

Ariane Cesario Lima

**Prevalência e reatividade cruzada entre SARS-CoV-2 e HCoVs
endêmicos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Keity Souza Santos

São Paulo

2023

Ariane Cesario Lima

**Prevalência e reatividade cruzada entre SARS-CoV-2 e HCoVs
endêmicos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Keity Souza Santos

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Ariane Cesario
Prevalência e reatividade cruzada entre SARS-CoV-2 e HCoVs endêmicos / Ariane Cesario Lima. -- São Paulo, 2023.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientadora: Keity Souza Santos.

Descritores: 1.Coronavírus sazonais 2.COVID-19
3.Imunidade humoral 4.Reatividade cruzada 5.Proteína RBD

USP/FM/DBD-287/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Esta dedicatória é uma pequena forma de expressar minha gratidão a Deus, aos meus pais.

DEDICATÓRIA

Dedico estas palavras com profunda gratidão a Deus e aos meus amados pais, cujo amor, apoio e orientação têm sido os pilares inabaláveis da minha jornada de aprendizado. Também desejo expressar minha sincera gratidão ao meu grupo de estudo, uma equipe brilhante e comprometida, cuja colaboração e dedicação têm sido fundamentais na minha busca pelo conhecimento.

Agradeço a Deus, fonte de toda sabedoria e inspiração, por guiar meus passos e iluminar meu caminho em cada etapa do meu percurso acadêmico. Sua graça e misericórdia me fortaleceram e me deram a coragem necessária para enfrentar desafios, superar obstáculos e continuar em busca da excelência.

Aos meus queridos pais, minha gratidão é imensurável. Vocês são os heróis silenciosos que têm estado ao meu lado, oferecendo amor incondicional, encorajamento constante e um apoio inabalável. Vocês foram os primeiros a acreditar em mim e me mostraram que tudo é possível quando se tem determinação e apoio familiar. Sou verdadeiramente abençoado por tê-los como meus pais e sou eternamente grato por tudo o que fizeram e continuam a fazer por mim.

Agradeço ao Dr. Jorge Kalil pelo acolhimento no Laboratório de Imunologia, Dra. Keity por aceitar me orientar, ao Heraldo Possolo de Souza por ter cedido as amostras e a fundação CAPES pelo apoio financeiro.

“Existem muitas hipóteses
em ciência que estão erradas. Isso é
perfeitamente aceitável, elas são a abertura
para achar as que estão certas.”

Carl Sagan

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de “International Committee of Medical Journals Editors” (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documento. Guia de apresentação de dissertações, tese e monografias. Elaborada por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação;2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Classificação dos Coronavírus SARS-CoV-2	18
1.2	Estrutura Viral	19
1.3	Genoma e Replicação Viral.....	21
1.4	Coronavírus Endêmicos	23
1.5	Coronavírus Emergentes	24
1.6	Vetores animais.....	27
1.7	Epidemiologia.....	29
1.8	Imunologia da Infecção por Coronavírus	30
1.8.1	Resposta humoral	33
1.8.2	Reatividade Cruzada de Anticorpos	35
2	JUSTIFICATIVA.....	37
3	OBJETIVOS.....	38
3.8	Objetivo Geral	38
3.9	Objetivos Específicos	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.8	Casuística	39
4.2	Amostras.....	39
4.3	Proteínas de Coronavírus Endêmicos	39
4.4	ELISA.....	40
4.6	Análise estatística	41
5	RESULTADOS	42
5.1	Dados Demográficos.....	42
5.2	Prevalência dos Coronas Vírus endêmicos.	44
5.3	Comparação entre anticorpos anti-HCoVs e anti-SARS-CoV-2.....	46

5.4 Correlação entre títulos de anticorpos contra SARS-CoV-2 e Coronas Endêmicos.....	47
5.5 Níveis de anticorpos e desfechos clínicos	50
6 DISCUSSÃO.....	55
7 CONCLUSÃO	58
8 REFERÊNCIAS	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcento
+ssRNA	RNA de fita simples
<	menor que
>	maior que
≥.	maior ou igual
°C.	grau Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
Alfa-CoV	<i>Alphacoronavirus</i>
APCs.	do inglês – <i>Antigen-Presenting Cell</i>)
APN.	aminopeptidase N
Beta-CoV	<i>Betacoronavirus</i>
CoV	coronavírus
COVID-19	do inglês, coronavirus disease 19
CTL.	do inglês – <i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>
DAMP.	do inglês, damage-associated molecular patterns
DC.	inglês – <i>Dendritic Cells</i>
Delta-CoV	<i>Deltacoronavirus</i>
DNA.	ácido desoxirribonucleico
DO.	densidade ótica
DPP-4.	receptor dipeptidil peptidase 4
ECA2.	enzima conversora da angiotensina II
ELISA.	do inglês, enzyme-linked immunosorbent assay
Gama-CoV	<i>Gammacoronavirus</i>
H2SO4	ácido sulfúrico
HCFMUSP.	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCoV.	do inglês <i>Human Coronaviruses</i>
HE.	hemaglutinina-esterase
ICB.	Instituto de Ciências Biomédicas
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

IFN.	interferon
IgA.	imunoglobulina tipo A
IgG.	imunoglobulina tipo G
IgM.	imunoglobulina tipo M
IL.	interleucinas
IRAs	infecções respiratórias agudas
IRF3.	fator regulador interferon 3
KDa.	Quilodalton
Mers COV	do inglês, Middle East Respiratory Syndrome (Síndrome respiratória do
Mg.	miligrama
mg/mL.	miligrama por mililitro
MHC.	do inglês, major histocompatibility complex
min.	minutos
miRNA.	micro RNA
mL.	mililitro
mm.	milímetro
mM.	milimolar
mRNA.	RNA mensageiro
nAb.	anticorpos neutralizantes
nm.	nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD.	do inglês, o-Phenylenediamine dihydrochloride
ORF.	do inglês, Open Reading Frame
PAMP.	do inglês, pathogen-associated molecular patterns
PBS.	tampão fosfato salino
pH.	potencial de hidrogênio
Pp.	poliproteínas
RBD.	do inglês – <i>Receptor Binding Domain</i>
RNA.	ácido ribonucleico
RPM.	rotações por minuto
RTC.	do inglês – <i>Replication-Transcription Complex</i>
RT-qPCR.	PCR em tempo real com transcrição reversa

s.	segundos
S1	subunidade S1
S2	subunidade S2
Sars	do inglês, Severe Acute Respiratory Syndrome
SDRA.	síndrome do desconforto respiratório agudo
ssRNA.	do inglês – <i>single-stranded RNA</i>
STAT1.	fator de transcrição ativador de sinal transdutor e ativador de transcrição 1
TMPRSS.	proteína transmembrana serina protease 2
UTI	unidades de terapia intensiva
WHO	do inglês, World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomia dos Coronavírus	19
Figura 2. Estrutura do Coronavírus	20
Figura 3. Estrutura da proteína Spike	21
Figura 4. Organização gnômica dos Coronavírus	22
Figura 5 As origens e hospedeiros intermediários dos Coronavírus que infectam humanos	29
Figura 6. Tempo de sobrevida de pacientes internados com Covid19	44
Figura 7. Frequência dos HCoVs	45
Figura 8. Frequência de positividade de HCoVs por idade.	46
Figura 9. Análise entre os títulos de anticorpos de Sars CoV 2 e coronavírus endêmicos.	47
Figura 10. Correlação entre anticorpos IgG RBD de Sars CoV 2 e HCoVs.	49
Figura 11. Comparação de anticorpos IgG RBD para HCoVs em grupos com diferentes desfechos clínicos	51
Figura 12. Análise entre a razão dos títulos de anticorpos anti Sars CoV 2 para HCoVs, conforme seu desfecho clínico	53
Figura 13. Comparação entre anticorpos IgG RBD dos HCoVs, nos diferentes desfechos clínicos.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 HCoV s e seus receptores, sintomas e períodos de incubação.	27
Tabela 2. Similaridade entre as sequências de aminoácidos de HCoV s e o SARS-CoV-2	35
Tabela 3. Dados demográficos da coorte em estudo.	42
Tabela 4. Média de idades entre gêneros e o desfecho clínico	43
Tabela 5. Comparação entre os títulos de anticorpos contra IgG RBD para SARS CoV 2, entre os variados desfechos clínicos.	50

RESUMO

Lima, AC. Prevalência e reatividade cruzada entre SARS-CoV-2 e HCoVs endêmicos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Os coronavírus são conhecidos desde a década de 1960. Até hoje, existem sete coronavírus conhecidos capazes de infectar humanos: OC43, HKU1, NL63 e 229E. Esses geralmente causam sintomas de resfriado comum, principalmente em períodos de inverno. O Mers-CoV e o Sars-CoV causaram surtos controlados em alguns países. No entanto, no final de 2019, surgiu uma nova variante na China, chamada de Sars-Cov-2. Em pouco tempo, o vírus se espalhou pelo mundo, tornando-se uma pandemia. A infecção por Sars-CoV-2 pode levar a diferentes desfechos clínicos em humanos, desde casos assintomáticos até infecções graves. Ainda não está claro quais são os fatores que podem levar a um prognóstico pior da doença. Portanto, nosso objetivo foi entender os mecanismos humorais que levam a diferentes desfechos e o papel dos coronavírus endêmicos na doença COVID-19. Para isso, utilizamos amostras de 252 indivíduos internados no Hospital das Clínicas em São Paulo. Comparamos os títulos de anticorpos IgG RBD entre o Sars-CoV-2 e os HCoVs. Constatamos que infecções prévias por coronavírus endêmicos não influenciam o desfecho final da doença COVID-19. No entanto, é importante ressaltar que mais estudos são necessários para uma compreensão completa dos fatores que contribuem para a gravidade da doença. Nossas descobertas fornecem um insight inicial sobre o papel dos coronavírus endêmicos, mas mais pesquisas são essenciais para corroborar esses resultados e ajudar no desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e tratamento para a COVID-19.

Palavras-chave: Coronavírus Sazonais. COVID-19. Imunidade Humoral. Reatividade Cruzada. Proteína RBD

ABSTRACT

Lima, AC. Prevalence and cross-reactivity between SARS-CoV-2 and endemic HCoVs [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Coronaviruses have been known since the 1960s. To date, there are seven known coronaviruses capable of infecting humans: OC43, HKU1, NL63, and 229E. These often cause symptoms of the common cold, especially in winter periods. Mers-CoV and Sars-CoV have caused controlled outbreaks in some countries. However, at the end of 2019, a new variant emerged in China, called Sars-Cov-2. Before long, the virus spread across the world, becoming a pandemic. Sars-CoV-2 infection can lead to different clinical outcomes in humans, from asymptomatic cases to severe infections. It is still not clear what are the factors that can lead to a worse prognosis of the disease. Therefore, our aim was to understand the humoral mechanisms that lead to different outcomes and the role of endemic coronaviruses in the COVID-19 disease. For this, we used samples of 252 individuals hospitalized at the Hospital das Clínicas in São Paulo. We compared IgG RBD antibody titers between Sars-CoV-2 and HCoVs. We found that previous endemic coronavirus infections do not influence the final outcome of the COVID-19 disease. However, it is important to emphasize that more studies are needed for a complete understanding of the factors that contribute to the severity of the disease. Our findings provide initial insight into the role of endemic coronaviruses, but further research is essential to corroborate these results and help develop effective prevention and treatment strategies for COVID-19.

Keywords: Seasonal Coronavirus. COVID-19. Humoral Immunity. Cross Reactivity. RBD protein.

1 INTRODUÇÃO

Coronavírus são vírus envelopados de RNA de fita simples com polaridade positiva que causam infecções respiratórias e intestinais em uma variedade de animais, inclusive em humanos. Esses vírus, a princípio, não foram considerados altamente patogênicos para humanos, sendo, em geral, sazonais e associados a síndromes gripais. Porém, nos últimos 20 anos, dois coronavírus foram responsáveis por epidemias virulentas de síndrome respiratória aguda grave (SARS, do inglês – *Severe Acute Respiratory Syndrome*), em Hong Kong (China), em 2003, denominada SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*) e na Arábia Saudita em 2012, denominada MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*)(1, 2).

Em 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou estado de pandemia causada por um novo tipo de coronavírus. Esse novo vírus foi primeiramente detectado em dezembro de 2019 em Wuhan, na China (1) e após análise genômica de amostras de pacientes com pneumonia de causa desconhecida na cidade de Hubei, China, este novo coronavírus foi identificado (1, 2). Denominado SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), devido à semelhança com outro vírus da mesma família, a doença respiratória aguda causada por este novo vírus foi denominada COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*) (3).

O SARS-CoV-2 se espalhou rapidamente pelo mundo, sobrecarregando os sistemas de saúde, principalmente as unidades de terapia intensiva (UTIs), o que levou à uma taxa de mortalidade mais alta do que o esperado. As infecções respiratórias agudas (IRAs) são característica de coronavírus em geral e, por definição, são divididas em infecções do trato respiratório superior, que afetam as vias aéreas nasais, laringe e faringe, e infecções do trato respiratório inferior, que atingem os brônquios, traqueia e alvéolos (4).

As IRAs são responsáveis por inúmeras internações hospitalares e alta taxa de morbidade, sendo os idosos e as crianças os mais acometidos pela doença. Segundo a OMS, aproximadamente 2,6 milhões de crianças menores de cinco anos morrem em decorrência de complicações causada por infecções respiratórias (5, 6). Em geral, os agentes causadores de IRAs são bactérias e vírus como adenovírus, rinovírus, enterovírus, vírus da parainfluenza e coronavírus, sendo este último

responsável por cerca de 10% dos casos (4). Além de infecções em humanos, os coronavírus também são responsáveis por afetarem animais de criação e domésticos, tornando-o também de interesse veterinário ((7).

1.1 Classificação dos Coronavírus SARS-CoV-2

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), os coronavírus (CoVs) pertencem a ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, a qual é composta de duas subfamílias: *Torovirinae*, cujos gêneros infectam suínos, bovinos e equinos e *Coronavirinae*, composta por quatro gêneros: *Alphacoronavirus* (Alfa-CoV), *Betacoronavirus* (Beta-CoV), *Deltacoronavirus* (Delta-CoV) e *Gammacoronavirus* (Gama-CoV) (Figura 1) (8, 9).

Os vírus do gênero *Alphacoronavirus*, infectam mamíferos como felinos, suínos, morcegos e outros animais silvestres e dentro desse grupo se destacam os coronavírus humanos HCoV-229E e HCoV-NL63. O gênero *Betacoronavirus*, também podem infectar mamíferos, e é o gênero que possui o maior número de vírus que infectam humanos, sendo eles, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV 2. Já os gêneros *Gamma* e *Deltacoronavirus*, podem infectar aves, baleias e porcos (7, 10).

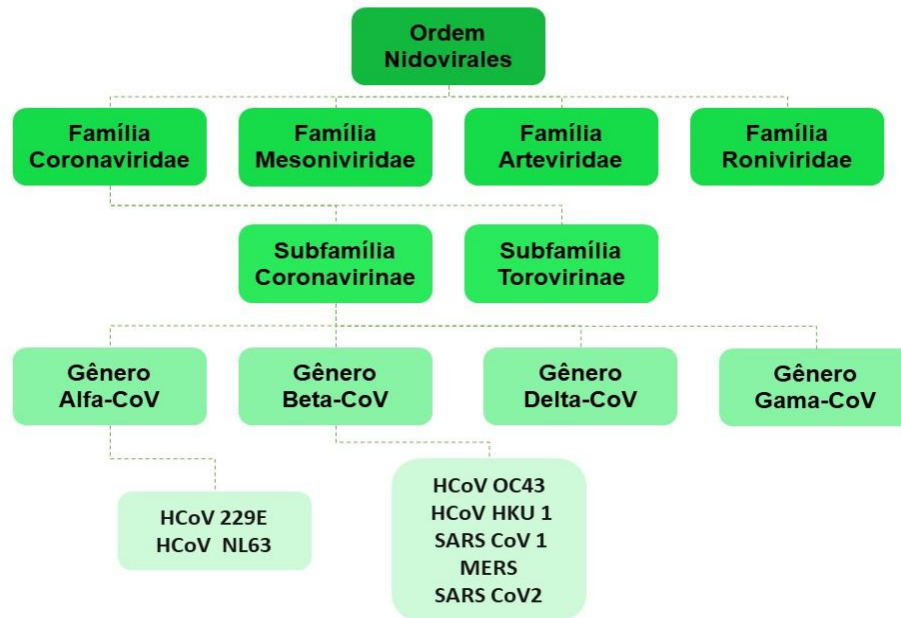


Figura 1 dos Coronavírus

FONTE: Adaptado de 12

NOTA: Este diagrama é a representação simplificada da árvore genealógica dos coronavírus, entre os gêneros *Alpha* (Alfa-CoV) e *Betacoronavirus* (Beta-CoV), estão em destaque os coronavírus capazes de infectar humanos.

1.2 Estrutura Viral

Os coronavírus são pleomórficos e possuem formato esférico com diâmetro que pode variar de 50 a 200 nm. São assim chamados por possuírem na sua membrana projeções que se assemelham a uma coroa (do latim, *corona*) ((11). São vírus de fita simples de RNA sentido positivo. Esse RNA possui a extremidade 5' capeada (Cap 5') e uma cauda de adeninas (poli A) na extremidade 3', e codifica proteínas estruturais e não estruturais (12). O conjunto de proteínas estruturais é composto por: proteína de membrana (M), proteína do envelope viral (E), proteína do nucleocapsídeo (N) e a proteína *Spike* (S), e, em algumas espécies de *Betacoronavirus*, a proteína hemaglutinina-esterase (HE) também é codificada (Figura 2)(13).

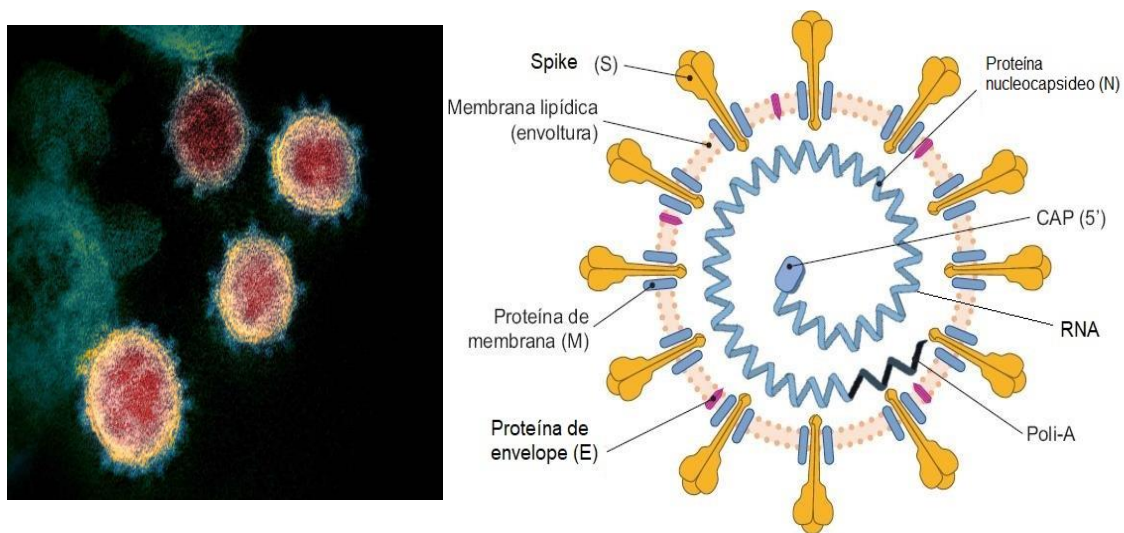


Figura 2. Estrutura do Coronavírus

FONTE: Adaptado de 16

NOTA: Em A), imagem do vírus feita pelo *NIAID Rocky Mountain Laboratories (RML)*, U.S. NIH (domínio público) usando microscopia eletrônica de varredura. Em B), representação do vírion, em que se observa a proteína *Spike (S)*, a proteína de membrana (*M*), a proteína de envelope (*E*), a proteína de nucleocápsideo (*N*), a qual envolve o RNA e o detalhamento da cauda poli A na extremidade 3' e a proteção Cap na extremidade 5'.

A proteína N possui formato helicoidalmente simétrico e é constituída por monômeros com cerca de 43 a 50 KDa. Tem como principal função proteção e estabilização do RNA viral, sendo também responsável pela formação de complexos de ribonucleoproteínas helicoidais (14).

A proteína M, é a proteína mais abundante e é composta por monômeros que variam entre 25 a 30kDa. Ela possui três domínios que se projetam através do envelope viral, pode se ligar ao complexo de Golgi da célula hospedeira, auxiliando a formação de novos vírus, e participa da fusão entre a membrana viral e a célula hospedeira (15, 16).

A proteína E consiste em um polipeptídeo de 8 a 12 KDa, que contribui para a montagem das partículas virais no complexo de Golgi (17) e na patogenicidade do vírus (18).

A proteína (HE, presente em alguns Beta-CoV, é responsável por aumentar a virulência e auxiliar na inserção e liberação do vírus na membrana da célula hospedeira (10).

A proteína S está ligada a membrana do vírus, tendo em média de 128 a 160kDa. Ela é responsável por se ligar com o receptor da célula hospedeira, e permitir a entrada do vírus na célula alvo (19). Por ser uma proteína de ligação ao hospedeiro e estar exposta na membrana do vírus, ela é utilizada como principal alvo para o desenvolvimento de medicamentos, vacinas e anticorpos monoclonais (18). A proteína Spike é composta por 2 subunidades, a subunidade S1, que se liga ao receptor da célula hospedeira por um domínio de ligação ao receptor (RBD, do inglês – *Receptor Binding Domain*) localizado em sua extremidade distal, e a subunidade S2, que causa a fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira através da clivagem mediada pelas proteases da célula do hospedeiro, processo que ocorre após a ligação do RBD ao receptor celular (Figura 3) (20, 21).

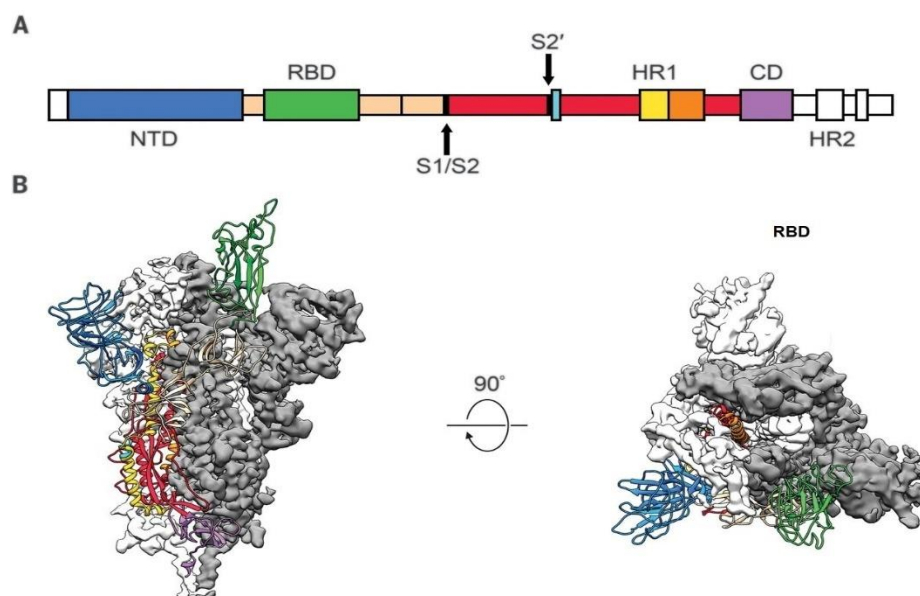


Figura 3. Estrutura da proteína Spike

FONTE: Adaptado de 27

NOTA: Em A), sequência da proteína *Spike* (S), em que as setas pretas representam locais de clivagem da proteína para fusão da membrana viral e da célula hospedeira. Em B), representação da proteína Spike e da sua porção RBD (22).

1.3 Genoma e Replicação Viral

Os coronavírus possuem o maior genoma entre os vírus de RNA positivo, com 27 a 31 kb. Sua fita de RNA é não segmentada, policistrônica e, como dito anteriormente, possui em sua porção terminal 5' proteção Cap e uma cauda poli A em sua região terminal 3' (23, 24). Os genomas dos diferentes coronavírus possuem

organizações semelhantes, em que os dois terços mais próximos da região 5' possuem dois grandes quadros de leitura (ORFs, do inglês – *Open Reading Frames*), ORF1a e ORF1b, usados para codificar proteínas envolvidas na síntese do RNA viral, e o terço do seu genoma mais próximo da porção 3' contém os genes necessários para a produção de suas proteínas estruturais e suas proteínas acessórias (25, 26).

As ORFs codificam duas poliproteínas: pp1 e pp1ab. Estas proteínas são clivadas para produzir 16 proteínas não estruturais, que formam um complexo que atua na replicação e transcrição viral (27). Na região 3' estão os genes que codificam proteínas estruturais e, intercalados a eles, estão os genes que codificam proteínas acessórias, as quais se acredita terem papel fundamental para a patogenicidade dos vírus e a modulação da resposta imunológica do hospedeiro (figura 4) (28).

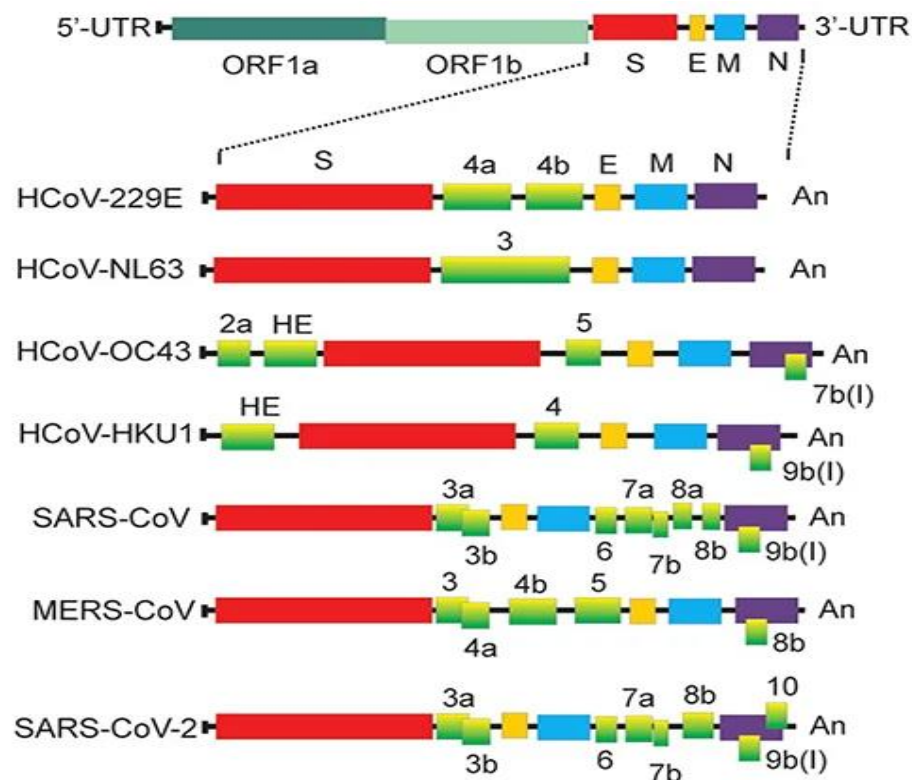


Figura 4. Organização genômica dos Coronavírus

FONTE: Adaptado de 36

NOTA: Representação esquemática dos genomas dos 7 coronavírus que infectam humanos. Os dois quadros de leitura, ORF1a e ORF1b, estão próximos à região 5' e as proteínas estruturais estão destacadas: *Spike* (S), Envelope (E), Membrana (M) e Nucleocapsídeo (N). O detalhamento mostra as proteínas acessórias intercaladas em verde e a hemaglutinina esterase presente em dois deles.

Os vírus podem entrar na célula de duas formas, por meio da interação entre o receptor celular e a proteína *Spike*, em que ocorre a clivagem da porção S2 da proteína ou, com auxílio de uma serina protease celular TMPRSS2 (proteína transmembrana serina protease 2), ocorre a fusão da membrana viral com a membrana da célula infectada, ou por via endocítica, em que após a ligação da proteína *Spike* ao receptor da célula hospedeira, as furinas e catepsinas acidificam o pH da célula e, com isso, o vírus entra na célula por endocitose (29).

A replicação viral se inicia logo após a entrada do vírus na célula hospedeira, quando o material genético é liberado no citoplasma da célula. Por ser de polaridade positiva o RNA viral age como um mRNA, que utilizaribossomos do hospedeiro para tradução das suas proteínas. As duas ORFs na porção 5', produzem as duas poliproteínas que, após o processamento por proteases virais como poliovírus 3C-like e *papain-like*, geram as 16 proteínas não estruturais que participam da formação do complexo RNA replicase-transcriptase (RTC, do inglês – *Replication-Transcription Complex*). Os RTC têm diversas funções, entre elas inibir a tradução de proteínas do hospedeiro, interação com proteínas ribossomais que levam a degradação do do mRNA da célula hospedeira e formar na membrana do retículo endoplasmático vesículas denominadas de membrana dupla, onde são transcritos os RNAs subgenômicos que dão origem às proteínas estruturais e acessórias. Esse material é levado ao complexo de Golgi onde ocorre a montagem do vírus,e, subsequentemente, a liberação do vírion por exocitose (30, 31).

1.4 Coronavírus Endêmicos

Atualmente, são conhecidos sete coronavírus que podem infectar humanos (HCoV, do inglês *Human Coronaviruses*), dos quais dois pertencem ao gênero Alfa-CoV, NL63 e 229E, e cinco pertencem ao gênero Beta-CoV, HKU1, OC43, SARS-CoV, MERS-CoV e o mais recente SARS-CoV 2 (24). Quatro HCoVs (229E, OC43, NL63 e HKU1) são globalmente distribuídos (32) e acredita-se que sejam responsáveis por aproximadamente 30% dos resfriados comuns (24).

O Alfa-CoV 229E foi o primeiro a ser descoberto em 1966 em amostras de secreções nasais de estudantes de medicina com sintomas de resfriado na cidade

de Chicago (USA) (33). O HCoV 229E causa infecção do trato respiratório superior, sendo os principais sintomas dores de cabeça, febre e coriza, muito semelhante aos sintomas da gripe comum. Embora apenas 10 a 20% dos pacientes infectados apresentem sintomas, este coronavírus oferece maior grau de perigo a indivíduos imunocomprometidos e crianças, nos quais a infecção respiratória pode se tornar grave. Seu período de incubação é de 2 a 5 dias e para adentrar as células, o 229E utiliza o receptor celular APN (aminopeptidase N), presentes nas células das vias respiratórias e gastrointestinais (Tabela 1) (34).

O Beta-CoV OC43 foi descoberto em 1967, a partir de amostras de nasofaringe de pacientes com sintomas gripais (35), semelhante ao 229E, causa sintomas gripais leves. Seu período de incubação é de 3 a 5 dias (36) e ainda não se sabe a qual receptor celular este Coronavírus se liga para adentrar a célula hospedeira (32).

Em 2004, outro coronavírus foi descoberto em amostras de aspirado nasofaríngeo de crianças que sofriam de bronquite na Holanda, denominado de New Haven, NL63 (37). Este vírus pertence ao gênero dos Alfa-CoV e, assim como o SARS-CoV, utiliza a proteína ECA2 (enzima conversora da angiotensina II) para entrar nas células hospedeiras (12). Com um período de incubação de 2 a 4 dias, geralmente causa sintomas gripais leves, porém em idosos, crianças e imunossuprimidos pode levar a quadros de infecções brandas do trato respiratório inferior (32).

Em 2005, o coronavírus HKU1 foi detectado em amostras de pacientes idosos com pneumonia em Hong Kong (38). O HKU1 pertence ao gênero dos Beta-CoVs, assim como o 229E, o OC43 e o NL63, causa apenas sintomas comuns aos vírus que infectam o trato respiratório superior como tosse, febre e coriza, porém em idosos e imunossuprimidos é capaz de causar pneumonia (32). Até o momento não foi identificado a qual receptor o HKU1 se liga para infectar a célula hospedeira.

1.5 Coronavírus Emergentes

Até o ano de 2001, os coronavírus haviam sido associados apenas a resfriados leves, mas, entre 2002 e 2003, após um surto de SARS um novo

coronavírus associado aos casos foi descrito e denominado SARS-CoV (39). Em um curto período esse vírus tornou-se endêmico, infectando cerca de 8.000 indivíduos, e causando a morte de 774 indivíduos em várias partes do mundo, como Canadá, EUA (Estados Unidos da América) e Vietnã (40). Os sintomas iniciais da doença são dor de cabeça, mal-estar e dificuldade respiratória, porém, o quadro pode progredir e causar infecções no fígado e no cérebro. O período de incubação varia de 2 a 11 dias e cerca de 30% das pessoas precisam de cuidados intensivos (39, 40). Para invadir as células hospedeiras o SARS-CoV utiliza uma proteína transmembrana denominada Receptor de Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2), a qual é expressa em células do sistema respiratório, intestino, coração, fígado e rins e cuja função é a regulação do Sistema Renina-Angiotensina, em que promove a diminuição da pressão sanguínea (40-42).

O MERS-CoV foi descrito pela primeira vez em 2012, em uma amostra de um idoso na Arábia Saudita que faleceu em decorrência da doença respiratória (43). Com uma taxa de mortalidade de 35% (maior que o SARS-CoV, com uma taxa de 11%), tornou-se um dos vírus mais letais para os humanos, porém apresenta baixo potencial de transmissão, sendo observado propagação maior entre pessoas sintomáticas e que tiveram contato com camelídeos infectados. Não foi observado a transmissão entre pessoas assintomáticas, o que pode explicar o baixo número de vítimas quando comparada aos outros coronavírus (44) principais sintomas se manifestam em torno de 3 a 13 dias sendo febre, dor de garganta e tosse, podendo evoluir para pneumonia que pode ser de branda a grave, o que pode levar a um choque séptico. Desde o seu primeiro caso, países da Península Arábica e em suas proximidades sofrem de pequenos surtos endêmicos de MERS-CoV. Em 2015, por exemplo, foi registrado um pequeno surto na Coreia do Sul, com 185 casos confirmados (44, 45). Para infectar a célula hospedeira, o MERS-CoV usa o receptor dipeptidil peptidase 4 (DPP-4), uma glicoproteína do tipo II, que, assim como os receptores de ECA2, estão presentes, principalmente, em células pulmonares e também em macrófagos (46).

Em 2019, surgiu na província de Hubei, na China, uma nova cepa denominada de SARS-CoV 2, isolada de pacientes que tiveram quadro de pneumonia (47). Semelhante ao SARS-CoV e o NL63, para adentrar na célula hospedeira o SARS-CoV 2 utiliza a proteína ECA2. Em pouco tempo, o vírus

atravessou fronteiras geográficas e se disseminou por todos os países do globo, levando a OMS a decretar estado de pandemia em 2020 (48, 49). Sua letalidade é de 3,4%, menor quando comparado ao MERS-CoV e ao SARS-CoV, contudo apresenta alta transmissibilidade. Estudos mostram que o RBD presente no SARS-CoV-2 possuem algumas diferenças em relação ao RBD do SARS-CoV, o que poderia ter conferido uma vantagem evolutiva capaz de levar a um alto nível de infectividade (50).

A doença causada pelo SARS-CoV 2 foi denominada COVID-19, e os principais sintomas vão além dos sintomas gripais comuns aos coronavírus, incluindo diarreia, perda de paladar e olfato por longos períodos de tempo, pneumonia aguda e, juntamente com o MERS-CoV, são os únicos coronavírus capazes de causar insuficiência renal aguda (47, 51). O vírus causou mais de 600 milhões de casos em todo o mundo, com um número de mortes em torno de 6 milhões até setembro de 2022. No Brasil, os dados mostram que houve cerca de 34,6 milhões de casos registrados e cerca de 685 mil óbitos registrados por COVID-19, colocando o país como o terceiro no ranking dos países com maior número de casos de COVID-19, ficando atrás apenas dos EUA e da Índia (52).

A infecção pelo SARS-CoV-2 apresenta quadro de sintomas que podem variar de assintomática a sintomas leves, moderados até graves (47). Os sintomas graves podem evoluir para pneumonia grave, insuficiência respiratória, e falência de múltiplos órgãos. Também podem ocorrer manifestações sistêmicas, que estão ligadas diretamente com a síndrome inflamatória, que ocorre quando os níveis de quimiocinas e interleucinas inflamatórias estão aumentadas, principalmente a IL6 (53) Ainda não está claro quais fatores podem levar ao agravamento da doença. Estudos propõem que a gravidade da doença está relacionada a diferentes fatores como idade, doenças cardíacas e cardiovasculares, hipertensão arterial, diabetes e obesidade, porém esses fatores não puderam ser associados a todos os indivíduos que desenvolveram COVID-19 grave (47, 51).

O diagnóstico dos coronavírus e, principalmente, do SARS-CoV 2 pode ser realizado através de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR, do inglês – *Real-Time Polymerase Chain Reaction*), considerada a técnica “gold standard”, ou através de teste rápido por imunocromatografia, ambos utilizando material de swab nasofaríngeo e oral.

Tabela 1 HCoVs e seus receptores, sintomas e períodos de incubação

	HCoV-229E	HCoV-OC43	SARS-CoV	HCoV-NL63	HCoV-HKU1	MERS-CoV	SARS-CoV2
PERÍODO DE INCUBAÇÃO	2-5 DIAS	2-5 DIAS	2-11 DIAS	2-4 DIAS	2-4 DIAS	2-13 DIAS	3-6 DIAS
TRANSMISSÃO	AEROSOL	AEROSOL	AEROSOL FECAL ORAL	AEROSOL	AEROSOL	AEROSOL	AEROSOL FECAL ORAL
RECEPTORES CELULAR	APN	???	ECA2	ECA2	???	DPP4	ECA2
PRINCIPAIS SINTOMAS	Mal-estar Dor de cabeça Secreção nasal Espirros Dor de garganta Febre e tosse	Mal-estar Dor de cabeça Secreção nasal Espirros Dor de garganta Febre e tosse	Febre Mialgia Dor de cabeça Mal-estar Tosse seca Dispneia Dificuldade respiratória Diarreia	Tosse Rinorreia Taquipnéia Febre	Febre Nariz escorrendo Tosse Dispneia	Febre Tosse Arrepios Dor de garganta Mialgia Artralgia Dispneia Pneumonia Diarreia e vômito Insuficiência renal aguda	Febre Tosse seca Dispneia Mialgia Dor de cabeça Diarreia Dificuldade respiratória Pneumonia
Doença(s) associadas	Infecção respiratória branda (resfriado comum)	Infecção respiratória	Síndrome respiratória aguda grave	Infecção respiratória branda	Infecção respiratória	Síndrome respiratória aguda grave	Síndrome respiratória aguda grave

*(12, 54, 55)

1.6 Vetores animais

Os coronavírus infectam diversas espécies animais, entre elas, mamíferos (bovinos, suínos, equinos, cetáceos e morcegos) e aves. Os Alfa e Beta-CoV são encontrados em mamíferos (Figura 5). Já os Delta e Gama-CoV foram achados exclusivamente em aves (56-58). Assim como para a maioria dos vírus, os hospedeiros de coronavírus são classificados como hospedeiro natural, organismo primário da infecção viral, e um hospedeiro intermediário, organismo que pela proximidade facilita a infecção de humanos, mas não é um hospedeiro natural (12, 57-59).

Os roedores são descritos como hospedeiros naturais para os Alfa-CoV HKU1 e OC43(12, 24). Bovinos são apontados como hospedeiros intermediários para o HCoV OC43, devido à estreita semelhança entre ele e os coronavírus que atingem

gados (54, 60). No entanto, nenhum hospedeiro intermediário foi encontrado para HCoV HKU1(12, 54, 57, 61).

Os Betacoronavírus tem váriasVárias espécies de morcegos são hospedeiros naturais de Beta-CoV (24, 54), porém o hospedeiro intermediário de HCoV NL63 ainda é desconhecido (57). Após analisar as cepas de coronavírus em alpacas, descobriu-se semelhança entre essas cepas e o HCoV 229E, apontando alpacas como hospedeiros intermediários dessa cepa (61).

Ao comparar sequências genômicas entre os coronavírus encontrados em humanos e civetas (*Paradoxurus hermaphroditus*) vendidas no mercado de animais na China, a análise revelou semelhança entre os genomas, identificando esses animais como hospedeiros intermediários do SARS-CoV (56, 62, 63).

Camelos são hospedeiros intermediários conhecidos para MERS-CoV. Estudos observara, que além da análise genômica mostrar semelhanças entre os vírus coletados em camelos e humanos, anticorpos específicos contra MERS-CoV também foram encontrados em camelos (64-66).

Os primeiros estudos da pandemia de SARS-CoV 2 constataram semelhanças entre o ele e coronavírus que infectam morcegos, sugerindo que, assim como outros BetaCoV, o SARS-CoV-2 tem como hospedeiro natural o morcego (54). No entanto, a questão permanece aberta sobre qual é o hospedeiro intermediário. Achados indicaram que os pangolins (*Manis pentadactyla*) atuariam como hospedeiros intermediários, visto que foram encontrados anticorpos contra SARS-CoV 2 em pangolins vendidos no mercado de animais de Wuhan, cidade considerada estopim de propagação do vírus (67, 68).

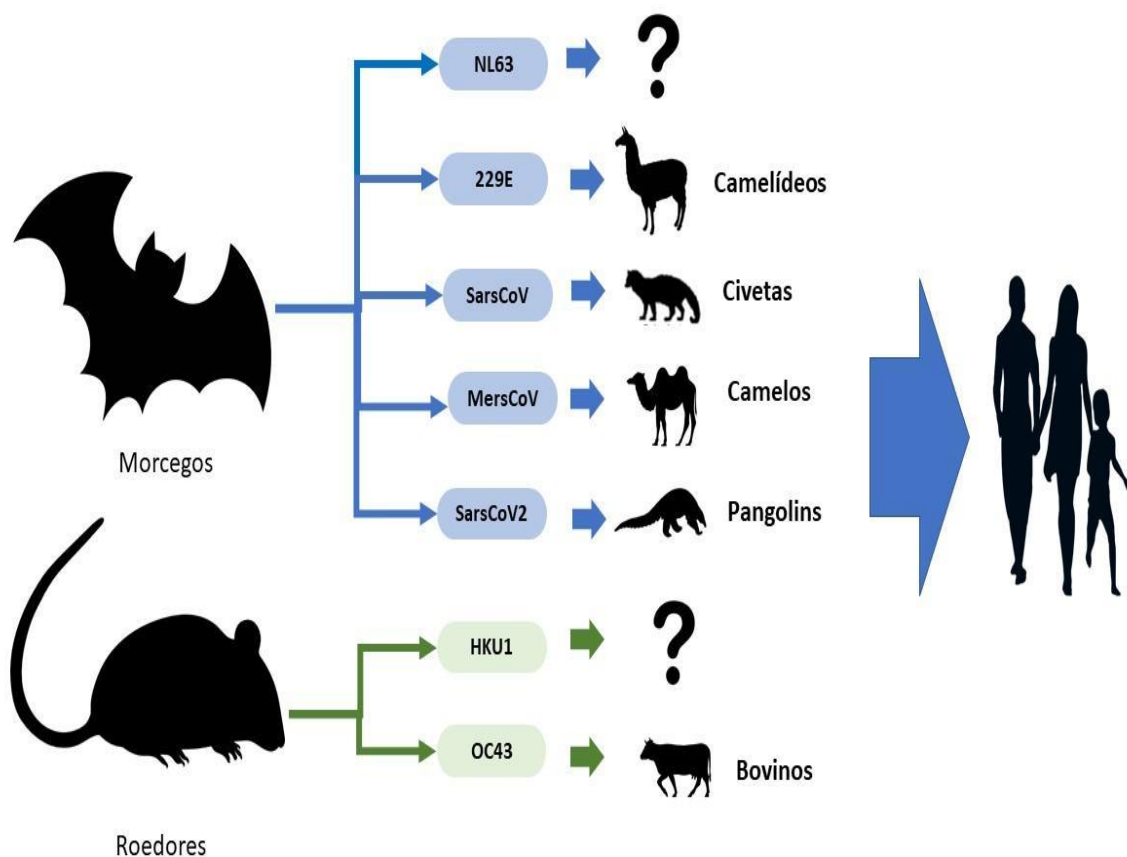


Figura 5 As origens e hospedeiros intermediários dos Coronavírus que infectam humanos
FONTE: Adaptado de Jie cui, 2019

1.7 Epidemiologia

Conforme mencionado anteriormente, os HCoVs causam aproximadamente 30% dos casos de gripe e têm distribuição global (24, 32). A incidência desses vírus é maior durante os meses de inverno e há uma baixa detecção nos meses de verão (69, 70). Eles são comumente associados à coinfeção com outros vírus respiratórios, como o vírus da influenza e o vírus sincicial respiratório ((71).

A falta de dados sobre a prevalência dos HCoVs é uma questão importante, pois a maioria dos estudos realizados até o momento foi em crianças hospitalizadas com doenças respiratórias (72-74). A maioria desses estudos usa ensaios de PCR, o que dificulta a compreensão da soroprevalência desses vírus na população. Estudos longitudinais na Europa e nos Estados Unidos mostram que as espécies predominantes de HCoV podem mudar de ano a ano (69, 74, 75).

Os estudos sobre soroprevalência variam muito de acordo com a população estudada, idade e localização. Uma pesquisa realizada nos EUA demonstrou que, em média, quase 60% das crianças são soropositivas para alphacoronavírus com 2 meses de vida (74). Outra pesquisa realizada com 318 crianças nas Filipinas demonstrou que 90% das crianças com menos de 2 meses de idade tinham anticorpos contra os quatro HCoV, sendo o 229E o mais prevalente, com cerca de 64% de positividade, seguido pelos NL63, HKU1 e OC43(73). Estudo realizado na China que usou sorologia para proteínas Spike em adultos e crianças mostrou que mais de 70% dos indivíduos apresentavam IgG anti-spike para os quatro HCoVs (76).

No Brasil, faltam dados de soroprevalência e os estudos de circulação dos HCoVs na população em geral ainda são inconclusivos, só temos disponíveis dados de sequenciamento, que avaliam infecção aguda e não contato prévio. Um estudo de PCR de pacientes internados em um hospital de São Paulo com sintomas semelhantes aos da gripe mostrou que 11,5% dos pacientes eram positivos para HCoVS (77).

Outro estudo que também incluiu pacientes hospitalizados com doenças respiratórias constatou que 7,7% eram HCoV positivos. A espécie mais comum foi NL63 (50%), seguida de OC3 (27,3%) ((78). Os dados também são observados quando se utiliza a população do sul do Brasil, onde a prevalência do HCoV, medida por testes de PCR, é de aproximadamente 7%. Além disso, foi observado que as crianças apresentam a maior prevalência dessa infecção (79). Já na região norte estudo realizado na cidade de Belém, no estado do Pará, no norte do país, mostrou que de 308 pacientes, apenas um foi positivo para o vírus HCoV. (80).

1.8 Imunologia da Infecção por Coronavírus

Para combater a invasão do vírus, o hospedeiro precisa montar uma resposta imune inata e adaptativa eficaz (81). A primeira linha de defesa contra os vírus são a barreira física, como a pele, e células de Langerhans, células dendríticas (DC, do inglês – *Dendritic Cells*) presente na derme capazes decapturam os patógenos e dar início as respostas imunes através da apresentação de antígenos (82). O início da

resposta imune é mediado pela resposta imune inata através da produção de Interferons do tipo 1 (IFN) e da função de células *Natural Killers* (NK) (81, 83).

IFNs, divididos em IFN- α e IFN- β , são secretados por macrófagos, monócitos e pelas células infectadas e possui ação autócrina, atuando na própria célula, e parácrina, atuando nas células adjacentes (84). Os IFNs são produzidos a partir do reconhecimento de Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMP, do inglês – *Pathogen-Associated Molecular Pattern*). No caso do SARS-CoV 2, a fita de RNA viral é reconhecida pelos receptores semelhantes a *Toll* (TLRs, do inglês – *Toll-Like Receptors*) presentes nos endossomos. O TLR 3 reconhece fitas duplas de RNA (dsRNA, do inglês – *double-stranded RNA*), enquanto os TLRs 7 e 8 são responsáveis pelo reconhecimento de fitas simples de RNA (ssRNA, do inglês – *single-stranded RNA*) ((81, 85). A conexão entre os PAMPS virais e os receptores TLR 7 e 8 ativa fatores que estimulam a transição do gene IRF (*Interferon Regulatory Factors*), gene que codifica proteínas pró-inflamatórias e IFNs (86, 87).

O principal papel do IFN é inibir a síntese de proteínas e a degradação do RNA viral (81). Para isso eles se ligam aos seus receptores diméricos denominados IFNAR1 e IFNAR2, que, por sua vez, ativam os fatores de transcrição STAT1, STAT2 e IRF9. Essa ativação desencadeia a expressão de genes responsáveis pela degradação do material genético viral e o bloqueio na tradução das proteínas das virais e celulares (86, 88).

Além dessas funções, os IFN também atuam aumentando a citotoxicidade de células NK e de linfócitos T citotóxicos (CTL, do inglês – *Cytotoxic T Lymphocyte*), além de recrutar linfócitos para a região da infecção inicial (81). Estudos demonstraram que uma das formas pelas quais o SARS-CoV 2 modula a resposta do imune hospedeiro é através da inibição e/ou diminuição da produção de IFN, o que levaria ao aumento da proliferação viral e atraso na criação da resposta imune adaptativa, levando a um pior prognóstico da doença (89-92).

A principal função das células NK durante uma infecção viral é eliminar as células infectadas pelo vírus. Ao reconhecer uma célula infectada, as células NK liberam grânulos contendo proteínas como a perforina, que atuam na membrana da célula formando poros que facilitam a entrada de granzimas, cuja função é provocar apoptose celular. As células NK também está envolvida na produção de citocinas

pró-inflamatórias como as interleucinas IL-15 e IL-12, que ativam outras células do sistema imune inato e adaptativo (93).

As DCs e os macrófagos além de reconhecerem os PAMPS, também reconhecem Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs, do inglês – *Damage-Associated Molecular Pattern*), que são substâncias endógenas liberadas pelas células danificadas pelo vírus após a piroptose (81). O reconhecimento por essas células desencadeia a produção de citocinas como IL-6, IL-1, TNF- α e quimiocinas que atraem células do sistema imune para o local primário da infecção (93). As DCs também são responsáveis por apresentar peptídeos virais às células do sistema imune adaptativo, promovendo a ativação e diferenciação dos linfócitos nos centros germinativos (94). Além disso, durante a infecção por SARS-CoV 2, as DCs produzem citocinas, como IL1, IL2 e IFN- γ , que estimulam a diferenciação de linfócitos T com expressão do correceptor CD4 (T CD4+) para um perfil pró-inflamatório denominado TH1 (*T Helper 1*), responsável por estimular a diferenciação de células T CD8+, a ativação de macrófagos e a troca de classes dos anticorpos produzidos pelos linfócitos B (53, 95)

O tempo que leva para ativação da resposta adaptativa pelas células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês – *Antigen-Presenting Cell*) da resposta imune inata é primordial para o controle da propagação viral e o desfecho da doença (96). A imunidade adaptativa leva em torno de 6 a 10 dias para ser montada e atuar contra o SARS-CoV 2 (97). Uma das principais células da imunidade adaptativa envolvida na eliminação do vírus é o CTL que expressa o correceptor CD8 (T CD8+), que, assim como as células NK, elimina as células infectadas por exocitose de seus grânulos citotóxicos (81). As células T CD8+ reconhecem os antígenos virais via MHC classe I apresentados por células infectadas e por APCs que fagocitaram células infectadas ou partículas virais (98). Estudos mostraram que as células T CD8+ estão associadas ao prognóstico da COVID-19. Indivíduos com sintomas leves da doença apresentaram taxas mais altas de T CD8+ quando comparados com aqueles com a forma mais grave da doença (99).

Estudos mostraram que o balanço entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias produzidas pelas diferentes células do sistema imune ativadas pela infecção é essencial para o desenvolvimento da doença sem

complicações (96). Pacientes com COVID 19 grave apresentaram um fenômeno conhecido como “tempestade de citocinas”, caracterizado pelo aumento acentuado das citocinas pró-inflamatórias, ocasionando uma resposta exacerbada no local da infecção, a qual resulta em dano tecidual extenso que pode levar a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e ao óbito (100-103).

1.8.1 Resposta humoral

Um mecanismo importante da resposta imune adaptativa contra a infecção viral é a resposta humoral, a qual é mediada por anticorpos secretados por células produzidas a partir da diferenciação dos linfócitos B, os plasmócitos (81, 104). As células B são encontradas nos folículos linfoides em sua forma *naïve* e são ativadas após o reconhecimento dos antígenos pelos seus receptores de membrana BCR (*B-cell receptor*). Os linfócitos B endocitam os antígenos e, com isso, ocorre aumento da expressão das proteínas Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), que induz a proliferação dessas células, e B7, proteína de membrana responsável pela interação entre os linfócitos B e T (81).

Após a interação entre os linfócitos, as células B se diferenciam em dois tipos: células de memória, as quais irão retornar para os folículos linfoides e serão ativadas quando houver um segundo encontro com o antígeno, e as células plasmocitárias, responsáveis pela produção dos anticorpos para combate da infecção (105). Os anticorpos secretados pelas células B plasmocitárias atuam nos vírus durante sua fase extracelular e possuem diferentes funções como neutralização, opsonização e ativação do sistema complemento (81, 105).

Os anticorpos neutralizantes atuam impedido a ligação do vírus à célula hospedeira competindo pelos receptores que o vírus tem afinidade (106). A maioria dos anticorpos contra SARS-CoV-2, são contra antígenos da proteína N e S, principalmente da região RBD (107, 108). Nessa região são encontrados diversos epítopos virais alvos de anticorpos neutralizantes (109) demonstrado por pesquisas que encontraram correlação positiva entre títulos de anticorpos anti-RBD e anticorpos neutralizantes (110, 111). Por este motivo a região RBD é amplamente estudada para ser alvo terapêutico e diagnóstico (112). Na opsonização, os anticorpos reconhecem antígenos virais e se ligam às partículas do vírus, facilitando o reconhecimento por células fagocitárias. A interação ocorre através da porção Fc

(*Fragment crystalline*) dos anticorpos e os receptores de Fc presentes na membrana das células fagocitárias (81).

Os anticorpos também atuam na ativação do sistema complemento através da via clássica. Essa via é ativada quando o anticorpo que se liga ao vírus, se liga também à proteína C1 do sistema complemento pela porção Fc. Essa ligação desencadeia uma cascata de ativação de proteínas, as quais resultam em poros nas membranas de células infectadas e na opsonização do vírus circulante (105).

A primeira classe de anticorpo gerado pelas células B são as imunoglobulinas do tipo M (IgM). Produzidas logo no início da resposta humoral, as IgM são usadas como receptores na membrana nas células B e secretadas por células plasmocitárias. Porém a especificidade da IgM para o patógeno é baixa, sendo assim necessário o refinamento do anticorpo. Para que isso ocorra, os plasmócitos passam por um processo de maturação que leva à hipermutações no DNA na célula, gerando anticorpos com classes diferentes de maior especificidade como IgG, IgA e IgE (104).

Para a COVID-19, a IgM circulante no sangue pode ser detectada após 3 dias do início dos sintomas e tem seu pico após cerca de 21 dias (113). A soroconversão para IgG ocorre entre 1 e 2 semanas após o início dos sintomas (114-116). Por ser um vírus que infecta a mucosa, a IgA possui papel principal na resposta humoral da COVID-19, sendo detectadas no soro logo na primeira semana, e permanecendo circulante mesmo após 40 dias (117). Entretanto, no estudo de Long e colaboradores, foi observado que em alguns pacientes havia presença de IgM antes de haver presença de IgG, (107).

A relação entre os títulos de anticorpos e a gravidade da COVID-19 ainda não está claramente estabelecida, e as pesquisas sobre esse tema têm apresentado resultados conflitantes. Vários estudos têm correlacionado títulos elevados de IgM, IgA e IgG com a gravidade da doença, sugerindo uma possível explicação relacionada à maior persistência viral (118-121). No entanto, outros estudos não encontraram essa mesma correlação (122-124). Os mesmos dados conflitantes ocorreram ao correlacionar comorbidades e títulos de anticorpos. Alguns estudos relataram que pacientes com comorbidades apresentavam níveis mais baixos de anticorpos e pior desfecho da COVID-19, enquanto outros autores não encontraram essa correlação (123, 125, 126).

1.8.2 Reatividade Cruzada de Anticorpos

Ao analisar coortes pré-pandêmicas, foram detectados anticorpos IgG contra Sars-CoV-2, o que poderia ser explicado pela ativação de células B de memórias decorrentes de infecções anteriores contra outros HCoVs (127, 128). Diferentes grupos de pesquisa têm analisado o papel de anticorpos contra outros HCoVs na infecção pelo SARS-CoV 2, a fim de decifrar seu papel durante o curso e o desfecho da COVID-19. Alguns estudos têm mostrado que infecções prévias de HCoVs poderiam ser responsáveis por infecções leves ou assintomáticas em crianças (129), enquanto outros estudos apontaram para uma correlação entre maiores títulos de anticorpos contra outros HCoV com melhor prognóstico da doença em adultos (48, 129, 130).

Embora tenham evoluído de maneiras diferentes, os coronavírus alfa e beta compartilham uma média de 60% de identidade entre suas proteínas S e N (Tabela 2) (112, 131). A alta homologia entre os vírus, poderia justificar a reatividade cruzada encontrada entre os anticorpos produzidos pelo organismo durante diferentes infecções por coronavírus.

Tabela 2. Similaridade entre as sequências de aminoácidos de HCoVs e o SARS-CoV-2

	Alfa- CoV		Beta-CoV	
	NL63	229E	OC43	HKU1
Spike (Completa)	60,0%	61,8%	57,9%	58,0%
Domínio S1	51,4%	62,5%	51,7%	55,6%
Domínio S2	66,3%	66,5%	72,7%	72,7%
RBD	59,3%	59,3%	54,7%	67,6%
Nucleocapsídeo	65,1%	57,9%	62,1%	65,1%

A resposta humoral prévia foi observada, principalmente, quando testadas com a região S1 da proteína *Spike* e a proteína N, as quais são mais conservadas entre os coronavírus. Ao testar a região RDB, não foram encontrados níveis significativos de anticorpos com reatividade cruzada com outros HCoVs (132), porém um estudo mostrou um anticorpo raro encontrado em pacientes com COVID-19 que tem alta reatividade cruzada com um epítipo conservado da RBD de SARS-CoV (130).

Pesquisas mostram que, em média, cerca de 16% e 4,2% dos pacientes possuem reatividade cruzada entre as proteínas N e S, respectivamente. Quando se analisa apenas a região RBD da proteína Spike, verifica-se que apenas 0,92% dos pacientes apresentam reatividade cruzada. Juntando essa informação com o estudo de Hejun Liu e colaboradores citado anteriormente (REF), levanta-se a hipótese de que esses anticorpos de reatividade cruzada contra RBD existam, porém não compartilham a função neutralizante entre os diferentes HCoVs. Esses dados podem ser utilizados para gerar imunossaios com maior especificidade baseados em epítomos da RBD (133-135).

Apesar de parecer benéfica a presença de anticorpos com reatividade cruzada, alguns estudos mostraram que a correlação entre uma maior resposta humoral prévia contra outros coronavírus, está associada à maior gravidade da COVID-19 (56, 136, 137). Esses dados conflitantes geram dúvida sobre qual seria a melhor abordagem para desenvolvimento de novos alvos terapêuticos de combate à infecção e de tratamento.

2 JUSTIFICATIVA

As respostas imunológicas prévias contra os HCoV's endêmicos podem ter influências positivas ou negativas no desfecho clínico de indivíduos afetados pela COVID-19. No entanto, a prevalência sorológica desses HCoV's em nossa população ainda é desconhecida. Apesar das semelhanças moleculares entre os HCoV's, as mutações específicas que os distinguem permitiram que diferentes cepas virais, como o SARS-CoV-2, escapassem à imunidade pré-existente. Portanto, é de extrema importância investigar a prevalência da soroconversão e o potencial dos anticorpos gerados em resposta aos HCoV's endêmicos, bem como entender seus efeitos na infecção pelo SARS-CoV-2 em diferentes grupos populacionais.

3 OBJETIVOS

3.8 Objetivo Geral

Avaliar a prevalência dos HCoVs endêmicos em nossa coorte e relacionar infecções prévias a HCoVs endêmicos com a gravidade da COVID-19.

3.9 Objetivos Específicos

- Padronizar o ELISA específico para detecção dos anticorpos dos diferentes HCoVs OC43, NL63, 229E e HKU1;
- Avaliar os níveis de anticorpos para os HCoVs em relação aos anticorpos para SARS-CoV-2, aos desfechos clínicos e ao tempo de doença;
- Incluir outros dados clínicos na análise de correlação dos anticorpos anti-HCoVs com a gravidade da COVID-19.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.8 Casuística

Para este estudo, analisamos amostras sorológicas e prontuários de 252 indivíduos, entre março e julho de 2020, os quais tiveram diagnóstico para SARS-CoV-2 confirmado por PCR em tempo real, e/ou sorologia, e apresentaram sintomas agudos de COVID-19. Esses indivíduos estiveram internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) por tempos distintos e seu grau de comprometimento e sintomas tiveram diferentes desfechos clínicos observados ao decorrer das internações.

Este ensaio foi aprovado pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) (CAAE: 30417520.0.0000.0068), Número do Parecer: 4.228.204 (Anexo 1). Todos os participantes ou familiares assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2) no momento da admissão, e seus dados foram extraídos de seus prontuários médicos disponíveis no sistema do HC-FMUSP.

4.2 Amostras

Obtivemos amostras de sangue colhidas em tubos seco com gel de separação (Fabricante) no momento das admissões para exames no HC-FMUSP, as quais foram transportadas ao Laboratório de Imunologia situado no 9º andar do Instituto do Coração (INCOR).

Essas amostras foram centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos, com a finalidade de separar o soro do restante do sangue. O soro foi separado em alíquotas de 2ml, seguido por inativação térmica à 56 °C, durante 30 minutos e, posteriormente, armazenado em freezer -80 °C até o momento dos ensaios *in vitro*.

4.3 Proteínas de Coronavírus Endêmicos

Para este estudo, foram utilizadas proteínas RBD de 4 coronavírus endêmicos (HKU1, OC43, NL63 e 229E) produzidas a partir de plasmídeos por transformação bacteriana e expressão em células Expi 293F. Esse trabalho foi executado pela mestrandia Flávia Lopes Adami, sob a supervisão de sua orientadora Profa. Dra.

Silvia Beatriz Boscardin no Laboratório de Direcionamento de Antígenos para Células Dendríticas do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB) e as proteínas resultantes foram gentilmente cedidas ao nosso grupo.

4.4 ELISA

Para mensuração dos títulos de anticorpos IgG contra proteína RBD dos coronavírus endêmicos, empregamos a técnica de Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA, do inglês – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), utilizando microplacas *half-area high-binding* de 96 poços (Corning, Sigma-Aldrich, Alemanha). No primeiro dia de experimento, sensibilizamos as placas com 25 µL de proteína para cada coronavírus endêmico (HKU1, NL63, 299E e OC43) na concentração de 50 ng/ml por poço, diluídas em tampão de carbonato/bicarbonato 50 mM pH 9,0 (Sigma-Aldrich, Alemanha) e incubadas overnight a 4 °C.

No segundo dia, as proteínas não adsorvidas foram lavadas e as placas foram bloqueadas com 80 µL de Tampão de Bloqueio (PBS 1x contendo 0,02% de Tween 20, 1% de BSA e 5% de leite desnatado Mólico) por 2 horas em temperatura ambiente (TAa). Após este período, o tampão de bloqueio foi descartado e foi adicionado 50 µL de soro dos indivíduos em cada poço em triplicata, diluídos na proporção 1:50 com Tampão de Diluição (PBS 1x contendo 0,02% de Tween 20 e 0,25% de leite desnatado Mólico). Os três últimos poços foram utilizados como controle branco, em que apenas o tampão de diluição foi aplicado.

Estas placas foram incubadas a 37 °C em estufa por 45 minutos e, em seguida, lavadas em solução de lavagem (Tampão Fosfato Salino – PBS 1x contendo 0,02% de Tween 20). Subsequentemente, foi adicionado 25 µL de anticorpo secundário (Goat Anti-Human IgG Antibody, HRP, Sigma-Aldrich, Alemanha) diluído na proporção de 1:10000 em tampão de diluição e as placas foram novamente incubadas a 37 °C em estufa por 45 minutos e lavadas como mencionado anteriormente.

Para revelação das placas, foi adicionado 50 µL de tampão contendo 4 mg de *O-Phenylenediamine Dihydrochloride* (OPD) (fabricante), tampão citrato pH 9 e 30% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Sigma-Aldrich, Alemanha), estas placas foram deixadas abrigadas da luz, por 30 minutos. Para interromper a reação foi utilizado 50

μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 2 N. A leitura foi feita em comprimento de onda de 492 nm no espectrofotômetro de microplacas (Epoch, Biotek, Estados Unidos).

Por falta de amostras controles, o cálculo do valor de *cutoff* para determinação de positividade dos ensaios de ELISA foi feito utilizando a média das densidades ópticas (DO) dos controles brancos mais 3 vezes o desvio padrão.

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando os softwares *GraphPad Prism 7* (GraphPad Software, EUA) e *IBM SPSS Statistics 2.0* (IBM Software, EUA). Resultados de valor de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos. Para análise entre diferentes coronavírus, normalizamos os dados conforme descrito por Schwarzkopt e colaboradores (138) e utilizamos o valor da leitura obtida das amostras divididas pelo *cutoff*, obtendo-se assim um valor de razão. Essa normalização permite a comparação de resultados de diferentes isótipos e antígenos.

5 RESULTADOS

5.1 Dados Demográficos

Nossa coorte foi composta por 252 indivíduos, dos quais 41,7% eram do sexo feminino (n=105) e 58,3% eram do sexo masculino (n=147). A média de idade foi de 60,6 anos, sendo 61,7 anos para os homens e 58,4 anos para as mulheres. Através do acesso aos prontuários médicos, constatamos que a maioria desses indivíduos apresentava comorbidades. Entre as comorbidades mais prevalentes, destacaram-se o tabagismo, a hipertensão e o diabetes, o que está de acordo com estudos anteriores (139, 140). Dos pacientes incluídos na nossa coorte, 55% apresentavam hipertensão, 35% tinham diabetes e 21% eram tabagistas. Além disso, 66% dos pacientes possuíam outras condições médicas, como doenças cardíacas, imunossuprimidos e pacientes oncológicos. (tabela 3).

Para a análise de gravidade, dividimos nossa coorte com base no desfecho clínico. Observou-se que 129 (51%) pacientes foram encaminhados apenas para enfermaria, 37 (15%) para a Unidade de Terapia Intensiva (UTI), 31 (12%) necessitaram de UTI e Ventilação Mecânica Invasiva (VMI), e 56 (22%) desses indivíduos foram a óbito (conforme apresentado na tabela 3).

Tabela 3. Dados demográficos da coorte em estudo.

*Outras patologias: cardiopatias, imunossuprimido e pacientes oncológicos

	N	MÉDIA DE IDADES	COMORBIDADE				DESFECHO CLÍNICO			
			Fumante	Hipertensão	Diabetes	Outras patologias	Enfermaria	UTI	UTI +IMV	Óbito
COORTE	252	60.61	52 (21%)	137 (55%)	88 (35%)	165 (66%)	129 (51%)	37 (15%)	31 (12%)	56 (22%)
HOMENS	147 (58,3%)	61.76	35 (24%)	86 (59%)	53 (36%)	90 (61%)	70 (48%)	22 (15%)	19 (13%)	36 (24%)
MULHERES	105 (41,7%)	58.42	17 (16%)	51 (49%)	35 (33%)	75 (71%)	59 (56%)	15 (14%)	11 (10%)	20 (19%)

Para avaliar a relação entre a idade e os diferentes desfechos clínicos, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Observamos que a idade dos pacientes falecidos foi significativamente maior em comparação com os pacientes que foram direcionados apenas para a enfermaria ($p = 0,0190$). Além disso, realizamos uma análise de regressão multivariada para

obter um modelo que explique as relações entre nossas variáveis (Idade, comorbidades, sexo e os resultados do teste de Elisa). No entanto, não encontramos valores significantes (dados não apresentados).

Tabela 4. Média de idades entre gêneros e o desfecho clínico

	Enfermaria	UTI	UTI + VMI	Óbito
Coorte	58,3*(20-90)	62,3 (24-85)	57,5 (32-87)	66,4* (25-97)
Homens	60,4(22-90)	61,7(31-85)	58,7(45-78)	65,9(25-95)
Mulheres	55,7 (20-88)	63,3 (24-84)	55,5 (32-87)	67,3(46-97)

*p= 0,0190

Ao analisamos a função de sobrevivida global dos pacientes pelo teste de Kaplan-Meier, observamos uma média de internação de 42 dias com intervalo de confiança maior que 33% e menor que 50% (Figura1).

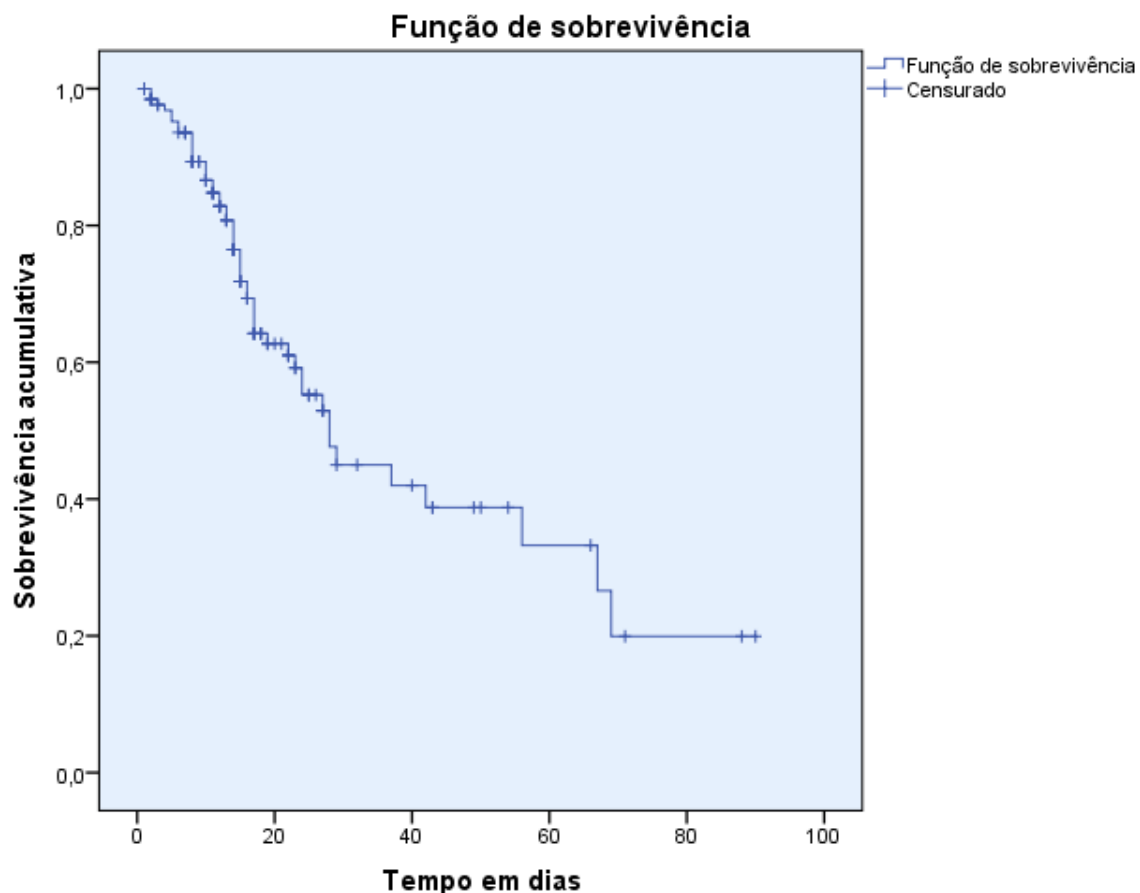


Figura 6. Tempo de sobrevida de pacientes internados com Covid19. Curva de sobrevida global, obtida pelo teste de Kaplan–Meie, de indivíduos acometidos por Covid-19.

5.2 Prevalência dos Coronas Vírus endêmicos.

Considerando que a prevalência de anticorpos específicos para HCoVs pode variar dependendo da população analisada, realizamos uma análise do reconhecimento dos HCoVs nos indivíduos de nossa coorte. Observamos que a prevalência geral, para pelo menos um HCoV, foi de xx%. O HCoV HKU1 apresentou a maior taxa de positividade, atingindo cerca de 60%, enquanto o HCoV 229E teve a menor porcentagem de indivíduos positivos, cerca de 19% (Figura 7).

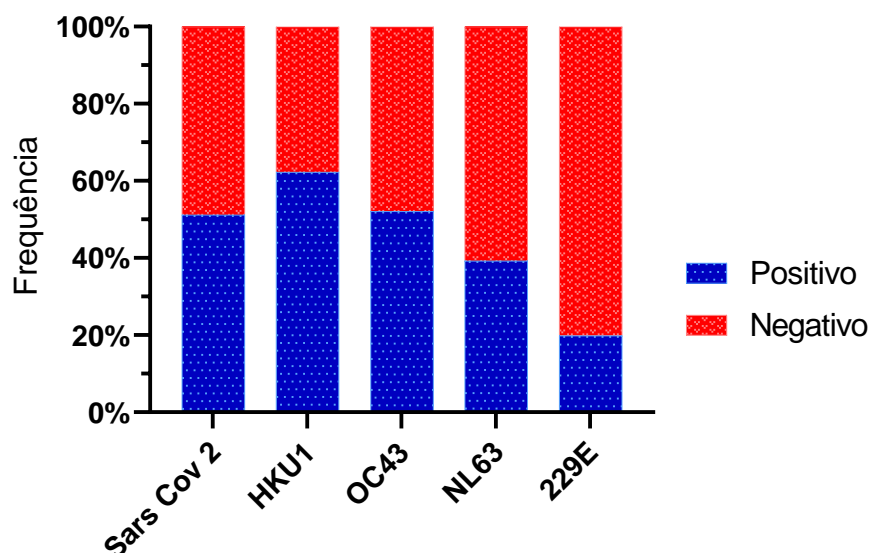


Figura 7. Frequência dos HCoVs. A porcentagem de indivíduos com valores positivos (azul) e negativos (vermelho) para IgG RBD, Sar CoV 2 e HCoVs, determinada pelo, O.D. menos o *Cutoff* de cada antígeno. Valores acima do ponto de corte foram considerados positivos e valores abaixo do ponto de corte foram considerados negativos.

Dividimos os indivíduos que testaram positivo para HCoVS em nossos ensaios de Elisa, de acordo com a idade, e os agrupamos por décadas. Observamos que, em todas as faixas etárias, a taxa de positividade para HKU1 é maior do que a dos outros coronavírus endêmicos. Entre os indivíduos de 20 a 29 anos, não tivemos resultados positivos para 229E, enquanto os demais grupos etários apresentaram uma taxa de reatividade em torno de 10%. O número de positivos para NL63 parece diminuir com a idade, variando de 35% a 15%, enquanto o OC43 mostra o oposto, com um reconhecimento que aumenta progressivamente com a idade, variando entre 15% e 30% (Figura 8).

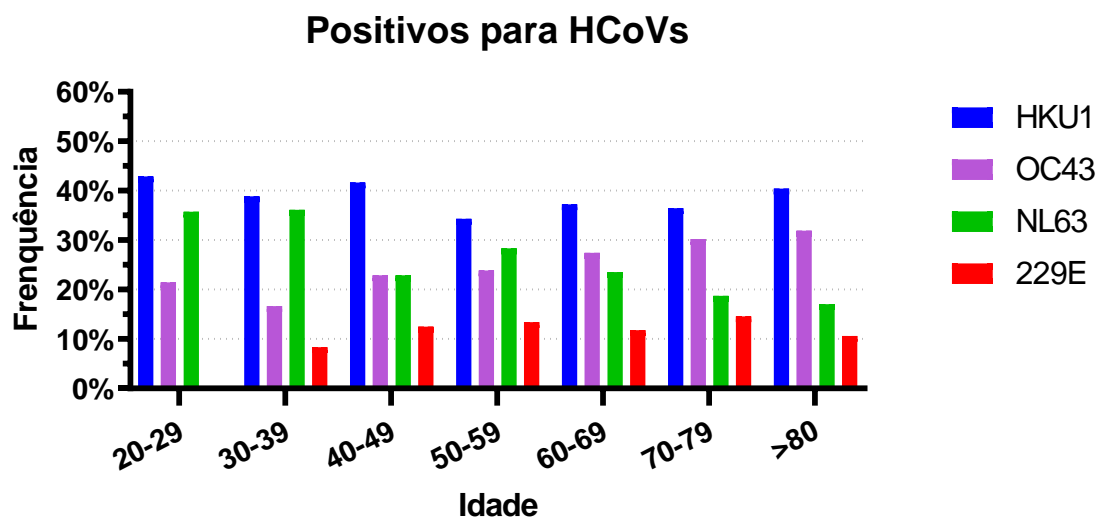


Figura 8. Frequência de positividade de HCoVs por idade. Os indivíduos positivos para HCoVs foram separados por idade, divididos em décadas (eixo X), e seu valor de positividade foi representado pela frequência (eixo Y).

5.3 Comparação entre anticorpos anti-HCoVs e anti-SARS-CoV-2

Ao compararmos os níveis de IgG RBD em indivíduos testados para o SARS-CoV-2 e os HCoVs, observamos que os níveis de HKU1 foram significativamente mais altos em relação ao SARS-CoV-2 ($p < 0,0001$). Por outro lado, os níveis de HCoV 229E foram significativamente menores em comparação ao SARS-CoV-2 ($p = 0,0219$). Utilizamos o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. (Figura 9).

Coronavírus Endêmico

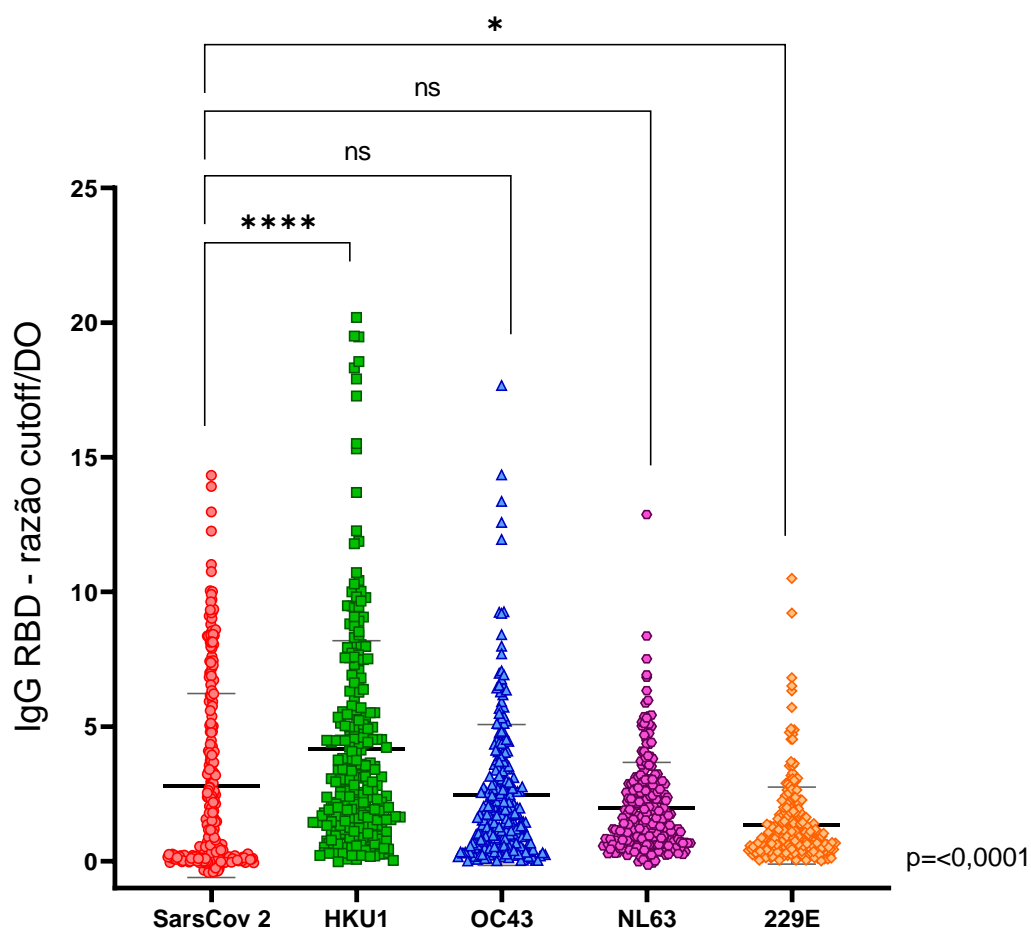


Figura 9. Análise entre os títulos de anticorpos de Sars CoV 2 e coronavírus endêmicos. Comparação entre títulos de anticorpos IgG para RBD de Sars CoV 2, com títulos de IgG RBD para os quatro tipos de coronavírus endêmicos, os valores são apresentados como uma razão, DO/cutoff, de modo a normalizar os dados. Usando o teste de Kruskal Wallis e o teste de Dunn para comparar os níveis de anticorpos para Sars CoV 2 e coronavírus endêmicos. A significância foi considerada nas seguintes formas $p < 0,05$ (*), $p < 0,0001$ (****), ns = não significativo, respectivamente.

5.4 Correlação entre títulos de anticorpos contra SARS-CoV-2 e Coronas Endêmicos.

Com o objetivo de avaliar a correlação entre os títulos de IgG RBD anti-SARS-CoV-2 e os títulos de IgG anti-HCoVs, utilizamos o teste de Spearman. Não encontramos correlação estatisticamente significativa entre o SARS-CoV-2 e nenhum dos HCoVs testados: HKU1 ($r = -0,02191$, $p = 0,7335$); OC43 ($r = -0,003824$, $p = 0,9524$); NL63 ($r = -0,03368$, $p = 0,5991$); 229E ($r = -0,02832$, $p =$

0,6585). Isso indica que os níveis de anticorpos para os HCoVs variam independentemente dos níveis obtidos para o SARS-CoV-2 (Figura 10).

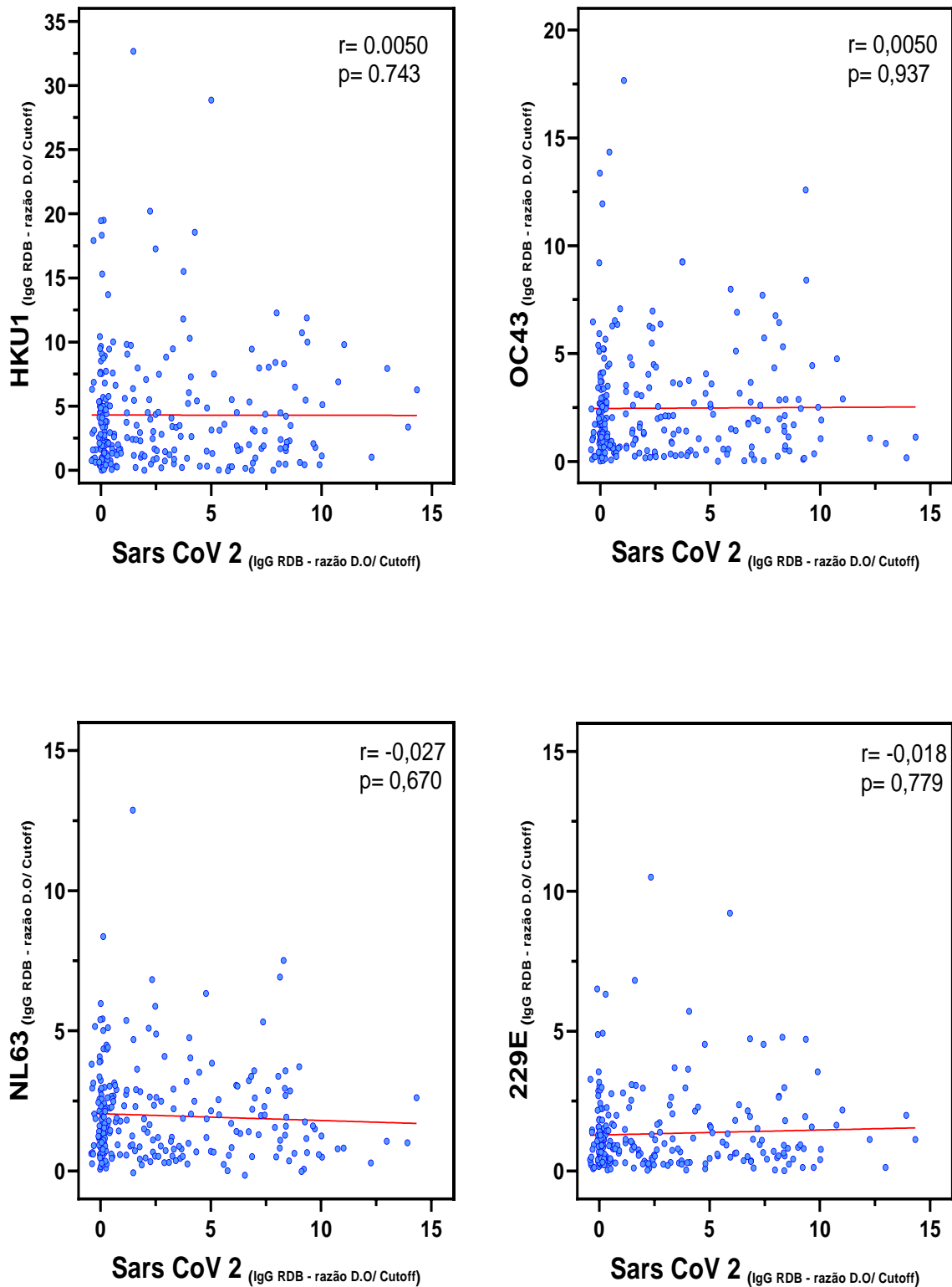


Figura 10. Correlação entre anticorpos IgG RBD de Sars CoV 2 e HCoVs. Utilizando os valores da razão (Do/cutoff) entre os anticorpos anti-SARS-CoV-2 e HCoVs, obtidos através do ensaio de Elisa direto, para avaliar as correlações entre eles, apresentamos os valores dos HCoVs no eixo y e os

valores de SARS-CoV-2 no eixo x. Empregamos o método de Spearman Rank, considerando valores de $p < 0,05$ e $r > 0,1$ ou $< 0,1$ como estatisticamente significativos.

5.5 Níveis de anticorpos e desfechos clínicos

Realizamos uma avaliação dos títulos de IgG RBD contra o SARS-CoV-2 em indivíduos com diversos desfechos clínicos (conforme Tabela 5). Utilizamos o teste de Anova para comparar os níveis de anticorpos e constatamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes desfechos clínicos, conforme demonstrado na (Figura 11).

Tabela 5. Comparação entre os títulos de anticorpos contra IgG RBD para SARS CoV 2, entre os variados desfechos clínicos.

<i>Teste de Dunn</i>	<i>Significância</i>	<i>Valor de p</i>
Enfermaria vs. UTI	ns	0,4074
Enfermaria vs. UTI + VMI	ns	>0,9999
Enfermaria vs. Óbito	ns	>0,9999
UTI vs. UTI + VMI	ns	0,1788
UTI vs. Óbito	ns	>0,9999
UTI + VMI vs. Óbito	ns	0,7667

Teste Anova e teste de comparações múltiplas de Dunn
Ns = não significativo

Sars Cov 2

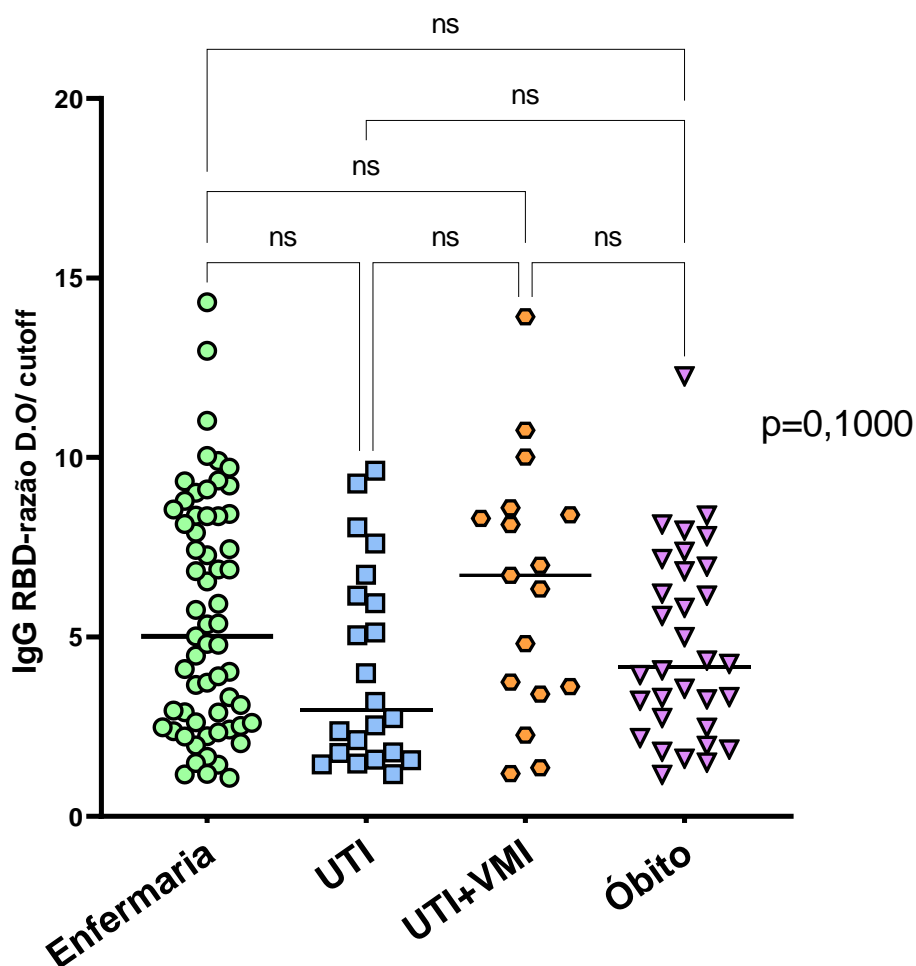


Figura 11. Comparação de anticorpos IgG RBD para HCoVs em grupos com diferentes desfechos clínicos. Analisamos os títulos de IgG RBD contra Sars CoV 2 e coronas endêmicos nos diferentes desfechos clínicos de nossa coorte. Os valores foram normalizados usando a razão (valor D.O. dividido pelo valor de corte de cada antígeno). Os grupos foram divididos de acordo com os desfechos clínicos descritos em seus prontuários. Para análise, utilizou-se o teste ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Dunn, ns = não significativo.

Em seguida, comparamos as proporções entre os títulos de anticorpos IgG RBD contra o SARS-CoV-2 e os HCoVs em indivíduos separados de acordo com seu desfecho clínico, com o objetivo de avaliar se diferentes níveis de anticorpos contra coronavírus endêmicos poderiam ser usados como indicadores do desfecho clínico.

Em quase todos os desfechos clínicos, exceto indivíduos que foram para UTI + VMI, foi notado que os títulos anti HKU1, eram significativamente maiores quando comparados ao anti Sars CoV 2 (Enfermaria $p < 0,0001$), (UTI $p = 0,0366$), (óbito $p = 0,0080$). No grupo de indivíduos que necessitaram apenas ir para a enfermeira, também se notou valor estatisticamente significativo ($p = 0,0245$) para OC43, o que não foi observado para outros desfechos clínicos. No grupo no qual foram para UTI+ VMI, não encontramos significância em nenhum dos HCoV S (Figura 12).

Optamos também por analisar os títulos de anticorpos IgG anti RBD, entre os quatros grupos com distintos desfechos clínicos, onde não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre eles (Figura 13).

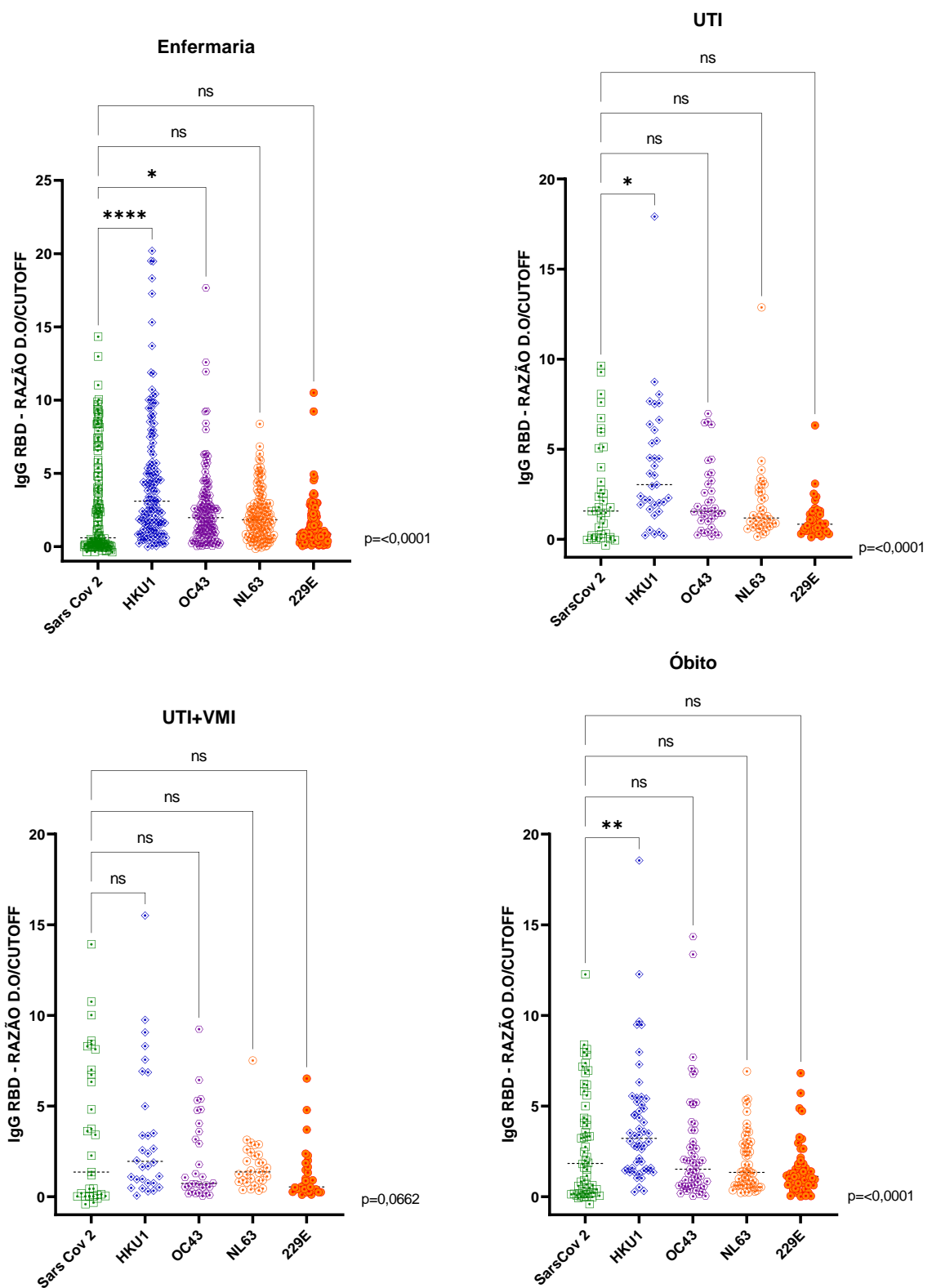


Figura 12. Análise entre a razão dos títulos de anticorpos anti Sars CoV 2 para HCoVs, conforme seu desfecho clínico. Os indivíduos foram separados conforme seu desfecho clínico, e empregamos teste anova para analisar as diferenças entre os títulos de IgG RBD. A significância foi considerada da seguinte forma $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,0001$ (****), ns = não significativo, respectivamente.

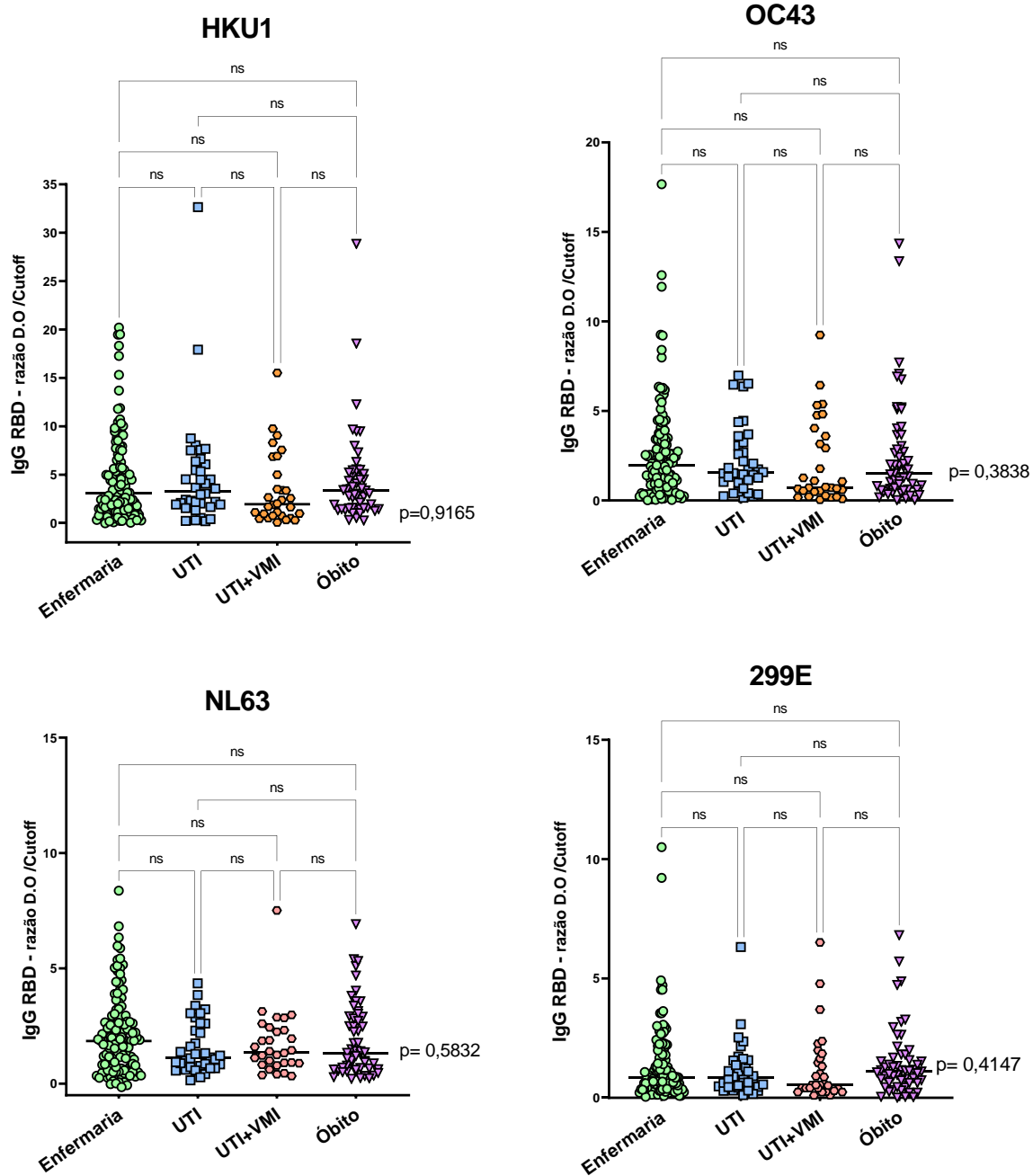


Figura 13. Comparação entre anticorpos IgG RBD dos HCoV, nos diferentes desfechos clínicos. Analisamos os títulos para cada coronavírus endêmico entre os indivíduos com diferentes desfechos clínicos. Utilizado teste de Anova seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. ns= não significativo.

6 DISCUSSÃO

Nosso objetivo neste estudo foi avaliar a prevalência e investigar a relação entre infecções prévias por HCoVs no contexto da doença causada pelo SARS-CoV-2. Para isso, analisamos amostras de soros de pacientes que foram admitidos no Hospital das Clínicas de São Paulo, o maior hospital da América Latina, com sintomas e diagnóstico de COVID-19.

Primeiramente fizemos uma análise global da coorte de internados, considerando dados demográficos e clínicos. Por meio de um teste de sobrevida global, constatamos que a média de dias de internação em nossa coorte foi de 42, o que é maior em comparação com países europeus e ocidentais, onde a média é de 18,5 dias. (140, 141). Em um estudo utilizando meta-análise, foi demonstrado que hospitais da América do Sul tiveram um tempo de internação mais longo em comparação com outros continentes, especialmente os africanos. O maior tempo de internação nos hospitais da América Latina é atribuído à qualidade do serviço oferecido, bem como à maior quantidade de leitos disponíveis. (142).

A idade tem sido amplamente reconhecida como um fator de risco significativo para pacientes com COVID-19, de acordo com diversos estudos científicos. Vários artigos têm destacado a relação entre a idade avançada e a gravidade da doença, assim como um aumento na taxa de mortalidade entre os pacientes mais velhos. (143-145) . A média de idade do grupo que veio a óbito é de 66,4 anos, o que é maior em comparação ao grupo que necessitou apenas de enfermagem, cuja média de idade foi de 57,8 anos.

Em nossa coorte de 252 indivíduos, 51% necessitaram apenas de internação na enfermagem, enquanto 26% precisaram de cuidados intensivos e auxílio de aparelhos respiratórios. Além disso, 22% desses indivíduos tiveram uma piora no curso da doença que os levou ao óbito.

As comorbidades têm sido consistentemente identificadas como fatores que contribuem para um pior prognóstico em pacientes com COVID-19. Condições como hipertensão, diabetes e doenças cardiovasculares estão associadas a um maior risco de desfechos adversos, incluindo a necessidade de ventilação mecânica e óbito.(48, 140, 146, 147). porém ao analisarmos nossa coorte através de análises estatísticas em busca de um modelo preditor de doença, não obtivemos resultados estatisticamente significativo.

Ao analisar os dados sorológicos em nossa coorte, observamos que 62,4% dos homens testaram positivo para o IgG RBD, enquanto apenas 37,6% das mulheres apresentaram resultados positivos. Esse resultado difere do que é relatado na literatura, onde são observados maiores títulos de RBD em mulheres, principalmente nas primeiras semanas da doença. (148, 149). Vale ressaltar que a proteína RBD desempenha uma função crucial na neutralização do vírus. Estudos têm demonstrado uma correlação positiva entre os níveis de RBD e os títulos de neutralização, sugerindo um prognóstico favorável para os pacientes (134, 150). No entanto, é importante salientar que, infelizmente, não foi possível obter dados de neutralização para esta coorte específica.

Ao agruparmos os indivíduos de acordo com o desfecho da doença e compararmos os níveis de anticorpos IgG RBD para o Sars-CoV-2 entre esses grupos, não observamos diferença significativa. Esses dados contradizem a literatura, que sugere uma associação entre níveis elevados de anticorpos e doenças mais graves, assim como um prognóstico desfavorável.(137).

Em nossos dados, observamos níveis mais baixos de anticorpos contra o Sars-CoV-2 em comparação com os anticorpos contra o betacoronavírus HKU1. No entanto, ao compararmos os anticorpos IgG RBD entre o Sars-CoV-2 e o alfacoronavírus 229E, observamos níveis mais altos para o Sars-CoV-2. Os níveis de anticorpos contra o HKU1 foram os mais elevados em todos os desfechos, mas não houve correlação com o prognóstico da doença, o que está em concordância com dados da literatura. É interessante notar que relatos na literatura indicam que, durante o curso da COVID-19, os níveis de anticorpos IgG para HKU-1 e OC43 aumentam após a exposição ao SARS-CoV-2. Isso corrobora a hipótese de reatividade cruzada entre os coronavírus, sugerindo que a exposição a outros coronavírus pode gerar uma resposta imunológica que também é eficaz contra o SARS-CoV-2. (151).

Por outro lado, ensaios de imunização em camundongos demonstraram que uma dose prévia de uma vacina contendo a proteína Spike de HCoVs, seguida por uma dose de Spike do SARS-CoV-2, resultou em títulos menores de anticorpos para a RBD do SARS-CoV-2 quando a primeira dose era derivada de HKU-1 ou NL63. Além disso, os títulos de anticorpos neutralizantes contra o SARS-CoV-2 foram reduzidos quando a Spike de qualquer um dos HCoVs foi utilizada na primeira dose.

(152). Esses dados sugerem que a presença de anticorpos pré-existentes contra outros HCoVs pode prejudicar a produção de anticorpos específicos contra o SARS-CoV-2 e interferir na atividade neutralizante. Isso indica a possibilidade de uma resposta imunológica cruzada que pode influenciar a eficácia da resposta imune contra o SARS-CoV-2 em indivíduos previamente expostos a outros coronavírus humanos. (152). Embora não tenhamos dados específicos de anticorpos contra os HCoVs em nossa coorte antes da vacinação, foi observado que os títulos de anticorpos contra o HKU1 foram bastante elevados. Esses resultados são consistentes com outros estudos que também relataram níveis elevados de anticorpos contra HCoVs em indivíduos expostos. Essa semelhança nos resultados destaca a importância de investigar a resposta imunológica em relação a diferentes coronavírus humanos para compreender melhor a reatividade cruzada e a resposta imune contra o SARS-CoV-2. (153, 154).

No nosso estudo, investigamos a relação entre os títulos de anticorpos para HCoVs e os grupos de acordo com o desfecho clínico. Observamos que, em todos os grupos, os títulos de anticorpos para o HCoV-HKU1 foram mais elevados em comparação com o SARS-CoV-2. Além disso, somente no grupo de pacientes que necessitaram apenas de internação na enfermaria, observamos maiores títulos de anticorpos para o HCoV-OC43 em relação ao SARS-CoV-2. Com base nesses dados, levantamos a hipótese de que o aumento dos títulos de HCoV-OC43 poderia estar associado a um melhor prognóstico. Essa hipótese já foi demonstrada em pesquisas anteriores, corroborando nossas observações. (56, 155). Ao compararmos os grupos utilizando os dados de anticorpos para o HCoV-OC43, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, o que também foi observado para os outros HCoVs. Esses resultados indicam que os títulos de anticorpos para os HCoVs não se correlacionam diretamente com o desfecho clínico dos pacientes estudados. É importante destacar que mais pesquisas são necessárias para compreender completamente a relação entre os títulos de anticorpos para HCoVs e o prognóstico da doença causada pelo SARS-CoV-2. Sendo assim, considerando as análises realizadas na nossa coorte não encontramos correlação entre os títulos de anticorpos para HCoVs e os desfechos clínicos na doença COVID19.

7 CONCLUSÃO

Após uma análise minuciosa, concluiu-se que os anticorpos IgG direcionados ao RBD (domínio de ligação ao receptor) dos coronavírus endêmicos não demonstraram reatividade cruzada com os anticorpos IgG anti-RBD do SARS-CoV-2. Essa descoberta indica que tais anticorpos não desempenham um papel significativo na proteção contra a COVID-19.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram de forma clara que os anticorpos gerados como resposta imunológica aos coronavírus endêmicos não possuem a capacidade de reconhecer e neutralizar o SARS-CoV-2. Isso implica que a imunidade adquirida por meio desses anticorpos não oferece uma proteção efetiva contra a infecção pelo novo coronavírus.

No entanto, é essencial ressaltar que a pesquisa científica continua evoluindo e novas descobertas podem surgir. Portanto, estudos adicionais são necessários para confirmar e aprofundar esses achados, a fim de fornecer uma compreensão mais abrangente da resposta imunológica à COVID-19 e permitir avanços significativos na prevenção e no tratamento da doença.

8 REFERÊNCIAS

1. Bogoch II, Watts A, Thomas-Bachli A, Huber C, Kraemer MU, Khan KJJotm. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel. 2020;27(2):taaa008.
2. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. 2020.
3. Organization WH. Novel Coronavirus (2019-nCoV): situation report, 11. 2020.
4. Simoes EA, Cherian T, Chow J, Shahid-Salles SA, Laxminarayan R, John TJJDcPiDCne. Acute respiratory infections in children. 2006.
5. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE, lancet WCHERGJT. WHO estimates of the causes of death in children. 2005;365(9465):1147-52.
6. Thomas M, Bomar PA. Upper respiratory tract infection. 2018.
7. Fields BN. Fields' virology: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
8. Sturman LS, Holmes KVJTmbocAiVR. Lauffer MA, Maramorosch K (eds.).". 1983;28:35-112.
9. Mahy BJN. Coronavirus come of age. 1980;288(5791):536-7.
10. Lai MM, Cavanagh DJAivr. The molecular biology of coronaviruses. 1997;48:1-100.
11. Gledhill A, Niven JSJVRA. Latent virus as exemplified by mouse hepatitis virus (MHV). 1955;1:82-90.
12. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai AC, Zhou J, et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. 2016;24(6):490-502.
13. Armstrong J, Niemann H, Smeekens S, Rottier P, Warren GJN. Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. 1984;308(5961):751-2.
14. Huang Q, Yu L, Petros AM, Gunasekera A, Liu Z, Xu N, et al. Structure of the N-terminal RNA-binding domain of the SARS CoV nucleocapsid protein. 2004;43(20):6059-63.
15. LAI MJAVR. The molecular biology of coronaviruses. 1997;48:1-100.
16. Arndt AL, Larson BJ, Hogue BGJJov. A conserved domain in the coronavirus membrane protein tail is important for virus assembly. 2010;84(21):11418-28.

17. Li Y, Surya W, Claudine S, Torres JJJoBC. Structure of a conserved Golgi complex-targeting signal in coronavirus envelope proteins. 2014;289(18):12535-49.
18. Gorkhali R, Koirala P, Rijal S, Mainali A, Baral A, Bhattarai HKJB, et al. Structure and function of major SARS-CoV-2 and SARS-CoV proteins. 2021;15:11779322211025876.
19. Tortorici MA, Velesler D. Structural insights into coronavirus entry. *Advances in virus research*. 105: Elsevier; 2019. p. 93-116.
20. Walls AC, Tortorici MA, Snijder J, Xiong X, Bosch B-J, Rey FA, et al. Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. 2017;114(42):11157-62.
21. Du L, Kao RY, Zhou Y, He Y, Zhao G, Wong C, et al. Cleavage of spike protein of SARS coronavirus by protease factor Xa is associated with viral infectivity. 2007;359(1):174-9.
22. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh C-L, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. 2020;367(6483):1260-3.
23. Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ, Montoya MJFil. SARS-CoV-2 accessory proteins in viral pathogenesis: knowns and unknowns. 2021:2698.
24. Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi MJTim. Molecular evolution of human coronavirus genomes. 2017;25(1):35-48.
25. Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, Snijder EJJVr. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. 2006;117(1):17-37.
26. Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler DJC. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. 2020;181(2):281-92. e6.
27. Hussain S, Pan Ja, Chen Y, Yang Y, Xu J, Peng Y, et al. Identification of novel subgenomic RNAs and noncanonical transcription initiation signals of severe acute respiratory syndrome coronavirus. 2005;79(9):5288-95.
28. Liu DX, Fung TS, Chong KK-L, Shukla A, Hilgenfeld RJAr. Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. 2014;109:97-109.
29. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. 2020;181(2):271-80. e8.
30. Bergmann CC, Silverman RHJCCjom. COVID-19: Coronavirus replication, pathogenesis, and therapeutic strategies. 2020;87(6):321-7.
31. Baker SJEoV. Coronaviruses: molecular biology. 2008:554.

32. Van der Hoek LJ. Human coronaviruses: what do they cause? 2007;12(4_part_2):651-8.
33. Hamre D, Kindig DA, Mann JJ. Growth and intracellular development of a new respiratory virus. 1967;1(4):810-6.
34. Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellichio CB, Shapiro LH, Look AT, et al. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. 1992;357(6377):420-2.
35. McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. 1967;57(4):933-40.
36. Bradburne A, Bynoe M, Tyrrell DJ. Effects of a "new" human respiratory virus in volunteers. 1967;3(5568):767.
37. Van Der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJ, Wolthers KC, et al. Identification of a new human coronavirus. 2004;10(4):368-73.
38. Woo PC, Lau SK, Chu C-m, Chan K-h, Tsoi H-w, Huang Y, et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. 2005;79(2):884-95.
39. Drosten C, Günther S, Preiser W, Van Der Werf S, Brodt H-R, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. 2003;348(20):1967-76.
40. Cheng VC, Lau SK, Woo PC, Yuen KY. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. 2007;20(4):660-94.
41. Hamming I, Timens W, Bulthuis M, Lely A, Navis Gv, van Goor HJT. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. 2004;203(2):631-7.
42. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme–related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. 2000;87(5):e1-e9.
43. Zaki AM, Van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RAJ. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. 2012;367(19):1814-20.
44. Zumla A, Hui DS, Perlman SJ. Middle East respiratory syndrome. 2015;386(9997):995-1007.
45. Chu DK, Poon LL, Goma MM, Shehata MM, Perera RA, Zeid DA, et al. MERS coronaviruses in dromedary camels, Egypt. 2014;20(6):1049.

46. Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DH, Müller MA, Dijkman R, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. 2013;495(7440):251-4.
47. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. 2020;395(10223):497-506.
48. Guan W-j, Ni Z-y, Hu Y, Liang W-h, Ou C-q, He J-x, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. 2020;382(18):1708-20.
49. WHO COJRtCSoc-RWC-CT. World health organization. 2020.
50. Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. 2020;581(7807):221-4.
51. Chan JF-W, Kok K-H, Zhu Z, Chu H, To KK-W, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. 2020;9(1):221-36.
52. Organization WH. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard Coronavirus (COVID-19) Dashboard [Internet].[consultado 25 Sep 2021].
53. Melenotte C, Silvin A, Goubet A-G, Lahmar I, Dubuisson A, Zumla A, et al. Immune responses during COVID-19 infection. 2020;9(1):1807836.
54. Ye Z-W, Yuan S, Yuen K-S, Fung S-Y, Chan C-P, Jin D-Y. Zoonotic origins of human coronaviruses. 2020;16(10):1686.
55. Tan W, Zhao X, Ma X, Wang W, Niu P, Xu W, et al. A novel coronavirus genome identified in a cluster of pneumonia cases—Wuhan, China 2019– 2020. 2020;2(4):61-2.
56. Guo Y-R, Cao Q-D, Hong Z-S, Tan Y-Y, Chen S-D, Jin H-J, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak—an update on the status. 2020;7(1):1-10.
57. Corman VM, Muth D, Niemeyer D, Drosten C. Hosts and sources of endemic human coronaviruses. 2018;100:163-88.
58. Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. 2019;17(3):181-92.
59. Vijaykrishna D, Smith GJ, Zhang JX, Peiris J, Chen H, Guan Y. Evolutionary insights into the ecology of coronaviruses. 2007;81(8):4012-20.
60. Vijgen L, Keyaerts E, Moës E, Thoelen I, Wollants E, Lemey P, et al. Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. 2005;79(3):1595-604.

61. Corman VM, Baldwin HJ, Tateno AF, Zerbinati RM, Annan A, Owusu M, et al. Evidence for an ancestral association of human coronavirus 229E with bats. 2015;89(23):11858-70.
62. Guan Y, Zheng B, He Y, Liu X, Zhuang Z, Cheung C, et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. 2003;302(5643):276-8.
63. Tu C, Crameri G, Kong X, Chen J, Sun Y, Yu M, et al. Antibodies to SARS coronavirus in civets. 2004;10(12):2244.
64. Alagaili AN, Briese T, Mishra N, Kapoor V, Sameroff SC, de Wit E, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection in dromedary camels in Saudi Arabia. 2014;5(2):e00884-14.
65. Perera R, Wang P, Gomaa M, El-Shesheny R, Kandeil A, Bagato O, et al. Seroepidemiology for MERS coronavirus using microneutralisation and pseudoparticle virus neutralisation assays reveal a high prevalence of antibody in dromedary camels in Egypt, June 2013. 2013;18(36):20574.
66. Müller MA, Meyer B, Corman VM, Al-Masri M, Turkestani A, Ritz D, et al. Presence of Middle East respiratory syndrome coronavirus antibodies in Saudi Arabia: a nationwide, cross-sectional, serological study. 2015;15(5):559-64.
67. Lee J, Hughes T, Lee M-H, Field H, Rovie-Ryan JJ, Sitam FT, et al. No evidence of coronaviruses or other potentially zoonotic viruses in Sunda pangolins (*Manis javanica*) entering the wildlife trade via Malaysia. 2020;17(3):406-18.
68. Prince T, Smith SL, Radford AD, Solomon T, Hughes GL, Patterson EIJV. SARS-CoV-2 infections in animals: reservoirs for reverse zoonosis and models for study. 2021;13(3):494.
69. Gaunt ER, Hardie A, Claas EC, Simmonds P, Templeton KEJJocm. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. 2010;48(8):2940-7.
70. Rucinski SL, Binnicker MJ, Thomas AS, Patel R, editors. Seasonality of Coronavirus 229E, HKU1, NL63, and OC43 From 2014 to 2020. Mayo Clinic Proceedings; 2020: Elsevier.
71. Zeng Z-Q, Chen D-H, Tan W-P, Qiu S-Y, Xu D, Liang H-X, et al. Epidemiology and clinical characteristics of human coronaviruses OC43, 229E, NL63, and HKU1: a study of hospitalized children with acute respiratory tract infection in Guangzhou, China. 2018;37:363-9.
72. Dijkman R, Jebbink MF, Gaunt E, Rossen JW, Templeton KE, Kuijpers TW, et al. The dominance of human coronavirus OC43 and NL63 infections in infants. 2012;53(2):135-9.

73. Sayama Y, Okamoto M, Saito M, Saito-Obata M, Tamaki R, Joboco CD, et al. Seroprevalence of four endemic human coronaviruses antibodies among Filipino children and their cross-reactivity and neutralization capacity against SARS-CoV-2. 2022.
74. Shao X, Guo X, Esper F, Weibel C, Kahn JS. J. Seroepidemiology of group I human coronaviruses in children. 2007;40(3):207-13.
75. Monto AS, DeJonge PM, Callear AP, Bazzi LA, Capriola SB, Malosh RE, et al. Coronavirus occurrence and transmission over 8 years in the HIVE cohort of households in Michigan. 2020;222(1):9-16.
76. Zhou W, Wang W, Wang H, Lu R, Tan W. J. First infection by all four non-severe acute respiratory syndrome human coronaviruses takes place during childhood. 2013;13:1-8.
77. Cabeça TK, Passos AM, Granato C, Bellei NJ. J. Human coronavirus occurrence in different populations of Sao Paulo: A comprehensive nine-year study using a pan-coronavirus RT-PCR assay. 2013;44:335-9.
78. Cabeça TK, Granato C, Bellei NJ. J. viruses or. Epidemiological and clinical features of human coronavirus infections among different subsets of patients. 2013;7(6):1040-7.
79. Trombetta H, Faggion HZ, Leotte J, Nogueira MB, Vidal LR, Raboni SMJP, et al. Human coronavirus and severe acute respiratory infection in Southern Brazil. 2016;110(3):113-8.
80. Nobre AFS, Sousa RCM, Santos MCd, Barbagelata LS, Costa Júnior E, Lima DF, et al. First detection of human coronaviruses associated with acute respiratory infection in Northern Brazil/Primeira detecção de coronavírus humano associado à infecção respiratória aguda na Região Norte do Brasil. 37-41.
81. Abbas A. Imunologia celular e molecular 7a edição: Elsevier Brasil; 2012.
82. Tang Y-Q, Yuan J, Osapay G, Osapay K, Tran D, Miller CJ, et al. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α -defensins. 1999;286(5439):498-502.
83. Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KAJV. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. 2011;3(6):920-40.
84. Borden EC. J. Ci, immunopathology. Interferons: pleiotropic cellular modulators. 1992;62(1):S18-S24.
85. Perlman S, Netland JJ. Nrm. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. 2009;7(6):439-50.

86. Kim Y-M, Shin E-CJE, medicine m. Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection. 2021;53(5):750-60.
87. Stanifer ML, Pervolaraki K, Boulant SJJjoms. Differential regulation of type I and type III interferon signaling. 2019;20(6):1445.
88. Schindler C, Levy DE, Decker TJJoBC. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. 2007;282(28):20059-63.
89. Arunachalam PS, Wimmers F, Mok CKP, Perera RA, Scott M, Hagan T, et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. 2020;369(6508):1210-20.
90. Laing AG, Lorenc A, Del Molino Del Barrio I, Das A, Fish M, Monin L, et al. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. 2020;26(10):1623-35.
91. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu W-C, Uhl S, Hoagland D, Møller R, et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. 2020;181(5):1036-45. e9.
92. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. 2020;369(6504):718-24.
93. Sivori S, Vacca P, Del Zotto G, Munari E, Mingari MC, Moretta LJC, et al. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. 2019;16(5):430-41.
94. Guilliams M, Lambrecht B, Hammad HJMi. Division of labor between lung dendritic cells and macrophages in the defense against pulmonary infections. 2013;6(3):464-73.
95. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, Grifoni A, Okba NM, Endeman H, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. 2020;5(48):eabd2071.
96. Vardhana SA, Wolchok JDJJJoEM. The many faces of the anti-COVID immune response. 2020;217(6).
97. Sette A, Crotty SJC. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. 2021;184(4):861-80.
98. Liu J, Wu P, Gao F, Qi J, Kawana-Tachikawa A, Xie J, et al. Novel immunodominant peptide presentation strategy: a featured HLA-A* 2402-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope stabilized by intrachain hydrogen bonds from severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein. 2010;84(22):11849-57.
99. Liao M, Liu Y, Yuan J, Wen Y, Xu G, Zhao J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. 2020;26(6):842-4.

100. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. 2020;395(10229):1033-4.
101. Zhou Y, Fu B, Zheng X, Wang D, Zhao C, Qi Y, et al. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. 2020;7(6):998-1002.
102. Ye Q, Wang B, Mao JJ. The pathogenesis and treatment of the Cytokine Storm in COVID-19. 2020;80(6):607-13.
103. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFJ. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. 2020;20(6):363-74.
104. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. 2008;26:261.
105. Crotty S. A brief history of T cell help to B cells. 2015;15(3):185-9.
106. Klasse PJ. Neutralization of virus infectivity by antibodies: old problems in new perspectives. 2014;2014.
107. Long Q-X, Liu B-Z, Deng H-J, Wu G-C, Deng K, Chen Y-K, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. 2020;26(6):845-8.
108. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;71(16):2027-34.
109. Shan S, Mok CK, Zhang S, Lan J, Li J, Yang Z, et al. A potent and protective human neutralizing antibody against SARS-CoV-2 variants. 2021;12.
110. Salazar E, Kuchipudi SV, Christensen PA, Eagar T, Yi X, Zhao P, et al. Convalescent plasma anti-SARS-CoV-2 spike protein ectodomain and receptor-binding domain IgG correlate with virus neutralization. 2020;130(12):6728-38.
111. Santiago L, Uranga-Murillo I, Arias M, González-Ramírez AM, Macías-León J, Moreo E, et al. Determination of the concentration of IgG against the spike receptor-binding domain that predicts the viral neutralizing activity of convalescent plasma and serum against SARS-CoV-2. 2021;10(3):208.
112. Galipeau Y, Greig M, Liu G, Driedger M, Langlois M-A. Humoral responses and serological assays in SARS-CoV-2 infections. 2020;11:610688.
113. Xiao AT, Gao C, Zhang S. Profile of specific antibodies to SARS-CoV-2: the first report. 2020;81(1):147-78.
114. Röltgen K, Powell AE, Wirz OF, Stevens BA, Hogan CA, Najeeb J, et al. Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. 2020;5(54):eabe0240.

115. Premkumar L, Segovia-Chumbez B, Jadi R, Martinez DR, Raut R, Markmann AJ, et al. The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. 2020;5(48):eabc8413.
116. Ma H, Zeng W, He H, Zhao D, Jiang D, Zhou P, et al. Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19. 2020;17(7):773-5.
117. Padoan A, Sciacovelli L, Basso D, Negrini D, Zuin S, Cosma C, et al. IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study. 2020;507:164-6.
118. Ma H, Zeng W, He H, Zhao D, Yang Y, Jiang D, et al. COVID-19 diagnosis and study of serum SARS-CoV-2 specific IgA, IgM and IgG by chemiluminescence immunoanalysis. 2020.
119. Ou J, Tan M, He H, Tan H, Mai J, Long Y, et al. Study on the expression levels of antibodies against SARS-CoV-2 at different period of disease and its related factors in 192 cases of COVID-19 patients. 2020.
120. Carsetti R, Zaffina S, Piano Mortari E, Terreri S, Corrente F, Capponi C, et al. Different innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 infection of asymptomatic, mild, and severe cases. 2020;11:610300.
121. Lynch KL, Whitman JD, Lacanienta NP, Beckerdite EW, Kastner SA, Shy BR, et al. Magnitude and kinetics of anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibody responses and their relationship to disease severity. 2021;72(2):301-8.
122. Sun B, Feng Y, Mo X, Zheng P, Wang Q, Li P, et al. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. 2020;9(1):940-8.
123. Hu Q, Cui X, Liu X, Peng B, Jiang J, Wang X, et al. The production of antibodies for SARS-CoV-2 and its clinical implication. 2020.
124. Qin C, Ziwei MPLZM, Tao SYMY, Ke PCXMP, Shang MMPKJCID. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China; Clinical Infectious Diseases; Oxford Academic. 2020.
125. Staines HM, Kirwan DE, Clark DJ, Adams ER, Augustin Y, Byrne RL, et al. Dynamics of IgG seroconversion and pathophysiology of COVID-19 infections. 2020.
126. Cervia C, Nilsson J, Zurbuchen Y, Valaperti A, Schreiner J, Wolfensberger A, et al. Systemic and mucosal antibody responses specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19. 2021;147(2):545-57. e9.
127. Jaimes JA, André NM, Chappie JS, Millet JK, Whittaker GRJJomb. Phylogenetic analysis and structural modeling of SARS-CoV-2 spike protein reveals an evolutionary distinct and proteolytically sensitive activation loop. 2020;432(10):3309-25.

128. Braun J, Loyal L, Frentsch M, Wendisch D, Georg P, Kurth F, et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. 2020;587(7833):270-4.
129. Henss L, Scholz T, Von Rhein C, Wieters I, Borgans F, Eberhardt FJ, et al. Analysis of humoral immune responses in patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. 2021;223(1):56-61.
130. Sagar M, Reifler K, Rossi M, Miller NS, Sinha P, White LF, et al. Recent endemic coronavirus infection is associated with less-severe COVID-19. 2021;131(1).
131. Hicks J, Klumpp-Thomas C, Kalish H, Shunmugavel A, Mehalko J, Denson J-P, et al. Serologic cross-reactivity of SARS-CoV-2 with endemic and seasonal Betacoronaviruses. 2021;41(5):906-13.
132. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. 2003;300(5624):1394-9.
133. Liu H, Wu NC, Yuan M, Bangaru S, Torres JL, Caniels TG, et al. Cross-neutralization of a SARS-CoV-2 antibody to a functionally conserved site is mediated by avidity. 2020;53(6):1272-80. e5.
134. Iyer AS, Jones FK, Nodoushani A, Kelly M, Becker M, Slater D, et al. Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients. 2020;5(52):eabe0367.
135. Anderson EM, Goodwin EC, Verma A, Arevalo CP, Bolton MJ, Weirick ME, et al. Seasonal human coronavirus antibodies are boosted upon SARS-CoV-2 infection but not associated with protection. 2021;184(7):1858-64. e10.
136. Prévost J, Gasser R, Beaudoin-Bussièrès G, Richard J, Duerr R, Laumaea A, et al. Cross-sectional evaluation of humoral responses against SARS-CoV-2 spike. 2020;1(7):100126.
137. Aguilar-Bretones M, Westerhuis BM, Raadsen MP, de Bruin E, Chandler FD, Okba NM, et al. Seasonal coronavirus-specific B cells with limited SARS-CoV-2 cross-reactivity dominate the IgG response in severe COVID-19. 2021;131(21).
138. Schwarzkopf S, Krawczyk A, Knop D, Klump H, Heinold A, Heinemann FM, et al. Cellular immunity in COVID-19 convalescents with PCR-confirmed infection but with undetectable SARS-CoV-2-specific IgG. 2021;27(1):122.
139. Siddiqi Z, Fatima J, Bhatt D, Shukla V, Malik M, Ashfaq A, et al. Prevalence of comorbidities in survivors and non-survivors of severe COVID-19 at a dedicated COVID care centre. 2022;70:11-2.

140. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. 2020;395(10229):1054-62.
141. Vekaria B, Overton C, Wiśniowski A, Ahmad S, Aparicio-Castro A, Curran-Sebastian J, et al. Hospital length of stay for COVID-19 patients: Data-driven methods for forward planning. 2021;21(1):1-15.
142. Alimohamadi Y, Yekta EM, Sepandi M, Sharafoddin M, Arshadi M, Hesari EJMRM. Hospital length of stay for COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. 2022;17.
143. Covid C, Team R, COVID C, Team R, Bialek S, Boundy E, et al. Severe outcomes among patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19)—United States, February 12–March 16, 2020. 2020;69(12):343.
144. Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, Antonelli M, Cabrini L, Castelli A, et al. Baseline characteristics and outcomes of 1591 patients infected with SARS-CoV-2 admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. 2020;323(16):1574-81.
145. Yehia BR, Winegar A, Fogel R, Fakhri M, Ottenbacher A, Jessor C, et al. Association of race with mortality among patients hospitalized with coronavirus disease 2019 (COVID-19) at 92 US hospitals. 2020;3(8):e2018039-e.
146. Guan W-j, Liang W-h, Zhao Y, Liang H-r, Chen Z-s, Li Y-m, et al. Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis. 2020;55(5).
147. Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, Bacon S, Bates C, Morton CE, et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. 2020;584(7821):430-6.
148. Huang B, Cai Y, Li N, Li K, Wang Z, Li L, et al. Sex-based clinical and immunological differences in COVID-19. 2021;21(1):1-10.
149. Tai W, He L, Zhang X, Pu J, Voronin D, Jiang S, et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. 2020;17(6):613-20.
150. Lv H, Wu NC, Tsang OT-Y, Yuan M, Perera RA, Leung WS, et al. Cross-reactive antibody response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV infections. 2020;31(9):107725.
151. Gouma S, Weirick ME, Bolton MJ, Arevalo CP, Goodwin EC, Anderson EM, et al. Health care worker seromonitoring reveals complex relationships between common coronavirus antibodies and COVID-19 symptom duration. 2021;6(16).

152. Lin C-Y, Wolf J, Brice DC, Sun Y, Locke M, Cherry S, et al. Pre-existing humoral immunity to human common cold coronaviruses negatively impacts the protective SARS-CoV-2 antibody response. 2022;30(1):83-96. e4.

153. Dugas M, Grote-Westrick T, Vollenberg R, Lorentzen E, Brix T, Schmidt H, et al. Less severe course of COVID-19 is associated with elevated levels of antibodies against seasonal human coronaviruses OC43 and HKU1 (HCoV OC43, HCoV HKU1). 2021;105:304-6.

154. Baker SCJTPidj. Coronaviruses: from common colds to severe acute respiratory syndrome. 2004;23(11):1049-50.

155. Nguyen-Contant P, Embong AK, Kanagaiah P, Chaves FA, Yang H, Branche AR, et al. S protein-reactive IgG and memory B cell production after human SARS-CoV-2 infection includes broad reactivity to the S2 subunit. 2020;11(5):e01991-20.