positivo para COVID-19 e precisam de internação UTI com uso de respirador. - GRUPO 5: sangue e saliva; grupo POSITIVO CURADO, que são aquelas pessoas que tiveram resultado positivo para COVID-19 e que não apresentam nenhum sintoma e já passaram da fase de quarentena. Para participar da pesquisa o participante precisa ter mais que 12 anos de idade (para entrar nos grupos 3 ou 4) ou mais que 18 anos para os grupos 1, 2 e 5. O participante ou um representante poderão assinar o TCLE ou Termo de Assentimento. Como será a participação na pesquisa será: 1º) Responder um questionário, presencialmente ou por telefone. Ficar à vontade para responder honestamente as perguntas, porque as respostas serão mantidas em segredo. As perguntas serão sobre dados pessoais (nome, idade), hábitos de vida (fumo, bebida alcoólica, exercícios físicos), doenças existentes e uso de medicamentos. Neste dia os pesquisadores combinarão o dia e o lugar para colher o material biológico, ou autorizar usar os dados do prontuário médico (quando estiverem internados e impossibilitados de responder perguntas). 2º) Autorizar/doar uma amostra de sangue (16 ml para

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4862

E-mail: cep@fcfrp.usp.br



**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-
FCFRP/USP**



Continuação do Parecer: 4.076.158

os participantes do GRUPO 3 ou GRUPO 4 e 28 ml para os GRUPOS 1, 2 e 5). Essa quantidade é igual a duas colheres e meia de sopa ou pouco menos e, se o participante for dos GRUPOS 1, 2, 3 e 5 um pouco de saliva, que será coletada da boca com algodão. Se o participante for do GRUPO 4, também doará 20 ml de aspirado de fluido pulmonar, que é uma secreção que os médicos/enfermeiros retiram do pulmão de quem está intubado, para melhorar a respiração (essa secreção é retirada de rotina, independentemente da pesquisa e normalmente é descartada no lixo. Neste caso, será doada à pesquisa). 3º) Autorizar coleta, uma única vez, de secreção do nariz e da garganta com um cotonete, para exame de infecção pelo coronavírus, se o participante for GRUPO 1 e não tiver feito este exame recentemente. As coletas desses materiais biológicos serão realizadas por um profissional capacitado, usando material esterilizado e descartável. O número de vezes que o participante terá que doar material biológico dependerá do grupo que ele estiver: - GRUPOS 1, 2 e 5: participante doará uma única vez. - GRUPOS 3 e 4: participante doará nos seguintes momentos: no dia que estiver internado e receber o diagnóstico POSITIVO para o novo coronavírus, dois dias depois e uma vez por semana até sair do hospital.

FLUXO DE TRABALHO PARA OS GRUPOS G2 e G5 De forma geral, o fluxo de trabalho será o seguinte: • A) Haverá divulgação pública da pesquisa, via mídias eletrônicas (Facebook, Instagram e Whatsapp), para que participantes potenciais interessados em colaborar se manifestem. • B) Aqueles que tiverem interesse responderão, inicialmente, o formulário eletrônico disponível em <https://pt.surveymonkey.com/r/IMUNOCOVID> (Anexo: Questionário Online), que poderá ser acessado por meio da internet em aparelhos eletrônicos como smartphones, tablets e computadores. • C) Após estas respostas, aqueles que se enquadrarem nos requisitos da pesquisa e aceitarem participar, serão contatados pelo telefone informado no questionário online. • D) Nesta ligação, um pesquisador devidamente capacitado explicará ao participante da pesquisa os seguintes itens, de forma totalmente didática e compreensível: 1. O teor da pesquisa e sua finalidade; 2. Como a pesquisa beneficiará a sociedade; 3. A quantidade de material biológico a ser doada e como o procedimento é realizado; 4. A aplicação de questionário de hábitos, condições de saúde e aferição de sinais vitais. 5. Possíveis desconfortos gerados pelos procedimentos; 6. A não oneração de quaisquer custos para o participante, voluntariedade e ausência de benefícios monetários ou hospitalares por parte dos pesquisadores; 7. Não haverá problemas à continuidade do atendimento médico caso não queira participar. 8. O sigilo absoluto em todos os âmbitos da pesquisa e nosso compromisso com este item; 9. Leitura do TCLE na íntegra e aceite dos termos sem assinatura momentânea; 10. Esclarecimento de eventuais dúvidas e agendamento das coletas e assinatura do TCLE. • E) Após estas explicações e, caso o participante concorde, procederemos à

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcfrp.usp.br



**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-
FCFRP/USP**



Continuação do Parecer: 4.076.158

aplicação de um questionário complementar (Anexo: Questionário Geral). • F) Após a conversa e aplicação do Questionário Geral via telefone, a coleta de material biológico e assinatura do TCLE realizar-se-ão no dia e horário acordados com o participante. Nesta visita domiciliar, algumas observações importantes realizadas em domicílio deverão complementar o preenchimento do Questionário Geral. Alternativamente, será feita outra busca ativa por participantes, independentemente da divulgação em mídias sociais. Para tal, serão avaliados os relatórios gerados pelo setor de Vigilância Epidemiológica da Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto e acesso aos prontuários via sistema Hygia (após as devidas autorizações), para localização e contato telefônico com pacientes sabidamente diagnosticados positivos para SARS-COV2, atendidos nas Unidades Básicas de Saúde. Em sequência, os passos da pesquisa serão os mesmos listados acima, nos itens D, E e F. Os participantes do grupo G1 serão recrutados no Campus USP, conforme descrito no projeto de pesquisa, mas também deverão responder às questões do Questionário Geral e serem testados por swab nasofaríngeo para SARS-COV2, caso não apresentem testagem recente para o vírus.

Os questionários compreendem a coleta de dados pessoais e informações clínico-laboratoriais conforme descritos no TCLE.

As amostras de material biológico colhidas serão:

COLETAS DE MATERIAL BIOLÓGICO dos grupos: G1, G2 e G5

Sangue - Serão coletados no total 28mL de sangue dos participantes via acesso venoso por um profissional capacitado, sendo:

- 4mL referentes a 1 tubo de citrato de sódio para coagulograma;
- 8mL em 2 tubos (de 4 mL cada) de EDTA para ensaios específicos da pesquisa;
- 4mL em EDTA destinado ao SAC (para hemograma e hemoglobina glicada);
- 4mL em 1 tubo de ativador de coágulo com gel separador, para dosagens bioquímicas;
- 4mL em 1 tubo heparinizado para dosagem de citocinas e outros mediadores
- 4mL em 1 tubo de gel separador de coágulo, também destinado a ensaios específicos da pesquisa.

Saliva - A saliva será coletada por meio de Salivette®, que consiste na introdução de um algodão totalmente estéril na boca do paciente sob a produção de saliva, suficiente para umedecer o algodão. A coleta do algodão da boca do participante será realizada com auxílio de gaze estéril

Endereço: Avenida do Café s/nº		
Bairro: Monte Alegre		CEP: 14.040-903
UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO	
Telefone: (16)3315-4213	Fax: (16)3315-4892	E-mail: cep@fcrp.usp.br



**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-
FCFRP/USP**



Continuação do Parecer: 4.076.158

para Salivette®, o qual será identificado e armazenado em gelo e encaminhado ao laboratório de pesquisa para processamento.

COLETAS DE MATERIAL BIOLÓGICO G3 E G4

Sangue - Serão coletados no total 16 mL de sangue de pacientes via acesso venoso por um profissional capacitado, sendo:

- 8 mL referentes a 2 tubos de EDTA
- 4 mL em 1 tubo com gel ativador de coágulo
- 4 mL em 1 tubo de heparina

Saliva - A saliva será coletada por meio de Salivette®, que consiste na introdução de um algodão totalmente estéril na boca do paciente sob a produção de saliva, suficiente para umedecer o algodão. A coleta do algodão da boca dos participantes dos grupo G3 será realizada com auxílio de gaze estéril para Salivette®, o qual será identificado e armazenado em gelo e encaminhado ao laboratório para processamento. Não haverá coleta de saliva de G4, devido às condições de intubação dos pacientes.

Aspirado de Fluido Pulmonar (AFP) - Estas amostras de fluido pulmonar são obtidas rotineiramente via aspiração por cateter traqueal por profissional capacitado e usualmente descartadas. Portanto, no dia da coleta hospitalar de sangue para a pesquisa, estas amostras de AFP que seriam descartadas, APENAS dos pacientes G4 em estado de intubação, serão acondicionadas em tubos cônicos estéreis para obtenção de macrófagos e estudos do muco. Sendo assim, aproximadamente 20 mL de AFP serão identificados e armazenados em gelo, seguido por encaminhamento ao laboratório para processamento. Esta amostra será obtida apenas uma vez durante o período de internação de G4. O AFP será processado dentro de 2 horas após a coleta e todas as operações serão realizadas em um laboratório NB-2. Após a passagem do AFP em um filtro de células de nylon de 100 µm para remover aglomerados e detritos, o sobrenadante será centrifugado e as células serão ressuspensas em meio completo RPMI 1640 resfriado. Em seguida, as células serão contadas em azul de tripan a 0,4%, centrifugadas e ressuspensas a uma concentração de 2×10^6 /mL para posterior utilização.

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-903
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-4213 Fax: (16)3315-4892 E-mail: cep@fcrp.usp.br



**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-
FCFRP/USP**



Continuação do Parecer: 4.076.158

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os seguintes documentos foram anexados: Declarações de Ciência e Compromisso Ético dos Pesquisadores da equipe listados no formulário da Plataforma Brasil; anuência da Santa Casa de Ribeirão Preto; nova versão do projeto; nova versão de TCLE; Declarações de responsabilidade e compromisso sobre devolutiva de exames aos pacientes/voluntários assinadas pelas Profas Dra Angelina Lettiere Viana e Ana Paula Moraes Fernandes; nova folha de rosto; compêndio descrevendo os procedimentos e coletas de dados e exames em cada grupo de participantes; questionários para divulgação pública e convite para participar da pesquisa; questionário aos participantes da pesquisa dos grupos G1, G2 e G5; questionário aos participantes da pesquisa dos grupos G3 e G4; Documento nomeado CompendioFINAL, que apresenta detalhadamente o fluxo de trabalho e os exames laboratoriais realizados.

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

-

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) em sua 197ª reunião extraordinária, de acordo com o Comunicado SEIMS-0014765796, de 09 de maio de 2020, que trata das orientações da CONEP para condução de pesquisas e atividade dos CEP durante a pandemia provocada pelo coronavírus SARS-COV-2 (COVID-19), em seu item 2.2.1. "Os demais protocolos de pesquisa relativos ao SARS-COV-2 (COVID-19), que não se enquadram nos novos critérios estabelecidos pela CONEP (item 2.1.), devem ser analisados SOMENTE nos CEP de origem.

Em atendimento às Resoluções vigentes, deverá ser encaminhado ao CEP/FCFRP, através da Plataforma Brasil, o relatório final da pesquisa conforme modelo de Relatório aprovado pelo CEP, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção da mesma. Informamos que, de acordo com a Resolução 466/12, item IV.5, letra d, o TCLE deve "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha". O TCLE

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcfrp.usp.br



**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-
FCFRP/USP**



Continuação do Parecer: 4.079.159

deve ser apresentado ao participante da pesquisa em documento impresso frente e verso e as assinaturas não devem ficar em folhas separadas do texto do TCLE. Cabe ao pesquisador responsável manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	CompendioFINALResubmis.pdf	08/06/2020 14:34:21	Cleni Mara Marzocchi Machado	Aceito
Outros	Aprova_CAPP_final.pdf	05/06/2020 22:19:45	Cleni Mara Marzocchi Machado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	AssentimentoADENDO2.pdf	05/06/2020 22:18:18	Cleni Mara Marzocchi Machado	Aceito
Outros	Aprovacao_CAPP.pdf	02/06/2020 20:45:53	Cleni Mara Marzocchi Machado	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1564214_E1.pdf	01/06/2020 21:35:27		Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaJonatanCarvalho.pdf	01/06/2020 18:47:10	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Outros	HygiaVigilanciaEpidemiologica.pdf	01/06/2020 18:38:58	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjCOVID_ADENDO_FINAL.pdf	01/06/2020 18:35:31	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaVinicius.pdf	01/06/2020 18:05:10	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaVanila.pdf	01/06/2020 18:01:30	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaNicola.pdf	01/06/2020 18:00:48	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaMarcelo.pdf	01/06/2020 18:00:31	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaLilian.pdf	01/06/2020 18:00:14	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaKAMILA.pdf	01/06/2020 17:59:55	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaIsabelle.pdf	01/06/2020 17:52:20	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuenciaGilberto.docx	01/06/2020 17:52:04	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcfrp.usp.br



**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-
FCFRP/USP**



Continuação do Parecer: 4.076.158

Declaração de Pesquisadores	AnuenciaFabiani.doc	01/06/2020 17:51:47	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaElixa.pdf	01/06/2020 17:51:12	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaCassia.pdf	01/06/2020 17:48:23	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaAugusto.pdf	01/06/2020 17:48:03	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaAngelina.pdf	01/06/2020 17:47:47	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaAnaPaulaMoraesFernandes.pdf	01/06/2020 17:47:32	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaThais.pdf	01/06/2020 17:47:16	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaNayore.docx	01/06/2020 17:47:04	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaLuanaUfscar.docx	01/06/2020 17:46:46	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ANUENCIAJamilie.docx	01/06/2020 17:46:29	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaIngrydCarmona.pdf	01/06/2020 17:46:12	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaGiovanna.pdf	01/06/2020 17:45:54	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaCaroline.pdf	01/06/2020 17:44:10	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaANGELO.pdf	01/06/2020 17:42:40	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaAnaFlavia.pdf	01/06/2020 17:40:56	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaAnaCarolinaXavier.pdf	01/06/2020 17:40:31	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaSandra.docx	01/06/2020 17:40:12	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Outros	CompendioFINAL.docx	01/06/2020 17:39:37	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	Carta_Encaminhamento_CEP.pdf	01/06/2020 17:34:46	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Outros	ANAPAUULA_termo_responsabilidade.pdf	01/06/2020 17:32:46	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Outros	Angelina_termo_responsabilidade.pdf	01/06/2020 17:31:05	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoNOVAassinada.pdf	01/06/2020 17:30:12	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcfrp.usp.br



**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-
FCFRP/USP**



Continuação do Parecer: 4.076.158

Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaSANTACASA.pdf	01/06/2020 17:29:04	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_final.docx	01/06/2020 17:23:18	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	AssentimentoADENDO.pdf	01/06/2020 17:21:17	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Outros	Questionario_online_Chamada_Publica.pdf	01/06/2020 17:19:29	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Outros	QuestionarioG3G4.pdf	01/06/2020 17:17:07	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Outros	QuestionarioG1G2G5.pdf	01/06/2020 17:02:55	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Cronograma	Cronograma_de_exec.docx	01/06/2020 16:59:27	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_Hospital.pdf	05/04/2020 17:32:02	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura.pdf	05/04/2020 17:27:14	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CamilaN.pdf	05/04/2020 17:23:01	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaIsabel.pdf	05/04/2020 17:08:47	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Omar_equipe.pdf	05/04/2020 17:05:00	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Fernando.pdf	05/04/2020 17:04:33	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Pedro.pdf	05/04/2020 17:04:08	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Lucia.pdf	05/04/2020 17:03:55	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Cristina.pdf	05/04/2020 17:03:42	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Carlos.pdf	05/04/2020 17:03:14	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Camila.pdf	05/04/2020 16:59:04	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
Declaração de Manual de Material Biológico / Biorrepositório /	criacao_biorrepositorio.pdf	05/04/2020 16:56:03	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-903

UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213 Fax: (16)3315-4802 E-mail: cep@fcfrp.usp.br



USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-
FCFRP/USP



Continuação do Parecer: 4.076.158

Biotanco	crisato_biorrepositorio.pdf	05/04/2020 16:56:03	Cristina Ribeiro de Barros Cardoso	Aceito
----------	-----------------------------	------------------------	---------------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

RIBEIRÃO PRETO, 08 de Junho de 2020

Assinado por:

Cleni Mara Marzocchi Machado
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fctfp.usp.br

