



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

LUIS GUILHERME CHIMENO

**Expressão de citocinas e perfil de imunoglobulinas na
COVID-19: avaliação em doadores de plasma
convalescente *versus* vacinados**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Marjorie de Assis Golim

**Botucatu
2022**

LUIS GUILHERME CHIMENO

Expressão de citocinas e perfil de imunoglobulinas na
COVID-19: avaliação em doadores de plasma
convalescente *versus* vacinados

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre(a) em Pesquisa e
Desenvolvimento: Biotecnologia Médica.

Orientador (a): Prof(a).Dr(a). Marjorie de Assis Golim

Botucatu
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Chimeno, Luis Guilherme.

Expressão de citocinas e perfil de imunoglobulinas na
COVID-19 : avaliação em doadores de plasma convalescente
versus vacinados / Luis Guilherme Chimeno. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Marjorie de Assis Golim
Capes: 21104000

1. COVID-19. 2. Citocinas. 3. Plasma. 4. Imunoglobulinas.

Palavras-chave: COVID-19; Citocinas; Plasma convalescente.

Dedicatória

Dedico a minha família, amigos e a todos que
de alguma forma me incentivaram nesta jornada.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por ter me guiado, guardado e abençoado a cada instante em todos os momentos.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Marjorie de Assis Golim, por todo carinho e dedicação para com seus alunos, pela oportunidade ímpar de aprendizado deste a especialização até o mestrado, mostrando-me como é maravilhosa a área de pesquisa.

Aos meus pais Antônia Claudia Moreira Szochalewicz Chimeno e Edson Chimeno, por todo amor incondicional, incentivo nos estudos, apoio emocional e pelas palavras sábias em momentos de crise.

Aos meus irmãos Lauro e João Pedro por cada momento de carinho e diversão necessária nesta jornada.

As minhas avós Oscarlina Alves Moreira e Valdete Alves Moreira, por todo amor incondicional e momentos de carinho necessários.

Os meus amigos do Laboratório de Citometria, Rodrigo Santos Lima, Mariana Janas Puatto, Lia Mantovani e Francielle Rocha, por todos os momentos de descontração.

As minhas amigas Larissa Sarri Binelli, Maria Eduarda Gonçalves, Isabela Silva Carrilho e em especial a Aline Márcia Marque Braz, por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho, as conversas e risadas que foram indispensáveis durante todos estes anos no laboratório.

Por fim, aos participantes desta pesquisa que proporcionaram o desenvolvimento deste projeto através de sua participação e a todos que de alguma maneira estiveram envolvidos neste estudo.

Epígrafe

“A amizade é um meio de nos isolarmos da humanidade cultivando algumas pessoas”
(Carlos Drummond de Andrade)

Resumo

CHIMENO, L. G. **Expressão de citocinas e perfil de imunoglobulinas na COVID-19: avaliação em doadores de plasma convalescente versus vacinados.** 2022. 62 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2022.

No final de 2019 a cidade de Wuhan, na província chinesa de Hubei, anunciou oficialmente a primeira epidemia pelo coronavírus 2 (SARS-CoV-2), que culminou na pandemia de COVID-19 (doença do coronavírus 2019), acometendo até o momento cerca de 508 milhões de pessoas. Múltiplos fatores influenciam a evolução da COVID-19, havendo dinâmicas alterações na imunidade celular, humoral e perfis de citocinas/quimiocinas, podendo progredir para hiperinflamação sistêmica. A fim de mitigar a ação deste fenômeno inflamatório e a evolução a infecção viral, a terapia com plasma convalescente é uma alternativa a ser considerada. O plasma oriundo de pessoas que se recuperaram da doença e desenvolveram imunidade pode fornecer imunização passiva a indivíduos infectados, visando neutralizar o patógeno e amenizar efeitos da resposta inflamatória grave. Este estudo teve por objetivo avaliar o perfil de expressão de citocinas/quimiocinas e imunoglobulinas específicas ao SARS-CoV-2 em candidatos elegíveis a doação de plasma convalescente para COVID-19. Os participantes foram distribuídos em grupos: G0 – n= 15 (controle - *naïve* para SARS-CoV-2 e não vacinados), G1 – n= 14 (*naïve* para SARS-CoV-2 e vacinados), G2 – n = 6 (convalescentes; não vacinados) e G3 – n = 15 (convalescentes; vacinados), totalizando 50 indivíduos. Foram avaliadas IL-8, RANTES, MIG, MPC-1 e IP-10, as concentrações dos anticorpos de classe IgG dirigidos contra SARS-CoV-2 (anti-nucleocapsídeo, anti-spike-S1 e anti-RBD) e a capacidade de inibição dos anticorpos neutralizantes (Nabs). Foi possível observar maiores níveis de anti-spike S1 e anti-RBD (mediana = 100.153 pg/mL e 41.253 pg/mL, respectivamente), bem como maior taxa de neutralização (mediana = 98%) em G3 quando comparado com os demais grupos. Quanto às quimiocinas, os grupos G1 e G3 apresentaram menores níveis, e estes são inversamente correlacionados aos níveis de NAbs em G3. Ao passo que G2 apresentou níveis plasmáticos mais elevados de IP-10, IL-8 e anti-nucleocapsídeos, características que podem ser deletérias ao receptor. Os resultados apontam para o potencial do plasma de indivíduos vacinados, independente de terem tido COVID-19, dado o conjunto de características que podem favorecer imunidade passiva, mediante as concentrações de imunoglobulinas específicas ao SARS-CoV-2 (anti-S1 e RBD) e maior capacidade de inibição viral. Desta forma, o plasma dos grupos G3 e G1, respectivamente, parecem agregar as características mais seguras e eficazes para TPC, de modo mais eficiente do que o plasma oriundo de indivíduos não vacinados e recuperados da COVID-19.

Palavras-chave: Citocinas, Plasma Convalescente, COVID-19

Abstract

CHIMENO, L. G. **Cytokine expression and immunoglobulin profile in COVID-19: evaluation in convalescent versus vaccinated plasma donors.** 2022. 62 p. Thesis (Master's degree). Botucatu School of Medicine, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2022.

At the end of 2019, the city of Wuhan, in the Chinese province of Hubei, officially announced the first epidemic of coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which culminated in the pandemic of COVID-19 (coronavirus disease 2019), affecting until the present. currently around 508 million people. Multiple factors influence the evolution of COVID-19, with dynamic changes in cellular and humoral immunity and cytokine/chemokine profiles, which can progress to systemic hyperinflammation. In order to mitigate the action of this inflammatory phenomenon and the evolution to viral infection, therapy with convalescent plasma has been considered an alternative. Plasma from people who have recovered from the disease and developed immunity can provide passive immunization to infected individuals, aiming to neutralize the pathogen and mitigate the effects of the severe inflammatory response. This study aimed to evaluate the expression profile of SARS-CoV-2-specific cytokines/chemokines and immunoglobulins in eligible candidates for COVID-19 convalescent plasma donation. Participants were divided into groups: G0 – n= 15 (control - naive to SARS-CoV-2 and unvaccinated), G1 – n= 14 (naive to SARS-CoV-2 and vaccinated), G2 – n = 6 (convalescents; not vaccinated) and G3 – n = 15 (convalescents; vaccinated), totaling 50 individuals. IL-8, RANTES, MIG, MPC-1 and IP-10, the concentrations of IgG class antibodies directed against SARS-CoV-2 (anti-nucleocapsid, anti-spike-S1 and anti-RBD) and the inhibition of neutralizing antibodies (Nabs). It was possible to observe higher levels of anti-Spike S1 and anti-RBD (median = 100,153 pg/mL and 41,253 pg/mL, respectively), as well as a higher neutralization rate (median = 98%) in G3 when compared to the other groups. As for chemokines, groups G1 and G3 had lower levels, and these are inversely correlated with NAbs levels in G3. While G2 showed higher plasma levels of IP-10, IL-8 and anti-nucleocapsids, characteristics that can be deleterious to the receptor. The results point to the potential of the plasma of vaccinated individuals, regardless of having had COVID-19, given the set of characteristics that can favor passive immunity, through the concentrations of immunoglobulins specific to SARS-CoV-2 (anti-S1 and RBD) and greater capacity for viral inhibition. In this way, plasma from groups G3 and G1, respectively, seem to aggregate the safest and most effective characteristics for PCT, more efficiently than plasma from unvaccinated individuals and recovered from COVID-19.

Keywords: Cytokines, Convalescent Plasma, COVID-19

Lista de Figura

Figura 1 — Estrutura viral do SARS-CoV-2	17
Figura 2 — Immunopatologia na COVID-19	19
Figura 3 — Mecanismos de ativação imunológica de vacinas baseadas em adenovírus para COVID-19	24
Figura 4 —Delineamento metodológico	29
Figura 5 — Níveis de anti-Spike S1, RBD e nucleocapsídeo nos grupos	34
Figura 6 — Capacidade de anticorpos neutralizantes em inibir a interação do vírus à proteína ACE2	38
Figura 7 — Índice de neutralização em decorrência à exposição aos epítomos virais	39
Figura 8 — Dosagem plasmática de CXCL10/IP-10 estratificado por grupos	42
Figura 9 — Dosagem plasmática de CXCL8/IL-8 estratificado por grupos	43
Figura 10 — Sinalização de IP-10 em células epiteliais das vias aéreas humanas .	46

Lista de Tabela

Tabela 1 –Classificação dos CoVs capazes de infectar seres humanos	16
Tabela 2 — Estratificação dos grupos	27
Tabela 3 — Critérios de inclusão específicos dos grupos	28
Tabela 4 — Caracterização dos indivíduos por grupo (frequência absoluta e relativa)	32
Tabela 5 – Concentrações dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 e capacidade de neutralização viral	33
Tabela 6 – Comparação entre os grupos dos níveis de imunoglobulinas anti-SARS- CoV-2 (Spike S1, RBD, Nucleocapsídeo) e do índice de inibição dos anticorpos neutralizantes	35
Tabela 7 – Concentrações de citocinas/quimiocinas por grupos	40
Tabela 8 – Níveis de correlação	45

Lista de Abreviações

AC – Anticorpos

ACE2 – Enzima conversora de angiotensina 2

ADE – Amplificação dependente de anticorpo (do inglês, *Antibody-dependent enhancement*)

AMPs – Peptídeos microbianos

Anti-n – Anticorpo anti-nucleocapsídeo

ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária

RBD - *receptor binding domain*

CCL2 – MCP-1

CCL5 – RANTES

CEP – Comitê de ética em pesquisa

CoV – Coronavírus

COVID-19 – Doença do coronavírus 2019

CPF – Cadastro de pessoa física

CT – Termo do inglês *Cycle Threshold*"

CXCL8 – IL-8

EUA – Estados Unidos da América

FDA – do inglês "*Food and Drugs Administration*"

hCoV – Coronavírus humano

IFNs – Interferons

IFN-1 – Interferon tipo 1

IFN-3 – Interferon tipo 3

IL – Interleucina

JAK – Janus Quinase

MERS-CoV – Coronavírus da síndrome respiratória do oriente médio

MIG – CXCL9

miRNA – MicroRNA

mRNA – RNA mensageiro

MS – Ministério da Saúde

NAbs – Anticorpos neutralizantes

NF-κB - Fator nuclear kappa B

NLRs – Receptor do tipo NOD

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PC – Plasma convalescente

RBD – do inglês “*receptor binding domain*”

PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões

Proteína E – Proteína do envelope viral

Proteína M – Proteína da membrana viral

Proteína N – Proteína do nucleocapsídeo

PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões

RIG-I – Receptor do tipo RIG

RG – Registro geral

RT-PCR – Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (do inglês “*reverse-transcriptase polymerase chain reaction*”)

SARS-CoV – Coronavírus da síndrome respiratória aguda

SARS-CoV-2 - Coronavírus2 da síndrome respiratória aguda grave

SDRA – Síndrome do desconforto respiratório agudo

SPIKE – glicoproteína S

SUS – Sistema Único de Saúde

TCLE – Termo de consentimento livre esclarecido

TLRs – Receptores Toll Like endossômico

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TPC – Terapia de plasma convalescente

TRALI – Lesão pulmonar associada à transfusão (do inglês “*transfusion related acute lung injury*”)

UTI – Unidade de tratamento intensivo

WHO – Organização mundial de saúde (do inglês “*World Health Organization*”)

α -CoV – Alfa coronavírus

β -Cov – Beta coronavírus

γ -CoV – Gama coronavírus

δ -CoV – Delta coronavírus

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Característica e estrutura viral	15
1.2 Processo de infecção celular	17
1.3. Estado de Hipercitocinemia (Tempestade de citocinas)	20
1.4. Uso do Plasma Convalescente na COVID-19	21
1.5. Imunização	23
2. OBJETIVO GERAL	26
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	27
3.1 Definição de amostragem	27
3.2 Amostra de sangue periférico	28
3.3.1 Caracterização de imunidade prévia contra o vírus SARS-CoV-2	30
3.3.2 Citocinas/Quimiocinas	30
3.3.3 Detecção de anticorpos neutralizantes	30
3.3.4 Pannel sorológico de IgG anti-SARS-CoV-2	31
3.3.5 Análise estatística	31
3.3.6 Análise de correlação	31
4. RESULTADO E DISCUSSÃO	32
4.1 Anticorpos anti-SARS-CoV-2 nos diferentes grupos	33
4.2 Dosagens de quimiocinas plasmáticas	40
4.3 Correlação entre as variáveis	45
5. CONCLUSÃO	49
6. REFERÊNCIAS	50
7. ANEXOS	61

1. INTRODUÇÃO

No final de 2019, no mês de dezembro, a cidade de Wuhan na província chinesa de Hubei, anunciou oficialmente a primeira epidemia causada pelo novo coronavírus 2 (SARS-CoV-2), que culminou numa pandemia mundial, sendo a doença denominada como COVID-19 (doença do coronavírus 2019). O vírus infecta o trato respiratório que pode variar desde sintomas de resfriado comum até o quadro de síndrome respiratória aguda grave. (JAN, 2020; WHO, 2021).

Até o primeiro semestre de 2022, segundo a Organização Mundial da Saúde (Who), a COVID-19 acometeu cerca de 508 milhões de pessoas em todo o mundo, levando a óbitos cerca de 6,2 milhões de indivíduos. Destes, 30,3 milhões de casos e 662 mil óbitos foram registrados somente no Brasil, que teve o primeiro caso registrado em 26 de fevereiro de 2020 (MINISTERIO DA SAUDE, 2020), sendo o terceiro país com maior número de casos, estando atrás dos Estados Unidos da América (EUA) e Índia (WHO, 2021; BRASIL, 2021c).

O alto número de casos deve-se a elevada taxa de transmissibilidade do vírus, que ocorre pelo contato com secreções (gotículas respiratórias) expelidas por tosse, expiro e afins, de indivíduos contaminados, sendo eles sintomáticos ou assintomáticos. O nível de transmissibilidade sofre influência direta de fatores como tempo de exposição e distanciamento da fonte de infectada, tendo como maior risco de contágio a exposição a indivíduos sintomáticos. Ressalta-se também como fonte de transmissão a capacidade do vírus permanecer ativo em superfícies e em suspensão no ar (aerossóis) (WIERSINGA, 2020; BOUROUIBA, 2020).

1.1 Característica e estrutura viral

Os coronavírus (CoV) são categorizados em quatro gêneros distintos, os alfa-coronavírus (α -CoV), beta-coronavírus (β -CoV), gama-coronavírus (γ -CoV) e delta-coronavírus (δ -CoV), numerados de um a quatro respectivamente. Esta família viral compartilha diversas semelhanças genotípicas e fenotípicas. Os coronavírus são conhecidos por sua capacidade de causar infecções respiratórias, sendo os gêneros α -CoV e β -CoV capazes de infectar células humanas (Tabela 1) (SU, 2016).

Tabela 1 – Classificação dos CoVs capazes de infectar seres humanos.

Gênero	Espécies
β-CoV	SARS-CoV-2
	SARS-CoV
	MERS-CoV
	HCoV-HKU1
	HCoV-OC34
α-CoV	HCoV-NL63
	HCoV-229E

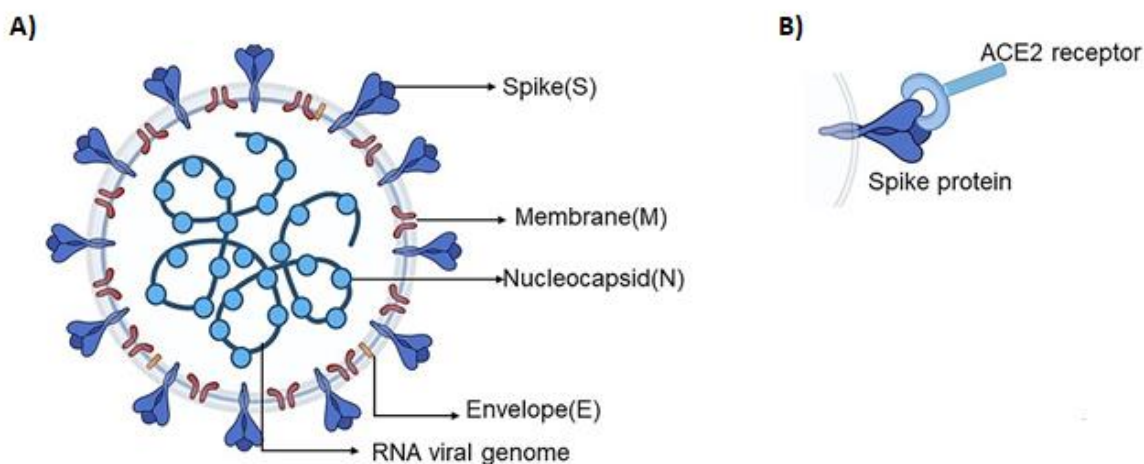
Fonte: Adaptado de SU, Shuo et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. Trends in microbiology, v. 24, n. 6, p. 490-502, 2016; PASQUEREAU, Sébastien et al. Resveratrol inhibits HCoV-229E and SARS-CoV-2 coronavirus replication *in vitro*. Viruses, v. 13, n. 2, p. 354, 2021.

Sete espécies de coronavírus conseguem causar infecção em humanos, sendo HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 as que são mais prevalentes, porém que possuem caráter endêmico de baixa patogenicidade, causando infecções comumente assintomáticas ou apresentando síndrome gripal leve autolimitada. Deve-se destacar duas espécies, o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), que surgiu por volta do ano de 2002, e o coronavírus da síndrome respiratória do oriente médio (MERS-CoV), identificado em 2012. Estes sendo os primeiros coronavírus relatados a induzirem complicações de quadro clínico e elevada taxa de mortalidade, 9% e 36% respectivamente. O novo coronavírus diferencia-se dos demais devido à capacidade de causar complicação em múltiplos órgãos e um estado de hiperinflamação que pode levar ao óbito (SU, 2016; PASQUEREAU, 2021).

O SARS-CoV-2 agente etiológico causador da atual pandemia mundial é pertencente ao gênero *Betacoronavirus*, família *Coronaviridae* e subfamília *Orthocoronavirinae*, sendo seu genoma semelhante ao SARS-CoV, constituído por RNA de fita simples de polaridade positiva, tamanho variado de 26kb a 32kb, envelope proteico constituído por quatro proteínas principais, sendo elas: glicoproteína de pico (S “*Spike*”), formada pelas subunidades S1 e S2, cita-se especialmente o domínio ligante ao receptor [do inglês *receptor binding domain* (RBD)] presente em S1 (PEREIRA, 2021; WALLS, 2020); proteína da membrana viral (M); proteína do

envolpe viral (E) e proteína do nucleocapsídeo (N), seis proteínas acessórias e demais proteínas não estruturais (Figura 1) (LIMA, 2020)

Figura 1 – Estrutura viral do SARS-CoV-2



A) O SARS-CoV-2 tem sua estrutura formada principalmente pelas proteínas de superfície *Spike* (S), membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídeo (N), sendo esta disposta no RNA viral. B) O vírus utiliza-se da proteína S para ligar-se à proteína ACE2 humana.

Fonte: MIN, Long; SUN, Qiu. Antibodies and vaccines target RBD of SARS-CoV-2. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, p. 247, 2021.

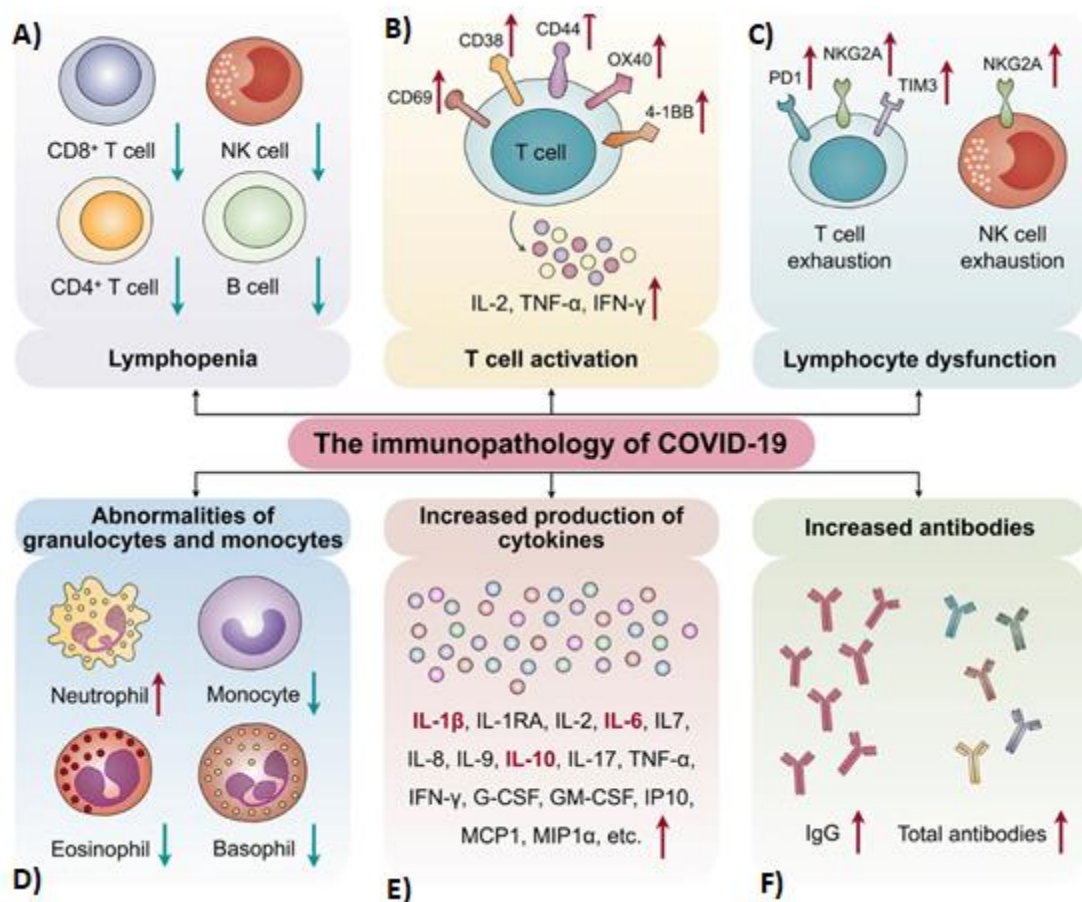
1.2 Processo de infecção celular

A infecção celular e de tecidos pode ocorrer por endocitose ou fusão de membrana, nos dois casos é mediada pela ligação da proteína S ao receptor correspondente na membrana celular, neste caso sendo a enzima conversora de angiotensina 2 humana (ACE2). Este receptor é expresso em diversas células como células renais, pneumócitos tipo I e tipo II, adipócitos, células cardíacas, do tronco cerebral, do trato gastrointestinal, linfócitos, monócitos, mucosa nasal e oral (MARTINEZ-ROJAS, 2020). A presença da glicoproteína S é um dos fatores principais que determinam a virulência, havendo semelhança de 76% dos aminoácidos formadores desta proteína entre as espécies SARS-CoV e SARS-CoV-2 (OU, 2020)

Durante a infecção do SARS-CoV-2 a imunidade inata é a primeira linha de defesa, a qual desempenha papel fundamental na inibição da disseminação patogênica. Ela

é baseada no reconhecimento de padrões moleculares gerais. Esses padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são detectados por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que incluem receptores toll-like endossomais (TLRs), receptor do tipo RIG (RIG -I) e receptores do tipo NOD (NLRs). As interações PAMPs – PRRs desencadeiam a produção de promotores inflamatórios como fator nuclear kappa B (NF- κ B) e o regulador de interferon do tipo 3 (IFN-3) que contribuem para produção e liberação de interferon do tipo 1 (IFN-1) e citocinas pró-inflamatórias. A infecção pelo SARS-CoV-2 leva a uma baixa produção de interferons (IFNs) do tipo 1 e tipo 3 (relacionados a inibição da replicação viral) e elevada produção de quimiocinas. Durante o curso da doença o vírus se replica sem provocar a produção de IFNs, devido possuir diversas proteínas em sua estrutura que realizam papel antagônico à produção e ativação de IFN, culminando em diversas alterações no sistema imunológico, conforme demonstrado na figura 2 (KHOSROSHAHI, 2021).

Figura 2 – Immunopatologia da COVID-19



A linfopenia é frequente na infecção por SARS-CoV-2 e acomete todos os tipos de linfócitos, sendo mais acentuada de acordo com a severidade da doença (A); a ativação de células T é dada pelo aumento da expressão de receptores de superfície vírus específico, induzindo liberação de IL-2, TNF- α e INF- γ (B); linfócitos T e células NK apresentam fenótipo de exaustão celular (aumento de proteína de morte celular programada – PD1, domínio de imunoglobulina de células T e domínio de mucina 3 - TIM3 e receptor inibitório de NK - NKG2A) (C); também há desbalanço nos níveis neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos (D); aumento de citocinas e quimiocinas, em especial IL-1 β , IL-6 e IL-10 que caracterizam a tempestade de citocinas (E); culminando na produção de anticorpos totais e da classe IgG (F).

Fonte: YANG, Li et al. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. Signal transduction and targeted therapy, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2020.

1.3. Estado de Hipercitocinemia (Tempestade de citocinas)

Nos casos graves de COVID-19 a resposta inflamatória desencadeada pela infecção estimula a produção exacerbada de citocinas inflamatórias, induzindo uma hiperinflamação sistêmica intensa (a denominada “tempestade de citocinas”). Esta desregulação imune é responsável pelo intenso dano tecidual e celular, pela inflamação pulmonar e sistêmica, levando a quadros de pneumonia viral letal, sepse viral e síndrome respiratória aguda severa. Além de contribuir para incidência de prováveis complicações hepáticas, cardiovasculares e neurais (KIM, 2021).

Observando a evolução clínica da COVID-19 a literatura reporta aumento nas concentrações de IL-1 β , CXCL8 (IL-8), IL-10, CCL2 (MPC-1), IFN- γ , CXCL10 (IP-10) e TNF- α nos pacientes com quadro moderado, enquanto IL-2, IL-10, IP-10, MPC-1 (CCL2) e TNF- α apresentaram-se mais acentuadas nos indivíduos com quadros mais graves, encaminhados a unidade de tratamento intensivo (UTI), podendo indicar biomarcadores de valor preditivo para o agravo da doença (HUANG, 2020).

Alguns estudos reportam aumento dos níveis de RANTES em pacientes com infecção leve, permanecendo elevada após a recuperação, indicando possível associação com a proteção viral promovida por esta quimiocina, sendo ela responsável pela migração e direcionamento de células T no processo da infecção viral aguda, podendo indicar um possível preditor de melhor prognóstico (HERR, 2021).

Zhao e colaboradores reportaram que durante as primeiras semanas de infecção grave ocorre elevação de IL-10 e IL-1RA (antagonista natural de receptor das interleucinas IL-1 α e IL-1 β), as quais possuem padrão de indução anti-inflamatório, permanecendo elevadas até cerca da quarta semana de infecção, enquanto as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-12, IFN- γ e IL-27 aumentam no estágio avançado da infecção, aproximadamente após a quarta semana. Esta correlação negativa entre citocinas anti e pró-inflamatórias, favorece a piora do quadro (ZHAO, 2020).

1.4. Uso do Plasma Convalescente na COVID-19

A fim de mitigar a ação da tempestade de citocinas e os demais efeitos sob o organismo, alternativas de tratamento têm sido buscadas. Dentre elas, a utilização do plasma convalescente (PC), o qual têm histórico de eficácia no tratamento e na profilaxia pós-exposição em infecções respiratórias anteriores à COVID-19.

Os primeiros relatos da utilização da imunização passiva na prevenção e tratamento de doenças infecciosas humanas datam de 1890. O plasma imune obtido de pessoas curadas ou recuperadas, o chamado plasma convalescente (PC), foi usado durante surtos de várias doenças infecciosas, considerando que nas respectivas épocas não haviam outras alternativas terapêuticas e/ou específicas para as patologias. Dentre elas podemos citar: gripe espanhola, sarampo, caxumba, SARS, MERS, febre hemorrágica Argentina, ebola e H1N1 (SANTOS E LIMA, 2020; ENRIA, 2008; WHO, 2014; CHENG 2004; OPAS, 2020).

A transfusão de PC recebeu atenção especial devido ao surgimento da COVID-19 (SARS-CoV-2) (CASADEVALL 2020; CABRERA, 2020). O PC trata-se do plasma de pessoas acometidas previamente pelo patógeno ou derivados, sendo por infecção prévia ou vacinação, o qual possui componentes como anticorpos neutralizantes (NAbs), fatores de coagulação, anticorpos naturais, defensinas (peptídeos antimicrobianos – AMPs), pentraxinas (proteínas de fase aguda envolvidas na regulação da inflamação), exossomos e micro RNA (miRNA) relacionados na ativação e produção de citocinas anti-inflamatórias (MUNOZ, 2005; ROJAS, 2020; ASKENASE, 2020).

A utilização do PC é realizada através da transfusão, denominada como terapia de plasma convalescente (TPC), coletado de forma segura por aférese. A finalidade é fornecer uma imunização passiva aos indivíduos infectados, tendo como principal objetivo neutralizar o patógeno e prover benefícios com a imunomodulação, amenizando efeitos da resposta inflamatória grave (ROJAS, 2020; DUAN, 2020).

No estudo realizado por Bandopadhyay e colaboradores observou-se a ação anti-inflamatória do PC não está somente relacionada com a presença de níveis elevados de NAbs, mas sim, com a sinergia destes anticorpos funcionais com demais fatores presentes no PC. Indivíduos com COVID-19 grave e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) tratados com TPC tiveram redução significativa dos níveis

plasmáticos de IP-10, M-CSF e IL-6, em relação aos tratados com o procedimento padrão. Considerando a forte associação estas citocinas com a presença de SDRA, estes dados corroboram na demonstração da eficiência da TPC na COVID (BANDOPADHYAY, 2020).

Tem sido demonstrado que os níveis de citocinas/quimiocinas no plasma de doadores convalescentes (IFN- γ , IL-10, IL-15, IL-21 e MCP-1) encontram-se mais elevados do que em doadores não expostos ao vírus (grupo controle). Desta forma, a avaliação do impacto destes componentes na evolução da doença se faz necessária, visto que os efeitos da imunomodulação induzida por PC podem favorecer a ação pró ou anti-inflamatória (BONNY, 2020).

A utilização do PC é regulamentada pelos órgãos governamentais como Ministério da Saúde (MS), *Food and Drugs Administration* (FDA), Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), WHO e outras, que forneceram orientações sobre o emprego do PC no decorrer da pandemia, baseando-se em resultados obtidos em estudos clínicos de TPC em outras doenças infecciosas.

Inicialmente no Brasil, baseando-se nas normativas gerais das demais organizações regulatórias, tinha-se como prerrogativa a permissão de coleta e aplicação de PC dos indivíduos convalescentes não imunizados, contraindicando a doação de indivíduos vacinados, devido à falta de dados, naquele momento, referentes à eficácia e segurança da imunidade fornecida pelas vacinas (BRASIL, 2021b). Posteriormente, com o surgimento de resultados promissores e comprobatórios do perfil imunológico dos indivíduos vacinados e eficácia das vacinas disponíveis, foi regulamentado o uso de PC de indivíduos vacinados (BRASIL, 2021a). No entanto, a nota técnica Nº 33/2021 destaca que, no presente momento, doadores vacinados contra a COVID-19 que nunca foram infectados pelo vírus SARS-CoV-2 não atendem a definição de doadores de plasma convalescente, sendo imprescindível que o doador tenha tido a doença, comprovada por exames laboratoriais.

O emprego de TPC é autorizado apenas como protocolos de ensaio clínico ou uso experimental, devendo ser consideradas as orientações da agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA): que os ensaios clínicos sejam controlados, seja realizado monitoramento de eventos adversos, que o projeto tenha aprovação ética e no desenvolvimento haja adoção de boas práticas de nos serviços de saúde, ficando a critério do médico o momento ideal da indicação do PC (BRASIL, 2020).

Quanto ao momento estimado para a aplicação da TPC, não há um consenso na literatura, demonstrando variabilidade dos resultados quanto ao momento e número de administrações do PC, variando segundo o estado clínico do paciente, porém é mais indicado o uso precoce (YE, 2020; MAIR-JENKINS, 2015; VAN DEN BERG, 2022). Os estudos realizados até o momento evidenciam a necessidade de melhor compreender os componentes do PC e suas correlações, de maneira a elucidar sua ação na TPC.

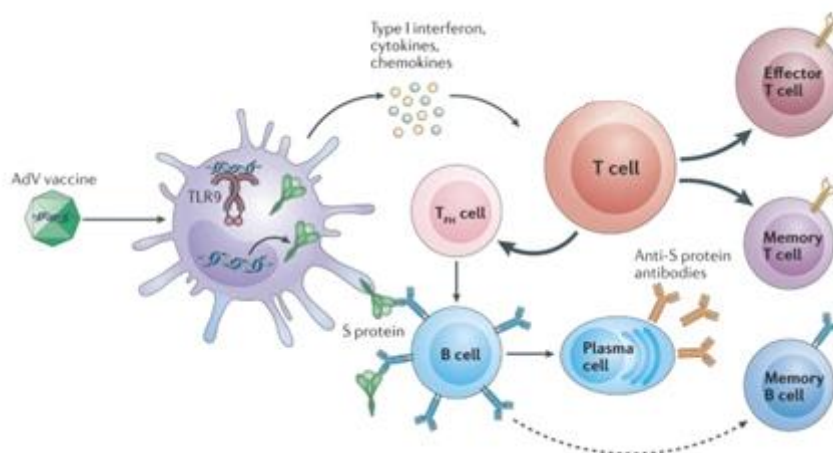
1.5. Imunização

Com o decorrer da pandemia houve a necessidade de desenvolver formas de combate ao vírus já disseminado, devido sua alta transmissibilidade e taxa de mortalidade, considerando a baixa disponibilidade de tratamentos específicos, eficazes que influenciassem diretamente o processo infeccioso. Deste modo, impulsionou-se o desenvolvimento de vacinas contra a COVID-19 por diversos laboratórios produtores de imunizantes no mundo, os quais possuem *status* de aprovação para uso emergencial em decorrência da pandemia mundial (FILHO, 2022).

Os imunizantes têm por objetivo estimular a resposta imune humoral e adaptativa, levando a indução de concentrações suficientes de anticorpos neutralizantes para prevenir a infecção e de número suficiente de linfócitos T de memória para evitar a replicação viral nos pulmões, prevenindo assim formas graves e óbitos. Atualmente no Brasil estão disponíveis alguns imunizantes, dentre eles a ChAdOx nCoV-19, produzida pela universidade de Oxford juntamente a farmacêutica AstraZeneca, que no território nacional faz parceria de produção com o instituto FioCruz. É uma vacina de vetor de adenovírus de chimpanzé deficiente para replicação que expressa a sequência completa do gene da glicoproteína da espícula (*Spike*) do SARS CoV-2, conforme exemplificado na Figura 3 (TEIJARO, 2021; BULA ASTRAZENECA).

Figura 3 – Mecanismos de ativação imunológica de vacinas baseadas em adenovírus para COVID-

19



Fonte: Adaptado de: Teijaro JR, Farber DL. COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. Nature Reviews Immunology. 2021 Mar 5; 21(4).

Em 17 de setembro de 2021 foi aprovado no Brasil a utilização do medicamento baricitinibe para o tratamento de pacientes internados com COVID-19, inserindo-o as medicações disponíveis no Sistema único de Saúde (SUS) através da portaria SCTIE/MS N°34/2022, de 31 de março de 2022. Este primeiro tratamento específico está indicado exclusivamente para adultos que necessitem de oxigenação por máscara facial, cateter nasal, com alto fluxo de oxigênio ou ventilação não invasiva. Este medicamento é um inibidor seletivo das enzimas Janus quinase (JAK) 1 e 2, as quais possuem vias de ação associadas a inflamação e resposta imunológica, deste modo, o baricitinibe modula a sinalização destas vias que levam a hiperinflamação sistêmica, bem como é capaz de inibir a internalização viral por ação indireta na ACE2 (BRASIL, 2022; BRASIL, 2021; ASSADIAS, 2021).

Diante do exposto, considerando a gravidade da COVID-19, especialmente em indivíduos não imunizados e/ou imunocomprometidos, além da restrita disponibilidade de tratamento, torna-se evidente a necessidade de busca ativa de terapias alternativas e eficazes para minimizar este problema e a TPC pode trazer benefícios a estes pacientes. Deste modo, faz-se relevante a caracterização do plasma de indivíduos que não tiveram a doença e foram vacinados, bem como dos indivíduos que tiveram a infecção pelo SARS-CoV-2 após a vacinação, de modo a avaliar o potencial

terapêutico destes plasmas, podendo aumentar a gama de hemocomponentes disponíveis para esta finalidade.

2. OBJETIVOS GERAL

Definir os perfis imunes de doadores de plasma convalescente comparados aos vacinados.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar diferentes grupos de indivíduos com potencial para doação de plasma convalescente, considerando: aqueles que tiveram COVID-19 e se recuperaram (não vacinados); indivíduos que não tiveram COVID-19 e foram vacinados (Astrazeneca) e; indivíduos que tiveram COVID-19 posterior à vacinação;
- Quantificar as concentrações plasmáticas de citocinas/quimiocinas;
- Avaliar se há diferença entre os grupos quanto a produção de anticorpos dirigidos contra os antígenos RBD, nucleocapsídeo e Spike-S1 do SARS-CoV-2.
- Avaliar se há diferença entre os grupos no padrão de anticorpos neutralizantes para SARS-CoV-2;
- Avaliar se há associação entre as variáveis.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Definição de amostragem

Este trabalho trata-se de um estudo de coorte prospectivo, no qual foram convidados a participar indivíduos que entraram em contato ou não com SARS-CoV-2, vacinados ou não, dividindo-os em: G0, G1, G2 e G3 (Tabela - 2) respectivamente, seguindo critérios de inclusão geral e específicos para cada grupo.

Tabela 2 - Estratificação dos grupos.

Grupos	Descrição	Indivíduos (nº)
G0	Indivíduos sem contato prévio com SARS-CoV-2 e não vacinados.	15
G1	Indivíduos sem contato prévio com SARS-CoV-2 e vacinados com duas doses do imunizante da AstraZeneca	15
G2	Indivíduo que tiveram COVID-19 e não foram vacinados	15
G3	Indivíduos vacinados com duas doses do imunizante AstraZeneca e que tiveram COVID-19 posterior a vacinação	15

Foram coletados os seguintes dados demográficos: nome, número do registro geral (RG), Cadastro de Pessoa Física (CPF), número do prontuário MVSoul, sexo, idade, data de nascimento, data provável da infecção pelo SARS-CoV-2 (se aplicável), data do resultado positivo do teste de reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para COVID-19, entre outros.

Para recrutamento dos participantes da pesquisa foram utilizados os seguintes critérios:

Critérios de Inclusão Geral:

- Indivíduos de ambos os sexos;
- Idade superior a 18 anos (completos);
- Que não apresentem comorbidade, doença autoimune e/ou doença infectocontagiosa.

Todos os indivíduos de G0, G1, G2 e G3 atendiam aos critérios de doação de sangue convencional, regulamentadas pela Resolução da Diretoria Colegiada da Anvisa – RDC 34, de 11 de junho de 2014, Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017 – Anexo IV, juntamente a regulamentação estipulada e vigente no decorrer da pandemia prevista na NOTA Técnica nº 19/2020/SEI/GSTCO/DIRE1/ANVISA e suas subseqüentes atualizações, tendo potencial para doação de plasma convalescente.

Para realização deste projeto foram seguidas as normativas vigentes no momento de elaboração e execução do trabalho, podendo haver posteriores alterações nas normativas de doação de sangue e plasma convalescente, diante da dinâmica da COVID-19.

Para cada grupo foram adotados critérios de inclusão específicos (Tabela 3) além dos já mencionados anteriormente.

Tabela 3 – Critérios de inclusão específicos dos grupos.

Grupos	Critérios
G0	Resultado negativo na pesquisa de anticorpos anti-IgM/IgG para COVID-19 Não vacinados contra COVID-19. Amostras pré-pandêmicas
G1	Resultado negativo na pesquisa de anticorpos anti-IgM/IgG para COVID-19 Vacinados com duas doses do imunizante Astrazeneca
G2	RT-PCR para SARS-CoV-2 positivo Quadro clínico leve (síndrome gripal) ou assintomático durante a infecção Não vacinados contra COVID-19
G3	RT-PCR para SARS-CoV-2 positivo após duas doses do imunizante Astrazeneca Quadro clínico leve (síndrome gripal) ou assintomático durante a infecção Caso positivo para COVID-19, 30 dias ou mais após imunização completa (duas doses)

Critérios de Exclusão:

Serão excluídos os participantes que apresentarem nas análises perfil sorológico incompatível aos critérios de inclusão do grupo ao qual foram inseridos.

3.2 Amostra de sangue periférico

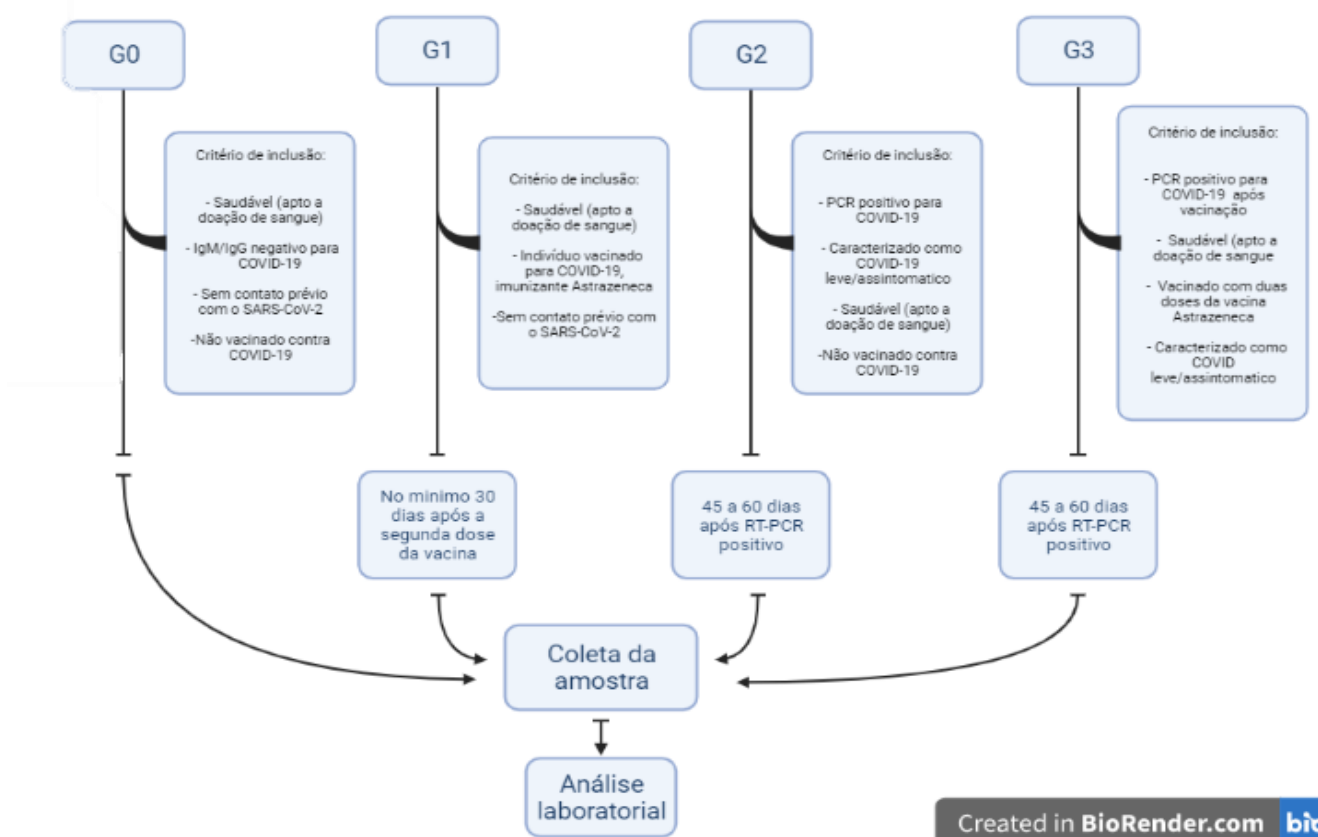
Foram coletados 4mL de amostra do sangue total em tubo com anticoagulante (EDTA) em um único momento, sendo as amostras centrifugadas a 200G por 10

minutos para obtenção do plasma, separadas em alíquotas e congeladas em freezer -80 °C dentro de 2 a 3 horas após a coleta para as análises posteriores.

Momentos das coletas:

- G0: coleta realizada após resultado negativo no teste rápido IgM/IgG COVID-19.
- G1: coleta realizada 30 dias após segunda dose da vacina AstraZeneca.
- G2: coleta realizada no período de 45 a 60 dias após resultado positivo RT-PCR para SARS-CoV-2.
- G3: coleta realizada no período de 45 a 60 dias após resultado positivo RT-PCR para SARS-CoV-2.

Figura 4 – Delineamento metodológico.



Fonte: material elaborado pelo autor.

3.3.1 Caracterização de imunidade prévia contra o vírus SARS-CoV-2:

Foi realizada triagem sorológica para identificação de indivíduos não imunes ao novo coronavírus, de modo a selecionar os participantes da pesquisa, etapa realizada com teste rápido para detecção de IgM/IgG anti-SARS-CoV-2, por imunocromatografia (ECO[®] Diagnostica). Foi realizada punção digital para coleta de uma gota de sangue, adicionada a um cassete de teste, seguida por solução tampão. A leitura é realizada em 15 minutos, avaliada pela presença ou ausência de bandas nas regiões específicas para IgG ou IgM.

3.3.2 Citocinas/Quimiocinas:

Foi utilizado o kit BD[™] Cytometric Bead Array (CBA[®]) Human Chemokine Kit para determinação das quimiocinas IL-8, RANTES, CXCL9 (MIG), MPC-1 e IP-10, preparado conforme as instruções do fabricante, avaliado em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur[®], constituído de 4 detectores de fluorescência, fornecendo resultados emitidos em pg/mL após análise no software FCAPArray[®].

3.3.3 Detecção de anticorpos neutralizantes:

Utilizou-se o kit SARS-CoV-2 NeutraLISA (EUROIMMUN[®]), para detecção dos anticorpos neutralizantes contra a porção S1/RBD da proteína de pico do SARS-CoV-2. Mede a atividade neutralizante de anticorpos anti-S1/RBD possibilitando a confirmação da sua funcionalidade em inibir a ligação de S1/RBD a ACE2, prevenindo à infecção de células do hospedeiro. Conforme o fabricante, há 100% de concordância dos resultados em comparação com o teste de neutralização por redução de placa (PRNT50: *padrão-ouro*). Kit registrado na ANVISA para uso diagnóstico (IVD – registro nº 10338930270).

3.3.4 Pannel sorológico de IgG anti-SARS-CoV-2:

Utilizou-se o kit LEGENDplex® Multi-Analyte Flow Assay (LEGENDplex® SARS-CoV-2 Serological IgG Panel – Marca Biolegend™) que consiste em imunoensaio baseado em beads capazes de distinguir imunoglobulinas dirigidas contra diferentes antígenos virais (Anti-spike S1, Anti- Nucleocapsideo e Anti-proteína S/RBD) presentes na amostra, que usam o mesmo princípio básico dos imunoensaios sanduíche, sendo a detecção realizada por citômetro de fluxo modelo FACSCalibur®, constituído de 4 detectores de fluorescência.

3.3.5 Análise estatística.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote Rcmdr do software R®, versão 4.0.4, e o software GraphPad Prism®, versão 5.01. Inicialmente as variáveis foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk com a finalidade de avaliar a simetria dos dados. Em seguida foi realizada análise de variância utilizando-se dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney (somente para IL-8). As variáveis que apresentaram significância no teste de Kruskal-Wallis foram submetidas ao teste post hoc de Dunn no software GraphPad Prism®. Foram consideradas com significância estatística as variáveis que apresentaram $p < 0,05$.

3.3.6 Análise de Correlação

Análises foram realizadas usando matriz de correlação dos analitos no software R sendo adotadas as seguintes interpretações: para os resultados de correlação obtidos pelos métodos de Spearman e Pearson, para os valores numéricos de cor. $\leq 0,3$ apresentam correlação desprezível, entre $\geq 0,3$ e $\leq 0,5$ foram consideradas fracas, de $\geq 0,5$ e $\leq 0,7$ apresentam correlação moderada e $\geq 0,7$ é vista como correlação forte. Em relação à proporcionalidade dos testes, foi dado que valores de cor. positivos são diretamente proporcionais e valores negativos são inversamente proporcionais. Foram somente considerados os valores de cor. das correlações que apresentaram p-value considerados como significantes ($p \leq 0,05$), com intervalo de significância de 0,95 (MIOT, 2018; MUKAKA, 2012).

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Neste estudo foram incluídos 51 indivíduos no total (n=51), moradores da cidade de Botucatu, São Paulo, sendo excluído apenas um participante de G1 (1,96%), em virtude do perfil sorológico detectado nos testes (Tabela - 4).

Tabela 4 – Caracterização dos indivíduos por grupo (frequência absoluta e relativa)

	G0	G1	G2	G3	Total
Nº Inicial	15 (29,41%)	15 (29,41%)	6 (11,77%)	15 (29,41%)	51 (100,00%)
Nº final	15 (30,00%)	14 (28,00%)	6 (12,00%)	15 (30,00%)	50 (100%)
Idade (média)	30,2	31,2	29,3	34,4	31,28
Sexo					
Homens	6/26 (23,08%)	8/26 (30,77%)	4/26 (15,38%)	8/26 (30,77%)	26/50 (52,00%)
Mulheres	9/24 (37,50%)	6/24 (25,00%)	2/24 (8,33%)	7/24 (29,17%)	24/50 (48,00%)

Fonte: Material elaborado pelo autor.

Para todos os grupos foi possível recrutar o número de participantes delineado para o estudo (n=15), exceto o grupo 2, que ficou com menor amostragem (n=6). Como a inclusão dos participantes da pesquisa decorreu após o início da campanha de vacinação em massa no município de Botucatu, este fato influenciou negativamente a inclusão de participantes em G2, pois a partir deste momento reduziu-se o número os indivíduos não imunizados.

4.1 Anticorpos anti-SARS-CoV-2 nos diferentes grupos

As concentrações dos anticorpos (ACs) plasmáticos dirigidos contra epítopos virais específicos (Spike S1, RBD ou nucleocapsídeo), assim como o percentual de anticorpos neutralizantes estão sumarizados na tabela 5 pelos valores de mediana, mínimo e máximo de cada variável.

Tabela 5 – Concentrações dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 e percentual de neutralização viral.

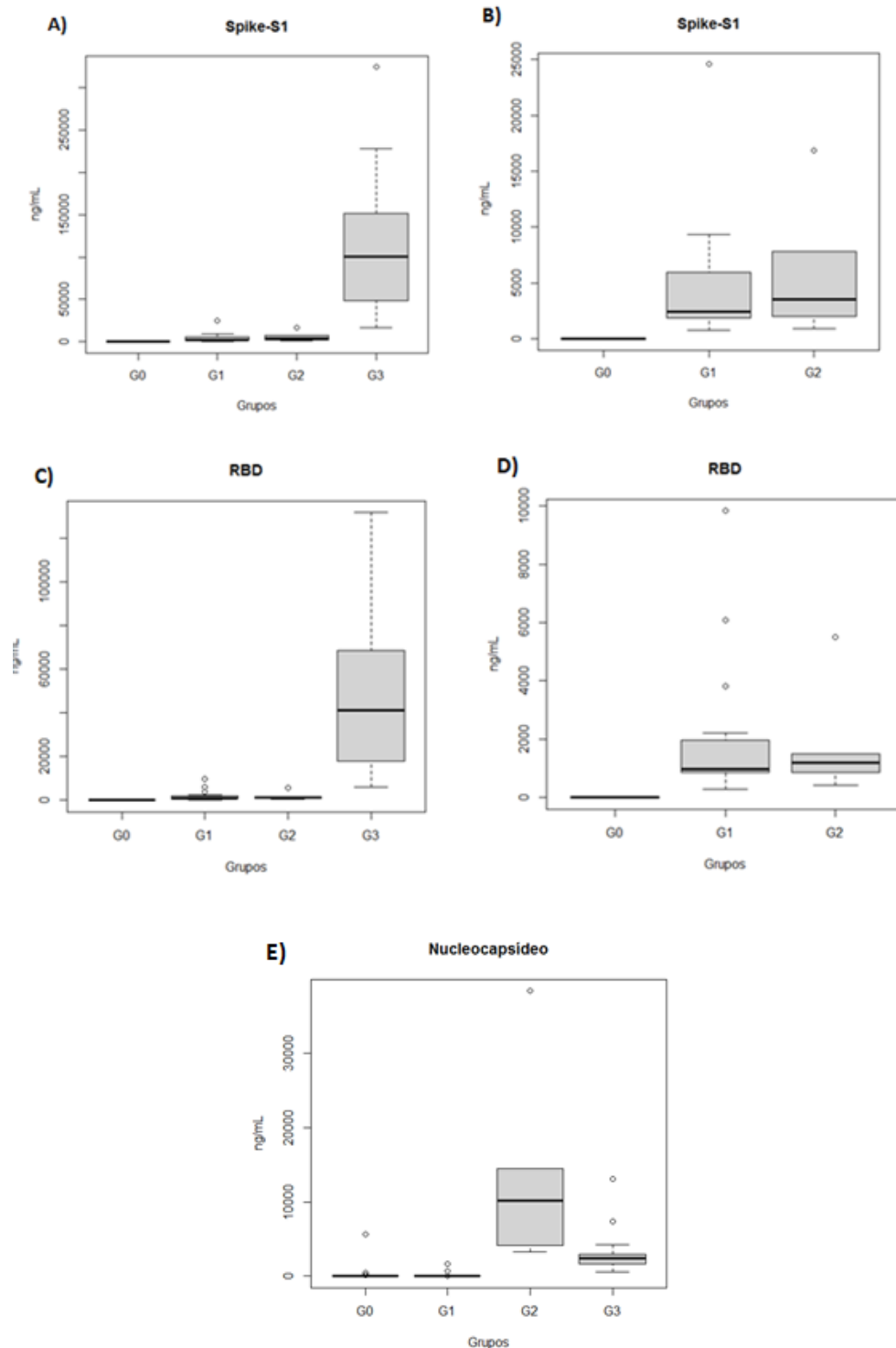
	G0	G1	G2	G3
	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana
	Min. – Max	Min. – Max	Min. – Max	Min. – Max
Anti-Spike S1 (pg/mL)	0 0 – 0	2.448 755 – 24.559	3.534 915 – 16.853	100.155 16.853 – 324.098
Anti-RBD (pg/mL)	0 0 – 0	967 294 – 9.824	1.183 422 – 5.506	41.253 6.075 – 131.830
Anti-Nucleocapsídeo (pg/mL)	0 0 – 5.590	0 0 – 650	10.137 3.272 – 38.359	2442 626 – 13.054
Neutralização (IH%)	0 0 - 0	81 0 – 96	38 5 – 70	98 90 - 99

As concentrações de anticorpos utilizam como unidade de medida pg/mL. IH% = percentual de neutralização/inibição.

Fonte: Material elaborado pelo autor.

Os níveis de IgG anti-SARS-CoV-2 estão representados na figura 5 através de *box plots* de mediana e amplitude interquartílica das variáveis (Anti-S1, RBD e neucleocapsídeo).

Figura 5 – Níveis de anti-Spike S1, RBD e nucleocapsídeo nos grupos.



A) Concentrações de Anti-Spike S1 (ng/mL) estratificado por grupos; B) Anti-Spike S1 (ng/mL) em diferente escala evidenciando G0, G1, G2; C) Concentrações de Anti-RBD (ng/mL) estratificado por grupos e D) Anti-RBD (ng/mL) em diferente escala evidenciando G0, G1, G2. E) Concentração de Anti-N (ng/mL) estratificado por grupos. *Boxplot* demonstram as medianas e amplitude interquartílica dos grupos estudados. Fonte: elaborado pelo autor.

G0 - *Naive* para COVID-19 não vacinados; G1 - Vacinados (Astrazeneca) *naive* para COVID-19;
G2 - Recuperados da COVID-19 (não vacinados); G3 - Recuperados da COVID-19 posterior à vacinação.

Avaliando o grupo controle (G0) observou-se que não foram detectados anticorpos contra S1, RBD ou neutralizantes. Este grupo constituiu-se por amostras coletadas no período pré-pandêmico. Porém, 4 indivíduos (26%) apresentaram IgG anti-nucleocapsídeo. Possivelmente, estes anticorpos são oriundos de outras coronavírus, considerando que a proteína N apresenta semelhança com outros coronavírus humanos (hCoVs), incluindo aqueles que causam infecções assintomáticas ou autolimitadas (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1), havendo possibilidade de reação cruzada entre os coronavírus (KHAN, 2020). Dobano e colaboradores (2021) detectaram anticorpos anti-N em amostras pré-pandêmicas, atribuindo este fato ao contato prévio com outras coronavírus, corroborando a hipótese de reação cruzada de anticorpos anti-N com o novo coronavírus.

Entre os participantes de G1, sem COVID prévia e vacinados, houve detecção de anti-N em 2 amostras (14%), nos levando a inferir que seja o mesmo motivo do observado em G0, visto que a vacina Astrazeneca é constituída de vetor de adenovírus recombinante que expressa somente a proteína S em sua totalidade (subunidade S1 e domínio RBD), assim não induzindo a produção de anti-N (BULA ASTRAZENECA).

A fim de comparar os perfis dos grupos do estudo, os resultados das dosagens quantitativas de IgG anti-SARS-CoV-2 e do percentual de anticorpos neutralizantes foram submetidos pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's Post Roc.

Tabela 6 – Comparação entre os grupos dos níveis de imunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 (Spike S1, RBD, Nucleocapsídeo) e do índice de inibição dos anticorpos neutralizantes.

Grupos	Spike S1		RBD		Nucleocapsídeo		Neutralização	
	Diferença	p-Value	Diferença	p-Value	Diferença	p-Value	Diferença	p-Value
G0 vs G1	Sim	<0,01	Sim	<0,01	Não	NS	Sim	<0,01
G0 vs G2	Sim	<0,01	Não	NS	Sim	<0,01	Não	NS
G0 vs G3	Sim	<0,01	Sim	<0,01	Sim	<0,01	Sim	<0,01
G1 vs G2	Não	NS	Não	NS	Sim	<0,01	Não	NS
G1 vs G3	Sim	<0,01	Sim	<0,01	Sim	<0,01	Sim	<0,01
G2 vs G3	Não	NS	Não	NS	Não	NS	Sim	<0,01

NS = não significativo. Diferença estatística avaliada pelo método de Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's Post Roc. Fonte: Material elaborado pelo autor.

Para melhor controle das variáveis foi optado por incluir no estudo somente indivíduos que receberam o mesmo imunizante, nestes casos a vacina da Astrazeneca, aplicada em massa no município de Botucatu, São Paulo, onde foi realizado o estudo de efetividade.

As análises comparativas entre G0 (controle) e G1 (*naïve*/vacinados) evidenciam maior produção de anticorpos (S1, RBD e neutralizantes) em G1, conforme esperado, devido ao estímulo imunológico induzido pelo imunizante. Quando comparado G0 com G2 (COVID⁺/não vacinados) esta diferença limitou-se à produção de anti-S1, não sendo vista nos anticorpos dirigidos contra RBD e neutralizante. Isso demonstra haver um potencial relevante no plasma de doadores vacinados que não tiveram doença, visto que pode fornecer capacidade de imunização passiva maior do que no plasma daqueles não vacinados e recuperados da doença.

Comparando G1 com G2 não houve diferença na produção de anti-S1, anti-RBD e neutralizantes entre pessoas somente vacinadas (G1) ou que tiveram COVID (convalescentes – G2).

Ademais, não há diferença nos níveis de anti-S1, RBD e nucleocapsídeo entre convalescentes vacinados (G3) ou não (G2). No entanto, o índice de anticorpos com capacidade de inibir a ação viral é significativamente maior em G3 (vacinados convalescentes). Importante ressaltar que este grupo foi avaliado a rigor no período de 45 a 60 dias pós-infecção, ou seja, em momento recente de convalescência. A avaliação da persistência destes níveis a longo prazo se faz necessária. Vale ressaltar que G2 e G3 compõem o universo amostral que representa as características dos doadores de PC conforme preconiza a legislação atual.

Lo Sasso e colaboradores (2021) reportaram níveis semelhantes de anti-RBD em indivíduos exclusivamente vacinados, porém, apresentando diferença significativamente maior quando comparado com o grupo recuperado de COVID-19, diferentemente de nossos achados. Além disso, ao comparar indivíduos convalescentes/vacinados com aqueles somente vacinados, não observaram diferença na produção deste AC.

Na análise intergrupos, os níveis de anti-N apresentaram-se maiores em G2 (mediana= 10.137 pg/mL) comparando-se aos demais ($p < 0,01$) (Tabela 5). Inicialmente, acreditava-se que a presença destes ACs em altas concentrações

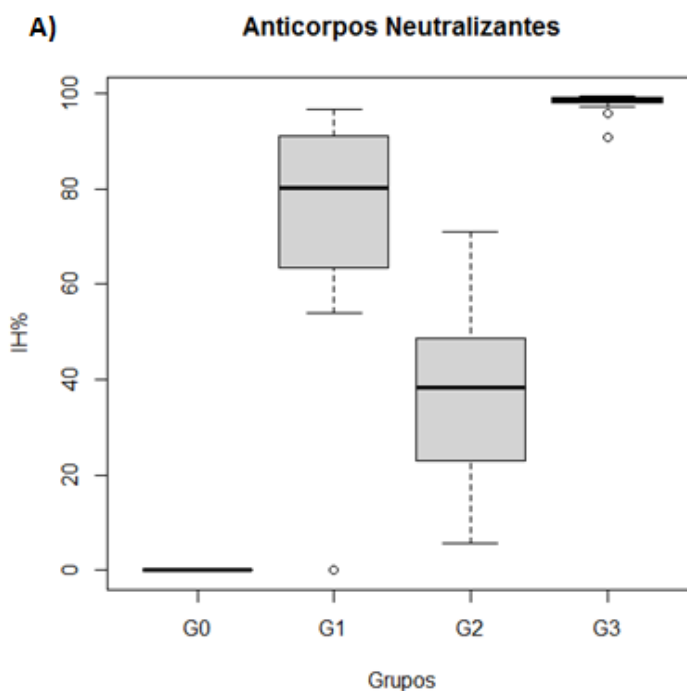
conferia proteção aos indivíduos com COVID-19, porém anti-nucleocapsídeo não fornece imunidade prolongada, visto que apresenta meia vida de 52 dias aproximadamente, sendo significativamente reduzida em comparação aos demais anticorpos contra SARS-CoV-2 (GRANDJEAN, 2020). Conforme demonstrado por Batra e colaboradores (2021), concentrações elevadas deste AC em pacientes graves correlacionaram-se com o agravamento do quadro clínico e encaminhamento à UTI, indicando que anti-N, ao não apresentar ideal capacidade de neutralização, possa ligar-se ao vírus sem neutralizá-lo podendo favorecer o fenômeno de amplificação dependente de anticorpo (do inglês, *Antibody-Dependent Enhancement* - ADE). Anticorpos subneutralizantes induzidos por infecções primárias podem apresentar reação cruzada com outros sorotipos, exibir baixo ou nulo efeito protetor e servir como facilitadores à infecção celular, com consequente prejuízo à homeostase imune na resposta à infecção (CLARK, 2021).

Estudo recente conduzido por Junqueira avaliou o plasma de indivíduos com COVID-19 demonstrando a capacidade de infectar monócitos e macrófagos *in vitro* através do fenômeno de ADE, causando morte celular por piroptose (morte inflamatória), e assim liberando os mediadores inflamatórios presentes no citosol, podendo favorecer negativamente o curso da doença. Ao avaliar plasma de indivíduos vacinados não foram observados os mesmos achados, além disso os níveis de Acs neutralizantes foram maiores, prevenindo a infecção e minimizando o avanço da doença (JUNQUEIRA, 2022).

Desta forma, podemos hipotetizar que níveis elevados de anti-N observados em G2 podem não ser benéficos aos receptores de PC, por não conferirem atividade neutralizante adequada, além de poder favorecer o fenômeno ADE, tendo assim potencial de agravar a evolução clínica após TPC.

Ao analisarmos NABs foram observados maiores percentuais de neutralização nos seguintes grupos, respectivamente: G3 (mediana= 98; mínima = 90; máxima = 99), G1 (mediana= 81; mínima = 0; máxima = 96) e G2 (mediana= 38,41; mínima = 5; máxima = 70). Os indivíduos do grupo controle (G0) não apresentaram NAB, condizente com o esperado (Figura 6).

Figura 6 – Capacidade de anticorpos neutralizantes em inibir a interação do vírus à proteína ACE2.



IH% = Percentual de neutralização dos anticorpos. A) Mediana e amplitude interquartílica do percentual de neutralização dos anticorpos estratificados por grupo.

Fonte: Material elaborado pelo autor.

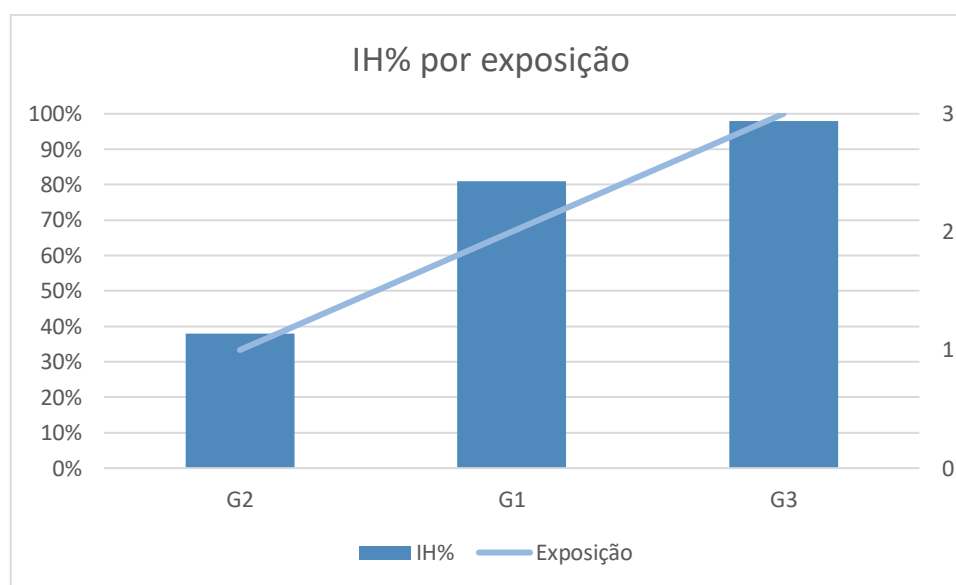
Houve diferença significativa nos percentuais de anticorpos neutralizantes entre os grupos ($p < 0,01$ – G0xG1; G0xG3; G1xG3; G2xG3), exceto em G0 *versus* G2, G1 *versus* G2 (Tabela 6). Portanto, pacientes convalescentes não apresentaram maiores níveis de NAbs do que indivíduos somente vacinados ou saudáveis.

Importante ressaltar a homogeneidade da capacidade de neutralização obtida na avaliação do plasma dos participantes do grupo 3, aumentando a probabilidade de fornecer destes anticorpos funcionais na TPC, visto que não são mensurados rotineiramente na rotina hemoterápica. Ao passo que há uma variabilidade maior na produção destes anticorpos entre doadores convalescentes não vacinados (G2), sendo importante, neste caso, uma avaliação quantitativa destes anticorpos para selecionar os plasmas com real potencial de imunização passiva.

Segundo a literatura, a ação do anti-Spike S1 neutralizante está direcionada ao bloqueio da ligação antígeno/receptor de membrana e fusão de membrana, enquanto o anti-RBD neutralizante atua diretamente no domínio RBD do vírus, bloqueando a ligação da proteína ACE2 humana, ou seja, tem maior ação de

neutralização, interferindo diretamente a entrada viral na célula hospedeira (DU, 2021). Chen e colaboradores (2020) observaram que pacientes assintomáticos para COVID-19 obtiveram taxas baixas ou nulas na produção de NAbs competentes, correlacionando a função destes à estimulação prolongada e reforçada dos receptores de linfócitos B (BCR). Este fato pôde ser visto em nossos resultados, dada a curva crescente na capacidade de neutralização de anticorpos em decorrência ao número de exposição a epítomos virais. Desta forma, G2, que teve um único momento de estímulo (infecção), apresentou os menores percentuais de neutralização (IH%= 38%), seguido de G1 com dois momentos de estímulo devido às doses vacinais (IH% = 81), atingindo maiores níveis em G3, o qual foi exposto a três momentos de estímulo (duas doses da vacina e infecção pelo SARS-CoV-2) (Figura 7).

Figura 7 – Índice de neutralização em decorrência à exposição aos epítomos virais.



IH%= porcentagem de inibição dos anticorpos neutralizantes. Exposição = quantidade de exposições a epítomos do SARS-CoV-2 através da infecção viral e/ou imunização.

Fonte: Material elaborado pelo autor.

Em estudo realizado por Lucas et al. (2021) observou-se que os indivíduos que apresentaram maior capacidade neutralizadora de seus ACs tinham níveis menores de carga viral, evidenciando atuação destes anticorpos na dinâmica da infecção. Observou-se também que a presença de NAbs correlacionou-se com a melhora dos sinais clínicos da doença e redução da mortalidade, demonstrando que títulos

satisfatórios precoces de NAb podem influenciar positivamente o curso da infecção. Logo, estas características relacionadas a neutralização nos levam a inferir que os maiores índices de neutralização apresentados por G3 seguido de G1 confirmam maior capacidade imunoprotetora ao receptor de hemocomponentes oriundos destes doadores.

4.2 Dosagens de quimiocinas plasmáticas

Os resultados obtidos das dosagens de quimiocinas plasmáticas com uso de kit multiplex por citometria de fluxo permitiram identificar variações destas proteínas solúveis nos diferentes grupos. Ressalta-se que o grupo G0 não foi incluído nesta análise por restrição da quantidade de insumos disponíveis, sendo priorizados os grupos expostos ao vírus por infecção ou vacinação. A mediana, valores mínimo e máximo estão sumarizados na Tabela 7, estratificados por grupo.

Tabela 7 – Concentrações de citocinas/quimiocinas por grupos

	G1 Mediana Min. – Max	G2 Mediana Min. – Max	G3 Mediana Min. – Max
IP-10	84 50 – 158	162 97 – 245	87 49 - 238
MPC-1	20 4,9 – 59	29 16 – 95	24 0 – 38
MIG	56 14 – 178	43 37 – 134	47 13 - 144
RANTES	4476 1335 – ≥4716	4716 2251 – ≥4716	3439 938 – ≥4716
IL-8	1,9 0,17 – 4,61	3,4 2,4 – 22	1,6 0 – 7,4

Unidade de medida (pg/mL).

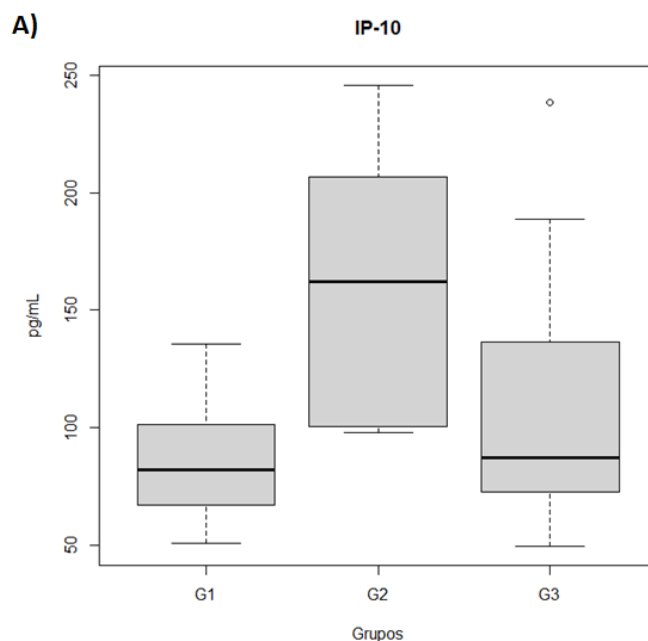
Fonte: Material elaborado pelo autor.

Muito tem sido estudado a respeito do uso de plasma convalescente de doadores não vacinado na contribuição da recuperação de indivíduos infectados pela COVID-

19 em estado grave. No entanto, nossos resultados demonstram que este grupo de doadores (G2), além de apresentar menores concentrações de ACs específicos contra SARS-CoV-2 e da capacidade neutralizante, também apresentou maior nível de quimiocina IP-10 (mediana = 162 pg/mL) (Figura 8), diferença significativa quando comparada a G1 (mediana = 84 pg/mL), ou seja, indivíduos somente vacinados ($p=0,02$). Em diversos estudos realizados visando a caracterização do perfil de citocinas na COVID-19 (YANG, 2020; HAROUN, 2021; ZHANG, 2021) tem sido reportada a associação de determinadas quimiocinas com a gravidade da doença, entre elas a IP-10. Lev et al. (2021) descrevem ter encontrado maiores níveis nas patologias virais associadas a problemas pulmonares, bem como a presença aumentada em pacientes graves de COVID-19, correlacionando níveis >1000 pg/mL com o aumento da gravidade e mortalidade da doença.

Observamos aqui que os níveis de ACs anti-Spike S1 e anti-RBD (Figura 5) foram menores em G2 quando comparados a G3 e G1, bem como G2 apresentou maiores níveis de IP-10, como descrito anteriormente, sendo que este perfil elevado de IP-10 e menores concentrações de ACs foi semelhante ao encontrado por Lu et al. (2021), que relataram haver correlação inversamente proporcional entre as concentrações de IP-10 e ACs IgG contra o SARS-CoV-2 nos indivíduos convalescentes.

Figura 8 – Dosagem plasmática de CXCL10/IP-10 estratificado por grupos.



A) Concentração (pg/mL) da quimiocina IP-10 estratificado por grupo. *BoxPlot* elaborado com valores de mediana e amplitude interquartílica.

Fonte: Material elaborado pelo autor.

Na comparação intergrupos, não se observou diferença significativa nos níveis de MCP-1 e MIG.

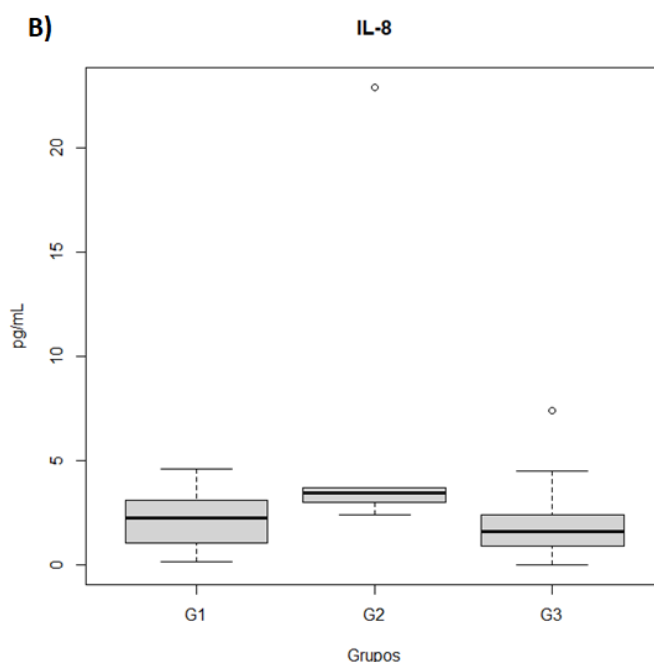
Os níveis de RANTES apresentaram-se elevados em todos os grupos, estando comumente acima do limite superior de detecção do kit (≥ 4716 pg/mL). Não houve diferença entre os grupos. Chi e colaboradores (2020) observaram concentração de RANTES de 7.776pg/mL (mediana) em indivíduos convalescentes, 9.057 pg/mL (mediana) para indivíduos saudáveis, 10.361 pg/mL e 7.409 pg/mL para indivíduos assintomáticos e sintomáticos respectivamente. Estes dados corroboram com nossos achados, evidenciando que para dosagem desta quimiocina seria recomendado aplicar fatores de diluição do plasma, entretanto, em ensaios multiplex que envolvem diferentes analitos concomitantes, esta alternativa seria inviável para um único analito. Outra possibilidade para contornar esta questão técnica seria o uso de ensaios com maior capacidade de detecção de RANTES.

No que se refere a avaliação de IL-8, maiores níveis foram observados em G2 (Figura 9) em relação aos demais grupos (mediana=3,45pg/mL; mínima=2,4;

máxima=22), sendo esta diferença significativa quando comparada a G1 ($p=0,03$) (mediana=1,97 pg/mL; mínima = 0,17; máxima = 4,61), e G3 ($p=0,01$) (mediana=1,60 pg/mL; mínima = 0; máxima = 7,4).

IL-8 é uma citocina pró-inflamatória presente em altas concentrações nos pacientes com COVID-19 grave (HUANG, 2021), e inclusive foi recentemente associada ao tempo de duração da doença, sendo que pacientes com títulos mais elevados ($\geq 10,65$ pg/mL) apresentaram maior duração da doença do que aqueles com concentrações mais baixas (MA, 2021).

Figura 9 - Dosagem plasmática de CXCL8/IL-8 estratificado por grupos



A) Concentração (pg/mL) da quimiocina IL-8 estratificado por grupo. BoxPlot elaborado com valores de mediana e amplitude interquartílica.

Fonte: Material elaborado pelo autor.

Neste estudo foram avaliados plasmas provenientes de sangue total, coletado de forma convencional, mimetizando as condições (proporção de volume de plasma) da doação de sangue. Dado ao fato da plasmaférese (padrão ouro para coleta de plasma convalescente) reduzir as concentrações das substâncias presentes no sangue, como as imunoglobulinas, em virtude da hemoliluição (NAKANISHI, 2014), deve-se considerar que neste contexto podem haver variações das concentrações de componentes plasmáticos extraídos. Esta variação ocorre pois o volume de plasma

removido deve ser substituído por fluido de reposição (soro fisiológico) na mesma proporção. Conforme o plasma é repostado a quantidade da substância extraída torna-se menor, cerca de 60 a 70% da concentração inicial, pois é diluída em função do fluido de reposição, necessário para evitar hipovolemia significativa, o que poderia resultar em colapso vasomotor (DAGA, 2017; WINTERS, 2021). Deste modo, para fins de TPC é importante considerar o uso de plasma obtido por doação convencional pelo maior potencial de fornecer imunidade passiva, haja visto a maior concentração de fatores plasmáticos neste hemocomponente quando comparado ao obtido por aférese.

Entretanto, especialmente na COVID-19 que pode causar importantes danos pulmonares, é necessário ponderar os riscos advindos da transfusão de plasma oriundo de sangue total, pois a maior concentração dos componentes plasmáticos pode favorecer a imunidade passiva, mas também a ocorrência da lesão pulmonar aguda relacionada a transfusão (TRALI), a qual possui alta taxa de mortalidade de 5% a 10% e incidência 0,08% a 15% dentre as reações transfusionais. A transfusão de plasma pode conter anticorpos do doador contra antígenos leucocitários humanos (HLA) ou antígenos neutrofílicos (HNA) do receptor, e estes podem induzir TRALI de origem imunológica, que caracteriza 80% dos casos desta complicação pós-transfusional. Estes anticorpos do doador ativam leucócitos do receptor, com consequente liberação de citocinas, ocasionando lesão endotelial e extravasamento capilar (BRASIL, 2010).

Qualquer hemocomponente que contenha plasma pode desencadear TRALI, no entanto há maior incidência desta complicação quando a doação do hemocomponente é feita através da coleta de sangue total ou quando o plasma é oriundo de mulheres múltiparas, em vista da produção de anticorpos advindos de múltiplas gestações, desta forma não sendo recomendado a utilização do plasma destas mulheres como hemocomponente (FABRON JUNIOR, 2007; GRANADOS, 2018; TAFFAREL, 2015).

4.3 Correlação entre as variáveis

Através das análises usando matriz de correlação dos analitos no software R foi possível observar algumas correlações de significância biológica, dispostas na tabela 8.

Tabela 8 – Níveis de correlação

	p-Value	Correlação (Cor.)	Classificação	Método
G2				
IP-10/MIG	0,04	0,82	PR. Forte	Spearman
IL-8/ Anti-N	<0,01	0,93	PR. Forte	Pearson
G3				
IP-10/MIG	<0,01	0,64	PR. Moderada	Spearman
IP-10/Neutraliza	0,04	-0,52	IP. Moderada	Pearson
MIG/Neutraliza	<0,01	-0,68	IP. Moderada	Pearson
IL-8/CT Carga Viral	0,04	-0,52	IP Moderada	Spearman

PR.=proporcional; IP=Inversamente Proporcional; CT= *Cycle Threshold*

Fonte: Material elaborado pelo autor.

Em G2 foram observadas fortes correlações positivas entre as variáveis IP-10 e MIG e entre IL-8 e anti-N. Considerando que estas características não observadas em G1 (indivíduos somente vacinados), pode-se inferir que a doença esteja induzindo este perfil no plasma convalescente.

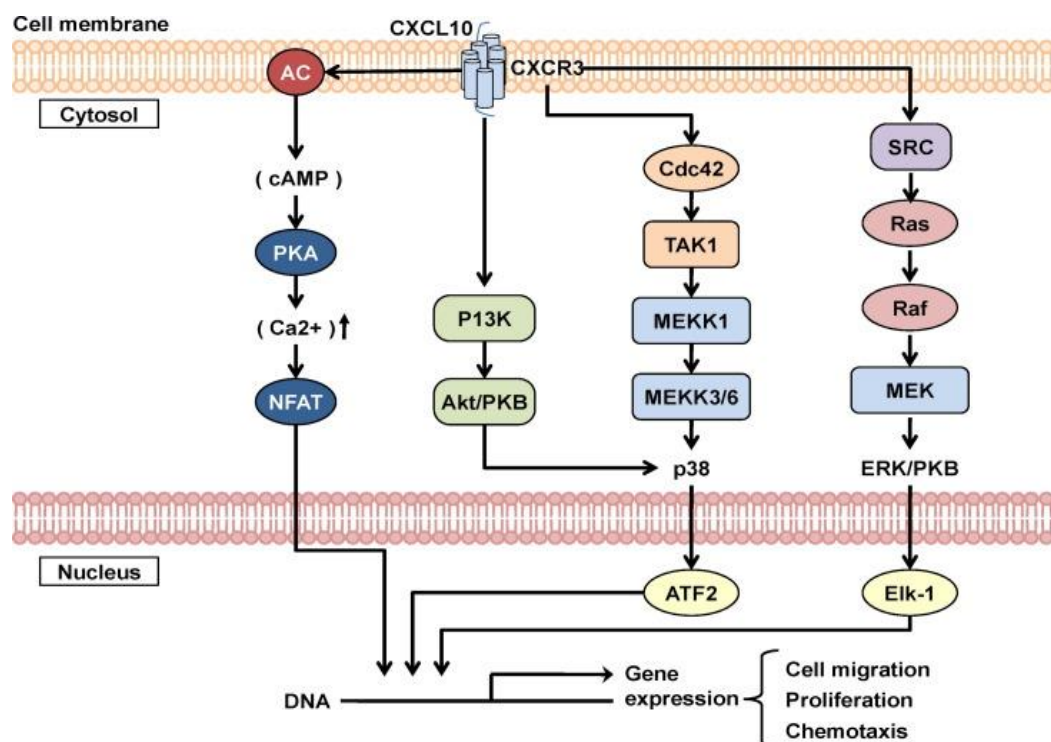
A mesma correlação positiva entre IP-10 e MIG foi observada em G3, porém menos intensa (classificação moderada). Além disso, em G3 observou-se que o aumento dos níveis de anticorpos neutralizantes é inversamente proporcional aos níveis de IP-10 e MIG. Deste modo, indivíduos imunizados que se infectaram posteriormente com SARS-CoV-2 parecem desenvolver características plasmáticas mais adequadas à TPC, atenuando riscos e proporcionando melhores condições benéficas aos receptores do hemocomponente.

Processos inflamatórios estão associados à produção de IP-10 por leucócitos, células endoteliais, epiteliais, estromais e queratinócitos, em resposta a secreção de interferon-gama. A IP-10 é uma molécula pleiotrópica de características pró-inflamatórias, que induz quimiotaxia, apoptose, inibição do crescimento celular, e é

capaz de se ligar e ativar o receptor CXCR-3, expresso em linfócitos T e B ativados, células NK, macrófagos e células dendríticas, apresentando um importante papel em doenças infecciosas (LIU et al., 2011; CHEN et al., 2020; LUPIERI et al., 2020).

Liu et al. (2011) relatam que a ligação de IP-10 e CXCR-3 desempenha papel importante na sinalização e indução de quimiotaxia em células epiteliais de vias aéreas e pneumócitos humanos por diferentes vias (figura 10), podendo ser importante no contexto da COVID-19.

Figura 10 - Sinalização de IP-10 em células epiteliais das vias aéreas humanas



Com o estímulo do receptor CXCR3 ocorre a ativação de vias que induzem a quimiotaxia, proliferação celular e produção de fatores pró-inflamatórios os quais podem retroalimentar a ativação deste receptor. Fonte: LIU, Mingli et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 22, n. 3, p. 121-130, 2011.

Apesar de apresentar papel importante em diferentes infecções virais, este pode ser benéfico ou deletério a depender da etiologia da infecção e da condição imunológica do hospedeiro (LIU et al., 2011).

Sabe-se que a IP-10 é um dos principais mediadores nas respostas antivirais, especialmente nas infecções do trato respiratório, estando envolvida na patogênese

da lesão pulmonar, visto que é produzida em altos níveis por células epiteliais brônquicas e alveolares ativadas em resposta à infecção, ativando CXCR3, culminando em várias condições patológicas pulmonares, incluindo o desenvolvimento de fibrose (KHALIL; ELEMAM; MAGHAZACHI, 2021). Além da sua característica quimiotóxica sobre monócitos, células NK e linfócitos T do perfil Th1, esta quimiocina pode induzir apoptose das células T, contribuindo com o quadro de linfopenia frequentemente observado em pacientes com SARS, MERS e COVID-19, prejudicando assim a atuação de linfócitos T na eliminação viral (KHALIL; ELEMAM; MAGHAZACHI, 2021).

Ao comparar o perfil de quimiocinas de SARS-CoV-2 com SARS-CoV e MERS-CoV disponíveis na literatura, Khalil, Elemam e Maghazachi (2021) concluem que IP-10 é uma citocina que contribui de forma crucial para a patogênese pulmonar nos três vírus estudados. No entanto, análises *ex vivo* de tecido pulmonar demonstraram diferenças no comportamento viral, incluindo maior capacidade de infecção e replicação do SARS-CoV-2, sugerindo em que este vírus modula a produção de citocinas e quimiocinas de forma diferente, ao passo que a produção de IP-10 é significativamente mais induzida por SARS-CoV-2 do que o SARS-CoV (KHALIL; ELEMAM; MAGHAZACHI, 2021; CHI, 2020; XU, 2020)

Além disso, Chen et al. (2020) relatam que IP-10 e MCP-1 são exemplos de citocinas relacionadas à trombose, e que estas podem servir como biomarcadores associados à gravidade da doença na COVID-19, contribuindo para a disfunção vascular dos pacientes acometidos. Lupieri et al. (2020) por sua vez, demonstraram que IP-10 prejudica a recuperação endotelial após lesão, e que o bloqueio desta quimiocina melhora o reestabelecimento endotelial, o que é de extrema importância em eventos cardiovasculares. Isto pode também se aplicar às complicações da COVID-19, nas quais eventos cardiovasculares são comuns.

Assim como a IP-10, a quimiocina MIG (CXCL-9) é um ligante de CXCR-3 capaz de induzir quimiotaxia (LIU et al., 2011). Infecções virais levam ao recrutamento de células NK para o sítio da infecção com intuito de promover a lise de células infectadas. No entanto, as células NK produzem IFN- γ , que pode levar à ativação de macrófagos e produção de MIG (CXCL-9), recrutando assim células CD4+CXCR3+ polarizadas para uma resposta de perfil Th1 (KHALIL; ELEMAM; MAGHAZACHI, 2021), podendo retroalimentar a indução de resposta pró-inflamatória pela IP-10

através da atuação desta sobre as células CD4+CXCR3+ quimioatraídas por MIG (PALOMINO 2015, KHOSROSHAHI, 2021).

Com relação a viremia, observou-se em G3 correlação inversa entre os níveis de CT (*cycle threshold*) e IL-8, indicando que quanto menor a carga viral menores também os níveis de IL-8. Os valores para o CT do teste RT-PCR de swab de nasofaringe encontrados foram mediana = 21,75, máxima = 32,59 e mínima = 16,62. CT representa o número de ciclos necessários para detecção mínima da carga viral do SARS-CoV-2, ou seja, quanto maior o CT menor a carga viral (KRUTTGEN, 2021).

Em conjunto, nossos achados indicam a relevância de se considerar o potencial da doação de plasma de indivíduos vacinados, independente de terem tido COVID-19, dado o perfil de características que podem favorecer a imunidade passiva, mediante as concentrações de imunoglobulinas específicas ao SARS-CoV-2 (anti-S1 e RBD) e maior capacidade de inibição viral. Além disso, os menores níveis de quimiocinas de ação pró-inflamatória (IL-8 e IP-10) nestes grupos minimizam possíveis agravos da TPC em pacientes já em condição severa. Outro ponto relevante é a menor concentração plasmática de anti-nucleocapsídeo quando comparado aos indivíduos não vacinados e recuperados da doença, visto que estas imunoglobulinas podem estar associadas ao fenômeno ADE, podendo influenciar na patogenicidade da infecção.

É importante ressaltar ainda que a capacidade imunoprotetora que o plasma convalescente pode ter em caráter preventivo/profilático, especialmente para indivíduos que têm contraindicações em receber vacinas ou medicamentos recomendados para o tratamento da COVID e também àqueles que têm alergia a constituintes dos imunizantes.

Desta forma, o plasma dos grupos G3 e G1, respectivamente, parecem agregar as características mais seguras e eficazes para TPC, de modo mais eficiente do que o plasma oriundo de indivíduos não vacinados e recuperados da COVID-19.

5. CONCLUSÃO

- De modo a compreender as variações das características do plasma convalescente foram avaliados três grupos: indivíduos vacinados (Astrazeneca) *naïve* para COVID-19; recuperados da COVID-19 (não vacinados) e recuperados da COVID-19 posterior à vacinação.
- Foram quantificadas as quimiocinas plasmáticas (IP-10, MIG, RANTES, MCP-1 e IL-8) evidenciando elevação nas concentrações de IP-10 e IL-8 em G2 (convalescentes não vacinados) quando comparado aos demais grupos.
- Observou-se que G3 e G1 apresentaram concentrações mais elevadas dos anticorpos anti-Spike S1 e anti-RBD, enquanto G2 apresentou maiores concentrações de anti-nucleopósídeo.
- Verificou-se que o grupo G3 seguido de G2 apresentaram maiores percentuais de neutralização na análise intergrupos.
- Das variáveis analisadas, constatou-se associação biologicamente relevante entre IP-10/MIG e IL-8/anti-nucleocapsídeo (correlações proporcionais fortes) em G2, bem como IP-10/MIG (proporcional moderada), IP-10/neutralização e MIG/neutralização (inversamente proporcional moderada), IL-8/CT carga viral (inversamente proporcional moderada).

6. REFERÊNCIAS

Assadiasl S, Fatahi Y, Mosharmovahed B, Mohebbi B, Nicknam MH. Baricitinib: from rheumatoid arthritis to COVID-19. J Clin Pharmacol [Internet]. 2021 [citado 24 Mar 2022];61(10):10.1002/jcph.1874. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8250677/#:~:text=Baricitinib%20was%20approved%20in%202018%20by%20the%20US>

Askenase PW. COVID-19 therapy with mesenchymal stromal cells (MSC) and convalescent plasma must consider exosome involvement: do the exosomes in convalescent plasma antagonize the weak immune antibodies? J Extracell Vesicles. 2020;10(1):e12004.

Bandopadhyay P, D'Rozario R, Lahiri A, Sarif J, Ray Y, Paul SR, et al. Nature and dimensions of systemic hyperinflammation and its attenuation by convalescent plasma in severe COVID-19. J Infect Dis. 2021;224(4):565-74.

Batra M, Tian R, Zhang C, Clarence E, Sacher CS, Miranda JN, et al. Role of IgG against N-protein of SARS-CoV2 in COVID19 clinical outcomes. Sci Rep. 2021;11(1):3455.

Bonny TS, Patel EU, Zhu X, Bloch EM, Grabowski MK, Abraham AG, et al. Cytokine and chemokine levels in coronavirus disease 2019 convalescent plasma. Open Forum Infect Dis. 2020;8(2):ofaa574.

Bourouiba L. Turbulent gas clouds and respiratory pathogen emissions. JAMA. 2020;323(18):1837-8.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância em Saúde. Nota Técnica nº 19, de 3 de Abril de 2020 [Internet]. Brasília: Anvisa; 2020 [citado 24 Mar 2022]. Disponível em: <https://acreditacao.abhh.com.br/adm/doc/48b07973e8cb97e00aa392203e27620.pdf>

Brasil. Ministério da Saúde. Aspectos Hemoterápicos Relacionados a TRALI (lesão Pulmonar Aguda Relacionada à Transfusão) medidas para redução do risco Brasília - DF. 2010 [Internet]. 2010. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/aspectos_hemotrapicos_relacionados_trali.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Nota Técnica nº 12, de 3 de Fevereiro de 2021. Orientação sobre inaptidão temporária para doação de sangue de candidatos que foram submetidos a vacinação contra a Covid-19 e outras recomendações [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2021a [citado 24 Mar 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/sangue-tecidos-celulas-e-orgaos/notas-tecnicas/nota-tecnica-12-2021-gtsc#:~:text=Trata%2Dse%20de%20Nota%20T%C3%A9cnica,vacinas%20contra%20a%20Covid%2D19>

Brasil. Ministério da Saúde. Nota Técnica nº 33, de 22 de Abril de 2021. Atualização das recomendações sobre o uso de plasma de doador convalescente para o tratamento da Covid-19 e a doação deste tipo de plasma por indivíduos vacinados contra a Covid-19 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2021b [citado 24 Mar 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/sangue-tecidos-celulas-e-orgaos/notas-tecnicas/nota-tecnica-33-2021-gtsc#:~:text=Relat%C3%B3rio&text=p%C3%BAblica%20no%20Brasil,-,A%20NOTA%20T%C3%89CNICA%20N%C2%BA%2019%2F2020%2FSEI%2FGSTCO%2F,para%20combater%20a%20Covid%2D19>

Brasil. Ministério da Saúde. COVID-19, painel coronavírus [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2021c [citado 24 Mar 2022]. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>

Brasil. Resolução RE nº 3.584, de 17 de Setembro de 2021. Diário Oficial da União [Internet]. 17 Set 2021d [citado 24 Mar 2022]; Sec. 1-extra B, p. 3. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-re-n-3.584-de-17-de-setembro-de-2021-345761410>

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Vacina covid-19 (recombinante), profissional da saúde, versão 009 [Internet]. Brasília: Anvisa; 2021e [citado 10 Jun 2021]. Disponível em: [https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=VACINA%20COVID19%20\(RECOMBINANTE\)](https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=VACINA%20COVID19%20(RECOMBINANTE))

Brasil. Portaria SCTIE/MS nº 34, de 31 de Março de 2022. Torna pública a decisão de incorporar, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS, o baricitinibe para tratamento de pacientes adultos com Covid-19 hospitalizados que necessitam de oxigênio por máscara ou cateter nasal, ou que necessitam de alto fluxo de oxigênio ou ventilação não invasiva. Diário Oficial da União [Internet]. 1 Abr 2022 [citado 24 Mar 2022]; Sec. 1, p. 331. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-sctie/ms-n-34-de-31-de-marco-de-2022-390313174>

Cabrera JMA, Universidad del Rosario, CES University, Instituto Distrital de Ciencia Biotecnologia e Innovacion en salud, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud. Convalescent plasma for patients with COVID-19: a pilot study [Internet]. Clinicaltrials.gov. 2020 [citado 24 Mar 2022]:NCT04332380. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04332380?recrs=b&cond=COVID-19&draw=11&rank=99>

Casadevall A, Pirofski L. The convalescent sera option for containing COVID-19. J Clin Invest [Internet]. 2020 [citado 24 Mar 2022];130(4):1545-8. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/138003>

Chen X, Pan Z, Yue S, Yu F, Zhang J, Yang Y, et al. Disease severity dictates SARS-CoV-2-specific neutralizing antibody responses in COVID-19. Signal Transduct Target Ther. 2020;5(1):180.

Cheng Y, Wong R, Soo YOY, Wong WS, Lee CK, Ng MHL, et al. Use of convalescent plasma therapy in SARS patients in Hong Kong. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004;24(1):44-6.

Chi Y, Ge Y, Wu B, Zhang W, Wu T, Wen T, et al. Serum cytokine and chemokine profile in relation to the severity of coronavirus disease 2019 in China. *J Infect Dis* [Internet]. 2020 [citado 23 Out 2021];222(5):746-54. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7337752/>

Clark NM, Janaka SK, Hartman W, Stramer S, Goodhue E, Weiss J, et al. Anti-SARS-CoV-2 IgG and IgA antibodies in COVID-19 convalescent plasma do not facilitate antibody-dependent enhance of viral infection. *bioRxiv* [Internet]. 2021 [citado 23 Out 2021]:2021.09.14.460394. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34545365/>

Daga Ruiz D, Fonseca San Miguel F, González de Molina FJ, Úbeda-Iglesias A, Navas Pérez A, Jannone Forés R. Plasmapheresis and other extracorporeal filtration techniques in critical patients. *Medicina Intensiva*. 2017 Apr;41(3):174–87.

Dobaño C, Santano R, Jiménez A, Vidal M, Chi J, Rodrigo Melero N, et al. Immunogenicity and crossreactivity of antibodies to the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2: utility and limitations in seroprevalence and immunity studies. *Transl Res*. 2021;232:60-74.

Du L, Yang Y, Zhang X. Neutralizing antibodies for the prevention and treatment of COVID-19. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(10):2293-306.

Duan K, Liu B, Li C, Zhang H, Yu T, Qu J, et al. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2020 [citado 23 Out 2021];117(17):9491-6. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/early/2020/04/02/2004168117>

Enria DA, Briggiler AM, Sánchez Z. Treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res* [Internet]. 2008 [citado 5 Abr 2021];78(1):132-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18054395/>

Fabron Junior A, Lopes LB, Bordin JO. Lesão pulmonar aguda associada à transfusão. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2007 Apr;33(2):206–12.

Granados AL, Rojas CA, Rojas SR. Lesión pulmonar aguda post transfusional: reporte de caso y revisión de bibliografía. *Rev Clin Esc Med*. 2018;8(4):1-6.

Grandjean L, Saso A, Torres A, Lam T, Hatcher J, Thistlethwayte R, et al. Humoral response dynamics following infection with SARS-CoV-2. *MedRxiv*. 2020.

Haroun RA-H, Osman WH, Eessa AM. Interferon- γ -induced protein 10 (IP-10) and serum amyloid A (SAA) are excellent biomarkers for the prediction of COVID-19 progression and severity. *Life Sci*. 2021;269(262):119019.

Herr C, Mang S, Mozafari B, Guenther K, Speer T, Seibert M, et al. Distinct patterns of blood cytokines beyond a cytokine storm predict mortality in COVID-19. *J Inflamm Res*. 2021;14:4651-67.

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. *Lancet*. 2020;395(10223):497-506.

Jan H, Faisal S, Khan A, Khan S, Usman H, Liaqat R, et al. COVID-19: review of epidemiology and potential treatments against 2019 novel coronavirus. *Discoveries*. 2020;8(2):e108.

Junqueira C, Crespo Â, Ranjbar S, de Lacerda LB, Lewandrowski M, Ingber J, et al. Fc γ R-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation. *Nature* [Internet]. 2022 Apr 6 [cited 2022 Apr 6];1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-022-04702-4>

Khalil BA, Elemam NM, Maghazachi AA. Chemokines and chemokine receptors during COVID-19 infection. *Comput Struct Biotechnol J*. 2021;19:976-88.

Khan S, Nakajima R, Jain A, Assis RR, Jasinskas A, Obiero JM, et al. Analysis of serologic cross-reactivity between common human coronaviruses and SARS-CoV-2 using coronavirus antigen microarray. *BioRxiv*. 2020.

Khosroshahi LM, Rokni M, Mokhtari T, Noorbakhsh F. Immunology, immunopathogenesis and immunotherapeutics of COVID-19; an overview. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2021 [citado 22 Jul 2021];93:107364. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33486333/>

Kim JS, Lee JY, Yang JW, Lee KH, Effenberger M, Szpir W, et al. Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19. *Theranostics*. 2021;11(1):316-29.

Krüttgen A, Cornelissen CG, Dreher M, Hornef MW, Imöhl M, Kleines M. Comparison of the SARS-CoV-2 Rapid antigen test to the real star Sars-CoV-2 RT PCR kit. *Journal of Virological Methods*. 2021 Feb;288:114024

Lev S, Gottesman T, Sahaf Levin G, Lederfein D, Berkov E, Diker D, et al. Observational cohort study of IP-10's potential as a biomarker to aid in inflammation regulation within a clinical decision support protocol for patients with severe COVID-19. *PLoS One*. 2021;16(1):e0245296.

Lima LNGC, Sousa MS, Lima KVB. As descobertas genômicas do SARS-CoV-2 e suas implicações na pandemia de COVID-19. *J Health Biol Sci*. 2020;8(1):1.

Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(3):121-30.

Lo Sasso B, Giglio RV, Vidali M, Scazzone C, Bivona G, Gambino CM, et al. Evaluation of Anti-SARS-Cov-2 S-RBD IgG Antibodies after COVID-19 mRNA BNT162b2 Vaccine. *Diagnostics*. 2021;11(7):1135.

Lu Q, Zhu Z, Tan C, Zhou H, Hu Y, Shen G, et al. Changes of serum IL-10, IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α , IP-10 and IL-4 in COVID-19 patients. *Int J Clin Pract*. 2021;75(9):e14462.

Lucas C, Klein J, Sundaram ME, Liu F, Wong P, Silva J, et al. Delayed production of neutralizing antibodies correlates with fatal COVID-19. *Nat Med*. 2021;27(7):1309.

Lupieri A, Smirnova NF, Solinhac R, Malet N, Benamar M, Saoudi A, et al. Smooth muscle cells-derived CXCL10 prevents endothelial healing through PI3Ky-Dependent T cells response. *Cardiovasc Res*. 2019;116(2):438-49.

Ma A, Zhang L, Ye X, Chen J, Yu J, Zhuang L, et al. High levels of circulating IL-8 and soluble IL-2R are associated with prolonged illness in patients with severe COVID-19. *Front Immunol*. 2021;12:626235.

Mair-Jenkins J, Saavedra-Campos M, Baillie JK, Cleary P, Khaw F-M, Lim WS, et al. The effectiveness of convalescent plasma and hyperimmune immunoglobulin for the treatment of severe acute respiratory infections of viral etiology: a systematic review and exploratory meta-analysis. *J Infect Dis*. 2014;211(1):80-90.

Martinez-Rojas MA, Vega-Vega O, Bobadilla NA. Is the kidney a target of SARS-CoV-2? *Am J Physiol Renal Physiol*. 2020;318(6):F1454-62.

Miot HA. Análise de correlação em estudos clínicos e experimentais. *J Vasc Bras* [Internet]. 2018 [citado 22 Jul 2021];17(4):275-9. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jvb/a/YwjG3GsXpBFRZLQhFQG45Rb/?format=pdf&lang=pt>

Mukaka MM. Statistics corner: a guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J*. 2012;24(3):69-71.

Munoz LE, Gaip US, Franz S, Sheriff A, Voll RE, Kalden JR, et al. SLE--a disease of clearance deficiency? *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44(9):1101-7.

Nakanishi T, Suzuki N, Kuragano T, Nagasawa Y, Hasuike Y. Current topics in therapeutic plasmapheresis. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2013 Jul 26;18(1):41-9.

Organización Panamericana de la Salud. Consideraciones regulatorias sobre la autorización del uso de plasma de convalecientes (PC) para atender la emergencia de COVID-19, 22 de abril de 2020 [Internet]. Washington: OPAS; 2020 [citado 22 Jul 2021].

Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52024/HSSMTC_OVID19200005_eng.pdf?sequence=5&isAllowed=y

Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun*. 2020;11(1):1620.

Palomino DCT, Marti LC. Chemokines and immunity. *Einstein (São Paulo)*. 2015;13(3):469-73.

Pasquereau S, Nehme Z, Haidar Ahmad S, Daouad F, Van Assche J, Wallet C, et al. Resveratrol inhibits HCoV-229E and SARS-CoV-2 coronavirus replication in vitro. *Viruses*. 2021;13(2):354.

Pereira A, Cruz KAT, Lima PS. Principais aspectos do novo coronavírus Sars-Cov-2: uma ampla revisão. *Arq Mudi* [Internet]. 2021 [citado 10 Jun 2021];25(1):73-90. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/55455>

Rojas M, Rodríguez Y, Monsalve DM, Acosta-Ampudia Y, Camacho B, Gallo JE, et al. Convalescent plasma in Covid-19: possible mechanisms of action. *Autoimmun Rev*. 2020;19(7):102554.

Santos ES, Lima FLO. Uso do plasma convalescente como método de tratamento da doença do coronavírus 2019 (covid-19). *Hematol Transfus Cell Ther*. 2020;42:566.

Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai ACK, Zhou J, et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol*. 2016;24(6):490-502.

Taffarel P, Meregalli C, Jorro Barón F, Debaisi G, Lucca A. Lesión pulmonar aguda secundaria a transfusión (TRALI): reporte de un caso y revisión de la bibliografía. *Rev*

Arg de Ter Int. [Internet]. 2015; 33(1). Disponível em: <https://revista.sati.org.ar/index.php/MI/article/view/424>

Teijaro JR, Farber DL. COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(4):195-7.

Vilela Filho AS, Bianchetti BM, Peixer CM, Córdón MS, Rocha MOF, Vasconcelos VCR. Covid-19 vaccines: a literature review. *Braz J Dev* [Internet]. 2022 [citado 25 Jan 2022];8(1):1880-901. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/42433/pdf>

van den Berg K, Glatt TN, Vermeulen M, Little F, Swanevelder R, Barrett C, et al. Convalescent plasma in the treatment of moderate to severe COVID-19 pneumonia: a randomized controlled trial (PROTECT-Patient Trial). *Sci Rep*. 2022;12(1):2552.

Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veasler D. Structure, function, and antigenicity of the sars-cov-2 spike glycoprotein. *Cell*. 2020;181(2):281-92.

Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *JAMA* [Internet]. 2020 [citado 10 Jun 2021];324(8):782-93. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2768391>

Winters JL. Plasma exchange: concepts, mechanisms, and an overview of the American Society for Apheresis guidelines. *Hematology*. 2012 Dec 8;2012(1):7–12.

World Health Organization. WHO-convened global study of origins of SARS-CoV-2: China Part [Internet]. Geneva: WHO; 2021 [citado 10 Jun 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-convened-global-study-of-origins-of-sars-cov-2-china-part>

World Health Organization. Interim guidance for national health authorities and blood transfusion services [Internet]. Geneva: WHO; 2014 [citado 10 Jun 2021]. Disponível em:

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/135591/WHO_HIS_SDS_2014.8_en_g.pdf?sequence=1&isAllowed=y

World Health Organization. Use of convalescent whole blood or plasma collected from patients recovered from ebola virus disease for transfusion, as an empirical treatment during outbreaks interim guidance for national health authorities and blood transfusion services [Internet]. Geneva: WHO; 2014 [citado 10 Jun 2021]. Disponível em:

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/135591/WHO_HIS_SDS_2014.8_en_g.pdf?sequence=1&isAllowed=y

World Health Organization. WHO coronavirus disease (COVID-19) dashboard [Internet]. Geneva: WHO; 2021 [citado 10 Jun 2021]. Disponível em:

<https://covid19.who.int/table>

Xu Z-S, Shu T, Kang L, Wu D, Zhou X, Liao B-W, et al. Temporal profiling of plasma cytokines, chemokines and growth factors from mild, severe and fatal COVID-19 patients. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2020 [citado 11 Mar 2022];5(1):1-3.

Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-0211-1>

Yang L, Liu S, Liu J, Zhang Z, Wan X, Huang B, et al. COVID-19: immunopathogenesis and immunotherapeutics. *Signal Transduct Targeted Ther* [Internet]. 2020 [citado 23 Nov 2020];5(1):1-8. Disponível em:

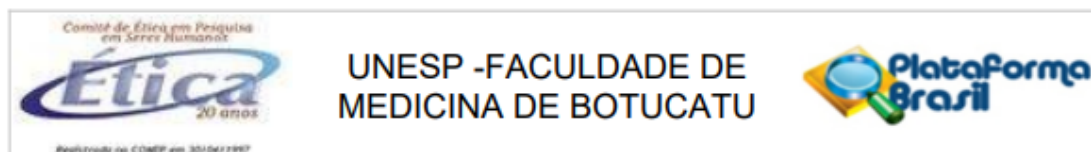
<https://www.nature.com/articles/s41392-020-00243-2>

Ye M, Fu D, Ren Y, Wang F, Wang D, Zhang F, et al. Treatment with convalescent plasma for COVID-19 patients in Wuhan, China. *J Med Virol*. 2020;92(10):1890-1.

Zhang Z, Ai G, Chen L, Liu S, Gong C, Zhu X, et al. Associations of immunological features with COVID-19 severity: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):738.

Zhao Y, Qin L, Zhang P, Li K, Liang L, Sun J, et al. Longitudinal COVID-19 profiling associates IL-1RA and IL-10 with disease severity and RANTES with mild disease. *JCI Insight*. 2020;5(13):e139834.

7. ANEXOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de citocinas e perfil de imunoglobulinas na COVID-19: avaliação em doadores de plasma convalescente versus vacinados.

Pesquisador: Marjorie de Assis Golim

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 52334921.5.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.042.913

Apresentação do Projeto:

As informações apresentadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa.

Trata-se de um estudo observacional de corte transversal cujo objetivo é verificar a expressão de citocinas e imunoglobulinas no plasma de doadores de sangue, a fim de comparar perfis de doadores não expostos ao vírus, convalescentes e/ou vacinados.

Serão avaliados 60 doadores de sangue do Hemocentro do Hospital das Clínicas de Botucatu e desses serão divididos em 4 grupos:

- G0 (grupo controle): Indivíduos saudáveis, sem contato prévio ao SARS-CoV-2 (confirmado pela pesquisa de anticorpos anti-IgM/IgG), não vacinados (n=15)
- G1: indivíduos saudáveis, sem contato prévio ao SARS-CoV-2 (confirmado pela pesquisa de anticorpos anti-IgM/IgG), vacinados com duas doses do imunizante da Astrazeneca (n=15)*.
- G2: indivíduos que tiveram COVID-19 confirmada por RT-PCR e não foram vacinados contra o vírus SARS-CoV-2 (n=15).
- G3: indivíduos vacinados com duas doses do imunizante Astrazeneca e que tiveram COVID-19 confirmada por RT-PCR posterior a vacinação (n=15).

Nesses grupos serão avaliados:

- Caracterização de imunidade prévia contra o vírus SARS-CoV-2:

Triagem sorológica para detecção de IgM/IgG anti-SARS-CoV-2, por meio de punção digital para

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

CEP: 18.618-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 5.042.913

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1815974.pdf	08/10/2021 15:22:19		Aceito
Outros	RespostaAsPendencias.pdf	08/10/2021 15:21:53	Marjorie de Assis Golim	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2LuisGuilherme.pdf	08/10/2021 15:14:15	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	BiorrepositorioAssinado.pdf	30/09/2021 10:09:17	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Outros	AnuencialBA2.pdf	29/09/2021 12:23:05	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Outros	AnuenciaHemocentro1.pdf	29/09/2021 12:18:51	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Outros	AnuenciaHcfmbSipe3352021.pdf	29/09/2021 12:16:14	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuencialInstitucional.pdf	29/09/2021 12:13:24	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	29/09/2021 12:12:30	Marjorie de Assis Golim	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoGuilhermeMestradoCEP.pdf	17/09/2021 10:05:13	Marjorie de Assis Golim	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 18 de Outubro de 2021

Assinado por:
Trajano Sardenberg
(Coordenador(a))

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP **Município:** BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1609

E-mail: cep@fmb.unesp.br