



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

FACULDADE DE MEDICINA

Maria Eduarda Gonçalves

Avaliação do receptor FcγIIIa (CD16) na COVID-19

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

Orientadora: Profa. Dra. Márjorie de Assis Golim

Coorientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Botucatu

2023

Maria Eduarda Gonçalves

Avaliação do receptor FcγIIIa na COVID-19

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

Orientadora: Profa. Dra. Márjorie de Assis Golim

Coorientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Botucatu

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Gonçalves, Maria Eduarda.

Avaliação do receptor Fc#404;IIIa (CD16) na COVID-19
/ Maria Eduarda Gonçalves. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Márjorie de Assis Golim

Coorientador: Rejane Maria Tommasini Grotto

Capes: 90400003

1. Leucócitos mononucleares. 2. Antígenos. 3. Síndrome
respiratória aguda grave. 4. COVID-19 (Doença).

Palavras-chave: Antígeno CD16; Células mononucleares do
sangue periférico; SARS-CoV-2.

Dedico este trabalho aos meus pais, Isabel e Jefferson, por sempre acreditarem em mim e por terem abdicado de suas vidas em prol de minhas realizações e felicidade.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência. Obrigada por nunca soltar minhas mãos e conduzir todas as etapas de minha vida.

Aos meus pais, **Isabel e Jefferson**, que nunca mediram esforços para me ajudar em tudo que foi e é preciso. Obrigada por me proporcionarem tanto amor e carinho.

Ao meu namorado, **Gabriel**, por não deixar eu desacreditar do meu potencial e por todo amor por mim. Obrigada por ser presente em minha vida.

À minha **família**, sinônimo de amor e união. Obrigada por me incentivarem sempre em meus sonhos e por toda compreensão.

À orientadora, **Dra. Márjorie**, pela oportunidade de realizar este trabalho. Sou grata por todo conhecimento compartilhado, e por me guiar nos primeiros passos da pós-graduação.

À minha coorientadora, **Dra. Rejane**, por toda ajuda durante a realização deste trabalho. Sua contribuição foi essencial.

Aos **professores** do programa de pós-graduação em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica), pelos ensinamentos que transcendem os limites da Universidade, por estarem sempre prontos a ensinar e ajudar. Obrigada por todo conhecimento transmitido durante o curso de mestrado.

À companheira de laboratório **Dra. Aline**, pelo companheirismo diário, pela ajuda em todas as etapas deste trabalho, por me ensinar as atividades realizadas no laboratório de Citometria de Fluxo, por acreditar que eu sou capaz, e tornar os dias mais leves e divertidos.

Aos meus **amigos**, que me proporcionaram tantos momentos felizes que me ajudaram a dar continuidade neste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, **Raíssa, Isabela e Guilherme**, por me ajudarem e proporcionarem um ambiente de trabalho e estudo agradável.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

RESUMO

Em dezembro de 2019 relatou-se o primeiro caso da doença pelo Novo Coronavírus - COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2 (Coronavírus 2 causador de Síndrome Respiratória Aguda Grave). De modo geral, diante uma infecção viral, os anticorpos apresentam papel crucial na proteção do hospedeiro, entretanto, o fenômeno de amplificação dependente de anticorpos (do inglês *antibody-dependent enhancement* - ADE) é um fator preocupante, visto que pode induzir o agravamento de infecções intermediadas pela atuação de anticorpos. Propôs-se neste estudo avaliar o envolvimento do receptor CD16 (FcγRIIIa) presente em células natural killer (NK) e monócitos na ADE por COVID-19. A metodologia foi dividida em três etapas (E): E1 – pacientes infectados com SARS-CoV-2, apresentando diferentes quadros clínicos, foram avaliados quanto a frequência de NK, monócitos circulantes e a expressão de CD16 nestas células; E2 – participantes foram caracterizados quanto ao perfil de anticorpos plasmáticos específicos contra SARS-CoV-2; E3 – após definição do perfil de anticorpos, avaliou-se o comportamento das células mononucleares desafiadas in vitro com SARS-CoV-2, na presença de diferentes perfis de anticorpos. Em E1 foi possível observar diferença significativa da idade entre os grupos avaliados (leve, moderado e grave), redução de monócitos circulantes no grupo grave e, menor expressão de CD16 nas células NK do grupo moderado em relação ao leve. Nas análises celulares diante da infecção in vitro pelo SARS-CoV-2, não constatou-se envolvimento da expressão de CD16 que pudesse ser associada à ADE. Apesar de não ter sido possível observar o fenômeno ADE in vitro na COVID-19, não podemos descartar sua ocorrência, visto que outros fatores inerentes ao protocolo de infecção in vitro como características das amostras de plasma selecionadas (tipos de anticorpos), a inativação do sistema complemento pré-cultura celular e a ausência, in vitro, de citocinas indutoras de ADE, como a IL-10, podem ter influenciado na expressão do CD16. Diante do exposto, não se pode descartar a ocorrência de ADE via receptor FcγRIIIa, pois outras condições que melhor mimetizem a infecção in vivo devem ser testadas.

Palavras-chave: Antígeno CD16; SARS-CoV-2; Células Mononucleares do Sangue Periférico.

ABSTRACT

In December 2019, the first case of the New Coronavirus disease - COVID-19, caused by SARS-CoV-2 (Coronavirus 2 causing Severe Acute Respiratory Syndrome) was reported. In general, in the face of a viral infection, antibodies play a crucial role in protecting the host, however, the phenomenon of antibody-dependent enhancement (ADE) is a worrying factor, as it can induce the worsening of infections mediated by the action of antibodies. This study proposed to evaluate the involvement of the CD16 receptor (FcγRIIIa) present on natural killer (NK) cells and monocytes in ADE due to COVID-19. The methodology was divided into three stages (E): E1 – patients infected with SARS-CoV-2, presenting different clinical conditions, were evaluated regarding the frequency of NK, circulating monocytes and the expression of CD16 in these cells; E2 – participants were characterized regarding the profile of specific plasma antibodies against SARS-CoV-2; E3 – after defining the antibody profile, the behavior of mononuclear cells challenged in vitro with SARS-CoV-2 was evaluated, in the presence of different antibody profiles. In E1, it was possible to observe a significant difference in age between the groups evaluated (mild, moderate and severe), a reduction in circulating monocytes in the severe group and lower expression of CD16 on NK cells in the moderate group compared to the mild group. In cellular analyzes of in vitro infection by SARS-CoV-2, no involvement of CD16 expression that could be associated with ADE was found. Although it was not possible to observe the ADE phenomenon in vitro in COVID-19, we cannot rule out its occurrence, given that other factors inherent to the in vitro infection protocol such as characteristics of the selected plasma samples (types of antibodies), inactivation of the pre-cell culture complement system and the absence, in vitro, of ADE-inducing cytokines, such as IL-10, may have influenced the expression of CD16. Given the above, the occurrence of ADE via the FcγRIIIa receptor cannot be ruled out, as other conditions that better mimic the in vivo infection must be tested.

Keywords: CD16 antigens; SARS-CoV-2; Peripheral Blood Mononuclear Cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Lista de Quadros

Quadro 1 – Critérios de inclusão específicos dos grupos.....	23
Quadro 2 – Condições de cultivo <i>in vitro</i>	29

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura do vírus SARS-CoV-2	12
Figura 2 – Mecanismo de entrada do vírus na célula	14
Figura 3 – Subpopulações de células <i>Natural Killer</i> humanas com base nas expressões de CD56 e CD16.....	15
Figura 4 – Representação esquemática dos receptores Fc de leucócitos humanos.....	17
Figura 5 – Mecanismo da ADE na infecção viral	18
Figura 6 – Delineamento metodológico	24
Figura 7 – Imunofenotipagem celular por citometria de fluxo	25
Figura 8 – Estratégia de <i>gates</i> para quantificação de subpopulações de monócitos e expressão de CD16 pelo parâmetro MIF (mediana de intensidade de fluorescência)	26
Figura 9 – Estratégia de <i>gates</i> para quantificação de subpopulações de células NK e expressão de CD16 pelo parâmetro MIF	26
Figura 10 – Isolamento de PBMC	28
Figura 11 – Etapas do processamento do desafio da infecção <i>in vitro</i>	29
Figura 12 – Distribuição das subpopulações de NK entre os grupos avaliados em E1 (mediana e semi-amplitude interquartílica).....	32
Figura 13 – Expressão da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de CD16 em células <i>Natural Killer</i> dos diferentes grupos	34
Figura 14 – Distribuição das subpopulações de monócitos entre os grupos avaliados em E1 (mediana e semi-amplitude interquartílica)	35
Figura 15 – Representação gráfica dos perfis plasmáticos dos participantes.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização dos indivíduos por grupo (frequência absoluta e relativa)	31
Tabela 2 – Caracterização plasmática dos grupos	35
Tabela 3 – Perfil das amostras de plasma contra SARS-CoV-2 dos dois participantes/grupo	36
Tabela 4 – Expressão de CD16 basal pré e pós-infecção nas células NK	37
Tabela 5 – Expressão de CD16 basal pré e pós-infecção nos monócitos	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina Humana 2
ADCC	Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos
ADE	Amplificação Dependente de Anticorpos
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
COVID-19	Doença por Novo Coronavírus de 2019
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FcγR	Receptores para Imunoglobulina G
HCoV	Coronavírus Humano
IFN-γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
MIF	Mediana de Intensidade de Fluorescência
MIP-1	Proteína Inflamatória de Macrófagos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Célula Mononuclear do Sangue Periférico
PBS	Tampão Fosfato-salino
PFU	Unidade Formadora de Placa
RT-qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 Causador de Síndrome Respiratória Aguda Grave
TLR	Receptor Toll-like
TMPRSS2	Serina Protease Transmembrana 2
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TNF-β	Fator de Necrose Tumoral beta
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

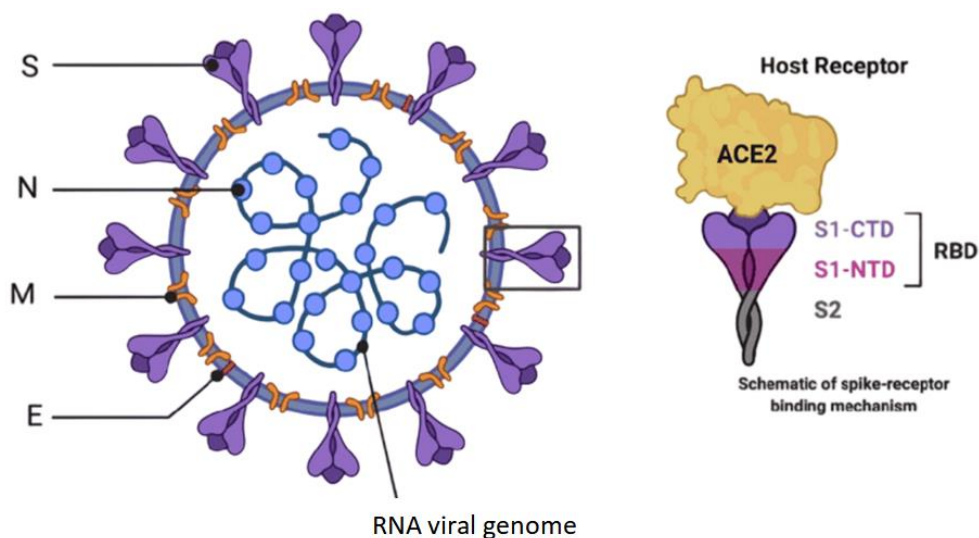
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	21
3. METODOLOGIA.....	22
3.1 Imunofenotipagens para avaliação da frequência e intensidade de expressão de CD16 em células NK e monócitos	24
3.2 Caracterização de imunidade prévia contra o vírus SARS-CoV-2:.....	26
3.3 Painel quantitativo de imunoglobulinas específicas anti-SARS-CoV-2..	27
3.4 Detecção de anticorpos neutralizantes.....	27
3.5 Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico	27
3.6 Infecção <i>in vitro</i> de células mononucleares com o vírus SARS-CoV-2 .	28
3.7 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR).....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, China, relatou-se o primeiro caso da doença COVID-19 (do inglês: coronavirus disease), causada pelo novo vírus SARS-CoV-2, o qual alcançou todo o mundo em pouco tempo (ZHENG et al., 2020). Em março de 2020, foi declarada pandemia por COVID-19 pela OMS (Organização Mundial da Saúde) (AZKUR et al., 2020).

Os coronavírus, descobertos pela primeira vez na década de 1960, fazem parte da família Coronaviridae, subfamília Orthocoronavirinae e gênero Betacoronavirus. São envelopados e apresentam como material genético RNA de fita simples de polaridade positiva. Todos os coronavírus têm genoma por volta de 30 kb envolto por capsídeo helicoidal envelopado em torno de 80 a 120 nm. Os membros da família Coronaviridae codificam, no mínimo, quatro proteínas estruturais e dezesseis não estruturais, em forma de pico, concedendo sua aparência de coroa, a qual deu origem ao seu nome (Figura 1) (LIU et al., 2020).

Figura 1 – Estrutura do vírus SARS-CoV-2



Fonte: Mahmood, Z. et al. 2020.

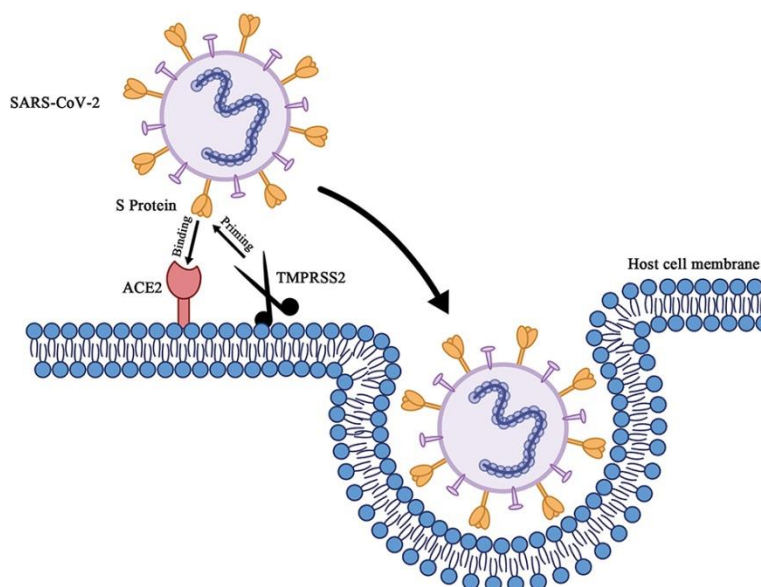
Legenda: Estrutura do SARS-CoV-2 mostrando a organização das proteínas spike (S), membrana (M) e envelope (E). O RNA viral está associado à proteína do nucleocapsídeo (N).

A transmissão ocorre pelo contato direto ou através da aspiração de gotículas respiratórias e aerossóis, porém, também foi relatada a transmissão por fômites, embora menos comum (MARKET et al., 2020). Após exposição ao agente infeccioso, diferentes mecanismos imunológicos são desencadeados na tentativa de controlar a infecção (CALICH et al., 2009; SAHA et al., 2014).

A COVID-19 apresenta um perfil complexo diante do quadro clínico dos pacientes, semelhante a outras infecções virais, sendo as manifestações clínicas dos pacientes infectados de extrema importância para o entendimento da fisiopatologia (AZKUR et al., 2020). A maioria das pessoas infectadas apresentam sintomas leves, como mal-estar, febre, fadiga, tosse, dispnéia leve, anorexia, dor de garganta, dores no corpo, dor de cabeça ou congestão nasal, e alguns também podem apresentar diarreia, náusea e vômito. Já em idosos ou imunossuprimidos são atípicas e rápida evolução, podendo levar à morte, principalmente naqueles com comorbidades pré-existentes.

A entrada do vírus no citoplasma da célula é facilitada pela proteína S (do inglês: *spike*) presente na superfície do SARS-CoV-2 que se liga a receptores humanos ACE2 (Enzima Conversora de Angiotensina Humana 2) e, através de clivagem proteolítica pela ação da TMPRSS2 (Serina Protease Transmembrana 2), também presente na superfície celular, ocorre a fusão das membranas viral e celular (Figura 2) (SARZI-PUTTINI, 2020).

Figura 2 – Mecanismo de entrada do vírus na célula



Fonte: WATANABE et al., 2021.

Legenda: A proteína S trimérica do SARS-CoV-2 se liga ao receptor celular ACE2 humano. A enzima TMPRSS2 cliva a proteína S para facilitar a fusão do envelope viral à membrana da célula hospedeira.

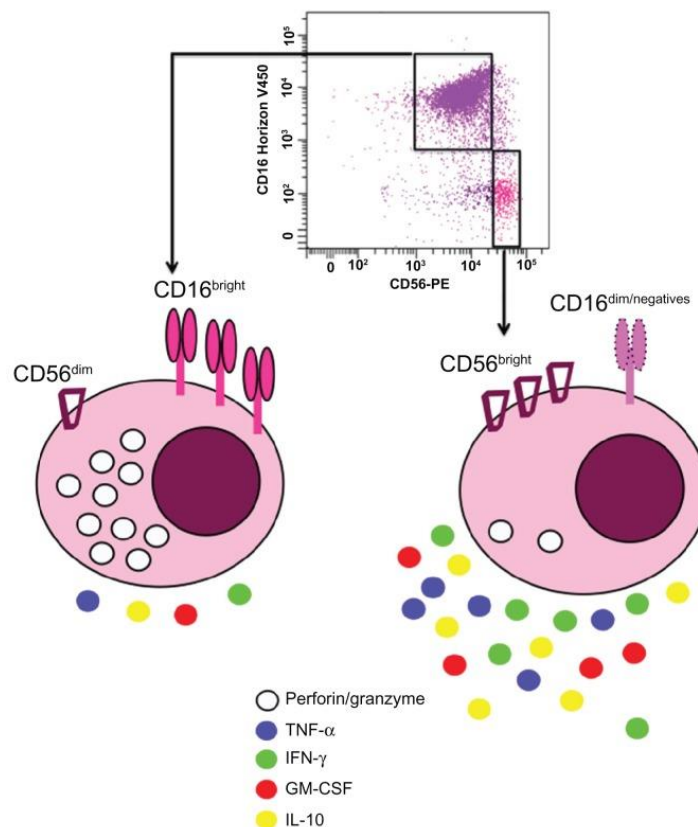
As respostas imunes inata e adaptativa apresentam-se envolvidas na infecção por coronavírus (LI et al., 2020; LIU et al., 2020; COSSARIZA et al., 2020; HOFFMANN et al., 2020). Os mecanismos da resposta imune inata envolvem barreiras físicas, químicas e biológicas, além de englobar elementos do sistema imunológico essenciais para a defesa imediata do hospedeiro, como neutrófilos, monócitos, macrófagos, complemento, citocinas e proteínas de fase aguda. Destaca-se que os coronavírus utilizam proteínas estruturais, não estruturais e proteínas acessórias para conseguirem chegar aos alvos da resposta imune inata (MARKET et al., 2020).

Entre as respostas imunes inata e adaptativa, as células NK (*Natural Killer*) desempenham um papel crítico e representam 15% do total de linfócitos no sangue periférico (KANTO et al., 2007). A maioria das NK (>95%) constituem subpopulação citolítica e expressam fenotipicamente $CD56^{low}CD16^{+}$, estas migram para sítios inflamatórios e portam perforinas, proteínas estas que rapidamente medeiam citotoxicidade. Uma menor subpopulação de NK no sangue (<5%) tem fenótipo

CD56^{high}CD16⁻, não têm perforinas, mas secretam grande quantidade de IFN- γ e TNF- α após ativação e são superiores às NK CD56^{low} nestas funções. Além disso, secretam citocinas com propriedades antivirais de relevância (MARKET et al., 2020).

Um estudo que avaliou função e fenótipo das células NK periféricas de pacientes COVID-19, mostrou que na admissão dos pacientes o número destas células não se correlacionou com a gravidade da doença. No entanto, os pacientes com COVID-19 grave apresentaram número consideravelmente menor de células NK circulantes em relação àqueles com doença leve. Já no período de convalescença, houve normalização dos níveis de células NK (ZHENG et al., 2020).

Figura 3 – Subpopulações de células *Natural Killer* humanas com base nas expressões de CD56 e CD16



Fonte: LANGERS et al., 2012.

Legenda: Cerca de 90% das células NK isoladas do sangue apresentam nível baixo de CD56 e alta densidade de CD16 (CD56^{dim}CD16^{bright}). Estas células são mais citotóxicas por meio da secreção de perforina e granzima do que as células que expressam CD56^{bright} e nenhuma ou baixa expressão de CD16 (CD56^{bright}CD16^{low}), as quais produzem mais citocinas.

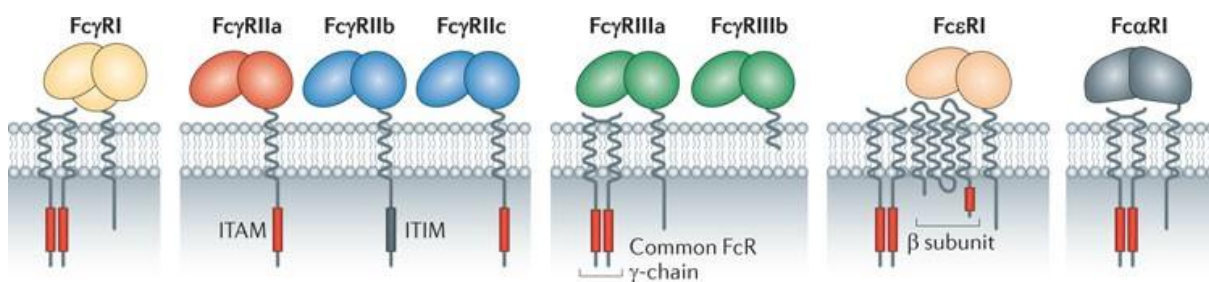
Em infecções virais, além das células NK, destacam-se também os monócitos. São leucócitos circulantes precursores de macrófagos teciduais e células dendríticas que realizam fagocitose, produção de citocinas e atuam na patogênese de distúrbios inflamatórios. Nesse aspecto, atuam na homeostase do vaso sanguíneo e, em processos infecciosos e inflamatórios, e são os primeiros a extravasarem para o tecido e diferenciando-se-se em macrófagos (ROBBINS et al., 2010).

Em humanos, três subpopulações de células monocíticas circulantes foram identificadas com base na expressão dos receptores CD14 e CD16: CD14^{high}/CD16⁻ monócitos clássicos ou inflamatórios, CD14^{high}/CD16⁺ monócitos intermediários e CD14^{low}/CD16⁺ monócitos não clássicos ou pró-inflamatórios. Em indivíduos saudáveis os monócitos pró-inflamatórios perfazem cerca de 10% dos monócitos totais, monócitos clássicos aproximadamente 85% e os monócitos intermediários cerca de 5% (DAMASCENO et al., 2019; MARIMUTHU R et al., 2018).

As pesquisas avaliando o comportamento de monócitos em pacientes COVID-19 têm demonstrado aumento significativo dos níveis periféricos. Monócitos totais estão mais elevados em pacientes com doença moderada no período de 4 a 6 dias após início dos sintomas. Por outro lado, nos pacientes com pior evolução da doença, os monócitos estão reduzidos neste mesmo período. No entanto, após 12º dia de sintomas ocorre inversão deste padrão, com tendência a normalização em pacientes (LIU, et al., 2020)

O receptor CD16, presente tanto em monócitos quanto em células NK, faz parte da família de receptores Fc para IgG (FcγRs). Existem três classes de FcγRs humanos: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16), sendo os dois últimos classificados em isoformas FcγRIIIa, FcγRIIIb, FcγRIIIc; FcγRIIIa e FcγRIIIb, que diferem entre si quanto à afinidade de ligação e característica ativadora/inibitória (MARZOCCHI-MACHADO et al., 2005; KULKARNI, 2019). Estes receptores medeiam várias funções celulares como produção de citocinas, fagocitose, degranulação, apresentação de antígenos e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) (VOGELPOEL et al., 2015; BOURNAZOS et al., 2020).

Figura 4 – Representação esquemática dos receptores Fc de leucócitos humanos.

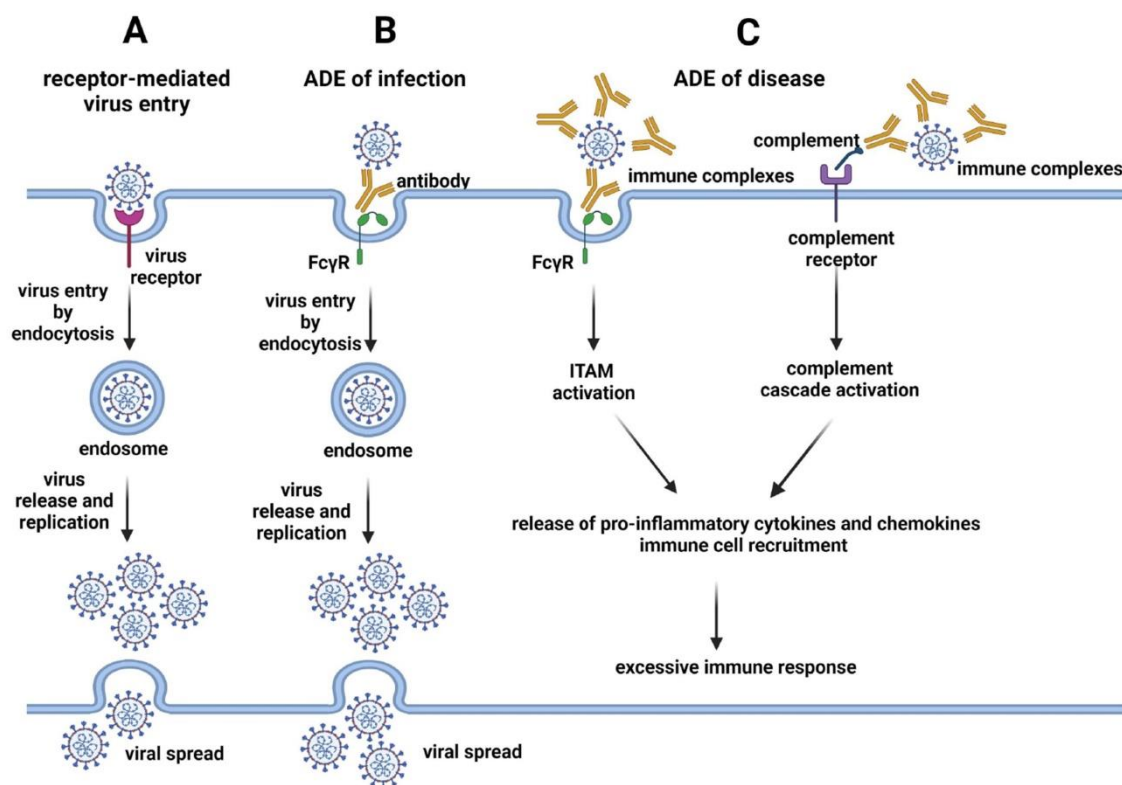


Fonte: Hogarth et al., 2012.

Legenda: Todos os FcγRs devem se ligar a várias moléculas de IgG, dentro de um complexo imunológico, para serem ativados. Entre os FcγRs, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc e FcγRIIIa possuem um domínio de sinalização citoplasmático clássico ITAM (motivo de ativação baseado em tirosina imunorreceptor) e podem ativar células imunes efetoras. Já o FcγRIIb é o único FcγR inibitório possui um ITIM citoplasmático (motivo inibidor baseado em tirosina imunorreceptor) que medeia a atividade de sinalização.

De modo geral, os anticorpos têm a função de proteger o hospedeiro contra a maioria das infecções virais, atuando de várias formas, incluindo a neutralização, opsonização e lise de células infectadas por vírus. Porém, como já documentado em outros estudos, especialmente na dengue, estes FcγRs podem contribuir para o fenômeno de amplificação dependente de anticorpos (do inglês *antibody-dependent enhancement* – ADE), no qual ocorre o agravamento de infecções intermediado pela atuação de anticorpos, que na incapacidade de neutralização eficiente do antígeno, acabam atuando como facilitadores do processo de entrada na célula do hospedeiro, favorecendo o patógeno (KULKARNI, 2019).

Figura 5 – Mecanismo da ADE na infecção viral



Fonte: ZANELLA, M. et al. 2022.

Legenda: **A)** infecção viral através de receptores celulares na ausência de anticorpos; **B)** anticorpos pré-existent não neutralizantes ou subneutralizantes que se ligam ao vírus interagem com receptores gama via fração cristalizável da imunoglobulina (Fcγ), facilitando a internalização do vírus nas células hospedeiras por endocitose; **C)** anticorpos pré-existent não neutralizantes ou subneutralizantes podem formar imunocomplexos com partículas virais. Estes podem interagir com os receptores Fcγ das células hospedeiras, ativando os ITAMs. Alternativamente, os imunocomplexos, através dos componentes ativados do complemento, interagem com receptores do complemento das células hospedeiras, ativando a cascata do complemento. As duas vias culminarão numa resposta imune exacerbada.

Nestas condições, os anticorpos ligados ao vírus via porção Fab auxiliam em sua entrada nas células-alvo via ligação da porção Fc do anticorpo, acoplando-se aos receptores Fc para imunoglobulinas (no caso de IgG são FcγRs) presentes na membrana da célula, propiciando a ADE nas células que expressam tais receptores como monócitos, macrófagos, células NK, células dendríticas e alguns tipos de granulócitos (KULKARNI, 2019). Várias infecções virais têm sido associadas ao fenômeno ADE, como a dengue (CHAU et al., 2009; Khandia et al., 2018), zika (Khandia et al., 2018), ebola (TAKADA et al., 2003), infecção pelo HIV (FÜST,

1997), e mais recentemente, levantou-se a possibilidade de ocorrer também na COVID-19 (LEE et al., 2020).

A maioria dos estudos avaliando ADE em infecções virais relata que o receptor Fc mais comum tem sido o FcγRIIIa (CD32a), inclusive na dengue (WANG et al., 2017; LEE et al., 2020). No entanto, estudo avaliando pacientes com dengue demonstrou haver associação da presença de anticorpos de maior afinidade ao FcγRIIIa (CD16), induzindo à susceptibilidade de desenvolver formas mais graves da doença, como por exemplo, a trombocitopenia grave (WANG et al., 2017).

Sabe-se que a expressão dos FcγRs é influenciada por citocinas (ANANIA et al., 2019; BOURNAZOS et al., 2020). Diferentes citocinas são capazes de induzir/inibir a expressão dos diferentes tipos de FcγRs. Por exemplo, a expressão de FcγRIIIa parece ser estimulada por IFN-γ, IL-3 e IL-6, e inibida por IL-4, TNF-α e TNF-β, ao passo que FcγRIIb, parece ser induzido por IL-10 e IL-6 e inibido por TNF-α e IFN-γ (ANANIA et al., 2019).

Existem relatos na literatura de diferentes citocinas que imunomodulam a expressão de FcγRIII. Estudo *in vitro* avaliando pacientes asmáticos demonstrou que IL-2 e IFN-γ induziram a expressão de FcγRIII, diferentemente de IL-4, IL-9 e IL-6 que inibiram a expressão deste receptor (DAVOINE et al., 2004). Blom et al. (2003) demonstraram que os níveis de TNF-α foram diretamente relacionados com a expressão de FcγRIII em macrófagos sinoviais, indicando que esta citocina possa induzir este receptor em células de pacientes com artrite reumatóide, enquanto que Velde et al. (1990) sugerem que IL-4 e IL-13 suprimam a expressão de FcγRs, incluindo FcγRIII (BOURNAZOS et al., 2020).

Apesar de estudos terem avaliado diferentes citocinas e seus papéis na expressão de FcγRIII, a IL-10 parece ser a mais relevante. Sugere-se que esta citocina tenha importante papel na indução da expressão de FcγRIII, estimulando monócitos a diferenciarem-se para a subpopulação não-clássica de imunofenótipo CD14⁺/CD16⁺ e consequentemente, aumentando sua atividade efetora e pró-inflamatória (VELDE et al., 1990; WANG et al., 2008).

Ao passo que sua expressão é influenciada por citocinas, quando expressos, os FcγRs possuem a função de mediar a produção destas, exercendo papel importante

na homeostase imunológica, que quando em desequilíbrio, pode resultar em inflamação exacerbada. Neste sentido, ainda não está claro qual seria o papel dos FcγRs na produção de citocinas durante infecções virais, até que ponto este poderia favorecer o hospedeiro ou o vírus (VOGELPOEL et al., 2015).

Nosso grupo de pesquisa tem observado que parte dos pacientes com COVID-19 apresentam menor frequência e intensidade de expressão de CD16 em monócitos e células NK. Kuri-Cervantes et al. (2020) reportaram achados muito semelhantes. Estas observações foram o estímulo para investigarmos o papel do FcγRIIIa (CD16) na COVID-19. Desta forma formulou-se a hipótese de que esta diminuição da expressão possa ter relação com a ocorrência de ADE, ocupando o receptor com o complexo anticorpos sub-neutralizantes/vírus.

2. OBJETIVOS

- 1) Avaliar a frequência das subpopulações de monócitos e células *Natural Killer* em pacientes com COVID-19;
- 2) Caracterizar o perfil plasmático contra SARS-CoV-2 dos participantes como critério de seleção dos grupos;
- 3) Avaliar o comportamento das células mononucleares (PBMC) desafiadas com infecção *in vitro* pelo SARS-CoV-2 na presença de diferentes perfis de anticorpos;
- 4) Associar ou não os achados com a possível ocorrência de ADE.

3. METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, sob o parecer 4.020.604, emenda 4.979.749. Foram incluídos pacientes que forneceram consentimento livre e esclarecido de forma virtual.

Etapa 1 (E1):

Foram incluídos neste estudo portadores do vírus SARS-CoV-2, confirmados pelos sintomas clínicos e exame de RT-qPCR, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, que necessitaram ou não de internação no período de pandemia COVID-19, ambos os sexos, com idade ≥ 18 anos, os quais foram avaliados em um único momento.

Classificados clínicamente e laboratorialmente como leve, moderado e grave. Foram incluídos pacientes com até 7 dias após confirmação de diagnóstico para casos leves (n=19); até 7 dias após internação na enfermaria para casos moderados (n=15) e até 7 dias após internação em unidade de terapia intensiva (UTI) para casos graves (n=18), totalizando 52 pacientes. Os participantes de E1 foram fenotipados para caracterização de monócitos e células *Natural Killer*.

Etapa 2 (E2):

Participantes de estudo anterior que tinham amostras de plasma pré-pandêmicas armazenadas, oriundas de biorrepositório do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, foram convidados a participar deste estudo. Ao todo, foram incluídos 38 indivíduos, moradores da cidade de Botucatu, São Paulo, de ambos os sexos, com idade ≥ 18 anos <60 anos.

Após consentimento, devidamente assinado, as amostras de plasma foram testadas para selecionar aqueles que não tiveram contato prévio com o SARS-CoV-2 nas amostras armazenadas (teste rápido IgG/IgM). As amostras com resultados não reagentes foram avaliadas quanto aos anticorpos específicos para proteínas virais e função neutralizante e, compuseram os grupos, conforme critérios descritos no quadro 1, sendo que G1 e G2 foram avaliados exclusivamente com amostras pré-

pandêmicas, e G3 e G4 foram convidados a participar da etapa prospectiva, doando nova amostra de sangue (5mL) para avaliar o perfil plasmático pós-vacinação, com duas doses do imunizante da AstraZeneca-Oxford, ChAdOx1 (AZD1222), vacina do tipo vetor viral não replicante, disponibilizada no Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil, aprovada para uso pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Os participantes foram divididos em quatro grupos conforme abaixo:

Quadro 1 – Critérios de inclusão específicos dos grupos

Grupos	Critérios
G1	Indivíduos sem contato prévio com SARS-CoV-2 e não vacinados.
G2	Indivíduos sem contato prévio com SARS-CoV-2, não vacinados, com anticorpos anti-nucleocapsídeo oriundos de outras HCoVs.
G3	Indivíduos sem contato prévio com SARS-CoV-2, vacinados, com anticorpos anti-Spike e RBD, com função neutralizante.
G4	Indivíduos sem contato prévio com SARS-CoV-2, vacinados, com anticorpos anti-Spike e RBD, sem função neutralizante.

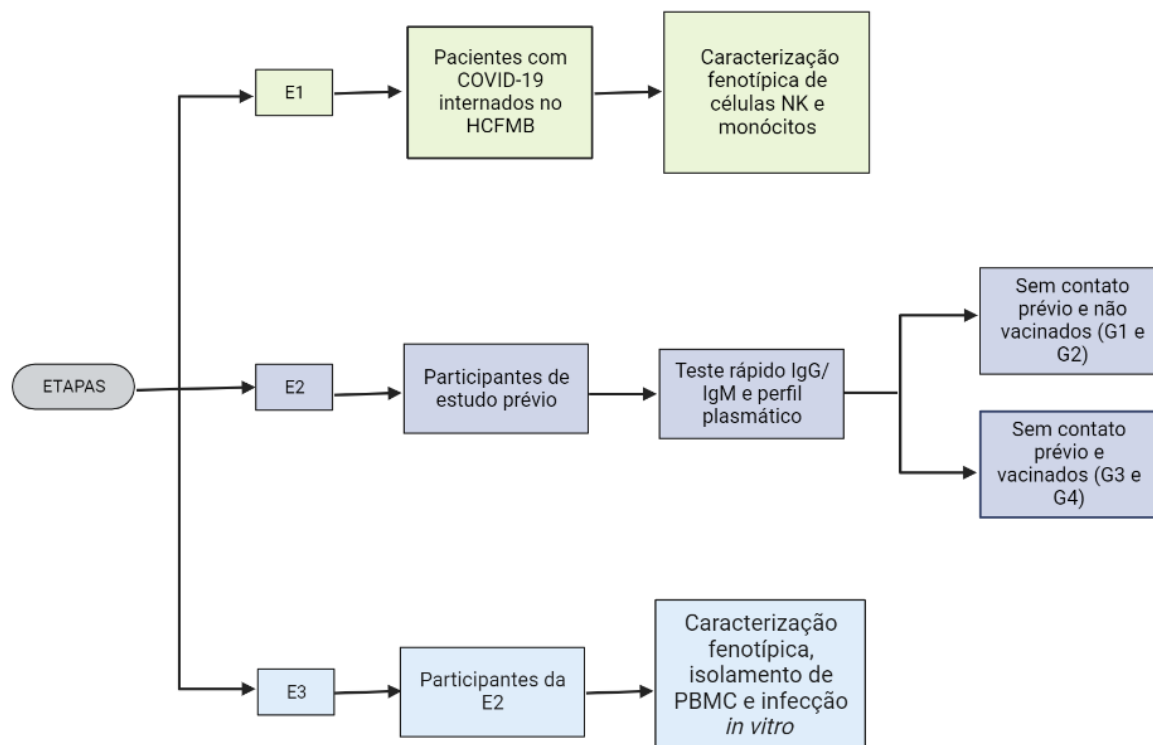
Fonte: arquivo pessoal, 2023.

A composição dos quatro grupos baseou-se nas possibilidades de indução à ADE, ou seja, a presença de anticorpos em níveis subneutralizantes. Assim, os participantes dos grupos G2 e G4, embora apresentassem anticorpos contra as proteínas Nucleocapsídeo (G2), Spike 1 e RBD (G4), estes estavam em concentrações subneutralizantes, portanto, poderiam favorecer o fenômeno de ADE. Já os participantes de G3 tinham níveis de anticorpos em concentrações neutralizantes.

Etapa 3 (E3):

Considerando os fatores determinantes na seleção dos perfis celulares a serem induzidos à infecção *in vitro*, de modo a compreender os mecanismos relacionados à ADE, alguns participantes foram selecionados de acordo com as características das amostras de plasma contra o SARS-CoV-2 (n=02/grupo). Então, foram submetidos à nova coleta de sangue periférico (15 mL) para caracterização fenotípica, isolamento de PBMC e infecção *in vitro* com a cepa B.1.1.7.

Figura 6 – Delineamento metodológico



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Foram excluídos pacientes coinfectados com outras patologias, internados em razão de outras doenças que não COVID-19, que posteriormente, testaram positivo.

Todas as etapas foram realizadas nos Laboratórios de Citometria de Fluxo e Biologia Molecular do Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LBA), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp.

3.1 Imunofenotipagens para avaliação da frequência e intensidade de expressão de CD16 em células NK e monócitos

Alíquotas de 100 µL de sangue total foram inseridas em tubos de poliestireno (12x75 mm), próprios para uso em citômetro de fluxo, incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos, por 30 minutos à temperatura ambiente e protegidas de luz. Foram utilizados marcadores de superfície celular específicos para a caracterização fenotípica de subpopulações de leucócitos circulantes:

monócitos ($CD14^+CD16^{+/-}$) e células NK ($CD3^-CD16^{+/-}CD56^+$). Após marcação, hemácias foram lisadas com 900 μ L de FACS Lysing Solution[®] - BD, para otimizar a análise de leucócitos. Após 15 minutos de incubação, a amostra foi centrifugada a 200 g por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 μ L de tampão fosfato-salino e o processo de lavagem foi repetido. Ao final, acrescentou-se 500 μ L de PBS para ressuspender as células e prosseguiu à leitura em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur[®] (BD), constituído de 4 detectores de fluorescência. A aquisição e análise dos dados foram realizadas no programa CellQuest[™] e FlowJo[™], empregando-se diferentes estratégias de análises.

Seguem os marcadores específicos para as linhagens celulares avaliadas:

Monócitos:

CD14 FITC/CD16 APC

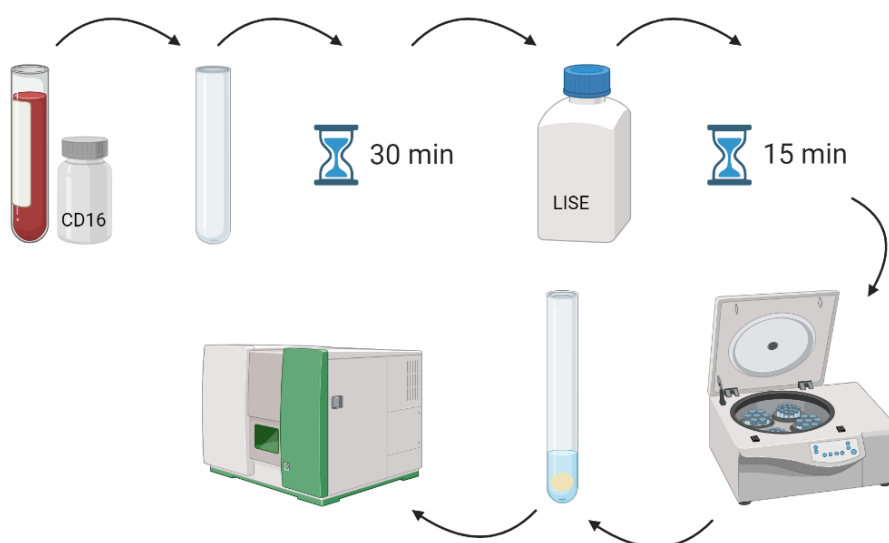
- Monócitos Clássicos: $CD14^+/CD16^-$
- Monócitos Não Clássicos: $CD14^+/CD16^+$

Células NK:

CD3 FITC/CD16 APC/CD56 PE/CD45 PerCP

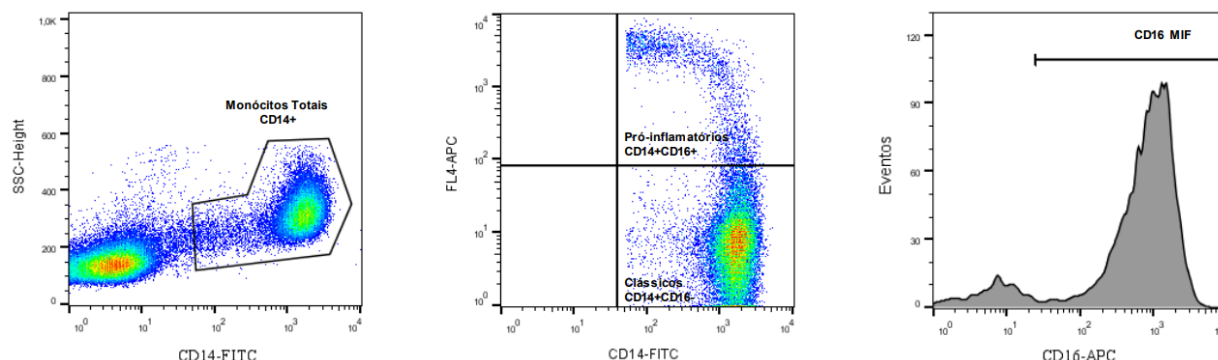
- Células NK^{dim}: $CD3^-/CD16^+/CD56^+CD45^+$
- Células NK^{bright}: $CD3^-/CD16^+/CD56^{++}CD45^+$

Figura 7 – Imunofenotipagem celular por citometria de fluxo



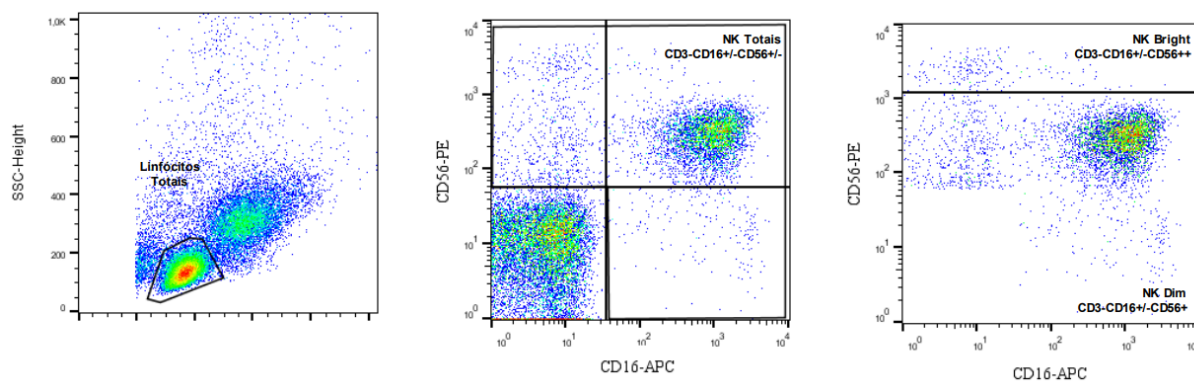
Fonte: Arquivo pessoal, 2023. Esquema realizado utilizando a plataforma BioRender[®].

Figura 8 – Estratégia de *gates* para quantificação de subpopulações de monócitos e expressão de CD16 pelo parâmetro MIF (mediana de intensidade de fluorescência)



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Figura 9 – Estratégia de *gates* para quantificação de subpopulações de células NK e expressão de CD16 pelo parâmetro MIF



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

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

Foi realizada triagem das amostras de plasma 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 IgG/IgM anti-SARS-CoV-2, por imunocromatografia (ECO[®] Diagnostica). Foi utilizada uma gota de plasma, adicionado ao cassete de teste, seguida por solução tampão. A leitura foi realizada em 15 minutos, avaliada pela presença ou ausência de bandas nas regiões específicas para IgG ou IgM.

3.3 Painel quantitativo de imunoglobulinas específicas 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-Nucleocapsídeo e Anti- RBD), 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.

3.4 Detecção de anticorpos neutralizantes

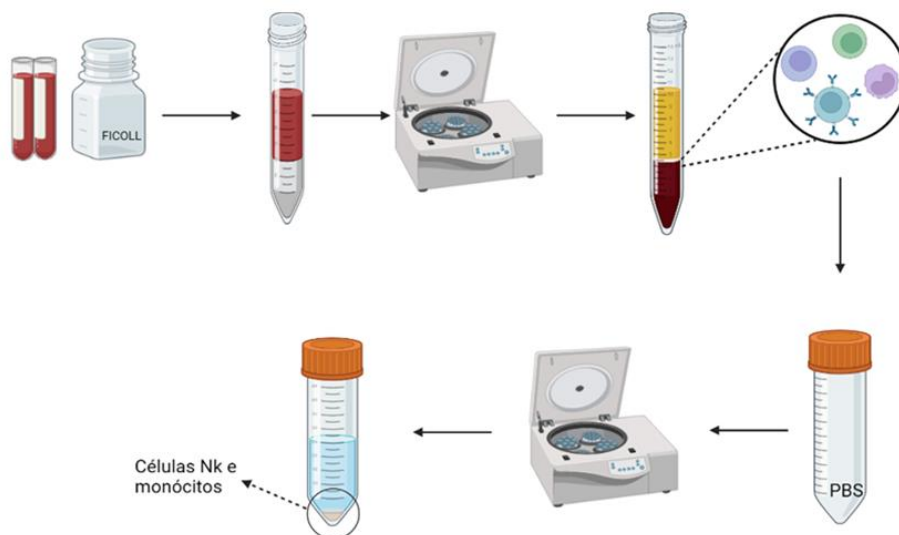
Utilizou-se o kit SARS-CoV-2 NeutralISA (EUROIMMUN®) para detecção dos anticorpos neutralizantes contra a porção S1/RBD da proteína de pico do SARS-CoV-2. O objetivo foi medir a atividade neutralizante de anticorpos anti-S1/RBD, possibilitando a confirmação da sua funcionalidade em inibir a ligação de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

3.5 Isolamento de Células Mononucleares do Sangue Periférico

As amostras de sangue periférico (8 mL) de cada participante que aceitou participar da etapa 3 foram utilizadas para isolar as PBMC (do inglês: *peripheral blood mononuclear cells*) através da centrifugação do sangue em gradiente de densidade. O sangue coletado foi adicionado a tubos cônicos de 50 mL, contendo 4 mL de solução Ficoll-Paque PLUS estéril. O sangue foi adicionado sobre o Ficoll de forma inclinada, ângulo aproximado de 45°, para favorecer a separação entre o Ficoll-Paque PLUS e o sangue (1:2 Ficoll/sangue). A centrifugação foi a 405 g, por 40 minutos a 25°C. Após, foi coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur o anel de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) presente na interface entre o plasma e Ficoll-Paque e, transferido para outro tubo, onde ocorreram duas lavagens com PBS (405 g, por 10 minutos a 4°C) para remoção de resíduos de Ficoll-Paque. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspensionado em 1 mL de PBS na concentração de 1×10^6 . A viabilidade foi avaliada pelo método de azul de trypan (Life Technologies, CA, USA), seguindo as

especificações do fabricante. A contagem de células viáveis foi realizada em Câmara de Neubauer.

Figura 10 – Isolamento de PBMC



Fonte: Arquivo pessoal, 2023. Esquema realizado utilizando a plataforma BioRender®.

3.6 Infecção *in vitro* de células mononucleares com o vírus SARS-CoV-2

As PBMC isoladas foram submetidas à infecção *in vitro* com o vírus SARS-CoV-2 (cepa B.1.1.7) na concentração inicial de $8,4 \times 10^7$ PFU/mL, amostra de pool de pacientes expandido, sendo diluído 100x no momento da infecção das PBMC. O vírus utilizado no experimento foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Biologia Molecular do HCFMB.

Para cada participante (n=08) as PBMC foram preparadas em quatro condições *in vitro* em placas de cultura de 12 poços, descritas no quadro 2 abaixo:

Quadro 2 – Condições de cultivo *in vitro*

Componentes	Condições		
	Ctl negativo	Ctl positivo	Teste
Meio RPMI	750 µL	500 µL	250 µL
PBMC	250 µL	250 µL	250 µL
Vírus	—	250 µL	250 µL
Plasma	—	—	250 µL

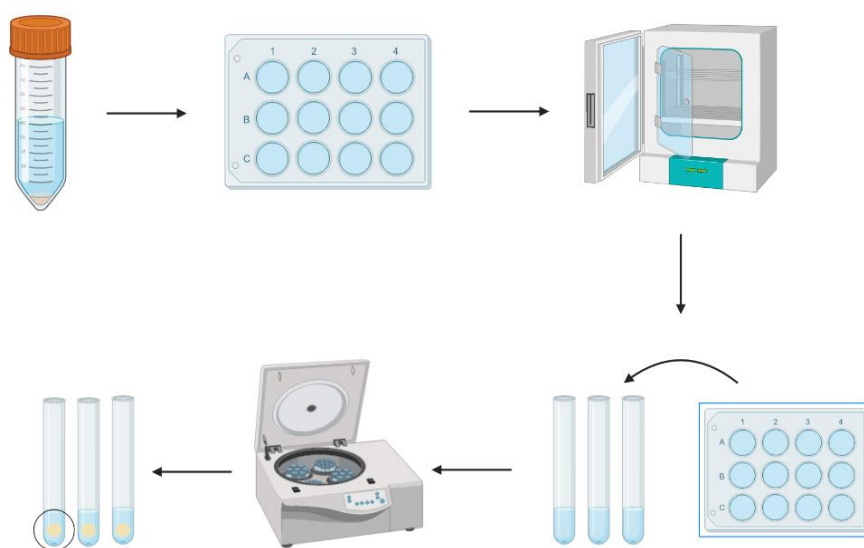
Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Legenda: Ctl negativo – expressão de CD16 basal; Ctl positivo - expressão de CD16 na presença do vírus; Teste - expressão de CD16 na presença de plasma e vírus.

Antes da incubação, o plasma foi retirado do freezer -80°C e colocado em banho Maria à 56°C por trinta minutos, com o objetivo de inativar o sistema complemento. As células foram incubadas por uma hora em estufa a 37°C sob agitação leve.

Após incubação, o conteúdo dos poços (1 mL) foi transferido para tubos cônicos (12x75 mm), sendo os poços lavados com PBS gelado (1 mL) para retirada de resíduo viral ou celular. Procedeu-se à lavagem, remoção de sobrenadante e ressuspensão em 1 mL de PBS. Uma alíquota foi usada para confirmação da infecção viral por RT-qPCR e outra para imunofenotipagens pós-infecção (descrito no item 3.1).

Figura 11 – Etapas do processamento do desafio da infecção *in vitro*



Fonte: Arquivo pessoal, 2023. Esquema realizado utilizando a plataforma BioRender®.

3.7 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR)

As amostras foram submetidas à extração do RNA viral, de forma automatizada (Extract 96 Locus), utilizando uma metodologia "In house" por bead magnética baseada em imobilização reversível em fase sólida (Solid Phase Reversible Immobilization, SPRI), seguida de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-qPCR) usando o kit de diagnóstico Gene Finder™ 2019-nCoV Assay, conforme as especificações do fabricante. A reação qPCR foi ciclada no CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad, EUA), usando as configurações recomendadas para obtenção dos valores de Cycle Threshold (CT), sendo consideradas amostras positivas aquelas com curvas de amplificação com CTs abaixo ou igual a 40 para pelo menos 2 genes dos 3 analisados (genes E, N e RdRp).

Utilizou-se o Kit GeneFinder™ COVID-19 Fast RealAmp desenvolvido para detecção qualitativa do RNA do SARS-CoV-2 por PCR em tempo real através da reação de transcrição reversa, usando como alvo os genes RdRp, N e E, segundo especificações do fabricante. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Aplicada no setor de Biologia Molecular.

Análises dos dados obtidos

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade *Shapiro-Wilk*. As variáveis com distribuição simétrica foram representadas por média e desvio padrão como medidas de tendência central, e submetidas à análise de variância utilizando o teste ANOVA e teste post hoc de Tukey. As variáveis com distribuição assimétrica foram representadas por mediana e semi-amplitude interquartílica e analisadas com os testes de *Kruskal-Wallis* e post hoc de *Dunn*. Foram realizados para todas as variáveis testes de correlação de Pearson e Spearman. Foi adotado como significância estatística valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Etapa 1

No total, foram incluídos 52 pacientes com COVID-19, classificados de acordo com a gravidade da doença em leve, moderado e grave, sexo e idade.

Tabela 1 – Caracterização dos indivíduos por grupo (frequência absoluta e relativa)

Grupos	Leve	Moderado	Grave	Universo amostral
Nº	19 (36%)	15 (29%)	18 (35%)	52 (100%)
Homens	10/24 (53%)	4/24 (27%)	10/24 (56%)	24/52 (46%)
Mulheres	9/28 (47%)	11/28 (73%)	8/28 (44%)	28/52 (54%)
Idade (média)	42,63 ^a	58,13 ^b	55,28 ^b	52,01

Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Legenda: Diferentes letras na mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

As análises estatísticas demonstraram que dentre as variáveis analisadas, a idade apresentou distribuição simétrica e as demais distribuição assimétrica.

Quanto à idade, pacientes com idade mais avançada classificaram-se nos quadros moderado (média: 58,13) e grave (média: 55,28), enquanto os pacientes que evoluíram de forma leve, configuraram-se entre aqueles de menor idade (média: 42,63). Esta diferença foi estatisticamente significativa na comparação leve versus moderado ($p = 0,0083$) e leve versus grave ($p = 0,00681$), não sendo vista diferença entre moderado e grave. Esta relação entre idade e gravidade da doença já era esperada, considerando ser a idade um fator de risco, o que contribui para a robustez dos nossos achados. Ejaz et al. (2021) avaliou pacientes com COVID e constatou risco substancial de mortalidade para adultos de meia-idade, maior risco para idosos e, menor risco para crianças e adultos jovens.

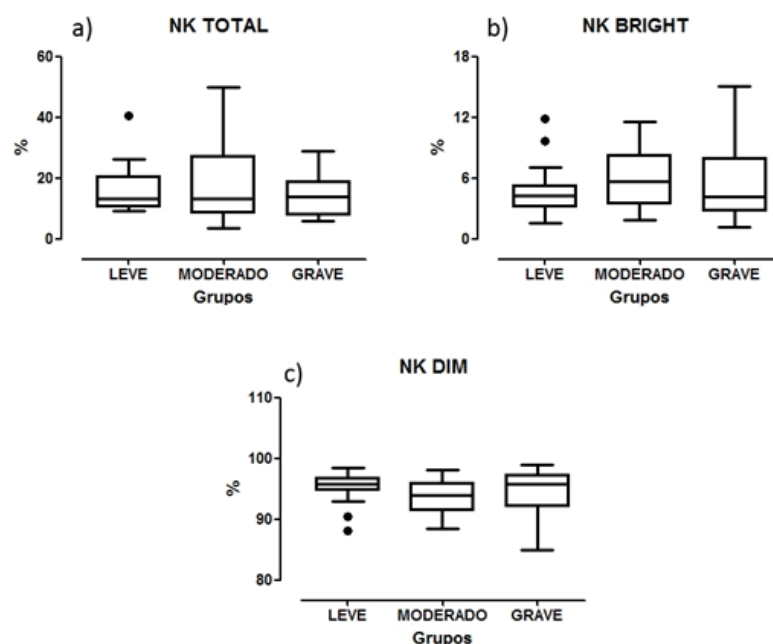
Observando as características fenotípicas dos pacientes dos diferentes grupos avaliados, destacando-se as subpopulações de células NK e monócitos, visto que ambas expressam CD16, encontramos os valores representados abaixo:

Entre os grupos de pacientes avaliados não foram observadas diferenças significativas dos níveis de células NK totais ($p = 0,7305$) ou de subpopulações

NK^{bright} (p=0,5192) e NK^{dim} (p=0,2529) circulantes (figura 13). Contribuindo com nossos resultados, Liu e colaboradores (2020) utilizaram citometria de fluxo para quantificar linfócitos T CD3⁺, subpopulações T CD4⁺, T CD8⁺, linfócitos B e células NK. Foi observado redução significativa nas contagens de T CD3⁺, T CD4⁺, T CD8⁺ no grupo grave quando comparado com o grupo leve e nenhuma diferença relevante nas contagens de linfócitos B e células NK. Wang et al. (2020) também realizaram citometria de fluxo, relatando diminuição de linfócitos totais, T CD4⁺, T CD8⁺ e linfócitos B nos pacientes graves em relação aos pacientes com doença leve. No entanto, não observaram diferença na razão CD4/CD8 e células NK.

Em contrapartida, Market (2020) reportou número reduzido de células NK circulantes em pacientes com COVID-19 grave quando comparado com pacientes com doença leve, da mesma forma Zhang (2020), observou drástica diminuição de células NK total em pacientes com COVID-19, assim como o comprometimento da função dada a exaustão celular diante o aumento da expressão de NKG2A, receptor ativador presente nas células NK. Portanto, parece não haver consenso na literatura sobre a frequência de NK circulantes nos pacientes com COVID-19.

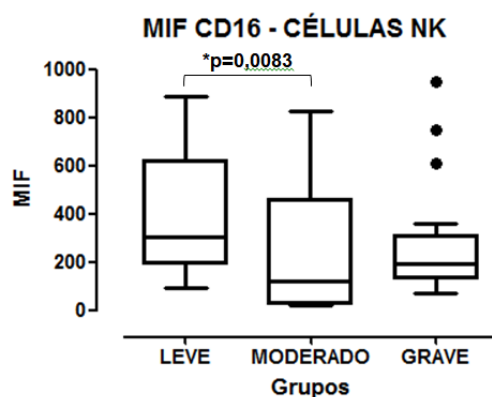
Figura 12 – Distribuição das subpopulações de NK entre os grupos avaliados em E1 (mediana e semi-amplitude interquartílica)



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

As análises da expressão de CD16 em células NK, utilizando-se o parâmetro mediana de intensidade de fluorescência (MIF), demonstraram diferença significativa entre os grupos leve e moderado ($p=0,0083$), visto que o grupo leve apresentou maior expressão de CD16 (mediana: 302,32) em relação ao moderado (mediana:121,88) (figura 14), resultado que favorece a hipótese da ocorrência de ADE. Apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa entre os grupos leve e grave, observa-se na figura 13 que o grupo grave (mediana: 190,74), assim como o moderado, apresentou menor expressão de CD16 em células NK em relação ao grupo leve.

Figura 13 – Expressão da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de CD16 em células *Natural Killer* dos diferentes grupos

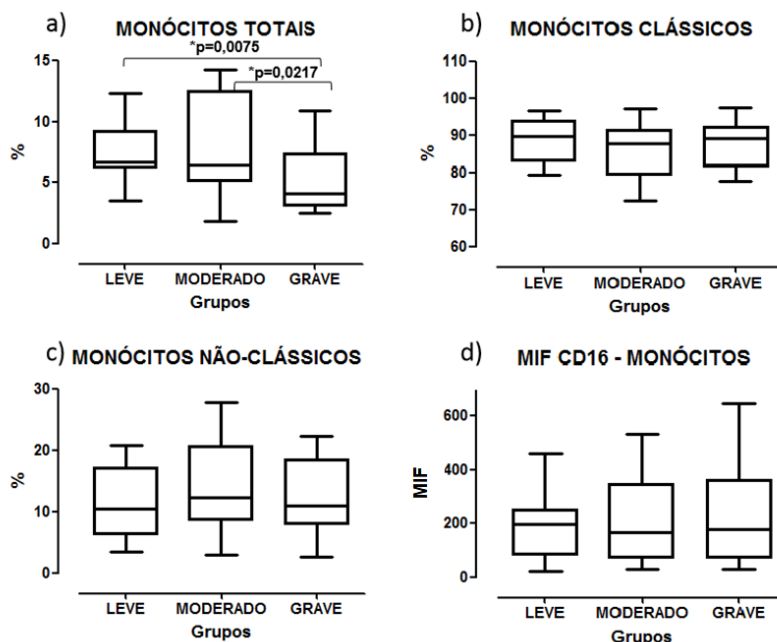


Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Após a transformação em valores relativos, observou-se que a expressão de CD16 em NK foi 148% maior no grupo leve comparado ao moderado, e 58% maior do que no grupo grave, fato que reforça a hipótese de ligação dos anticorpos de concentrações subneutralizantes ao receptor FcγIIIa (via fração Fc) e, consequentemente bloqueio do epítipo CD16 na superfície celular (Bournazos et al., 2020). Outra alternativa seria a formação de complexos vírus-anticorpos subneutralizantes, também ocupando o receptor CD16, via fração Fc. Ainda, considera-se a possibilidade da metaloproteinase ADAM17 (do inglês: *A Disintegrin And Metalloprotease-17*) clivar o CD16 das células NK ativadas. Esta clivagem ocorre no ectodomínio de forma rápida após ativação de diversos estímulos, desta forma, mediante o desprendimento da proteína da superfície celular, há consequente redução da expressão de CD16 (Jing Y et al., 2015).

Nas análises de monócitos totais (%), o grupo grave apresentou menores níveis quando comparado aos outros grupos (figura 14), havendo diferença significativa ($p=0,0075$) entre grupo leve (mediana: 6,74) *versus* grave (mediana: 4,08) e, grupo moderado (mediana: 6,40) *versus* grave ($p=0,0217$) (figura 15). Assim como neste estudo, Zhou et al. (2020), apontaram diminuição de monócitos em pacientes internado em UTI. Sun et al. (2020) relataram que pacientes graves apresentaram redução de monócitos quando comparados com o grupo leve, fato que condiz com os resultados encontrados neste estudo. Porém, quando analisadas as demais subpopulações monocíticas não houve diferença entre os grupos (monócitos clássicos: $p=0,4485$; monócitos pró-inflamatórios: $p=0,4485$), nem mesmo na expressão de CD16 ($p=0,9539$), ainda que os grupos moderado (mediana: 166,98) e grave (mediana: 177,03) tenham apresentado redução em comparação ao grupo leve (mediana: 198,10), conforme demonstrado na figura 14.

Figura 14 – Distribuição das subpopulações de monócitos entre os grupos avaliados em E1 (mediana e semi-amplitude interquartílica)



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Nas análises de correlação, avaliando as variáveis que se apresentaram diferentemente entre os grupos, não houve associação entre idade e expressão de

CD16 em NK ($p=0,8098$), nem mesmo entre idade e monócitos totais ($p=0,5089$), evidenciando não haver influência da diferença de idade.

Etapa 2

Todos os participantes apresentaram resultado negativo para o teste imunocromatográfico de IgG/IgM, portanto todos entraram na análise do perfil plasmático.

Dos 38 participantes testados quanto ao perfil plasmático contra SARS-CoV-2, dois ($n=02$) tiveram resultado compatível com doença prévia (positivo para todas as proteínas virais), portanto, foram excluídos das análises posteriores.

Os resultados apresentaram distribuição assimétrica, então foram utilizadas como medida de tendência central a mediana e semi-amplitude interquartilica ($p25-p75$) e estão sumarizados na tabela 2 abaixo.

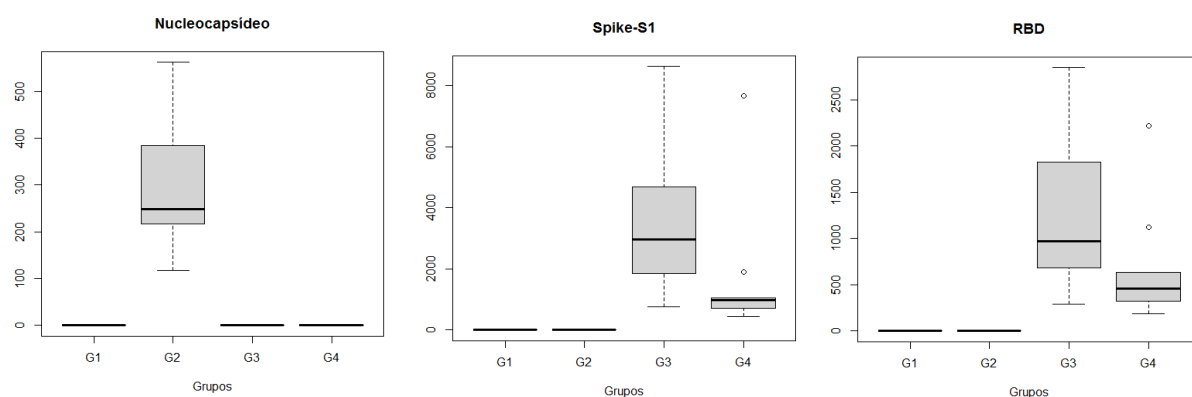
Tabela 2 – Caracterização plasmática dos grupos

	Nucleocapsídeo		RBD		Spike	
	<i>Mediana</i>	<i>p25-p75</i>	<i>Mediana</i>	<i>p25-p75</i>	<i>Mediana</i>	<i>p25-p75</i>
G1 (n = 07)	0	0-0	0	0-0	0	0-0
G2 (n = 09)	247,86	217,57- 383,67	0	0-0	0	0-0
G3 (n = 11)	0	0-0	967,54	685,31- 1826,86	2979,11	1857,43- 4680,33
G4 (n = 09)	0	0-0	460,87	320,66- 637,19	972,12	702,77- 1044,64

Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Legenda: *As concentrações de anticorpos utilizam como unidade de medida pg/mL.

Figura 15 – Representação gráfica dos perfis plasmáticos dos participantes



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Etapa 3

Foram selecionados dois participantes de cada grupo para representar os perfis plasmáticos encontrados na etapa E2 para proceder à fase de infecção *in vitro*, visando avaliar a ocorrência de ADE.

Tabela 3 – Perfil das amostras de plasma contra SARS-CoV-2 dos dois participantes/grupo

Grupos	ID	Vacina contra o 2019-nCoV	Doença por 2019-nCoV	Neutraliza (IH%)	Proteína N	Spike S1	RBD
G1	01	Não	Não	-17,88	0	0	0
	02	Não	Não	-24,49	0	0	0
G2	03	Não	Não	-23,64	217,57	0	0
	04	Não	Não	-21,79	561,81	0	0
G3	05	Sim	Não	80,30	0	1523,91	794,15
	06	Sim	Não	63,43	0	4185,36	879,71
G4	07	Sim	Não	-8,90	0	1044,64	637,19
	08	Sim	Não	1,34	0	702,77	320,66

Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Legenda: IH% = percentual de neutralização/inibição.

Foram realizadas análises fenotípicas pré e pós-infecção com SARS-CoV-2 para avaliar se a expressão de CD16 era influenciada pela presença do vírus e pelos diferentes perfis plasmáticos. As frequências das populações e subpopulações celulares foram mantidas nas diferentes condições de cultivo celular, demonstrando que a infecção não influenciou nas proporções celulares.

É importante destacar as diferenças entre os grupos e o objetivo de observação. Em G1, que não apresenta anticorpos contra o SARS-CoV-2, esperava-se não haver envolvimento do CD16 mediante a infecção *in vitro* exclusivamente, e realmente não houve. Em G2, na presença de anticorpos anti-N subneutralizantes oriundos de outras HCoV, se ocorresse ADE haveria redução de CD16 através da ligação Anti-N ao receptor, entretanto, não houve. Em G3, mediante anti-S e anti-RBD em concentrações neutralizantes, esperava-se não haver envolvimento do CD16 numa condição de níveis neutralizantes virais, e de fato não ocorreu. Já em G4, na presença de anti-S e anti-RBD em concentrações subneutralizantes, esperava-se que na presença de Igs subneutralizante junto com o vírus pudesse levar à redução da expressão de CD16, porém não houve.

No que se refere a expressão de CD16 pré e pós-infecção, a tabela 4 apresenta os valores observados em células NK.

Tabela 4 – Expressão de CD16 basal pré e pós-infecção nas células NK

Grupo	Pré-infecção	Pós-infecção				
	CD16 – basal	Ctl neg	Ctl pos	Teste	Cut-Off [Plasma/vírus]	Delta [Plasma – vírus]
G1 – 01	2392,8	2308,24	2525,48	3133,96	1,24 vezes	+608,48
G1 – 02	2594,55	1625,31	1610,76	2053,53	1,27 vezes	+442,77
G2 – 03	913,98	1031,98	1018,15	1485,51	1,46 vezes	+467,36
G2 – 04	1263,46	991,05	1113,97	1369,99	1,23 vezes	+256,02
G3 – 05	2109,69	2525,48	2641,65	2689,6	1,02 vezes	+47,95
G3 – 06	2594,55	1632,64	1700,08	2109,69	1,24 vezes	+409,61
G4 – 07	1715,44	1445,96	1420,18	1407,46	0,99 vezes	-12,72
G4 – 08	820,47	2016,91	2813,32	2890,26	1,03 vezes	+76,94

Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Legenda: Ctl neg: controle negativo; Ctl pos: controle positivo.

Ao avaliar a expressão de CD16 mediante a presença do vírus, dos 08 indivíduos analisados, 5 (62,5%) apresentaram aumento dos níveis de CD16 quando comparados à expressão basal. Talvez isso possa ter relação com uma imunomodulação em resposta ao patógeno. No entanto, seria necessário aumentar o número de avaliações para confirmar esta hipótese. O objetivo do *cut-off* foi avaliar se havia equivalência ou aumento da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) da expressão do teste quando comparado à expressão do controle positivo, verificando assim a influência do plasma. De forma surpreendente, não se observou redução da expressão de CD16 mediante as diferentes condições de infecção viral, pelo contrário, a expressão aumentou na presença de plasma em 7 de 8 amostras (87,5%), conforme observado na tabela tanto pelos valores de *cut-off* quanto pelo delta.

Tabela 5 – Expressão de CD16 basal pré e pós-infecção nos monócitos

Grupo	Pré-infecção	Pos-infecção				
	CD16 – basal	Ctl neg	Ctl pos	Teste	Cut-Off [Plasma/vírus]	Delta [Plasma – vírus]
G1 – 01	111,4	78,79	55,23	96,47	1,75 vezes	41,24
G1 – 02	47,4	449,1	964,66	620,82	0,64 vezes	-343,84
G2 – 03	1055,45	661,17	342,89	743,18	2,17 vezes	400,29
G2 – 04	2308,24	1064,99	930,57	509,37	0,55 vezes	-421,2
G3 – 05	457,25	210,02	168,49	130,97	0,77 vezes	-37,52
G3 – 06	47,4	333,76	311,99	582,94	1,86 vezes	270,95
G4 – 07	1345,57	673,17	596,2	1252,15	2,10 vezes	655,95
G4 – 08	2318,65	461,38	956,02	791,48	0,83 vezes	-364,54

Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Legenda: Ctl neg: controle negativo; Ctl pos: controle positivo.

Ao avaliar a expressão de CD16 em monócitos pós-infecção, comparando a expressão basal *versus* presença do vírus, observou-se redução de expressão em 75% das amostras infectadas (n=06). Na análise do *cut-off* não observamos um padrão mediante as diferentes condições de infecção, havendo um comportamento heterogêneo. Desta forma, não foi possível extrair conclusões sobre a ação dos anticorpos *in vitro*.

Neste estudo não foi possível observar a ocorrência de ADE *in vitro*. Existe a hipótese de que as características das amostras de plasma selecionadas tenham influenciado, considerando que G2 continha plasma com anti-nucleocapsídeo, oriundo de outras HCoVs e, G3 e G4 continham plasmas com anticorpos pós-vacinação (anti-S e anti-RBD), não havendo inclusão de perfil de anticorpos oriundos de plasma convalescente, o que pode ser um diferencial. Conforme demonstrado por Maemura e colaboradores (2021), usando plasma em fase convalescente da COVID-19 em células que expressam o FcγRIIIA observaram que o SARS-CoV-2 estimula a produção de anticorpos indutores de ADE, os quais permanecem presentes por pelo menos seis meses após a infecção em humanos.

Outro fator que pode ser contribuído para que o fenômeno ADE não tenha sido observado pode estar relacionado à inativação do sistema complemento. Estudo recente avaliando ADE em COVID-19 reportou o envolvimento de outros componentes do sistema imune que atuam em ADE *in vivo*, como o sistema complemento (fração C1q). Anticorpos pré-existentes em concentrações não neutralizantes ou subneutralizantes podem formar imunocomplexos com partículas virais, que *per se* interagem com receptores Fcγ das células hospedeiras, ativando os ITAMs (do inglês: *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) uma região altamente conservada no domínio citoplasmático de cadeias de sinalização de proteínas adaptadoras e receptores e é um mediador crítico de sinais intracelulares. Ainda, os imunocomplexos através dos componentes do sistema complemento podem interagir diretamente com seus receptores, ativando a cascata do complemento, podendo através de ambas as vias, levar à hipercitocinemia além do aumento da carga viral (ZANELLA, et al., 2022). Da mesma forma, Prohászka, et al. (2004) observou que a ADE através do sistema complemento se desenvolve logo após a infecção pelo HIV concomitantemente com a soroconversão e se correlaciona fortemente com a carga viral no curso da doença.

Ainda há a possibilidade da expressão do CD16 ter sido influenciada pela ausência de citocinas no desafio *in vitro*, visto que algumas citocinas, como IL-10, apresentam papel importante na indução da expressão de FcγIII (BOURNAZOS et al., 2020).

5. CONCLUSÃO

De modo a avaliar o receptor CD16 nas células NK e monócitos com o fenômeno ADE foram evidenciados:

- Nos pacientes com COVID-19 foram observadas diferenças significativas da idade entre os grupos; redução dos níveis de monócitos totais no grupo grave em relação aos outros grupos e, aumento da expressão de CD16 em NK no grupo leve quando comparado com moderado e grave;
- Nas análises de PBMC diante à infecção *in vitro* pelo SARS-CoV-2 não constatou-se envolvimento da expressão do CD16 que pudesse ser associada à ADE. Porém, não se pode descartar a ocorrência de ADE via receptor FcγIIIa, pois outras condições que melhor mimetizem a infecção *in vivo* devem ser testadas.

REFERÊNCIAS

- AKIRA, S. Innate immunity and adjuvants. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 366, n. 1579, p. 2748-2755, 2011.
- ANANIA, J. C. *et al.* The human FcγRII (CD32) family of leukocyte fcr in health and disease. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 10, p. 464, 2019.
- AZKUR, A. K. *et al.* Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. **Allergy**, Quebec, v. 75, n. 7, p. 1564-1581, 2020.
- BLOM, A. B. *et al.* Increased expression of Fcγ receptors II and III on macrophages of rheumatoid arthritis patients results in higher production of tumor necrosis factor alpha and matrix metalloproteinase. **Arthritis & Rheumatism**, Hoboken, v. 48, n. 4, p. 1002-1014, 2003.
- BOURNAZOS, S. *et al.* The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 20, n. 10, p. 633-643, 2020.
- BROWN, P. J.; NEUMAN, M. G. Digestive Disease Week 2000 conference report: new treatments for chronic hepatitis C. **Canadian Society for Clinical Pharmacology**, Oakville, v. 8, n. 2, p. 67-71, 2001.
- BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 16, n. 7, p. 407-420, 2016.
- CALICH, V.; VAZ, C. **Imunologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2009.
- CHAU, T. N. B. *et al.* Dengue virus infections and maternal antibody decay in a prospective birth cohort study of vietnamese infants. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 200, n. 12, p. 1893-1900, 2009.
- COSSARIZZA, A. *et al.* SARS-CoV-2, the virus that causes COVID-19: cytometry and the new challenge for global health. **Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, Hoboken, v. 97, n. 4, p. 340-343, 2020.

DAMASCENO, D. *et al.* Distribution of subsets of blood monocytic cells throughout life. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Saint Louis, v. 144, n. 1, p. 320-323, 2019.

DAVOINE, F. *et al.* Role and modulation of CD16 expression on eosinophils by cytokines and immune complexes. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 134, n. 2, p. 165-172, 2004.

DELLALIBERA-JOVILIANO, R. *et al.* Perfil celular imunológico e o papel na resposta inflamatória frente ao SARS-CoV-2. **Revista Interdisciplinar de Saúde e Educação**, Ribeirão Preto, v. 1, n. 2, 2020.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, Chicago, v. 118, n. 2, p. 503-508, 2000.

DUSTIN, L. B.; RICE, C. M. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 25, p. 71-99, 2007.

EJAZ, R. *et al.* Gender-based incidence, recovery period, and mortality rate of COVID-19 among the population of district Attock, Pakistan. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 83, p. e249125, 2023.

FARA, A. *et al.* Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines. **Open Biology**, London, v. 10, n. 9, 2010.

FÜST, G. Enhancing antibodies in HIV infection. **Parasitology**, London, v. 115, p. 127-140, 1997. Suppl.

HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ace2 and tmprss2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor cell. **Cell**, Cambridge, v. 181, n. 2, p. 271-280, 2020.

HOGARTH, P. M.; PIETERSZ, G. A. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. **Nature Reviews: Drug Discovery**, London, v. 11, n. 4, p. 311-331, 2012.

HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, New York, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

HUIZINGA, T. W. *et al.* Soluble Fc gamma receptor III in human plasma originates from release by neutrophils. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 86, n. 2, p. 416-423, 1990.

ISAGULIANTS, M. G. Hepatitis C virus clearance: the enigma of failure despite an impeccable survival strategy. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Hilversum, v. 4, n. 3, p. 169-183, 2003.

JIANG, Y. *et al.* COVID-19 pneumonia: CD8+T and NK cells are decreased in number but compensatory increased in cytotoxic potential. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 218, p. 108516, 2020.

JING, Y. *et al.* Identification of an ADAM17 cleavage region in human CD16 (FcγRIII) and the engineering of a non-cleavable version of the receptor in NK cells. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. e0121788, 2015.

KANTO, T.; HAYASHI, N. Innate immunity in hepatitis C virus infection: Interplay among dendritic cells, *natural killer* cells and *natural killer* T cells. **Hsoa Journal of Gastroenterology & Hepatology Research**, Herndon, v. 37, p. 319-326, 2007. Suppl. 3.

KHANDIA, R. *et al.* Modulation of Dengue/Zika Virus pathogenicity by antibody-dependent enhancement and strategies to protect against enhancement in Zika Virus infection. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 9, p. 597, 2018.

KLEIN, S. L.; FLANAGAN K. L. Sex differences in immune responses. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 16, n. 10, p. 626-638, 2016.

KULKARNI, R. Antibody-dependent enhancement of viral infections. **Nature Computational Science**, New York, p. 9-41, 2019.

KURI-CERVANTES, L. *et al.* Immunologic perturbations in severe COVID-19/SARS-CoV-2 infection. **BioRxiv** Preprint, New York, 2020. DOI 10.1101/2020.05.18.101717.

LEE, W. S. *et al.* Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies. **Nature Microbiology**, London, v. 5, n. 10, p. 1185-1191, 2020.

LI, G. *et al.* Coronavirus infections and immune responses. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 92, n. 4, p. 424-432, 2020.

LIU, Y. *et al.* Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. **Science China Life Sciences**, Beijing, v. 63, n. 3, p. 364-374, 2020.

LLOYD, A. R. *et al.* Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. **Immunology and Cell Biology**, Hoboken, v. 85, n. 1, p. 24-32, 2007.

LOZADA-REQUENA, I.; NÚÑEZ PONCE, C. COVID-19: respuesta inmune y perspectivas terapéuticas. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, Lima, v. 37, n. 2, p. 312-319, 2020.

LUDVIGSSON, J. F. Systematic review of COVID-19 in children shows milder cases and a better prognosis than adults. **Acta Paediatrica**, Oslo, v. 109, n. 6, p. 1088-1095, 2020.

MAEMURA T, *et al.* Antibody-dependent enhancement of SARS-CoV-2 infection is mediated by the IgG receptors FcγRIIA and FcγRIIIA but does not contribute to aberrant cytokine production by macrophages. **mBio**, Washington, v. 12, n. 5, p. e0198721, 2021.

MARIMUTHU, R. *et al.* Characterization of human monocyte subsets by whole blood flow cytometry analysis. **Journal of Visualized Experiments**, Boston, n. 140, p. 57941, 2018.

MARKET M. *et al.* Flattening the COVID-19 curve with *Natural Killer* cell based immunotherapies. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 11, p. 1512, 2020.

MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Receptors for Immunoglobulin G (FcγR). **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 1, p. 82-95, 2005.

MATHIOT, C. *et al.* Correlation between soluble serum CD 16 (sCD 16) levels and disease stage in patients with multiple myeloma. **Journal of Clinical Immunology**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 41-48, 1993.

MATHIOT, C. *et al.* Soluble CD16 in plasma cell dyscrasias. **Leukemia & Lymphoma**, Philadelphia, v. 32, n. 5-6, p. 467-474, 1999.

MERAD, M.; MARTIN, J. C. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 20, n. 6, p. 355-362, 2020.

MULLER-KOBOLD, A. C. *et al.* Levels of soluble FcγRIII correlate with disease severity in sepsis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 114, p. 220-227, 1998.

OLIVEIRA, C. M. B. *et al.* Cytokines and pain. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

PIRSALEHI, A. *et al.* Differential alteration trend of white blood cells (WBCs) and monocytes count in severe and non-severe COVID-19 patients within a 7-day follow-up. **Iranian Journal of Microbiology**, Tehran, v. 13, n. 1, p. 8-16, 2021.

PRICE, K. N. *et al.* COVID-19 and immunomodulator/immunosuppressant use in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Saint Louis, v. 82, n. 5, p. e173-e175, 2020.

PROHÁSZKA, Z. *et al.* Complement-mediated antibody-dependent enhancement of viral infections. *In*: SZE BENICS, J. (ed.). **The complement system**. Boston: Springer, 2004. p. 249-264.

QIN, C. *et al.* Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 71, n. 15, p. 762-768, 2020.

ROBBINS, C. S.; SWIRSKI, F. K. The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. **Cellular and Molecular Life Science**, Basel, v. 67, n. 16, p. 2685-2693, 2010.

RODRIGUES, T. S. *et al.* Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 218, n. 3, p. e20201707, 2021.

ROMAGNANI, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, McLean, v. 85, n. 1, p. 9-18, 2000.

SAHA, B.; SZABO, G. Innate immune cell networking in hepatitis C virus infection. **Journal of Leukocyte Biology**, Winstom-Salem, v. 96, n. 5, p. 757-766, 2014.

SARZI-PUTTINI, P. *et al.* COVID-19, cytokines and immunosuppression: what can we learn from severe acute respiratory syndrome? **Clinical and Experimental Rheumatology**, Pisa, v. 38, n. 2, p. 337-342, 2020.

SUN, S. *et al.* Abnormalities of peripheral blood system in patients with COVID-19 in Wenzhou, China. **Clinica Chimica Acta: International Journal of Clinical Chemistry**, Amsterdam, v. 507, p. 174-180, 2020.

TAKADA, A. *et al.* Antibody-dependent enhancement of Ebola virus infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, n. 13, p. 7539-7544, 2003.

VAN EEDEN, C. *et al.* Natural killer cell dysfunction and its role in COVID-19. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 17, p. 6351, 2020.

VELDE, A. A. *et al.* IL-4 decreases Fc gamma R membrane expression and Fc gamma R-mediated cytotoxic activity of human monocytes. **The Journal of Immunology**, Bathesda, v. 144, n. 8, p. 3046-3051, 1990.

VOGELPOEL, L. T. C. *et al.* Control of cytokine production by human Fc gamma receptors: implications for pathogen defense and autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 6, p. 79, 2015.

WALD, O. *et al.* Chemokines in hepatitis C virus infection: pathogenesis, prognosis and therapeutics. **Cytokine**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 50-62, 2007.

WANG, F. *et al.* Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 221, n. 11, p. 1762-1769, 2020.

WANG, T. T. *et al.* IgG antibodies to dengue enhanced for FcγRIIIA binding determine disease severity. **Science**, Washington, v. 355, n. 6323, p. 395-398, 2017.

WANG, Z. Q. *et al.* Interleukin-10 induces macrophage apoptosis and expression of CD16 (FcγRIII) whose engagement blocks the cell death programme and facilitates differentiation. **Immunology**, Oxford, v. 102, n. 3, p. 331-337, 2008.

WILK, A. J. *et al.* A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. **Nature Medicine**, New York, v. 26, n. 7, p. 1070-1076, 2020.

WU, D.; YANG, X. O. TH17 responses in cytokine storm of COVID-19: an emerging target of JAK2 inhibitor Fedratinib. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Hong Kong, v. 53, n. 3, p. 368-370, 2020.

ZANELLA, I. *et al.* Non-neutralizing antibodies: deleterious or propitious during SARS-CoV-2 infection? **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 110, p. 108943, 2022.

ZHANG, D. *et al.* Frontline science: COVID-19 infection induces readily detectable morphologic and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, Winston-Salem, v. 109, n. 1, p. 13-22, 2020.

ZHENG, M. *et al.* Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. **Cellular and Molecular Immunology**, Beijing, v. 17, n. 5, p. 533-535, 2020.

ZHOU, Y. *et al.* Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. **National Science Review**, Beijing, v. 7, n. 6, p. 998-1002, 2020.