

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

Laura Do Amaral Xavier

**AVALIAÇÃO DE ASPECTOS IMUNOMODULATÓRIOS INDUZIDOS POR
VESÍCULAS EXTRACELULARES (VEs) DE PACIENTES COM COVID-19 EM
CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONÓCITOS (mo-DC's)**

Belo Horizonte

2024

Laura do Amaral Xavier

**AVALIAÇÃO DE ASPECTOS IMUNOMODULATÓRIOS INDUZIDOS POR
VESÍCULAS EXTRACELULARES (VEs) DE PACIENTES COM COVID-19 EM
CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONÓCITOS (mo-DC's)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino

Coorientadora: Dra. Marcela Helena Gonçalves Pereira

Belo Horizonte

2024

X3a

Xavier, Laura do Amaral.

Avaliação de aspectos imunomodulatórios induzidos por vesículas extracelulares (VE's) de pacientes com COVID-19 em células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DC's) [recurso eletrônico] / Laura do Amaral Xavier. – 2024.

1 recurso eletrônico (112 f. : il.) : pdf

Orientador: Adriano de Paula Sabino.

Coorientadora: Marcela Helena Gonçalves Pereira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Células dendríticas – Teses. 2. Vesículas extracelulares – Teses. 3. Imunomodulação – Teses. 4. COVID-19 – Teses. 5. Síndrome Respiratória Aguda Grave – Teses. I. Sabino, Adriano de Paula. II. Pereira, Marcela Helena Gonçalves. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:614.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Realizou-se, no dia 12 de abril de 2024, às 09:00 horas, Faculdade de Farmácia, sala 3062, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *Avaliação de aspectos imunomodulatórios induzidos por vesículas extracelulares (VE's) de pacientes com COVID-19 em células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DC's).*, apresentada por LAURA DO AMARAL XAVIER, número de registro 2021702442, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Adriano de Paula Sabino - Orientador (UFMG), Profa. Leticia Gomes de Pontes (UFMG), Profa. Marcela Helena Gonçalves Pereira (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

(X) Aprovada

() Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 12 de abril de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Prof. Adriano de Paula Sabino (Doutor)
Profa. Leticia Gomes de Pontes (Doutora)
Profa. Marcela Helena Gonçalves Pereira (Doutora)
Profa. Adriana Oliveira Costa (Doutora)



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Gomes de Pontes, Usuária Externa**, em 02/05/2024, às 11:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcela Helena Gonçalves Pereira de Oliveira, Usuário Externo**, em 02/05/2024, às 14:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Oliveira Costa, Professora do Magistério Superior**, em 03/05/2024, às 08:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriano de Paula Sabino**, **Professor do Magistério Superior**, em 03/05/2024, às 10:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3214082** e o código CRC **06B4FA8E**.

Referência: Processo nº 23072.224438/2024-19

SEI nº 3214082

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a todas as forças cósmicas que atuaram e atuam nos permitindo caminhar por essa experiência única, a vida. À força de meus ancestrais, a importância do trabalho, suor e sangue de todos aqueles que correram para que aqui eu pudesse estar! Axé.

Agradeço à minha família, meus pais Denise e Marcelo, por me ensinarem tanto e por acreditarem em mim, pelas batalhas e dificuldades enfrentadas na vida para que eu e meus irmãos pudéssemos viver com dignidade e termos confiança e amor para seguir na vida. Agradeço todos os dias pela vida de vocês. Aos meus irmãos, Carlos e Daniel, por me ensinarem desde sempre a compartilhar, a compreender e a ter paciência, rrsrs. Amo vocês!

Ao meu companheiro Adriano, pelo carinho, dedicação e amor, por todo o apoio durante o desenvolvimento deste trabalho ouvindo meus sucessos e falhas, pelas noites e madrugadas que você me buscou na faculdade após experimentos, por sempre arrumar um jeito de fazer tudo ficar bem. Eu te amo!

Aos meus amigos Andressa, Robert e Heloísa por serem as pessoas que compartilho as dores e as delícias da vida. Aos amigos Rafael e Samara por estarem sempre presentes e por compartilharmos tantas risadas e momentos únicos como em nossas reuniões e pelo carinho em compartilharem a casa de vocês para um momento tão gostoso quanto nossas campanhas de D&D com nossos colegas de aventura.

Agradeço pelo início de minha vida acadêmica e no mundo da pesquisa através do acolhimento de José Dilermando, o querido Leco, meu orientador na iniciação científica, que me abriu as portas do Grupo de Estudos em Leishmanioses no René Rachou para que eu pudesse dar meus primeiros passos rumo à vida científica. Eu agradeço pela confiança e carinho depositados em mim, como você deposita em todos os seus alunos e alunas. Saiba que você foi muito importante para que eu chegasse até aqui!

À Myrian Morato, do laboratório de Cultivo Celular do Serviço de Virologia e Riquetsioses da FUNED. Myrian, você foi e é uma inspiração pra mim. No seu lab tive o primeiro contato e encantamento pelas técnicas de cultivo celular. Tive a honra de trabalhar com você e aprender tanto cientificamente (pela brilhante pesquisadora que você é), como também a ser um ser humano melhor. Você me abriu duas grandes portas, a primeira, ao ter sido sua

estagiária, e a segunda ao ser sua colega de trabalho após formada, pelo contrato emergencial na pandemia. Obrigada!

Aos colegas que tive a oportunidade de aprender e compartilhar antes e durante o período da pandemia de COVID-19 na FUNED, Cris Zoboli, pelas risadas inconfundíveis e humor contagiante, Talita e Alana pelos amplos treinamentos em biologia molecular, Naty, por todos os momentos bons e perrengues durante a rotina laboratorial desde a nossa chegada e nossos agradáveis momentos de café, pelas dicas que você sempre compartilhava comigo. Ana, Gabi, Adriana, André, Marta, por todo o aprendizado profissional e momentos compartilhados em equipe no lab. Cris Scarponi, por ter me dado oportunidade e confiar em mim para que desenvolvêssemos um trabalho muito importante sobre as bartoneloses junto ao meu colega Mauro, um ótimo profissional. Ao Felipe, pela confiança e apoio dedicado a mim e ao meu trabalho em sua condução como líder de equipe da biologia molecular e pelo incentivo de me impulsionar para outra oportunidade profissional, que me permitiu o desenvolvimento do mestrado. À Melina, desde os nossos plantões na FUNED e até o momento no lab de Hemato, por termos compartilhado tantos momentos desafiadores e nos aproximado de forma tão genuína. Ao Robert, pelo exemplo de profissionalismo e comprometimento, por nossas conversas intermináveis, por como nos apoiávamos nos perrengues e por ter se tornado meu grande amigo íntimo.

Agradeço ao meu orientador, professor Adriano, pela confiança profissional e acadêmica depositada em mim. Inicialmente por ter me selecionado para fazer parte da equipe de diagnóstico de COVID-19 no Laboratório Institucional de Pesquisas em Biomarcadores, a qual eu tive o prazer de pertencer durante os últimos três anos como Apoio Técnico do laboratório, como também enquanto sua aluna de mestrado. Obrigada por me orientar durante todo este processo de descobertas, acertos e erros. Foi um grande processo de evolução.

Aos meus colegas de lab do LINBIO, obrigada por me acolherem desde a minha chegada. À Danila e Simone, por compartilharmos momentos únicos e inesquecíveis na equipe de extração, ao Túlio por toda a ajuda, tanto na biologia molecular quanto em meus experimentos iniciais no cultivo celular contribuindo com toda sua expertise, à Natália, pelo suporte e imenso cuidado em nossas análises e laudos, pela referência que você é. À Sílvia, por termos nos aventurado neste amplo e lindo mundo das vesículas extracelulares e juntas termos discutido diversos protocolos, metodologias, quebrado a cabeça e seguido em frente, obrigada! À Fernanda por me inserir inicialmente no processo da citometria de fluxo, como

também auxiliar no processo da escolha das amostras usadas. À Camila, por cuidar tão bem do nosso lab, pela ajuda na busca de amostras, no preparo de várias soluções e todo o apoio que necessitamos. Por todos os outros que passaram e trilharam comigo nesta caminhada, meus mais sinceros agradecimentos.

Agradeço à minha co-orientadora, Dra. Marcela Helena. Você foi luz em um dos momentos mais difíceis da minha caminhada enquanto mestranda. Eu te agradeço do fundo do coração por acreditar em mim e em meu trabalho, por aceitar ser minha co-orientadora, por encarar comigo momentos que sozinha eu sei que eu não conseguiria. Obrigada pelas horas de bancada, por sofrer junto comigo, mas, sobretudo por me ajudar no processo de fazer dar certo! Você é um ser humano incrível que tive o prazer de conhecer no ano de 2023. É uma grande inspiração pra mim, enquanto pessoa, mulher, mãe e excelente pesquisadora. Obrigada por tudo!

Agradeço aos colegas da equipe do Laboratório de Sinalização da Inflamação, especialmente à professora Landa, Fernanda e Edvaldo por todo o auxílio e proatividade em ajudar! Vocês são maravilhosos.

Agradeço ao professor Dr. Helton Santiago, do Laboratório de Imunoparasitologia, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, do ICB por ceder o espaço do lab para que alguns processos do meu trabalho pudessem ser realizados. Agradeço à Cassiene, ao Cris e Eneida, por me auxiliarem nestes momentos.

À Juliana, professor André e Professor Diego, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia, por todo o auxílio nas análises por NTA e processos de ultracentrifugação, como também à Virgínia do Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados, no ICB. Ao querido Jamil do Laboratório de Físico-Química de Proteínas, do ICB, pelo apoio auxílio nas etapas de ultracentrifugação. Ao Centro de Microscopia da UFMG, em especial à Talita que solucionou todas as minhas dúvidas acerca dos processos de microscopia de vesículas. À Plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto René Rachou, em especial, à responsável Tisa, que nos auxiliou no processo de sorteamento celular.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais, ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, especialmente à Plataforma de Multiusuários, pelo apoio, incentivo e parcerias visando à melhoria da pesquisa no cenário brasileiro. Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, que tornaram possível a realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: As vesículas extracelulares (VEs) exercem um importante papel na comunicação intercelular tendo em vista sua capacidade de interação facilitada com as células alvo, como também o carreamento de diversas moléculas, proteínas, material genético e lipídeos oriundos da célula de origem executando o papel de sinalização celular. No presente trabalho, avaliou-se o potencial imunomodulatório de vesículas extracelulares derivadas do plasma de pacientes com COVID-19, pacientes com Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) e grupo controle. As análises foram baseadas no perfil fenotípico de células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DC's) sob influência destas vesículas, assim como, avaliação funcional das mo-DC's na ativação de células T em uma reação leucocitária mista (MLR). **Materiais e Métodos:** As amostras de plasma de pacientes com COVID-19 (moderado ou grave), SRAG e grupo controle foram isoladas através do método de ultracentrifugação. Foi coletado sangue periférico de doador saudável para obtenção de monócitos para diferenciação em células dendríticas (mo-DC's) *in vitro*, utilizando as citocinas IL-4 e GM-CSF (50ng/ml) e adicionando VEs de pacientes com COVID-19 (DC/VE COV), ou VEs de pacientes com SRAG (DC/VE SRAG), ou VEs do grupo controle (DC/VE CTRL) por 5 dias. Para maturação das DC's foi adicionado LPS (lipopolissacarídeo) por 48 horas após a diferenciação. A análise fenotípica das DC's foi realizada por citometria de fluxo avaliando os marcadores HLA-DR, CD80, CD86, CD11c, CD14 e PD-L1. A análise funcional dessas DC's foi conduzida através de uma MLR com linfócitos T alogênicos com o objetivo de avaliar o perfil de resposta imune adaptativa induzida. **Resultados:** As DC/VE COV tiveram a expressão diminuída de HLA-DR e CD86 quando comparados com as DC/VE SRAG e DC/VE CTRL. Além disso, encontramos maiores níveis de CD14 nas DC/VE COV quando comparado com as DC/VE SRAG, sugerindo que as VEs de pacientes com COVID-19 promovem um perfil imaturo em mo-DC's. As DC/VE COV cultivadas com linfócitos T alogênicos, induziram aumento nas frequências de células T reguladoras, bem como diminuição na produção de IL-2 pelas células T CD8⁺, aumento nos níveis de expressão de PD-1 nas células T CD8⁺, aumento na expressão de CTLA-4 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, o que sugere uma possível indução a tolerância periférica. Além disso, linfócitos T CD4⁺, co- cultivados com as DC/VE COV, produziram menores níveis de INFγ e TNF. **Conclusão:** Diante do exposto, conclui-se que as VEs derivadas de pacientes com COVID-19 moderado e grave são capazes de utilizar mecanismos para modular a resposta imune de modo a impedir a maturação das mo-DC's e geração de resposta efetora mediada pelas células T CD4⁺ e CD8⁺. Neste estudo, tal mecanismo se mostrou característico da infecção por SARS-CoV-2 associada a casos moderados e graves, tendo em vista as disparidades nas respostas induzidas por VEs relacionados a outros tipos de doenças respiratórias com possível origem viral.

Palavras-chave: células dendríticas; vesículas extracelulares; imunomodulação; COVID-19; SRAG.

ABSTRACT

Introduction: Extracellular vesicles (EVs) play an important role in intercellular communication due to their facilitated interaction with target cells, as well as the transport of various molecules, proteins, genetic material, and lipids originating from the parent cell, thus acting as cellular signaling mediators. In this study, the immunomodulatory potential of extracellular vesicles derived from the plasma of COVID-19 patients, Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) patients, and a control group was evaluated. Analyses were based on the phenotypic profile of monocyte-derived dendritic cells (mo-DCs) under the influence of these vesicles, as well as the functional evaluation of mo-DCs in activating T cells in a mixed leukocyte reaction (MLR). **Materials and Methods:** Plasma samples from COVID-19 patients (moderate or severe), SARS patients, and a control group were isolated using ultracentrifugation. Peripheral blood was collected from a healthy donor to obtain monocytes for in vitro differentiation into dendritic cells (mo-DCs) using IL-4 and GM-CSF cytokines (50ng/ml) and adding EVs from COVID-19 patients (DC/EV COV), or EVs from SARS patients (DC/EV SARS), or EVs from the control group (DC/EV CTRL) for 5 days. For maturation of DC's lipopolysaccharide (LPS) was added for 48 hours after differentiation. Phenotypic analysis of DCs was performed by flow cytometry evaluating the markers HLA-DR, CD80, CD86, CD11c, CD14, and PD-L1. The functional analysis of these DCs was conducted through an MLR with allogeneic T lymphocytes to assess the profile of induced adaptive immune response. **Results:** DC/EV COV showed decreased expression of HLA-DR and CD86 compared to DC/EV SARS and DC/EV CTRL. Additionally, we found higher levels of CD14 in DC/EV COV compared to DC/EV SARS, suggesting that EVs from COVID-19 patients promote an immature profile in mo-DCs. DC/EV COV cultured with allogeneic T lymphocytes induced an increase in regulatory T cell frequencies, as well as a decrease in IL-2 production by CD8⁺ T cells, an increase in PD-1 expression in CD8⁺ T cells, an increase in CTLA-4 expression in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, suggesting a possible induction of peripheral tolerance. Moreover, CD4⁺ T lymphocytes co-cultured with DC/EV COV produced lower levels of INF γ and TNF. **Conclusion:** Based on the findings, it is concluded that EVs derived from moderate and severe COVID-19 patients are capable of using mechanisms to modulate the immune response to prevent the maturation of mo-DCs and the generation of effector responses mediated by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. This mechanism was characteristic of SARS-CoV-2 infection associated with moderate and severe cases, considering the disparities in EV-induced responses related to other types of respiratory diseases with possible viral origin.

Keywords: dendritic cells; extracellular vesicles; immunomodulation; COVID-19; SARS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do vírus SARS-CoV-2	17
Figura 2 – Mapa da COVID-19 no mundo.....	19
Figura 3 – Aspectos fisiopatológicos da infecção por SARS-CoV-2.....	22
Figura 4 – Proteínas envolvidas no subtipos de COVID longa.....	25
Figura 5 – Ligantes de células dendríticas e linfócitos T.....	26
Figura 6 – Biogênese dos exossomos e interação celular	32
Figura 7 – Rotas de formação das vesículas extracelulares	33
Figura 8 – Obtenção de PBMCs do sangue total de doadores saudáveis.....	40
Figura 9 – Desenho experimental da avaliação fenotípica e funcional das mo-DC's sob efeito de vesículas extracelulares	42
Figura 10 – Estratégia de análise de mo-DC's pela citometria de fluxo	44
Figura 11 – Dot plot representativo da separação de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺	45
Figura 12 – Estratégia de análise do Painel Citocinas.....	48
Figura 13 – Estratégia de análise do Painel Tregs	49
Figura 14 –Estratégia de gates de CD4⁺ e CD8⁺ para avaliação de regulação e exaustão celular.....	49
Figura 15 – Principais sintomas associados à gravidade de COVID-19 nos pacientes selecionados no estudo.....	52
Figura 16 – Quantificação proteica pelo método de BCA.....	53

Figura 17 – Representação gráfica da Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) de vesículas extracelulares.....	54
Figura 18 – Imagens da Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	54
Figura 19 – Expressão de marcadores característicos de exossomos e microvesículas detectados em VEs extraídos do plasma do grupo controle e pacientes portadores de SRAG e COVID-19.....	55
Figura 20 – Comparação fenotípica entre monócitos e mo-DC's obtidos de doador saudável	58
Figura 21 – Viabilidade de mo-DC's nos grupos analisados.....	59
Figura 22 – Frequência e expressão de marcadores em mo-DC's.....	61
Figura 23 – Análise dos níveis de expressão dos marcadores em mo-DC's.....	62
Figura 24 – Representação gráfica da viabilidade de células T CD3⁺.....	66
Figura 25 – Frequência de populações de linfócitos T CD4⁺ CD8⁺ e Tregs	67
Figura 26 – Expressão de CTLA-4 e PD-1 em linfócitos T CD4, CD8 e Tregs em co- cultivo com mo-DC's	70
Figura 27 – Produção de citocina IL-10 em linfócitos Tregs	74
Figura 28 - Produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺.....	75
Figura 29 – Produção de citocinas por linfócitos T CD8⁺.....	76
Figura 30 – Desenho conclusivo do estudo	81

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 – Painéis de anticorpos usados para avaliação de resposta imune adaptativa induzida por mo-DC's em reação leucocitária mista (MLR)	47
Tabela 2 – Caracterização dos grupos amostrais usados para o isolamento de vesículas extracelulares.....	51
Tabela 3 – Perfil geral dos pacientes com COVID-19 envolvidos no estudo.....	52
Quadro 1 – Objetivos e suas evidências demonstradas no presente estudo	79

LISTA DE ABREVIATURAS

APC - *Antigen Presenting Cells* (Células apresentadoras de antígenos)

ATB - Antibiótico

BFA – Brefeldina A

BSA - *Bovine serum albumin* (Albumina sérica bovina)

CD - *Cluster of Differentiation* (Grupo de diferenciação)

CTLA-4 - *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4* (Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos)

DC - *Dendritic cell* (Célula Dendrítica)

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

Foxp3 - *Forkhead box P3* (Fator de transcrição “forkhead box” P3)

GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (Fator de Crescimento de Colônia de Granulócito e Macrófago)

HD - *Healthy donor* (doador saudável)

HLA-DR - *Human Leukocyte Antigen- D Related* (Antígeno Leucocitário Humano DR/MHC classe II)

IFN - Interferon

IL - *Interleukin* (Interleucina)

iDC - *Immature Dendritic Cells* (Células dendríticas imaturas)

IgG - *Immunoglobulin G* (Imunoglobulina G)

ILVs - *Intraluminal vesicles* (Vesículas intraluminais)

ISEV – International Society of Extracellular Vesicles (Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares).

LPS - Lipopolissacarídeo

mDCs - *Mature Dendritic Cells* (Células dendríticas maduras)

MET - Microscopia eletônica de transmissão

MFI - *Median fluorescence intensity* (Intensidade Mediana de Fluorescência)

MHC - *Major histocompatibility complex* (Complexo principal de histocompatibilidade)

miRNAs - MicroRNAs

MLR - *Mixed leukocyte reaction* (Reação mista de linfócitos)

mRNAs - RNAs mensageiros

Mo-DC(s) - Célula(s) dendrítica(s) diferenciada(s) *in vitro* a partir de monócito(s)

MVBs - *Multivesicular bodies* (Corpos multivesiculares)

PBMCs - *Peripheral blood mononuclear cell* (Células mononucleadas do sangue periférico)

PBS - *Phosphate buffered saline* (Solução salina tamponada com fosfato)

PD-1 - Proteína 1 de morte celular programada

PD-L1 - Ligante à proteína 1 de morte celular programada

PRR - *Pattern recognition receptors* (Receptor de reconhecimento de padrões)

RNAs - *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute Medium* (Meio *Roswell Park Memorial Institute*)

SDS - *Sodium dodecyl sulfate* (Dodecil sulfato de sódio)

SFB - Soro fetal bovino

TCR - *T cell receptor* (Receptor de células T)

TGF - Fator de crescimento transformador β

Th - *T helper* (Células T auxiliaries)

TLR - Receptor tipo Toll

TNF - *Tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)

TReg - Linfócitos T reguladores

VE/VEs - Vesículas extracelulare

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	COVID-19	17
1.1.1	Biologia e Transmissão	17
1.1.2	Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento.....	20
1.2	Aspectos imunológicos da COVID-19.....	25
1.3	Vesículas Extracelulares	29
1.3.1	Exossomos	31
1.3.2	Microvesículas	30
2	OBJETIVOS.....	34
2.1	Objetivo Geral	34
2.2	Objetivos Específicos.....	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1	Descrição da população de estudo	35
3.1.1	CrITÉrios de Inclusão e Exclusão nos Grupos	35
3.1.2	Amostras de Sangue Periférico	36
3.2	Vesículas Extracelulares	37
3.2.1	Isolamento e quantificação de vesículas extracelulares	37
3.2.2	Caracterização de vesículas extracelulares	37
3.2.2.1	Western Blot	37
3.2.2.2	Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....	38
3.2.2.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão	39
3.3	Avaliação do efeito de exossomos na diferenciação de mo-DC's.....	39
3.3.1	Processamento de PBMC's para obtenção de mo-DC's	39

3.3.2	Diferenciação de monócitos em células dendríticas (Mo-DC's).....	41
3.3.3	Análise fenotípica de mo-DC's por citometria de fluxo.....	43
3.4	Análise Funcional de mo-DC's	44
3.4.1	Obtenção de linfócitos T alogênicos para co-cultivo	44
3.4.2	Análise do perfil de resposta imune adaptativa gerada após co-cultivo	45
3.5	Análises Estatísticas.....	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	Dados dos grupos amostrais	50
4.2	Isolamento e caracterização de VEs do plasma	53
4.3	Análise Fenotípica de mo-DC's	57
4.4	Análise funcional das mo-DC's geradas sob estímulo de vesículas extracelulares.	65
5	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS	82
	ANEXOS	98

Durante os quatro anos de pandemia o SARS-CoV-2 sofreu mutações significativas em seu material genético impactando diretamente sua transmissibilidade e severidade da infecção. A partir deste contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) criou classificações denominadas variantes de preocupação (variants of concern / VOCs) e variantes de interesse (variants of interest / VOIs). As VOIs são identificadas quando observadas mutações que podem se relacionar com a maior dispersão viral, infectividade, transmissibilidade e pode vir a se tornar uma VOC quando tais aspectos se comprovem a partir de um monitoramento epidemiológico constante (PAHO, 2023). Outra denominação utilizada pela OMS são as VUMs (Variants Under Monitoring), variantes sob monitoramento, sendo elas caracterizadas por sofrerem mutações em regiões antigênicas conhecidas, porém, quando as evidências de seu impacto fenotípico e epidemiológico ainda não são claras. Desde maio de 2021 a OMS atualizou os nomes das variantes já existentes usando o alfabeto grego como referência para as novas classificações. Atualmente são conhecidas cinco VOCs sendo Alpha; inicialmente identificada no Reino Unido em setembro de 2020, Beta; identificada na África do Sul em maio do mesmo ano, Gama; identificada em Manaus em novembro de 2020, Delta, na Índia em outubro de 2020 e a mais recente Ômicron inicialmente identificada em novembro de 2021 na África do Sul.

O modo de transmissão já conhecido do vírus se dá pelo contato direto ou indireto em boca, nariz e olhos com secreções respiratórias de indivíduos contaminados através de algum mecanismo dispersor como a fala, tosse, espirros, coriza, contato direto com fluidos contaminados, dentre outros. A entrada do vírus em seu hospedeiro ocorre pela ligação do domínio de ligação do receptor (receptor-binding domain - RBD) da proteína Spike com a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE 2 - angiotensin-converting enzyme 2) presente nas células do hospedeiro, implicando em uma fusão de membrana e penetração do vírus. O receptor ACE2 é bem expresso em células epiteliais de órgãos humanos como pulmão, coração, fígado, rins e células endoteliais. Outros animais também possuem o ACE2 expresso em seus tecidos como os macacos, camundongos, gatos, bovinos e suínos, assim como, os que conhecidamente já estão associados à transmissão zoonótica de doenças respiratórias tais como as civetas, pangolins e galinhas (FRANCISCHETTI *et al.*, 2020; HABAS *et al.*, 2020; SUN, *et al.*, 2020). As infecções associadas aos Coronavírus humanos têm como característica principal atingir o trato respiratório, por vezes causando sintomas gripais gerais como febre, tosse, mal estar, congestão nasal, dentre outros, também podendo evoluir para quadro grave (OPAS, 2022). A Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) é caracterizada por um conjunto de sintomas respiratórios de maior severidade como a dispnéia, baixa

saturação de oxigênio (<95%), febre alta, mialgia, dentre outros. A SRAG, ou SARS (do inglês: Severe Acute Respiratory Syndrome) foi descrita pela primeira vez em uma epidemia com origem no sul da China onde houve a classificação do SARS-CoV-1, no ano de 2002 (STADLER *et al.*, 2003). Atualmente o mundo ultrapassa de 700 milhões de casos confirmados de COVID-19 com aproximadamente 7 milhões de óbitos (WHO, 2024) (Figura 2). No Brasil, até fevereiro de 2024, há um total aproximadamente 38 milhões de casos confirmados, com cerca de 710 mil óbitos (Coronavírus Brasil, 2024).

Mapa da COVID-19 no mundo

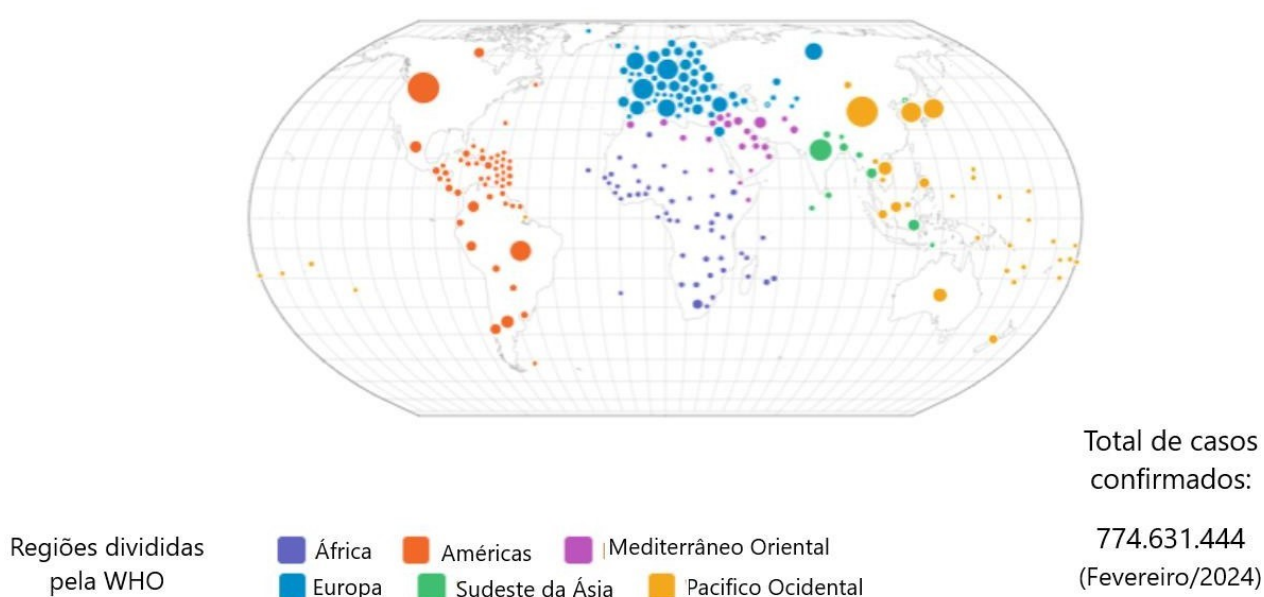


Figura 2 – Mapa da COVID-19 no mundo. Representados no mapa as regiões divididas pela Organização Mundial da Saúde com marcação da densidade de casos registrados. Os pontos sugerem as regiões com registros e sua respectiva densidade de casos. Atualmente no mundo cerca de 774 milhões de pessoas já foram contaminadas pelo vírus SARS-CoV-2 (Atualizado em fevereiro de 2024). Fonte: Adaptado de WHO.

1.1.2 Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento

Todas as medidas de prevenção para contenção de vírus respiratórios devem ser seguidas como o uso correto de máscaras cobrindo boca e nariz, distanciamento social, isolamento em casos detectáveis, higienização constante das mãos dentre outros (OPAS, 2022). Atualmente há no Brasil a distribuição de vacinas contra o SARS-CoV-2 já aprovadas

e/ou autorizadas para uso pela ANVISA. A nacional Coronavac (Butantan) que utiliza da tecnologia do vírus inativado, Oxford (Astrazeneca) e Jansen (Jansen-Cilag) elaboradas a partir de um vetor adenovírus recombinante e Corminaty (Pfizer/Wyeth) que usa a tecnologia do RNA mensageiro, assim como, as vacinas bivalentes aprovadas no segundo semestre do ano de 2023 pela ANVISA (Corminaty e Spikevax). A vacinação infantil já ocorre em crianças acima de seis meses e já está incluída no Calendário Nacional de Vacinação desde janeiro de 2024 (BRASIL, 2024).

O diagnóstico padrão-ouro da infecção por SARS-CoV-2 atualmente é o exame de RT-PCR preferencialmente realizado entre o terceiro e quinto dia após o início dos sintomas. Este método diagnóstico visa a detecção de regiões do genoma viral por amplificação do material genético, como as proteínas estruturais do vírus: S (spike), N (nucleocapsídeo) e E (envelope) e possui maior sensibilidade e especificidade para detecção de casos. Possuindo uma menor sensibilidade comparado ao exame de RT-PCR, o diagnóstico pela busca por antígenos virais por imunodiagnóstico, conhecidos como testes rápidos também são amplamente adotados, principalmente devido a sua celeridade e maior viabilidade de aplicação em laboratórios e farmácias. A adoção de técnicas sorológicas como ELISA e quimioluminescência para a detecção de anticorpos não são mais utilizadas como método diagnóstico, pois se desviam do período de infecção, e devido ao início da vacinação não possui mais a capacidade de rastreabilidade de casos (OPAS, 2021).

As formas de tratamento para a COVID-19 disponíveis atualmente no Brasil, todas sob prescrição médica, são as drogas anti-inflamatórias, que visam a diminuição de uma resposta inflamatória exacerbada e possível agravamento da doença, como o glicocorticóide Dexametasona (WHO, 2021) e o Baricitinib. Outra alternativa para o tratamento da doença são os medicamentos inibidores de proteases e de inibição da replicação viral como o Rendesivir, e mais recentemente o Paxlovid (Nirmatrelvir + Ritonavir) que possui uma autorização emergencial pela ANVISA (CONITEC, 2022).

1.1.3 Aspectos imunológicos da COVID-19

A resposta imune inata na infecção por SARS-CoV-2 é ativada a partir dos receptores do tipo Toll (TLR - Toll like receptor) presentes em células do sistema imune do hospedeiro como os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Receptores como TLR3 e TLR4 exercem papel crucial na sinalização para a produção de citocinas pró-inflamatórias em

infecções virais como IL-1, IL-6, INFs e TNF- α após o reconhecimento de PAMP's e/ou DAMP's (Padrão Molecular Associado a Patógenos / Padrão Molecular Associado ao Dano). No contexto da COVID-19, algumas citocinas já se encontram diferentemente reguladas de acordo com a severidade da doença, por exemplo, a baixa a produção de INF do tipo I em cerca de 10 dias após o início dos sintomas no plasma de pacientes em estado moderado, grave e crítico. (HADJADJ *et al.*, 2020) (Figura 3). Já é descrito que o SARS-CoV-2 possui algumas estratégias de evasão da imunidade primária sendo capaz de escapar do reconhecimento de sensores antivirais inatos, como a cascata de produção de IFN's do tipo I e III, através de suas próprias proteínas não estruturais como as Nsp's e proteínas acessórias como as ORF's (LOW *et al.*, 2022; RASHID *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2021). No ambiente da infecção, o intenso recrutamento de leucócitos e a super ativação do sistema imune inato podem levar a uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias conhecida como tempestade de citocinas ocasionando danos teciduais, como por exemplo nos quadros de injúria tecidual. Estudos sugerem que a IL-6, por exemplo, possui uma íntima relação com os casos mais graves da doença devido à presença elevada de macrófagos em tecidos atingidos, em alguns casos denominados como Síndrome da Ativação de Macrófagos (McGONAGLE *et al.* 2020; OKABYASHI *et al.* 2006; PARK, 2020). Contudo, a maior razão neutrófilos- linfócitos no sangue também está relacionada com um pior prognóstico da doença no período inicial da infecção (LIU *et al.* 2020). Os mecanismos de evasão do sistema imune do SARS- CoV-2 são muito eficientes, portanto, quanto maior o tempo para o sistema imune detectar o vírus maior pode ser o dano devido a sua rápida replicação no trato respiratório superior e outros tecidos (SETTE; CROTTY, 2021).

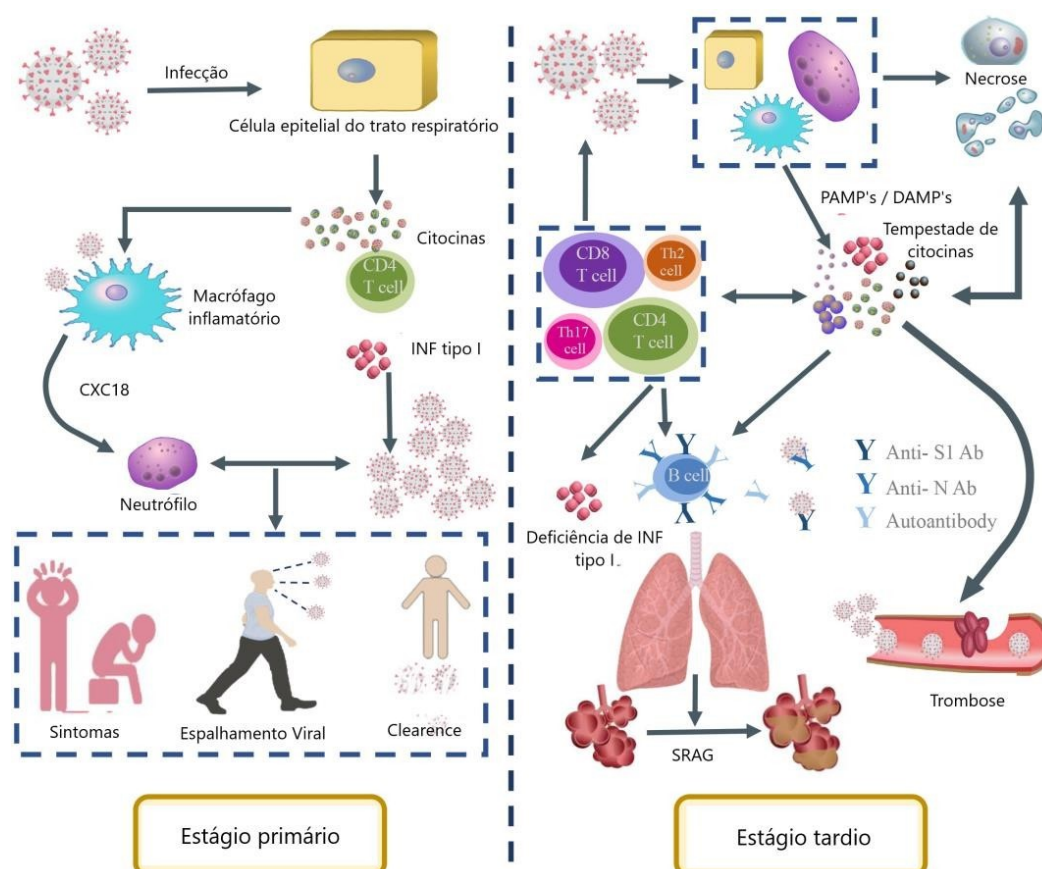


Figura 3 – Aspectos fisiopatológicos da infecção por SARS-CoV-2. No estágio primário da infecção por SARS-CoV-2, o vírus começa a replicar-se e a espalhar-se pelo trato respiratório superior. O hospedeiro inicia a resposta imune inata mediada por citocinas e interferons antivirais que inicia a resposta imune adaptativa. Nas fases iniciais, as pessoas infectadas apresentam sintomas de febre, mal-estar, tosse e produção de muco, aumentando o potencial de transmissibilidade. Se o hospedeiro conseguir ter uma boa resposta mediada por IFN nesta fase e uma regulação adequada da imunidade em relação à carga viral, a replicação viral seria interrompida e a eliminação viral será iniciada para limitar a gravidade da doença nesta fase. Estágio tardio: se o vírus não puder ser erradicado em tempo hábil, provavelmente devido a uma resposta inflamatória/interferon mediada por PAMP de forma tardia, a resposta imune muda para uma reação inflamatória inespecífica dominada pela sinalização de padrão molecular associado a danos (DAMP) originada das células hospedeiras infectadas por vírus danificadas ou disfuncionais. As células hospedeiras sofrem apoptose persistente, necrose ou piroptose que podem amplificar o dano tecidual. O ambiente inflamatório também desencadeia a expressão do fator tecidual ativado nas células endoteliais, macrófagos e neutrófilos, aumentando assim a ativação da cascata de coagulação nos pulmões, causando trombos microcirculatórios e SRAG e aumentando a gravidade e a mortalidade da doença. Fonte: Adaptado de Zhu *et al.* 2023.

Na resposta imune adaptativa os achados sugerem o forte papel imunossupressor de SARS-CoV-2 a partir da avaliação da contagem de linfócitos que se torna muito reduzida em indivíduos com COVID-19 em estado grave, afetando, por exemplo, a resposta imune

humoral que se torna incapaz de neutralizar o vírus (HUANG *et al.*, 2020). O marcador PD-1 (proteína de morte celular programada em linfócitos T) também se torna mais expresso em indivíduos com COVID-19 grave revelando o processo de exaustão do sistema imune (PACES *et al.*, 2020). Além disso, durante a fase crítica de COVID-19, foi encontrado elevada frequência de células T reguladoras (Tregs) PD1⁺, no pulmão de pacientes com COVID-19 grave que não sobrevivem, caracterizando Tregs disfuncionais (GONÇALVES- PEREIRA *et al.*, 2023). As células T CD4 encontram-se mais presentes em indivíduos em fase aguda e possui uma correlação negativa com a severidade da doença podendo indicar seu forte papel modulador destacando a importância de Th1 no recrutamento de células do sistema imune inato para o local da infecção e a produção de citocinas como IFN- γ , assim como, ativação de células B de memória (BRAUN *et al.*, 2020). O receptor de quimioquina CCR6⁺ expresso em células T CD4 é associado à migração destas células para tecido mucoso, sendo a produção de IL-22 por T CD4 nestes tecidos, relacionada ao reparo tecidual, reforçando no contexto da COVID-19, a importância de T CD4 na proteção ao dano pulmonar (MODERBACHER *et al.*, 2020; SETTE; CROTTY, 2021). A presença de células T CD8 encontradas em indivíduos em fase aguda também está associada a um melhor prognóstico da doença observada a sua capacidade de identificar muitos antígenos de SARS-CoV-2 como a proteína do nucleocapsídeo, membrana e Spike (SEKINE *et al.*, 2020; SETTE; CROTTY, 2021). Com relação aos títulos de anticorpos em indivíduos infectados com SARS-CoV-2, na ausência de imunização vacinal, alguns estudos revelaram altos níveis de soroconversão após aproximadamente o décimo dia de início de sintomas, sugerindo também uma correlação positiva entre o aumento da carga viral e os títulos de anticorpos encontrados (AMANAT *et al.*, 2020; LONG *et al.*, 2020; ROBBIANI *et al.*, 2020). Anticorpos IgG anti-RBD (Spike) e anti-proteína N (nucleocapsídeo) são os mais comumente encontrados em indivíduos infectados (SETTE; CROTTY, 2021). A vacinação contra COVID-19 mostrou-se eficaz na redução de casos e da severidade da doença (PAHO, 2022). Segundo Tang J. *et al.* (2022), a vacinação com imunizantes de mRNA mostrou, *in vivo*, menores níveis de anticorpos neutralizantes em lavados broncoalveolares, porém maiores níveis em circulação no sangue. Houve o aumento de células B e T de memória em circulação comparada a indivíduos convalescentes revelando que a vacinação tem importância significativa no contexto de uma infecção primária. Achados também reforçam a persistência e aumento de células B de memória até nove meses após vacinação com vacinas de mRNA (TERRERI *et al.*, 2022).

Mulheres e homens tendem a desenvolver respostas diferenciadas pela imunidade inata e adaptativa, sendo os homens considerados mais susceptíveis a desenvolverem casos

mais graves da doença. Agrawal *et al.* (2021) associam a diferença de gênero na severidade da COVID-19 aos níveis de CXCL-10 encontrados na população masculina em resposta ao INF- γ , assim como, a maior quantidade de linfócitos T citotóxicos encontradas em PBMC's de mulheres. O hormônio sexual feminino, estradiol, também sugere relação positiva com os níveis de INF's do tipo I, essencial citocina anti-viral (PECKHAM *et al.*, 2020). Sabe-se atualmente que a idade também se classifica como fator de risco, sendo a população idosa mais propensa a desenvolver o estado grave da doença. Em idosos atribui-se a menor quantidade de células T CD4⁺ imaturas circulantes ao risco de agravamento do estado de saúde (MODERBACHER *et al.*, 2020). Pessoas mais jovens e crianças por sua vez detêm uma maior quantidade de células T CD4 e apresentam resposta mais rápida. Todavia, em crianças menores de treze anos há relatos de casos do desenvolvimento da Síndrome Inflamatória Multissistêmica Pediátrica (SIM-P) após diagnóstico de infecção pelo SARS-CoV-2, caracterizada por sintomas muito similares à doença de Kawasaki, como rash cutâneo, inchaço, conjuntivite, linfadenopatias e danos cardíacos (WHO, 2021). Consiglio *et al.* (2020) demonstraram uma relação entre o desenvolvimento da síndrome com a baixa contagem de linfócitos T CD4⁺, assim como, a presença de autoanticorpos, sendo portanto, administrados nos casos de SIM-P a imunoglobulina intravenosa e corticosteróides.

Ao longo dos anos em que vivenciamos a pandemia de COVID-19 no mundo, alguns achados clínicos e laboratoriais evidenciaram o surgimento de complicações de médio a longo prazo na saúde de pessoas infectadas, logo, a COVID longa é um termo recentemente usado para designar tais eventos. A COVID longa pode ser caracterizada pela persistência de alguns sintomas derivados da infecção pelo SARS-CoV-2 no período acima de 12 semanas, tais como, fadiga, sudorese, falta de ar sem esforço físico demais, sintomas neurológicos como a dor de cabeça, depressão e ansiedade, sintomas sistêmicos como desconforto abdominal, quadros de diarreia, mialgia, artralgia, rash cutâneo, urticária, dentre outros (YONG, 2021; ZHANG, *et al.*, 2023). Alguns estudos demonstram que a COVID longa pode estar associada à presença de autoanticorpos, maiores níveis de INF's circulantes meses após infecção e a super ativação de células do sistema imune inato com a baixa contagem de linfócitos T e B naive (PALMON *et al.*, 2022; PLASSMEYER *et al.*, 2022). Segundo Liew *et al.* (2023), assinaturas proteômicas dos achados na COVID longa também têm ajudado a esclarecer os quadros encontrados dentre os subtipos de sintomas (Figura 4). As células dendríticas possuem também um importante papel na resolução do quadro de COVID longa estando relacionada com a efetividade do clearance viral, sendo sua diminuição relacionada a uma inflamação mais persistente e duradoura (ZHANG, *et al.*, 2023).

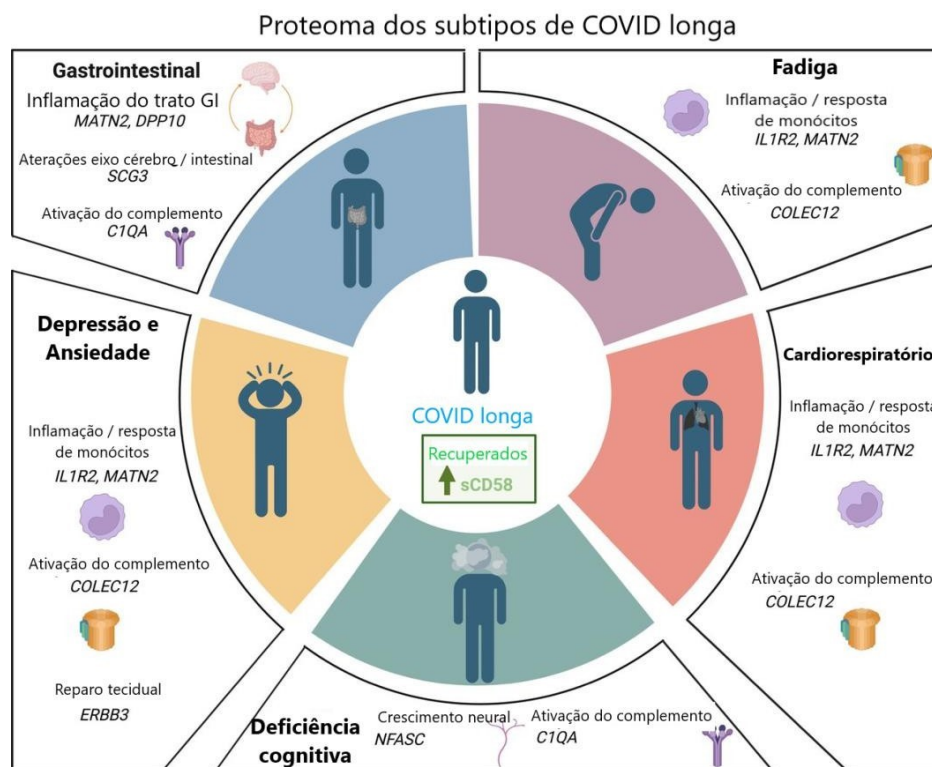


Figura 4 – Proteínas envolvidas nos subtipos de COVID longa. A COVID longa possui subtipos identificados ao longo de pesquisas realizadas em indivíduos com sintomas persistentes, geralmente após a 12ª semana de infecção. Alguns destes sintomas podem ser neurológicos, gastrointestinais e cardiorrespiratórios. Algumas proteínas estão intrinsecamente relacionadas a tais sintomatologias descritas por indivíduos pós infecção. Fonte: Adaptado de Liew *et al.* 2023.

1.2 Células Dendríticas

As células dendríticas (DC's – dendritic cells) fazem parte da imunidade inata e são um dos tipos de células apresentadoras de antígenos profissionais (APC's - antigens- presenting cells) presentes em nosso sistema imunológico, assim como, macrófagos e linfócitos B. São responsáveis pela sinalização de linfócitos T e ótimas ativadoras de células T imaturas (Figura 5). As DC's se subdividem em dois tipos: convencionais (cDC's) e plasmocitóides (pDC's) a depender de onde estão situadas (LIU; NUSSENZWEIG, 2010). As cDC's se subdividem em DC's migratórias, residentes de tecidos linfóides e derivada de monócitos (mo-DC's). DC's migratórias se originam de tecidos subcutâneos como derme e submucosa migrando aos linfonodos pela via linfática aferente, já as residentes de tecido

linfóide são encontradas em órgãos como timo e baço, assim como os linfonodos, e por fim, as mo-DC's são diferenciadas sob condições inflamatórias. O marcador CD8 alfa, presente em cDC's, tem sido associado à maquinaria de apresentação cruzada de antígenos (ALLAN *et al.*, 2003). As pDC's são encontradas circulando no plasma e conhecidamente produtoras de IFN-alfa durante infecções virais, onde penetram em tecidos linfóides pelo sangue, sendo também fenotipicamente imaturas quando em estado de não infecção e consideradas pouco estimuladoras diretas de linfócitos T (BELZ *et al.*, 2009; STEINMAN; HEMMI, 2006).

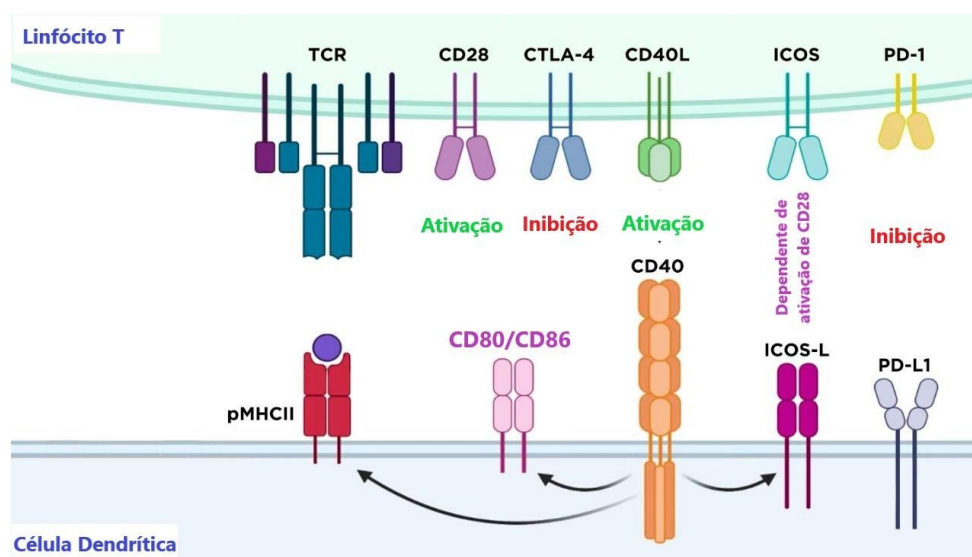


Figura 5 – Ligantes de células dendríticas e linfócitos T. A ativação e inibição de linfócitos T são mediados por moléculas coestimulatórias ou reguladoras, respectivamente. Após o primeiro sinal de ativação, desencadeado por apresentação antigênica via MHC-II ao TCR, o segundo sinal é desencadeado pela ligação de CD80/CD86 ao receptor CD28 do linfócito, assim como, CD40 em CD40L no caso de modulação positiva ou de ativação. A modulação negativa/imunossupressora/reguladora ocorre no caso de interação entre CD80/86 ou PD- L1 aos respectivos receptores CTLA-4 ou PD-1 nos linfócitos. Fonte: Adaptado de Imagens BioRender.

A maquinaria de apresentação antigênica se inicia com o processamento do antígeno pelas DC's e logo em seguida, a formação do complexo peptídeo / MHC (do inglês: *major histocompatibility complex*) ou HLA em humanos (do inglês: *human leukocyte antigen*) gerado no retículo endoplasmático e levado até a superfície celular. Ao migrar para regiões que abrigam linfócitos como os linfonodos, os peptídeos apresentados no MHC das DCs são reconhecidos pelo receptor e células T (TCR) dos linfócitos e desencadeiam o início da sinalização. Este primeiro processo de apresentação de antígeno, mediado por MHC + peptídeo interagindo com o TCR é chamado de sinal 1 de ativação. O sinal 2 promove a sobrevivência dos linfócitos T e ocorre a partir da interação entre as moléculas co-

estimulatórias presentes na superfície das DCs (e outras APCs) e linfócitos T (Figura 5) (ANDERSON e SIAHAAN, 2003). São reconhecidos como sinais positivos, aqueles que estimulam a ativação dos linfócitos a partir de sua ligação, como por exemplo, a ligação de moléculas membros da família B7 (CD80 e CD86 respectivamente) em DC's, com o CD28 expresso nos linfócitos, assim como CD40 e CD40L, que desencadeia a produção de algumas citocinas inflamatórias em APC's como IL-1, IL-6, IL-12, INF e TNF, sendo este o sinal 3, que promovem a diferenciação dos linfócitos T ativados. A ligação ICOS-L em ICOS também ativa a produção de citocinas como IL-5, IL-4 e a função efetora de células T, auxiliando também na formação de células T de memória (MARINELLI *et al.*, 2018). Portanto, as moléculas co-estimulatórias são peças chave no processo imunológico devido a tais interações e o terceiro sinal ocorre para melhor direcionamento do tipo de resposta de linfócitos T.

Sinais negativos são reconhecidos por inibir a ativação do linfócito, como por exemplo, a ligação de CD80/86 de células dendríticas com a molécula CTLA-4 (do inglês: *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) expressa em linfócitos, desencadeando um sinal de regulação nestas células, suprimindo a resposta inflamatória. CTLA-4 possui uma maior afinidade com o receptor CD80 em APC's do que CD28, sendo um mecanismo importante de manutenção da homeostase, impedindo respostas descontroladas dos linfócitos T (VAN COILLIE *et al.*, 2020). CTLA-4 é considerada uma molécula de checkpoint imunológico, assim como PD-1 e atuam como reguladores da resposta imunológica. A molécula PD-L1 (ligante de PD-1) em células dendríticas é um marcador co-inibitório pois, devido à sua ligação com PD-1, expresso em linfócitos, leva ao desenvolvimento da tolerância imunológica, prevenindo uma resposta imune excessiva que pode levar a destruição tecidual. Por outro lado, a expressão de PD-1 em linfócitos T CD8⁺ está associado a um fenótipo de exaustão e senescência linfocítica muito observado em infecções crônicas ou câncer (KURACHI, 2019; SARESELLA *et al.*, 2012).

No caso de haver somente o sinal 1 de ativação, com a ausência dos sinais subsequentes, os linfócitos T assumem o papel de tolerância que pode ser motivado por células dendríticas que tenham sofrido algum tipo de deleção em seus receptores co-estimulatórios, como também, induzidas a um fenótipo regulador (TAI *et al.*, 2018). Células dendríticas reguladoras podem ser induzidas através da presença citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGFβ, assim como, vitamina D3 e corticosteroides. As DC's tolerogênicas ou reguladoras podem desencadear uma anergia do sistema imune adaptativo levando também a redução da proliferação de linfócitos T (MORANTE-PALACIOS *et al.*, 2021).

Diversos estudos têm sido conduzidos com mo-DC's para variados fins, desde avaliar os aspectos imunológicos de determinadas patologias, como também, o uso destas células com viés terapêutico, como no contexto de imunização (DHODAPKAR *et al.*, 1999; GOLDSZMID *et al.*, 2012; SATO *et al.*, 2002). Alguns métodos são atualmente utilizados para obtenção de monócitos objetivando sua diferenciação em células dendríticas *in vitro*, como a separação de PBMC's por gradiente de Ficoll e separação dos monócitos por adesão a superfície de frascos de cultivo mantidos em estufa de CO₂. Outros métodos utilizados são as beads magnéticas com marcadores específicos de monócitos (CD14, CD16), ou sorteamento de monócitos após obtenção das PBMCs por citometria de fluxo. A diferenciação *in vitro* de monócitos em células dendríticas se torna viável por meio de protocolos que estabelecem o uso de algumas citocinas como IL-4 e GM-CSF. Sallusto e Lanzavecchia (1994) criaram um protocolo largamente difundido com o uso de tais citocinas resultando em DC's com um fenótipo imaturo apresentando sub expressão de CD14, e maiores expressões de CD11c, ICAM-1 e DC-SIGN e habilidade de estímulo de linfócitos T. Outros protocolos também são usados para diferenciação de monócitos em DC's como Sanarico *et al.* (2006) com o uso de IL-4, GM-CSF e IL-2 demonstrando, como no protocolo de Sallusto e Lanzavecchia, sub expressão de CD14. Xie *et al.* (2005) mostraram que as citocinas usadas no processo de diferenciação, como IL-4 e GM-CSF induzem a ativação das vias de sinalização Raf/MEK/ERK assim como P13K/AKT que levam a via NF- κ B. Estes sinais após ativados, regulam e promovem a diferenciação e sobrevivência das mo-DC's imaturas. De acordo com o trabalho de Tang-Huau, Segura (2019), fatores de transcrição são ativados em mo-DC's que diferenciam sua assinatura de macrófagos derivados de monócitos e são responsáveis pela mudança de fenótipo celular, como as vias BLIMP-1, IRF4 e AHR. Após diferenciação, há a necessidade de estímulo para maturação dessas células, feito em geral com o uso de LPS (lipopolisacarídeo), onde haverá maior expressão de CD80, CD86, CD40, HLA-DR, dentre outros marcadores, evidenciando a maior capacidade estimulatória após maturação. A maturação das mo-DC's reflete uma série de mudanças fenotípicas onde além da alteração do padrão de marcadores de superfície celular, ocorre também o aumento da motilidade destas células e perda de sua capacidade de adesão, facilitando o processo estimulatório (CECHIM; CHIES, 2019; DALOD *et al.*, 2014). Todos os procedimentos para o isolamento de monócitos *in vitro* podem ter impacto na diferenciação em mo-DC's e ter relação com diferentes padrões de produção de citocinas e interação com linfócitos T. Ainda em estudos funcionais com mo-DC's, a depender dos diferentes estímulos pode-se gerar fenótipos celulares com potencial imunogênico ou tolerogênico. Sendo assim, com o reconhecimento dos PAMP's, estas células

tendem a ativação de um fenótipo imunogênico e a eficaz ativação de células T, do mesmo modo, sob a presença de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 no microambiente, assim como, o contato com células apoptóticas, podem levar à sua tolerância e induzir anergia de linfócitos T. (ELKORD *et al.*, 2005; SATO *et al.*, 2002; STEINMAN, *et al.*, 2000).

Em infecções virais, as células dendríticas desempenham uma ação antiviral importante devido a sua função de apresentação antigênica direta e capacidade aumentada de estímulo de linfócitos T imaturos. No contexto da COVID-19, Borchering *et al.* (2021) demonstraram que as DC's têm a sua eficácia de apresentação antigênica diminuída em pacientes que sofreram dano alveolar difuso em decorrência da infecção por SARS-CoV-2 devido a maturação prejudicada destas células e a dificuldade de migração aos linfonodos. Pesce *et al.* (2021) demonstraram um potencial mecanismo alternativo de apresentação antigênica indireta com a evidência de que vesículas extracelulares (VEs) derivadas de DC's de pacientes infectados com SARS-CoV-2 apresentaram em seu conteúdo a proteína Spike do vírus, assim como, marcadores de suas células de origem, como HLA-DR e CD86, levando a entender que os exossomos destes pacientes também assumem neste contexto uma função de veículo apresentador de antígeno. Neste mesmo trabalho, constatou-se *in vitro* a indução de ativação de linfócitos T CD4⁺ por exossomos de pacientes com sintomas leves da COVID-19. *In vivo*, as mo-DC's se apresentam em estado inflamatório e se colocam em áreas específicas de células T (CHEONG *et al.*, 2010).

1.3 Vesículas Extracelulares (VEs)

As vesículas extracelulares (VEs) têm sido foco de muitos estudos nos últimos anos devido à suas diversas aplicações como biomarcadores de prognósticos, seu potencial terapêutico e uso em vacinas e tecnologias de *drug delivery*, dentre outros. De acordo com a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares em seu último guideline publicado em 2023 (MISEV 2023), as vesículas extracelulares se definem como partículas liberadas das células, delimitadas por uma membrana com bicamada lipídica, incapaz de realizar autorreplicação. Estas partículas podem ser liberadas de forma natural ou induzidas por diversos estímulos, como na presença de determinadas patologias. As VEs podem carrear diversas moléculas, peptídeos, material genético, dentre outros de sua célula de origem e são capazes de penetrar em células alvo, dispensando seu conteúdo, sendo cruciais na

comunicação intercelular. As VEs já são encontradas nos mais diversos tipos de fluidos corporais como sangue, plasma, saliva, sêmem, urina, leite materno, dentre outros (ALBERRO *et al.*, 2021; ARRAUD *et al.*, 2014; CHUTIPONGTANATE *et al.*, 2022; FOOT; KUMAR, 2021; KARPMAN *et al.*, 2017; ZHAN *et al.*, 2020).

No contexto das doenças, as VEs podem exercer diferentes papéis devido ao seu comportamento e capacidade de sinalização, se tornando um importante mecanismo nas respostas contra infecções, doenças tumorais, respiratórias e endoteliais, atuando principalmente na modulação imunológica. Na infecção pelo SARS-CoV-2, por exemplo, as VEs são capazes de mediar o transporte viral célula-célula e inibir a resposta a anticorpos neutralizantes (XIA *et al.*, 2023). Na infecção pelo vírus ZIKA as VEs são encontradas carreando a proteína viral E, e estabelecendo resposta de anticorpos neutralizantes (ZHAO *et al.*, 2023). No contexto do HIV, as VEs podem expressar moléculas CD4 em sua superfície que interagem com o vírus e dificulta sua interação com as células alvo (DIAS *et al.*, 2018). Em tumores, por exemplo, as VEs derivadas de células T reguladoras podem suprimir a atividade células T CD4⁺ e CD8⁺ através de miRNA's presentes em seu conteúdo como uma estratégia de evasão do sistema imune (MARAR *et al.*, 2021). Segundo revisão feita por Xie *et al.* (2022), exossomos derivados de células tumorais desempenham papel imunossupressor em várias células do sistema imune. Em células dendríticas, há a inibição de sua diferenciação e maturação na presença das vesículas de tumor, bem como, estas vesículas também estiveram associadas a atenuação de moléculas co-estimulatórias em DC's e aumento de citocinas inibitórias como TGFβ and PGE2. Em doenças respiratórias as VEs têm demonstrado seu importante papel na imunomodulação como na fibrose pulmonar idiopática, conforme mostrado por Makiguchi *et al.* (2016), que evidenciaram a presença de marcadores como o miRNA 21-5p derivado de exossomos, como preditor de mortalidade. A formação e liberação de VEs induzidas pela hipóxia em tecido pulmonar podem estimular macrófagos alveolares a expressarem as citocinas inflamatórias IL-6 e TNFα promovendo resposta inflamatória durante a injúria pulmonar na síndrome do desconforto respiratório agudo (MOON *et al.*, 2015). Em doenças endoteliais e síndrome coronária aguda já se é estabelecido que há o aumento de micropartículas (que englobam microvesículas e ectossomos) na circulação de pessoas acometidas com a doença (Yamada, 2021). Estes estudos evidenciam o importante papel das VEs em diversos mecanismos fisiopatológicos e imunológicos.

1.3.1 Exossomos

Os exossomos são um dos tipos de vesículas extracelulares (VEs) que possuem membrana com bicamada lipídica e se originam nos endossomos dentro de diversos tipos celulares. Possuem um tamanho que pode variar de aproximadamente 30 a 150 nm. Além dos exossomos, o grupo de VEs abriga as microvesículas e corpos apoptóticos. Os exossomos se formam a partir dos corpos multivesiculares nas células dentro dos endossomos primários e podem carregar diversos conteúdos de sua célula de origem como, por exemplo, proteínas, RNA's bioativos (mRNA, miRNA) e lipídeos, assim como, são capazes de levar tais conteúdos de uma célula a outra, sendo atualmente consideradas fundamentais no papel de comunicação intercelular (Figura 6) (VALADI *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2019). O processo de origem e as funções dos exossomos os diferenciam das microvesículas e dos corpos apoptóticos. O Complexo de Classificação Endossomal Necessário para Transporte (ESCRT) é uma maquinaria celular formada por uma seleção de quatro principais proteínas (ESCRT-0, I, II, III) que em associação com outras proteínas acessórias desempenham funções como o controle das proteínas presentes na membrana plasmática, a biogênese de vesículas intraluminais, dos corpos multivesiculares, lisossomos, como também, dos exossomos. O complexo ESCRT não é a única via responsável pela biogênese dos exossomos, sendo também encontrados corpos multivesiculares (MVB – multivesicular bodies) em células sem proteínas do complexo, o que sugere uma via alternativa que pouco se conhece. Podem ocorrer simultaneamente formações de MVB's dependentes e independentes da maquinaria ESCRT (STUFFERS *et al.*, 2009). As tetraspaninas são proteínas comumente encontradas na superfície dos exossomos, como CD9, CD63 e CD81 e estão envolvidas na formação e liberação de exossomos a partir da origem dos corpos multivesiculares nos endossomos. A seleção de tais marcadores de superfície ocorre através da invaginação das vesículas no momento de sua formação dentro dos MVB's (HESSVIK; LLORENTE, 2018).

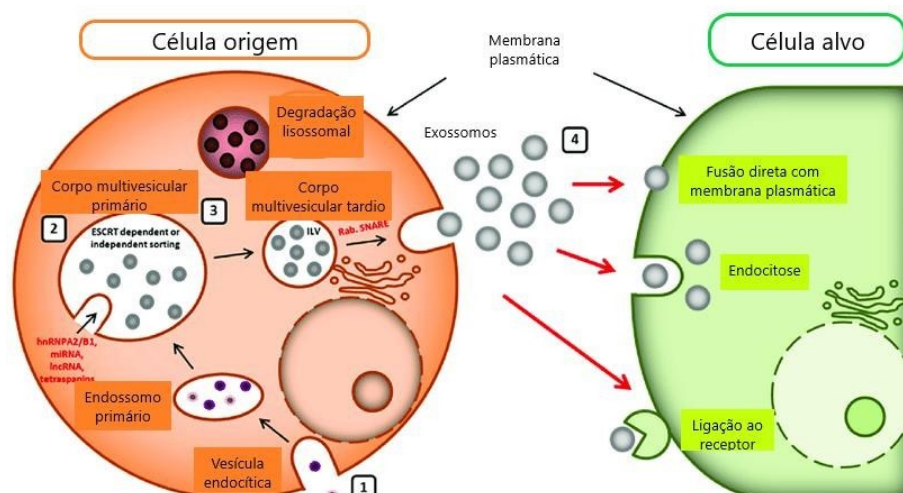


Figura 6 – Biogênese dos exossomos e interação celular. Os exossomos são um dos tipos de VEs e formam um importante mecanismo de comunicação intercelular devido a sua estrutura e origem. São capazes de carrear diversos tipos de moléculas como RNA's bioativos (miRNA's, siRNA's), lipídeos, proteínas, dentre outras e podem se conectar às células alvo de forma facilitada como fusão, endocitose ou ligação direta por receptores. Fonte: Adaptado de Tiwari *et al.*, 2021.

1.3.2 Microvesículas

As microvesículas compreendem um subtipo de VEs que atualmente se classificam no grupo dos ectossomos (microvesículas e micropartículas) (WELSH *et al.* 2024) e se derivam diretamente do brotamento externo da membrana plasmática (Figura 7). Também possuem bicamada lipídica e seu tamanho pode se sobrepor aos exossomos apresentando aproximadamente 150 nm a 1000 nm (WILLMS *et al.*, 2016). Sua geração e liberação da célula de origem se dá através de rearranjos do citoesqueleto que induzem a membrana plasmática a se dobrar e liberar esta vesícula. As microvesículas também são descritas no processo de comunicação intercelular e aplicadas a diversos campos, principalmente sua influência no câncer e na inflamação (ASHOUB *et al.*, 2024; GIDARO *et al.*, 2023; JEPPESEN *et al.*, 2023 PEDERSEN *et al.*, 2022).

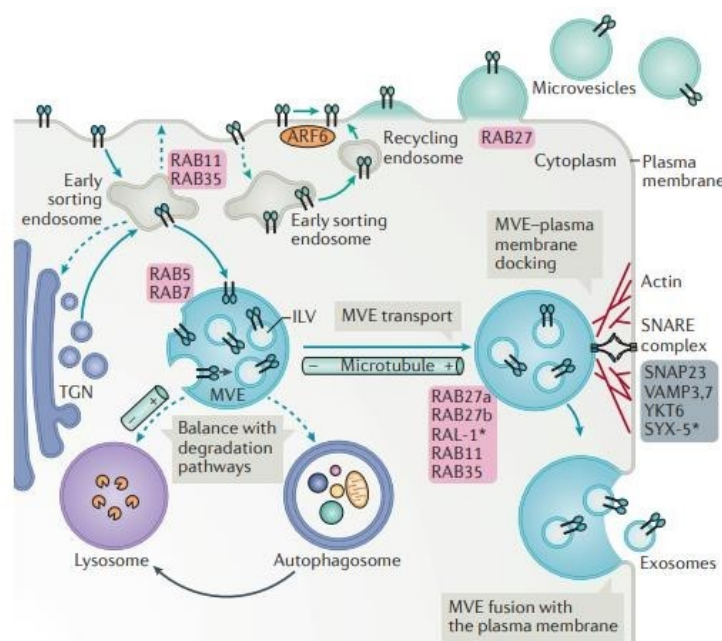


Figura 7- Rotas de formação das vesículas extracelulares. Exossomos e microvesículas possuem diferentes origens nas células. Diversas proteínas, como as da família das RAB's e filamentos de actina estão envolvidas no processo de formação e endereçamento das vesículas, assim como, sua liberação. Imagem de VAN NIEL *et al.*, 2018.

De acordo com a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV – International Society of Intracellular Vesicles), ao se trabalhar com tais vesículas, uma série de requisitos mínimos para análises devem ser levados em consideração, desde variáveis pré-analíticas para sua obtenção, seu isolamento na amostra biológica até a sua caracterização. As recomendações do ISEV também prevê o uso do no mínimo três técnicas para validar a etapa de caracterização, como usadas no presente trabalho. Existem diferentes técnicas que podem ser aplicadas para a separação/isolamento das VEs em tecidos ou fluidos biológicos que variam de métodos de baixa especificidade, como os kits de precipitação e centrifugação sem etapa adicional de separação, a alta especificidade, como por exemplo, filtração combinada com outro método para descarte de outros componentes presentes no material, como a ultracentrifugação (THÉRY *et al.*, 2018). Antes da etapa de caracterização, as amostras obtidas pelo método de isolamento escolhido, devem passar por uma etapa de quantificação total de proteínas. Na caracterização geral, pelo menos três marcadores proteicos devem ser encontrados, assim como, um marcador negativo para VEs, como no uso da técnica de Western Blot, por exemplo. Seguindo na etapa de caracterização, deve-se usar técnicas aprofundadas de imagem para visualização de tamanho, distribuição e concentração destas

vesículas como a microscopia eletrônica e a análise de rastreamento de nanopartículas (NTA – Nanoparticle tracking analysis) (THÉRY *et al.*, 2018).

Atualmente uma gama de estudos demonstram o papel dos exossomos na patogênese de determinadas doenças como câncer e infecções virais (ANDERSON; KASHANCHI; JACOBSON, 2016; JU *et al.*, 2021; KALLURI *et al.*, 2016). Na infecção por COVID-19, alguns estudos já demonstram o papel dos exossomos no espalhamento viral, no carregamento de partículas, RNA's e proteínas virais, como também na apresentação de antígenos, onde os exossomos de pacientes infectados por SARS-CoV-2 apresentaram maiores níveis de MHC-II (PESCE *et al.*, 2021). Análises proteômicas visando avaliar a carga exossomal de pacientes infectados por SARS-CoV-2 também já revelaram a ligação de diversas proteínas encontradas com a atividade do sistema complemento, ativação da coagulação e atividade de transporte, funções muito importantes na fisiopatologia da COVID-19 (BARBERIS *et al.*, 2021; GAMBARDILLA *et al.*, 2020; PESCE *et al.*, 2021).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar aspectos de ativação e de imunorregulação fenotípica e funcional de vesículas extracelulares (VEs) derivadas de pacientes com COVID-19 sobre células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DCs).

2.2 Objetivos específicos

- Isolar vesículas extracelulares a partir de plasma de pacientes com COVID-19, com Síndrome Respiratória (SRAG) (RT-PCR negativo para Covid-19) e de doadores saudáveis (grupo controle);
- Quantificar e caracterizar as vesículas extracelulares purificadas a partir do plasma de pacientes (COVID-19 e SRAG) e de doadores saudáveis por análise de rastreamento de nanopartículas, western blot e microscopia eletrônica de transmissão;

- Avaliar e comparar o fenótipo de mo-DC's de doador saudável, diferenciadas in vitro, após tratamento com VEs de pacientes com COVID-19 (DC/VE COV), SRAG (DC/VE SRAG) ou grupo controle (DC/VE CTRL);
- Avaliar o perfil de ativação dos Linfócitos T através de uma reação leucocitária mista (MLR) em co-cultivo com as mo-DC's após expostas às VEs de pacientes com COVID-19, SRAG e doadores saudáveis.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Descrição da população de estudo

Os pacientes participantes do estudo foram selecionados previamente no Hospital da Baleia, situado em Belo Horizonte, Minas Gerais, durante os anos 2020 e 2021, dos quais foram obtidas amostras de sangue venoso para as análises. O presente estudo está aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), Projeto CAAE N° 30428720.3.0000.5091, conforme parecer 3.979.661. Foi preenchida uma ficha clínica para cada paciente, após esclarecimento acerca dos objetivos do estudo, leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os prontuários dos pacientes selecionados foram analisados para obtenção de dados clínico-laboratoriais. O grupo controle foi constituído de indivíduos adultos saudáveis que tiveram as amostras de sangue coletadas na Faculdade de Farmácia da UFMG no ano de 2018, portanto negativos para COVID-19.

3.1.1 Critérios de Inclusão e Exclusão nos Grupos

a) Grupo de Pacientes

Critérios de inclusão

Foram selecionados pacientes com idade superior a 18 anos com diagnóstico confirmado de COVID-19 por RT-qPCR e pacientes classificados com Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) que tiveram exame RT-qPCR negativo para SARS-CoV-2. Os pacientes infectados por SARS-CoV-2 foram classificados como COVID-19 moderado/grave e selecionados na ala classificada como “COVID” do hospital, sob internação, incluindo

indivíduos que obtiveram alta após tratamento, assim como, óbitos em decorrência de complicações associadas à doença.

b) Grupo Controle

Critérios de inclusão

Fizeram parte do grupo controle indivíduos saudáveis, adultos, pareados por idade e sexo, coletados anteriormente ao início da pandemia de COVID-19 na Faculdade de Farmácia, UFMG.

Critérios de exclusão

Foram excluídos indivíduos com comorbidades, como neoplasias, doença renal ou hepática crônica e doenças autoimunes.

3.1.2 Amostras de sangue periférico

As amostras de sangue periférico de pacientes com COVID-19 e SRAG foram coletadas pela equipe médica do hospital por punção venosa em tubos de 9 ml contendo anticoagulante ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA), obedecendo normas de segurança. As amostras de sangue periférico de doadores saudáveis também foram coletadas em tubos de 9 ml contendo anticoagulante ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA), obedecendo normas de segurança. No laboratório, as amostras foram centrifugadas a 1200 g por 20 minutos para obtenção do plasma, que foi estocado em freezer a -80 °C para posterior obtenção das VEs.

Para a obtenção de monócitos para diferenciação em DC's avaliadas neste trabalho, foi coletado aproximadamente 100 ml de sangue periférico de doador saudável, do sexo masculino, 36 anos. A coleta foi realizada em tubos de heparina de 9 ml para separação e recuperação de PBMC's por centrifugação. A coleta e processamento foram realizados no laboratório de Imunoparasitologia, do departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

3.2 Vesículas Extracelulares

3.2.1 Isolamento e quantificação de Vesículas Extracelulares

As VEs foram isoladas a partir do plasma de doadores dos grupos COVID-19, SRAG e grupo controle individualmente em um volume de 100 microlitros diluídos 10X em PBS 1X estéril. Para obtenção de VEs a partir do plasma com o enriquecimento de pequenas vesículas (< 200 nm), foram utilizadas diferentes etapas de centrifugação de acordo com adaptação do protocolo de Théry *et al.*, 2006. Resumidamente, o plasma foi descongelado, em seguida foi submetido a uma centrifugação de 17.000g por 45 minutos, 4°C para sedimentação e eliminação de complexos proteicos e microvesículas. Em seguida, o sobrenadante foi submetido à ultracentrifugação a 100.000 g por 70 minutos, 4°C, em rotor de ângulo fixo (Beckman Coulter). O pellet obtido dessa primeira ultracentrifugação foi ressuscitado em 1 ml de PBS estéril (Phosphate Buffered Saline) e novamente ultracentrifugado a 100.000 g por 70 minutos, 4°C, para obtenção do pellet contendo VEs de pequeno tamanho. Ao final da ultracentrifugação, o pellet foi ressuscitado em 500 µL de PBS estéril, adicionado em microtubos com membrana de 0,22 µm (COSTAR®SPIN-X, Sigma) e centrifugados a 8.000 g por 5 minutos, para serem filtrados e reter de possíveis microvesículas indesejadas com tamanho superior a 220 nm e maior pureza do material a ser utilizado nos ensaios biológicos.

Após a recuperação do filtrado em aproximadamente 500 µl de PBS 1x estéril, uma alíquota de cerca 30 µl da suspensão contendo as VEs foi utilizada para quantificação de proteínas pelo ensaio com ácido bicinconínico - BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific®), seguindo as recomendações do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada a 562 nm em espectrofotômetro (Versa Max, Molecular Devices). O restante da suspensão de VEs foi estocado a -80°C (Cold Lab).

3.2.2 Caracterização de vesículas extracelulares

3.2.2.1 Western Blot

O método de Western Blot foi utilizado visando a identificação da proteína tetraspanina CD9 (24 kDa), relacionada à biogênese dos exossomos, e o marcador TSG 101

(45 kDa), uma proteína citosólica relacionada à formação dos corpos multivesiculares. Foi realizado um pool de VEs de cada condição experimental (COVID-19, SRAG e grupo controle) para que se sucedessem as análises de Western Blot. Aproximadamente 50µl de suspensão de VEs foram lisadas para obtenção do extrato protéico com 50µL de solução de lise (0,5% p/v de NP-40, 100mM de Tris/HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,2 mM de EDTA, 1mM de NaVO₃, 1mM de DTT, 1mM de PMSF, 200mM de NaCl, 25 mM de NaF, leupeptina e aprotinina) e deixadas em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 12.000 rpm em microcentrífuga (TermoFisher – 175 mm de diâmetro) por 15 minutos a 4°C e armazenado à -20°C até o momento do uso. Após lise, as proteínas totais das VEs foram quantificadas utilizando o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) de acordo com as normas do fabricante. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) no comprimento de onda de 595nm. As absorbâncias das amostras foram comparadas com as absorbâncias das curvas padrão construídas e as concentrações dos extratos foram calculadas e expressas em mg/mL. Os extratos proteicos totais (20µg), foram desnaturados com tampão LB5X (10% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 40% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, 0.25M Tris/HCl pH 6,8), associados ao banho seco (LGC biotechnology) a 100°C durante 5 minutos. Os fracionamentos das proteínas ocorreram em géis de 10% de poliacrilamida/SDS (Sulfato de Sódio) com subsequente transferência para membranas de nitrocelulose (HybondTM ECLTM, GE Healthcare). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com PBS-Tween 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado por, no mínimo, 1 hora e lavadas com PBS-Tween 0,1%. Estas membranas foram incubadas com os 1:500 do anticorpo anti-CD9 (ImmunoTools), 1:1000 para o anti-TSG 101 (Santa Cruz Biotechnology) a 4°C overnight. Após concluídas três lavagens com PBS-Tween 0,1% as membranas foram incubadas, durante 1 hora, à temperatura ambiente, com 1:3000 do anticorpo secundário policlonal conjugado à peroxidase anti-IgG2a de camundongo (Santa Cruz, Biotechnology). Em seguida, na presença da solução reveladora ECL-Plus (GE Healthcare), a membrana foi exposta contra filme de raios-X (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) e reveladas utilizando-se revelador e fixador (Kodak), de acordo com indicações do fabricante.

3.2.2.2 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

A análise do tamanho e concentração de VEs resultantes do isolamento foi realizada por meio da técnica de análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) através do

equipamento NanoSight NS300 (Malvern Instruments Ltd., UK) no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia, como também, no Laboratório de Biofísica de Sistemas Nanoestruturados do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. As amostras de suspensão de VEs foram processadas em pools de cada condição experimental (COVID-19, SRAG e grupo controle). A diluição usada no sobrenadante de VEs para leitura foi de 1:100. Um arquivo de vídeo foi gerado capturando o movimento browniano das partículas e os dados gráficos de tamanho e concentração das vesículas foram gerados pelo equipamento após leitura das amostras. O NanoSight gera um material de análise confiável devido a sua alta resolução e menores chances de interferência de leitura.

3.2.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise de VEs por microscopia eletrônica de transmissão foi realizada no Centro de Microscopia da UFMG, seguindo seu protocolo interno. A microscopia eletrônica de transmissão por contrastação negativa e a técnica de criomicroscopia foram realizadas como mais um método de caracterização. As amostras de suspensão de VEs foram processadas em pools de cada condição experimental (COVID-19, SRAG e grupo controle). Para o método de contrastação negativa houve o preparo da grid (lacey carbon de 300 mesh EMS) previamente submetida ao glow discharge durante 1 minuto a 10mA com argônio. Em seguida, 3 microlitros da amostra foram depositados na grid e após 1 minuto o excesso de material foi retirado com auxílio de um papel filtro. A contrastação foi realizada com 3µl acetato de uranila, durante 30 segundos e o excesso foi retirado com papel filtro. A amostra foi analisada em microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai G2-12 – Spirit Biotwin FEI – 120 kV). As imagens foram adquiridas através da câmera CCD com tensão de 60Kv. Objetivando maior resolução de imagem e mais detalhes na estrutura dos exossomos, o método de criomicroscopia também foi adicionalmente realizado a partir do preparo da amostra por *plunge freezing*, congelamento em etano líquido de amostras fluidas, depositadas sobre telas (grades) de microscopia eletrônica, para posterior análise em microscópio eletrônico de transmissão.

3.3 Avaliação do efeito de VEs na diferenciação de mo-DC's

3.3.1 Processamento de PBMC's para obtenção de mo-DC's

Os monócitos a serem diferenciados em células dendríticas foram obtidos a partir do processamento de PBMC's (células mononucleares do sangue periférico) de doador saudável. Foi coletado cerca de 100 ml de sangue periférico em tubos com o anticoagulante heparina de 9 ml (Vucuplast) e processadas utilizando Ficoll-Paque Plus (Cytiva, Sweden). Após adição do sangue no Ficoll-Paque na proporção Ficoll-sangue (1:3), os tubos foram centrifugados a 200 g por 40 minutos (ThermoScientific), a 15°C. A camada referente às PBMC's, foi cuidadosamente coletada de cada tubo e transferida a um novo tubo estéril e lavada duas vezes com volume final de 50 mL de PBS 1X estéril por centrifugação a 400g por 10 minutos, a 4°C (Figura 8). O sobrenadante foi desprezado e o pellet de células foi ressuspensionado em meio RPMI incompleto (Cytiva). A contagem de células viáveis foi realizada utilizando o corante azul de trypan 0,4%. Aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células foram plaqueadas por poço em 48 poços (duas placas de 24 poços) (Kasvi) com o volume final de 500 μ L de suspensão celular em meio RPMI incompleto e foram mantidas em estufa de CO₂ (saturação 5%) por 4 horas a 37°C para aderência dos monócitos.

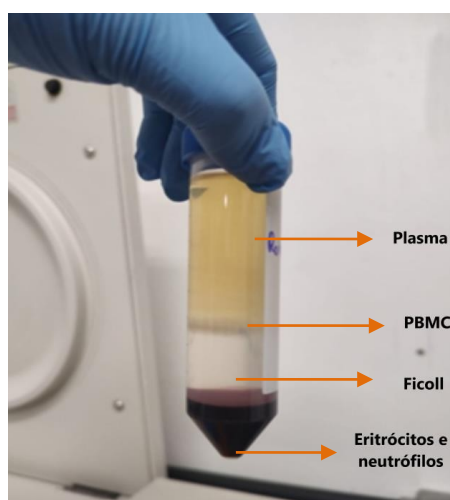


Figura 8 - Obtenção de PBMCs do sangue total de doadores saudáveis. Amostras foram processadas através de separação de densidade por gradiente de Ficoll (1200 g / 40 minutos) para posterior cultivo de monócitos. Representados na imagem as camadas derivadas da separação: plasma, PBMCs, Ficoll, e camada de neutrófilos e eritrócitos. Fonte: Acervo pessoal.

3.3.2 Diferenciação de monócitos em células dendríticas (mo-DC's)

A depleção de vesículas do soro fetal bovino (SBF) para suplementação do meio de cultura, foi realizada pelo método de ultrafiltração, como descrito por Kornilov *et al.*, (2018). O método de depleção de vesículas do soro fetal é crucial pois a presença de tais vesículas podem interferir no estímulo celular e modular a resposta das células dendríticas. O método de ultrafiltração consiste no uso de tubos do tipo Amicon 15 ml 100 kDa (Ref.: UFC910024, 100kDa Merk Millipore Ltd. Tullagreen, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland) e centrifugação do soro a 3.000 g por 55 minutos. Segundo os autores, tal método se mostrou mais eficiente para depleção no soro fetal do que a ultracentrifugação. A diferenciação de monócitos e suas análises fenotípica e funcional foram adaptadas a partir do protocolo de Saldanha (2020). Após o período de aderência dos monócitos, o sobrenadante com as células não aderentes foi retirado, lavou-se as células aderidas com PBS 1X estéril, adicionou-se 500 uL de meio RPMI com 10% de SBF (depletado), 1% de ATB, e as citocinas rhIL-4 (50 ng/ml, e-Bioscience) e rhGM-CSF (50 ng/ml e Sigma Aldrich). O desenho experimental está ilustrado na figura 9. As VEs isoladas de pacientes COVID-19 ou SRAG ou grupo controle foram adicionadas no primeiro dia do processo de diferenciação das células, após a adição das citocinas, na concentração de 30µg de suspensão de VEs por poço tratado. As células foram cultivadas por 5 dias em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Na placa de cultivo, foi adicionado um poço controle sem as VEs, denominado SE contendo os monócitos suplementado com o meio RPMI com 10% de SBF (depletado), 1% de ATB, e adição das citocinas rhIL-4 e rhGM-CSF, visando avaliar o efeito da diferenciação sem as VEs. Além disso, foi adicionado um poço para controle de diferenciação de monócitos em mo-DC's, denominado Mon (Figura 9) que recebeu apenas o meio RPMI com 10% de SBF (depletado) e 1% de ATB, sem a adição das citocinas rhIL-4 e rhGM-CSF. No quinto dia de diferenciação, houve a adição de 50ng/mL de Lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma) nos poços de mo-DC's na ausência e presença de VEs e deixado em cultura por mais 48 horas, para maturação das células dendríticas imaturas (iDC) e obtenção, portanto, de células dendríticas maduras (mDCs) (Figura 10). Após 48 horas de estímulo com LPS, as Mo-DCs já desprendidas foram coletadas do sobrenadante e posteriormente realizou-se etapas de lavagens em gelo, para coleta do restante de mo-DC's, utilizando solução de PBS-EDTA 4 mM estéril (Tecknova), a fim de capturar as mo-DC's frouxamente aderidas nos poços para prosseguir com a realização da imunofenotipagem das mo-DC's.

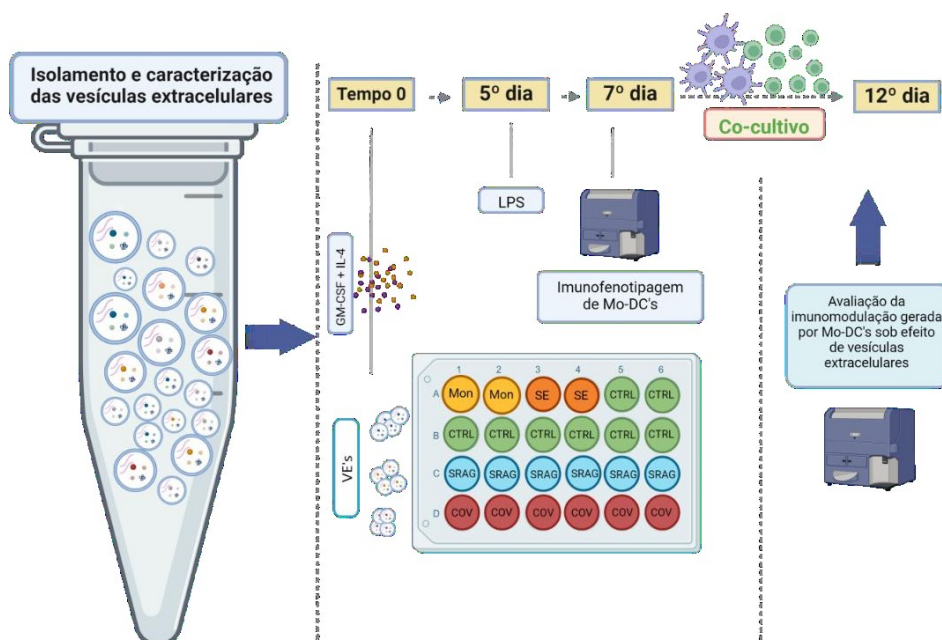


Figura 9 – Desenho experimental da avaliação fenotípica e funcional das mo-DC's sob o efeito de VEs. Após o isolamento e caracterização de VEs extraídas do plasma, monócitos de um doador saudável foram cultivados na presença das citocinas GM-CSF e IL-4, para indução na diferenciação de monócitos em mo-DC's, e estimuladas com VEs. Foram adicionados na placa poços que não recebem as citocinas GM-CSF e IL-4, representando o controle da diferenciação das mo-DC's (Mon – monócitos). Os poços sem VEs (SE) representam o controle da influência do tratamento com VEs. O CTRL representa os poços que receberam VEs do grupo controle; SRAG poços que receberam VEs extraído do plasma de pacientes SRAG, negativos para SARS-CoV-2, e COV os poços que receberam VEs de pacientes com COVID-19. No quinto dia foi adicionado LPS (Lipopolissacarídeo) como estímulo de maturação das iDC's (células dendríticas imaturas) para chegarem ao seu estado maduro (mDC's). Após 48 horas de estímulo houve a análise fenotípica das mo-DC's por citometria de fluxo avaliando seus principais marcadores. Para análise funcional as mo-DC's também foram submetidas à co-cultivo com linfócitos T alogênicos (derivados de outro doador) durante 5 dias e foi avaliado o perfil de resposta adaptativa induzida. O protocolo de diferenciação e análise fenotípica e funcional foi adaptado de Saldanha, 2020. Fonte: Acervo Pessoal (Criado em: BioRender).

3.3.3 Análise fenotípica de mo-DC's por citometria de fluxo

O fenótipo das mo-DCs geradas na ausência e presença de VEs de pacientes com COVID-19 (DC/VE COV) e SRAG (DC/VE SRAG) e doadores saudáveis (DE/VE CTRL) foi avaliado através da análise da expressão de diferentes marcadores por citometria de fluxo. Inicialmente as células foram lavadas com PBS, marcadas com o corante Live/Dead Yellow Viability Assay (ThermoFisher / Ref. L34959) em uma diluição de 1:1000, no escuro, no gelo, por 10 minutos, e lavadas com tampão FACS (PBS + 2% de SBF). O corante Live/Dead avalia a viabilidade celular através da coloração de células com membranas comprometidas penetrando e interagindo com as aminas livres presentes em sua superfície e no citoplasma. Em seguida, houve a marcação com anticorpos extracelulares específicos para fenotipagem das mo-DCs durante 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Foram usados anti- CD14 PE-Cy 7 (diluição 1:40, BioLegend / cat. 301813), anti-CD11c APC (diluição 1:100, Immunotools / cat. 21487116), anti-CD86 Pacific Blue (diluição 1:100, BioLegend / cat. 305423) anti-HLA-DR Perc-P (diluição 1:40, BD Biosciences), anti-CD80 FITC (diluição 1:40, Invitrogen / cat. MA1. 19590), anti PD-L1 PE (diluição 1:40, BioLegend / cat. 393608). Após a marcação, as células foram lavadas e ressuspensas em 200 µL de tampão FACS 2% (PBS, 2% de SFB). A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo – LSR Fortessa e analisadas através do software Flow Jo 10.9 (BD Biosciences), no Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores (LINBIO), localizado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG. Amostras com menos de 100 eventos foram excluídas das análises (Figura 10).

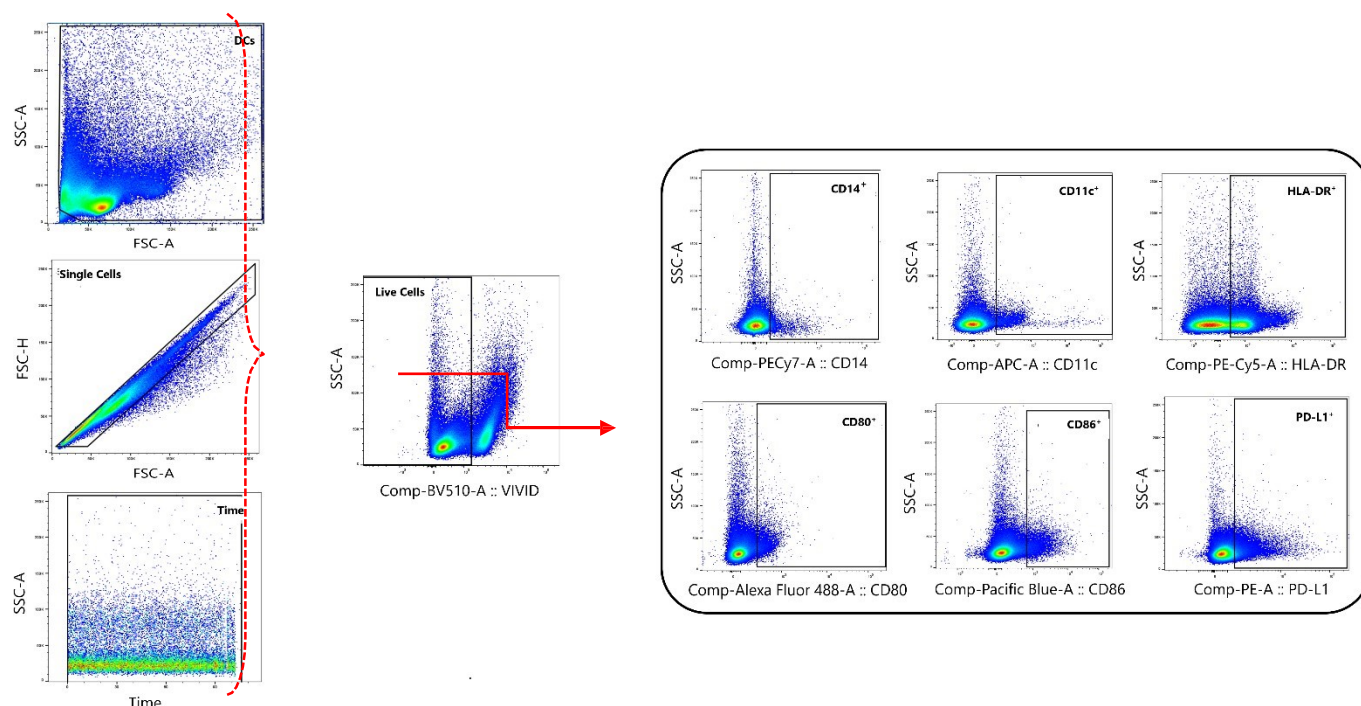


Figura 10 – Estratégia de análise de mo-DC's pela citometria de fluxo. Inicialmente foram selecionados os gates delimitando a população de células adquiridas (DCs), Singlets, para retirar a interferência de agrupamentos celulares e Time, para avaliar possíveis interferências no momento da aquisição. A partir da delimitação destes grupos, foi criada uma interseção gerada pelo comando boolean gate (make and gate) e a partir deste, foi selecionado o gate de células vivas (SSC-A x Vivid⁺). A partir da seleção da população de células vivas houve a análise das populações que determinam o fenótipo das células dendríticas. As análises demonstradas na figura foram feitas no programa Flow Jo 10.9 (BD Biosciences). Fonte: Acervo pessoal.

3.4 Análise Funcional das mo-DC's

3.4.1 Obtenção de Linfócitos T alogênicos para co-cultivo

Células T CD4⁺ e CD8⁺ foram obtidas através de PBMC's de amostra de sangue periférico coletado em tubos de 9 ml com anticoagulante heparina (marca Vucuplast) de doador saudável. As PBMCs foram isoladas segundo o protocolo descrito no tópico 3.3.1 e adicionadas em garrafa de cultivo celular (p25) (Kasvi) durante 6 horas para aderência dos monócitos e separação inicial dos linfócitos. Em seguida, o sobrenadante com as células não

aderentes foi coletado, centrifugado e as células foram contadas em câmara de Neubauer. Foi realizada a marcação extracelular para citometria em suspensão de 100µl contendo os anticorpos anti-CD3 FITC (diluição 1:40, BioLegend / cat. 300306), anti- CD4 APC (diluição 1:200, BioLegend / cat. 357408), anti-CD8 Perc-P (diluição 1:40, Elabscience) durante 30 minutos, a temperatura ambiente, no escuro. Decorrido o tempo da marcação, as células foram lavadas e ressuspendidas em FACS 2% e levadas para o *cell-sorting* no citômetro FACSaria II (BD) na Plataforma de Citometria do Instituto René Rachou, Belo-Horizonte, Minas Gerais. As células foram separadas de acordo com a expressão de CD4 e CD8 (Figura 11q). Após a separação, as células foram misturadas entre si, lavadas e contadas em laboratório.

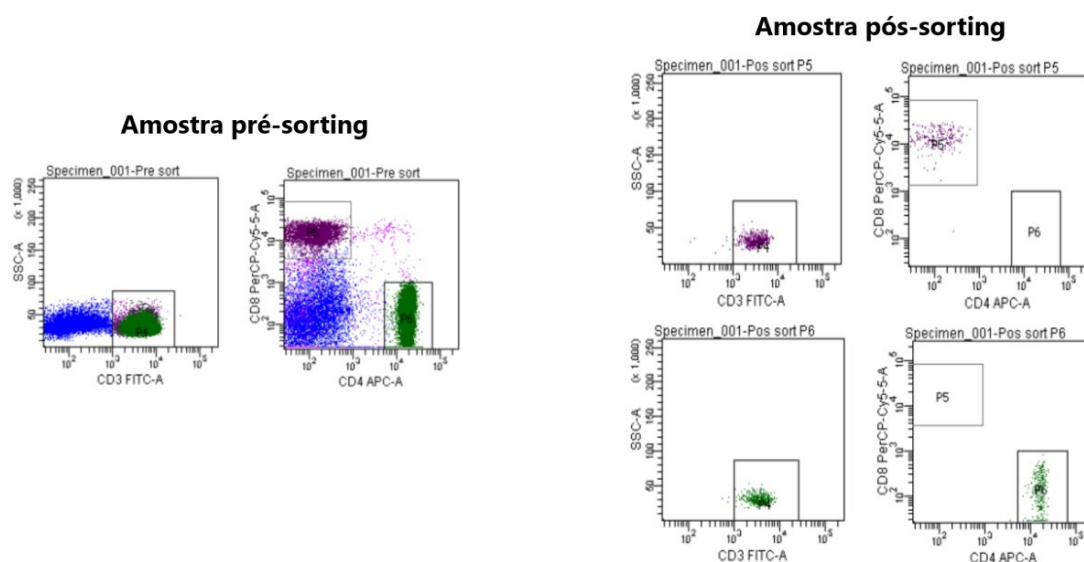


Figura 11 – Dot plot representativo da separação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Os linfócitos foram inicialmente selecionados usando os parâmetros de tamanho, granulosidade e singlet. Representados à esquerda da imagem, o padrão das células marcadas para CD3 e em seguida a seleção das subpopulações de células CD4 e CD8. À direita, os gráficos evidenciando o sucesso na separação das populações. Fonte: Acervo pessoal.

3.4.2 Análise do perfil de resposta imune adaptativa gerada após co-cultivo.

Após o 7º dia de diferenciação as mo-DC's foram submetidas a uma reação leucocitária mista (MLR do inglês: mixed leukocyte reaction) com o objetivo de avaliar o perfil de resposta imune adaptativa induzido em linfócitos T alogênicos pelas mo-DC's com

as VEs. O teste realizado foi adaptado de Saldanha, 2020. As Mo-DCs foram obtidas de acordo com o descrito no tópico 3.3.2 e plaqueadas 1×10^4 por poço. Após a separação de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, as células foram adicionadas ao mesmo tubo, lavadas e ressuspensas com meio RPMI suplementado com 10% de SFB, e contadas. Os linfócitos T (1×10^5 células por poço) foram adicionados aos poços contendo mo-DC's, em uma proporção de 10:1, respectivamente. Após o quinto dia de co-cultivo, que corresponde ao 12º dia do início dos experimentos, as células foram marcadas com um painel para avaliar o perfil da resposta imune adaptativa observando o fenótipo das células T e a produção de citocinas. Os anticorpos utilizados para a marcação dos painéis estão descritos na Tabela 1. Para a avaliação da produção de citocinas intracelulares, foi usado o reagente Brefeldina A (BFA) que age inibindo o transporte intracelular de proteínas e provocando a retenção das citocinas produzidas no retículo endoplasmático, o que possibilita a detecção e quantificação das citocinas nas células. O BFA foi adicionado em todos os poços da MLR na concentração de $03 \mu\text{g/mL}$ nas últimas 12 horas de cultivo. Terminado o período de cultura da MLR, as células foram lavadas com PBS gelado, marcadas com Live/Dead por 10min no gelo, lavadas com FACS 2%, marcadas com anticorpos de superfície (Tabela 1) por 30min em temperatura ambiente e novamente lavadas com FACS 2%. Para a marcação intracelular foi utilizado o reagente de fixação e permeabilização do kit eBioscience Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (ThermoFisher) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida as células foram marcadas com os anticorpos intracelulares por 45 min no gelo e no escuro, depois foram lavadas 3 vezes e por fim ressuspensas em tampão FACS 2% para aquisição no citômetro de fluxo – LSR Fortessa do Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores (LINBIO), localizado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG. As análises foram realizadas através do software Flow Jo 10.9 (BD Biosciences). As estratégias de análises usadas na citometria estão demonstradas nas Figuras 12, 13 e 14, respectivamente. Amostras com menos de 100 eventos foram excluídas das análises.

Tabela 1 – Painéis de anticorpos usados para avaliação da resposta imune adaptativa induzida por mo-DC's em reação leucocitária mista (MLR).

Painel 1 – Perfil de Treg / PD-1/ CTLA-4 / IL-10			
	Conjugado	Diluição	Marca / Catálogo
Live/Dead	BV510	1:1000	Invitrogen / L34959
Anticorpos de Superfície			
Anti- CD3	Alexa Fluor 700	1:40	Invitrogen / 56-0037-42
Anti-CD4	APC	1:200	BioLegend / 357408
Anti-CD8	BV 570	1:100	BioLegend / 301038
Anti-CD25	PE	1:40	Exbio / 1P-218-T100
Anti-CD127	FITC	1:20	Immunotools / 21811273
Anti-CTLA-4	PE/Cy7	1:100	BioLegend / 349906
Anti-PD-1	BV 605	1:40	BioLegend / 367406
Anticorpos Intracelulares			
Anti-Fox-P3	Pacific Blue	1:20	BioLegend / 300216
Anti-IL-10	Perc-P	1:40	BioLegend / 501418
Painel 2 – Perfil de produção de citocinas			
	Conjugado	Diluição	Marca / Catálogo
Live/Dead	AmCyan	1:1000	Invitrogen / L34959
Anticorpos de Superfície			
Anti-CD3	BV 650	1:40	BioLegend / 317324
Anti-CD4	APC	1:200	BioLegend / 357408
Anti-CD8	BV 570	1:100	BioLegend / 301038
Anticorpos Intracelulares			
Anti-TNF α	FITC	1:20	BioLegend / 502906
Anti- INF γ	Pacific Blue	1:20	BioLegend / 506526
Anti-IL-10	Perc-P	1:40	BioLegend / 501418
Anti-IL-2	PE/Cy 7	1:20	BioLegend / 506526

Fonte: Autoria própria

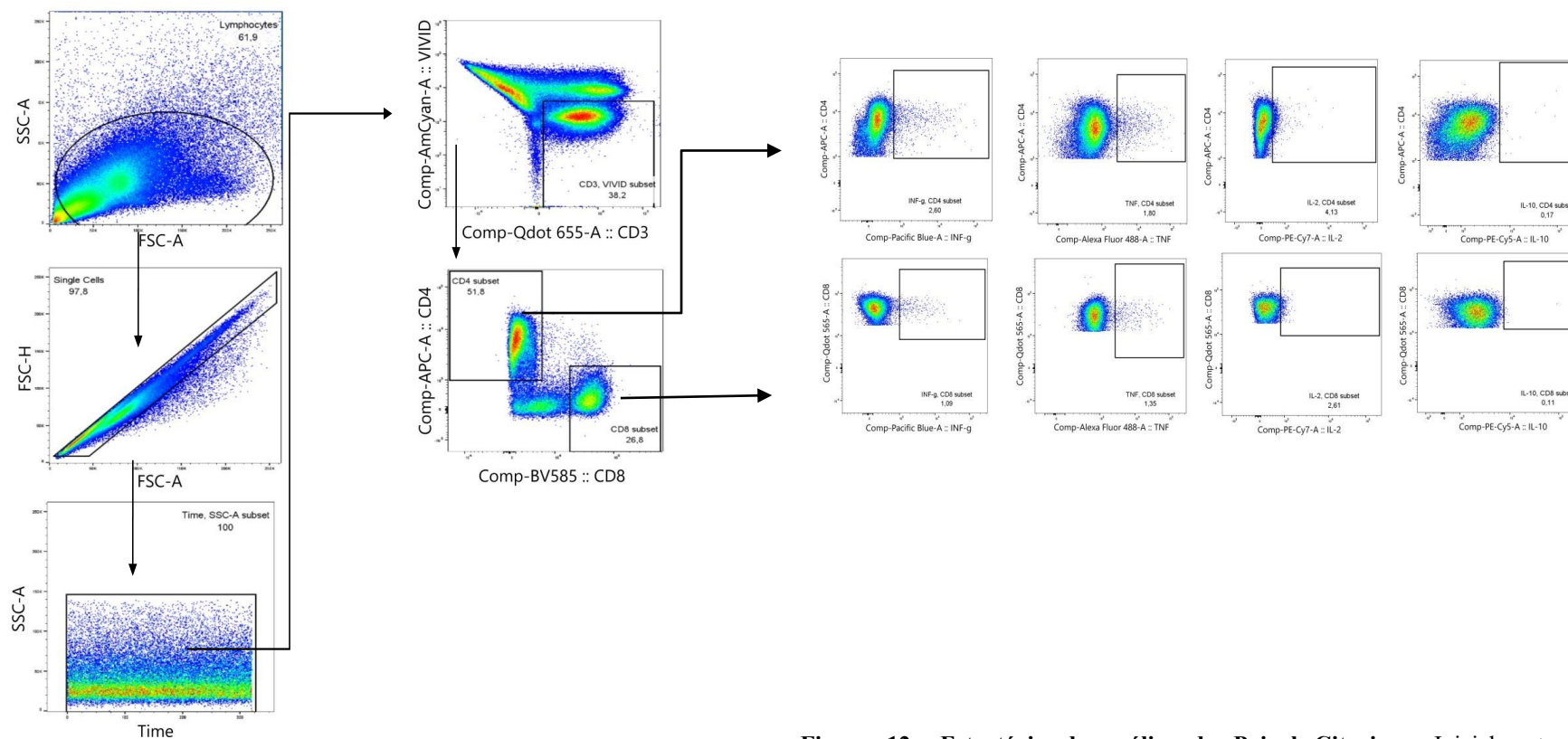


Figura 12– Estratégia de análise do Paineil Citocinas. Inicialmente foram selecionados os gates de Linfócitos, Singlets e Time que foram analisados nesta ordem dentro da população selecionada anteriormente para todas as amostras. Houve a seleção da população de células $CD3^+$ vivas ($CD3^+ViViD^-$) a partir da população Time. Dentro de $CD3^+$, foram selecionadas as populações de $CD4^+$ ($CD4^+CD8^-$) e $CD8^+$ ($CD4^-CD8^+$), e os gates das citocinas ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $IL-2$ e $IL10$) foram selecionados nas populações de $CD4^+CD8^-$ e $CD4^-CD8^+$ separadamente. Fonte: Acervo pessoal.

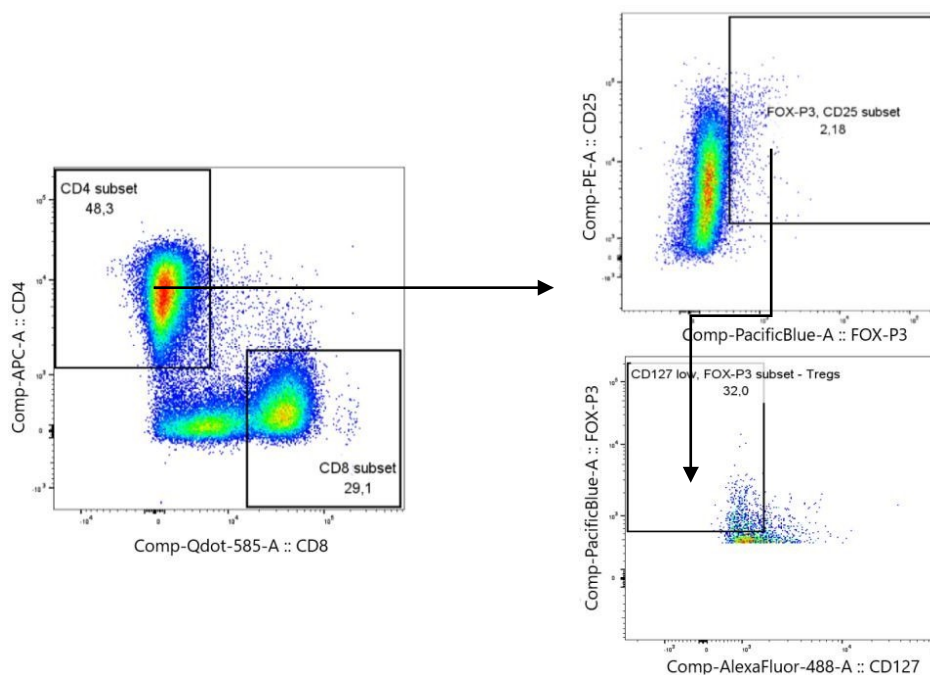


Figura 13 – Estratégia de análise do Pannel Tregs. Inicialmente foram selecionados os gates de linfócitos, singlets e time como esquematizado na Figura 11. Em seguida foi selecionada a população de células $CD3^+$ vivas ($CD3^+ViViD^-$). Dentro de $CD3^+$, foi selecionada a população de $CD4^+$ ($CD4^+CD8^-$) como representado. Dentro da população $CD4^+$ foram selecionados os gates de $CD25^+$ e Fox-P3 $^+$ e dentro desta subpopulação houve análise do gate $CD127^{low}$ Fox-P3 $^+$ gerando um fenótipo de Tregs: $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low} FOXP3^+$. Fonte Acervo pessoal.

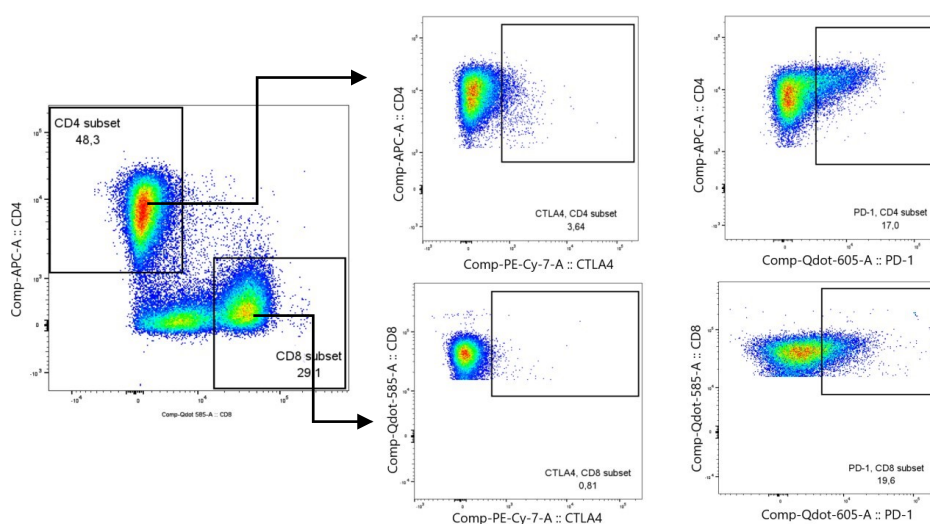


Figura 14 – Estratégia de gates de $CD4^+$ e $CD8^+$ para avaliação de regulação e exaustão celular. Dentro da população $CD4^+$ e $CD8^+$ (selecionadas de acordo com a figura 11) foram selecionados os gates de CTLA4 $^+$ e PD-1 $^+$. Fonte Acervo pessoal.

3.5 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 7.04 (Dotmatics, Boston, MA). Os testes de Shapiro Wilk e Kolmogorov-Smirnov foram empregados para avaliar a normalidade da distribuição dos dados. As comparações entre mais de dois grupos foram realizadas pela análise de variância (one-way ANOVA) e complementarmente o teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos. Foi considerado valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dados dos grupos amostrais

Para a obtenção das vesículas extracelulares (VEs) utilizadas no presente estudo, foram selecionadas amostras de plasma de pacientes internados no CTI do Hospital da Baleia, situado em Belo Horizonte, Minas Gerais. Os pacientes foram confirmados positivos para COVID-19 através do exame molecular de RT-PCR no ano de 2020 e não eram vacinados para o SARS-CoV-2. As amostras positivas para COVID-19 e as amostras de pacientes classificados como portadores da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), porém SARS-CoV-2 negativo, foram separadas e pareadas por sexo e idade através do banco de dados do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, UFMG. O grupo controle usado no presente trabalho deriva-se de amostras de indivíduos saudáveis coletadas em período anterior à pandemia de SARS-CoV-2 e armazenadas no banco de amostras do laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG. (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização dos grupos amostrais usados para o isolamento de vesículas extracelulares. A média de idade no grupo COVID foi maior principalmente devido ao acometimento mais severo da doença na população idosa, tendo em vista, a coleta realizada na ala CTI. Em todos os grupos houve maior número de pessoas do sexo feminino.

Características gerais dos grupos			
	CTRL	SRAG	COVID-19
N amostral	19	10	13
Idades ($\bar{x}$)	43 – 59 (49)	41 – 62 (48)	35 – 83 (60)
Sexo (F)	15 (79%)	06 (60%)	06 (46%)
Ano de coleta	2018	2020	2020-2021
RT-PCR +	-	-	13 / 13
Óbitos	-	-	02 / 13

Fonte: Autoria própria

Os pacientes com COVID-19 apresentaram sinais classificados entre moderado e grave de acordo com o prontuário médico. Do total desses indivíduos, 2 (15%) evoluíram a óbito e o restante obtiveram alta médica. Foi observado que dos 13 pacientes com COVID-19, cinco (38%) apresentaram a data de coleta do material para diagnóstico molecular realizada após o 7º dia de sintomas, ou seja, fora do período recomendado pelas principais agências de saúde, mesmo assim o SARS-CoV-2 ainda foi detectado. Notou-se que os pacientes que apresentaram quadro grave possuíam tipos mais diversos de comorbidades concomitantes à infecção pelo SARS-CoV-2. A hipertensão arterial em pacientes com COVID-19 moderada e grave foi de aproximadamente 85% (11/13) (Tabela 3). Os sintomas mais presentes nos indivíduos infectados com quadros moderados e graves observados neste estudo foram tosse seca, dispneia, dessaturação de oxigênio e febre (Figura 15). Dos seis indivíduos com a classificação de quadro grave, quatro apresentavam idades acima de 60 anos e cinco tiveram

detecção da infecção por RT-PCR após o 5º dia de sintomas, dentre eles, em um caso a coleta foi realizada no décimo dia após o início dos sintomas.

Tabela 3 – Perfil geral dos pacientes com COVID-19 envolvidos no estudo. O grupo COVID usado no estudo conta com pacientes com o quadro moderado e grave. Todos os pacientes estavam internados na ala CTI do Hospital da Baleia situado em Belo Horizonte, MG.

	COVID Moderado	COVID Grave
Óbitos	00	02
Comorbidades	Diabetes (=03), Hipertensão arterial (=06), Neoplasias (=03), Obesidade (=01)	Depressão (=01), Hipertensão arterial (=05), Neoplasias (=01), Trombose Venosa Profunda (=02), Obesidade (=01)
Período de coleta após os primeiros sintomas	01 - 08 dias	02 - 10 dias
TOTAL	07	06

Fonte: Autoria própria

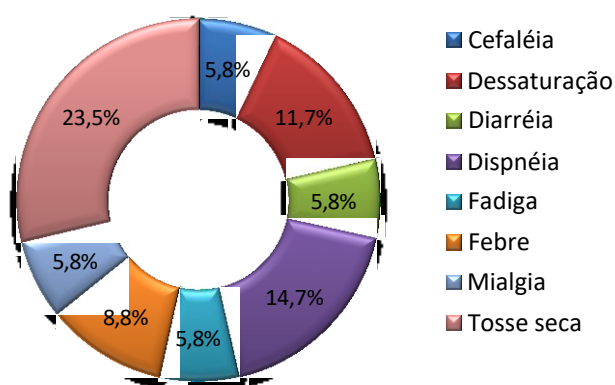


Figura 15 - Principais sintomas associados à gravidade de COVID-19 nos pacientes selecionados no estudo.

Dentre os pacientes selecionados para o isolamento de VEs do plasma, os principais sintomas foram tosse seca, dispnéia e dessaturação de oxigênio. Fonte: Acervo pessoal.

4.2 Isolamento e caracterização de VEs do plasma

Após o isolamento das vesículas extracelulares de cada grupo experimental, as amostras foram submetidas ao teste do ácido bicinonínico do kit Pierce BCA Protein Assay, conforme protocolo descrito pelo fabricante (Thermo Scientific®). Tais quantificações estão demonstradas na Figura 16.

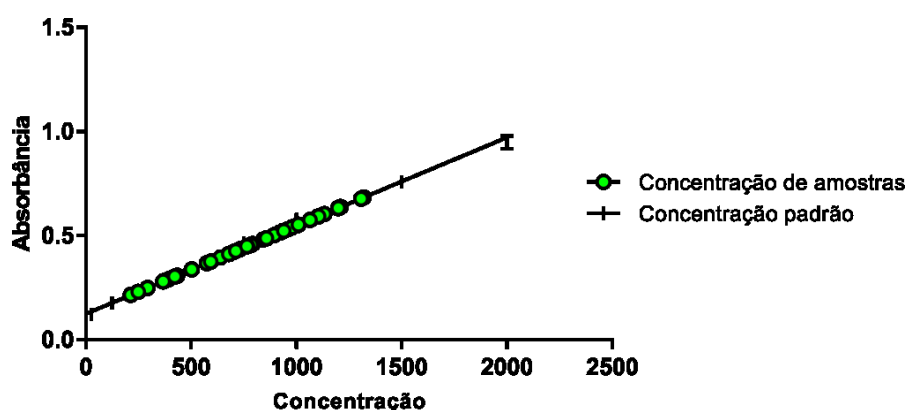


Figura 16 - Quantificação proteica pelo método de BCA. Marcadas em verde, estão as concentrações encontradas nas amostras dos grupos Controle, SRAG e COVID-19. A menor concentração encontrada foi de 212 µg/ml (grupo controle) e a maior 1.307 µg/ml (grupo COVID-19/grave). Fonte: Acervo pessoal.

A análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) aliada à microscopia eletrônica de transmissão e a criomicroscopia validaram a presença de VEs e seus marcadores. Algumas técnicas como as citadas, assim como o Western Blot são amplamente utilizadas na caracterização dessas vesículas. A concentração média de partículas/mL de cada grupo experimental, a análise por MET e o resultado do método de Western Blot das vesículas podem ser visualizadas nas figuras 17, 18 e 19, respectivamente. Os métodos para a caracterização de vesículas foram padronizados a partir da formação de pools amostrais com suspensão de VEs de cada grupo analisado no presente trabalho.

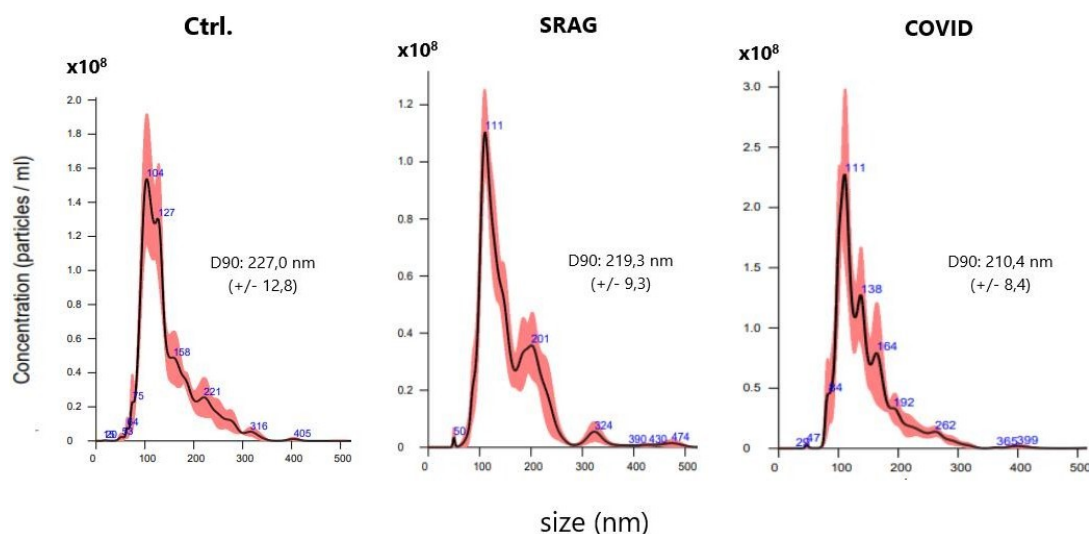


Figura 17. Representação gráfica da Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) de vesículas extracelulares. Amostras foram diluídas em 100x em água estéril. Os valores de D90 das amostras estão representados na imagem indicando o tamanho máximo de vesículas que representam 90% das partículas analisadas. Fonte: Acervo pessoal.

As vesículas apresentaram tamanhos máximos de aproximadamente 200 nm o que corresponde com os tamanhos esperados após etapa de filtração em 220 nm. As concentrações obtidas também foram consideradas favoráveis, porém, não foram levadas em consideração para o ensaio de cultivo celular pois as VEs foram usadas separadamente para esta finalidade.

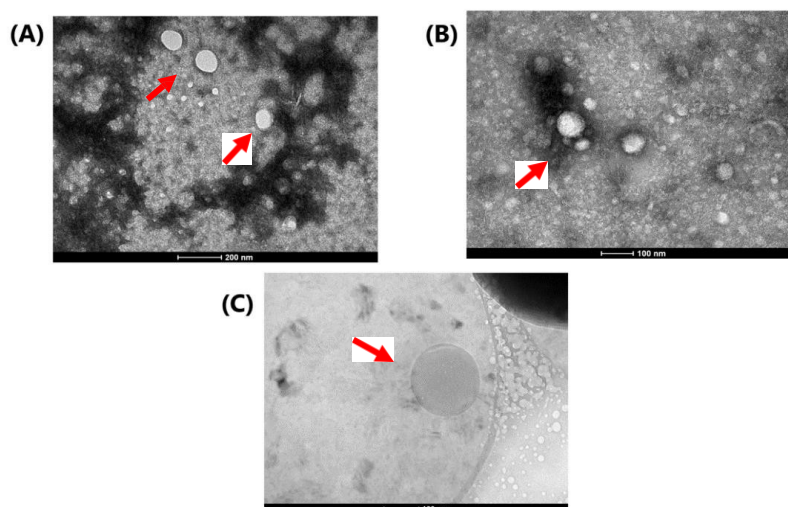


Figura 18. Imagens da Microscopia Eletrônica de Transmissão. Microscopia eletrônica de transmissão por contrastação negativa com acetato de uranila. Escala das imagens: 200 nm (A) e 100 nm (B), respectivamente.

(C) Criomicroscopia pelo método de *plunge freezing* evidenciando a bicamada lipídica que envolve o conteúdo das VEs. As imagens representadas foram obtidas do pool de VEs do grupo COVID-19. Fonte: Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Exossomos e algumas microvesículas são conhecidamente portadoras das proteínas tetraspaninas, integrinas, algumas proteínas de choque térmico, proteínas relacionadas com endereçamento como as Rab's, dentre outras (KOUREMBANAS, 2015; SIMONS; RAPOSO, 2012). No presente trabalho, o método de Western Blot evidenciou dois importantes marcadores presentes nas VEs isoladas, a proteína CD9, uma tetraspanina, e TSG101, importante proteína citosólica envolvida no complexo endossomal na formação dos exossomos (Figura 18). As amostras usadas em pool para este método foram separadas em grupo moderado e grave para melhor caracterização e confirmação da presença de VEs em ambos grupos.

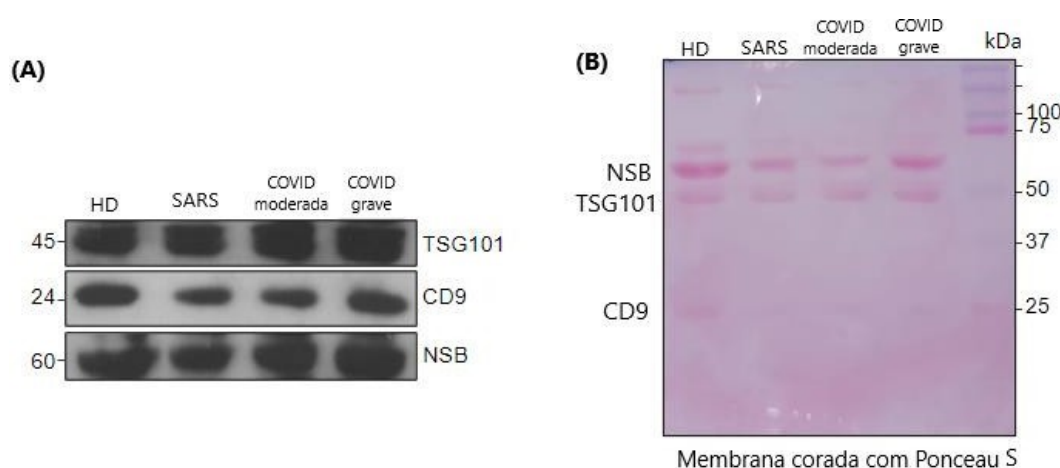


Figura 19 - Expressão de marcadores característicos de exossomos e microvesículas detectados em VEs extraídas do plasma do grupo controle e pacientes portadores SRAG e COVID-19. Foram realizadas extrações de proteínas totais do pool de VEs para a análise de duas proteínas relacionadas à biogênese de VEs pelo método de Western Blot. (A) Revelação de membrana indicando a presença das bandas específicas TSG 101 (45kDa) e CD9 (24kDa) e banda inespecífica (NSB) usada para normalização. (B) Membrana corada com Ponceau S. HD: do inglês Healthy Donor (grupo controle). SARS: do inglês: Severe Acute Respiratory Syndrome (grupo SRAG). Moderate COVID (grupo COVID-19 moderado) e Severe COVID (grupo de COVID-19 grave). Fonte: Acervo pessoal.

O estudo de VEs no geral compreende um amplo campo de pesquisas que inclui investigações acerca de sua biogênese, funções, alvos e suas potenciais aplicações em

diversos campos das ciências biológicas. Há algumas décadas após a descoberta de tais vesículas pensava-se que suas funções eram basicamente relacionadas à descarga de componentes não necessários para as células tornando-se meras carreadoras de “lixo celular”. Após anos de pesquisas mais aprofundadas no campo da Biologia Celular, verificou-se que as VEs participam ativamente de variados processos biológicos, principalmente relacionados à comunicação intercelular como no carreamento de diversas moléculas (lipídeos, proteínas, miRNA's e outros RNA's, material genético etc.) (COLOMBO *et al.*, 2014; RECORD *et al.*, 2014; SKOG *et al.*, 2008; VALADI *et al.*, 2007; VAN NIEL *et al.*, 2018; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2014). Os potenciais usos de tais vesículas na terapêutica também se torna cada vez mais estudado, como no carreamento de drogas (*drug delivery*) para diversas condições patológicas (FERREIRA *et al.*, 2022; PEDRIOLI, *et al.*, 2021; USMAN *et al.*, 2018). As VEs são um termo genérico para se abordar os seus tipos atualmente descritos como os mais conhecidos exossomos, microvesículas e os corpos apoptóticos, embora haja atualmente mais designações como os oncosomos e ectossomos (JEPPESEN *et al.*, 2023). A origem das microvesículas se dá através do brotamento externo da membrana plasmática e conteúdos carreados a partir de sua formação, como proteínas transmembranas e parte do conteúdo citosólico da célula de origem, já os exossomos se originam através do brotamento interno da membrana plasmática, que se torna um endossomo multivesicular carreando vesículas intraluminais futuramente liberadas das células como exossomos. Proteínas da família RAB são essenciais no tráfico de vesículas na célula e sua consequente liberação. Alguns mecanismos são usados para que as VEs se incorporem à célula alvo como fusão de membrana, pinocitose e ligação à receptores específicos que podem ocorrer através de sua ligação com os vários mediadores celulares como as integrinas, tetraspaninas, lipídeos, as caveolinas, lectinas, entre outros (JEPPESEN *et al.*, 2023; VAN NIEL *et al.*, 2018).

A proteína do gene 1 de susceptibilidade ao tumor (TSG101) é uma proteína citosólica que em VEs pode estar relacionada à sua via de biogênese (em exossomos), como também, pode participar do *sorting* de moléculas e receptores para a formação de microvesículas (CHOUDHURI *et al.*, 2014; JEPPESEN *et al.*, 2023; ZHANG *et al.*, 2018). CD9 é uma proteína da família das tetraspaninas e abundantemente encontrada em exossomos e pequenas VEs (*small ectosomes*). Há alguns anos a proteína CD9 esteve associada como um dos marcadores específicos de exossomos, porém, assim como outras tetraspaninas (CD63 e CD81), recentemente já foi relatada em outras vesículas de tamanho pequeno não sendo possível atribuir somente por sua presença, a denominação de exossomos (FORDJOUR *et al.*,

2022; MATHIEU *et al.*, 2021). Tendo em vista os recentes achados e de acordo com o atual *guideline* elaborado com as informações mínimas para estudos com VEs (MISEV, 2023), neste trabalho adotamos a denominação de vesículas extracelulares ou VEs para referir-nos a tais vesículas derivadas do plasma, considerando que os métodos usados para sua caracterização não são suficientes para determinar a sua biogênese. As vesículas isoladas apresentaram tamanho médio de ~100-220 nm aproximando-se de tamanhos similares a exossomos e pequenos ectossomos, como as microvesículas. As concentrações proteicas derivadas da quantificação por BCA apresentaram uma média geral de aproximadamente 850 µg/ml. As VEs foram usadas no presente trabalho como potenciais carreadoras de moléculas, proteínas, complexos solúveis derivados de seus doadores na ausência e na presença de COVID-19 e demais Síndromes Respiratórias Agudas. O sangue é um dos principais recursos de VEs estudadas atualmente, sendo assim, técnicas para obtenção de VEs diretamente do sangue e seus derivados (soro e plasma) já estão estabelecidas. As vesículas secretadas no soro e/ou plasma podem se originar de uma ampla gama de células, principalmente as células do sistema imune, logo, o efeito de tais vesículas nas células alvo vai depender de seu conteúdo e do microambiente no qual elas foram geradas. (ARRAUD *et al.*, 2014; HOLCAR *et al.*, 2020; SERRANO-PERTIERRA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2022). As VEs podem exercer um efeito modulador em células alvo, como demonstrado por Shlomovitz *et al.* (2021) onde vesículas derivadas de células necroptóticas exercem a indução de secreção de citocinas pró-inflamatória de macrófagos, tornando-o mais responsivo. Budden *et al.* (2021) também evidenciaram que VEs derivadas de células que ativam seus inflamassomos (complexo proteico citosólico que atua no reconhecimento de patógenos) carregam em seu conteúdo miRNA's pró-inflamatórios, como miR-155, miR124-3p, miR123-3p que atua possivelmente sinalizando sua célula alvo, executando seu papel modulatório.

4.3 Análise Fenotípica de mo-DC's

As amostras de sangue foram processadas para obtenção de PBMCs e diferenciação de monócitos em células dendríticas, expostas sob o tratamento com VEs de COVID-19, SRAG ou voluntários saudáveis e em seguida, no 5º dia, maturadas com LPS para posterior análise de marcadores de superfície através da citometria de fluxo.

Foi adicionado no início da diferenciação de Mo-DCs as VEs derivadas de doadores saudáveis (DC/VE CTRL) assim como, pacientes com COVID-19 (DC/VE COV) e SRAG (DC/VE SRAG) com o objetivo de testar o efeito modulatório de tais vesículas nas células.

Ao fim da diferenciação foi analisada através da citometria de fluxo a expressão de alguns principais marcadores destas células de acordo com a estratégia de análise apresentada no tópico 3.3.3 em Materiais e Métodos, na figura 10. Para que a diferenciação dos monócitos usados no experimento fosse validada, houve o cultivo destas células sem diferenciá-las e posterior comparação de seu fenótipo com as células diferenciadas. A maior expressão de CD14 foi evidenciada em monócitos, enquanto em mo-DC's houve baixa expressão destes marcadores (Figura 20). O marcador CD14 é expresso em todas as linhagens conhecidas de monócitos, como os clássicos, intermediários e não clássicos já em células dendríticas derivadas de monócitos, este marcador é muito pouco ou negativamente expresso (CRAVENS, 2003; KAPELLOS *et al.*, 2019; PALUCKA *et al.*, 1998) sendo assim, possível validar a etapa de diferenciação nas mo-DC's (Figura 20). Houve também o cultivo de monócitos para diferenciação em dendríticas na ausência de VEs para validação dos resultados sem o tratamento. A viabilidade de células dendríticas não foi alterada nos respectivos grupos analisados, como mostrado na figura 21.

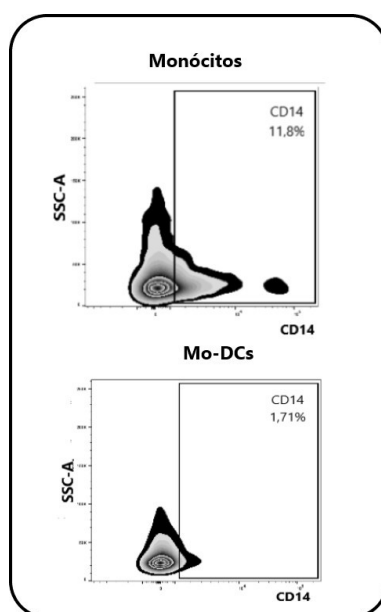


Figura 20 – Comparação fenotípica entre monócitos e mo-DCs obtidos de doador saudável. O marcador CD14 foi usado para representar uma importante diferença fenotípica entre os monócitos e as mo-DCs com o objetivo de validar a diferenciação celular. Análise obtida pelo software FlowJo v10.9. Fonte: Acervo pessoal.

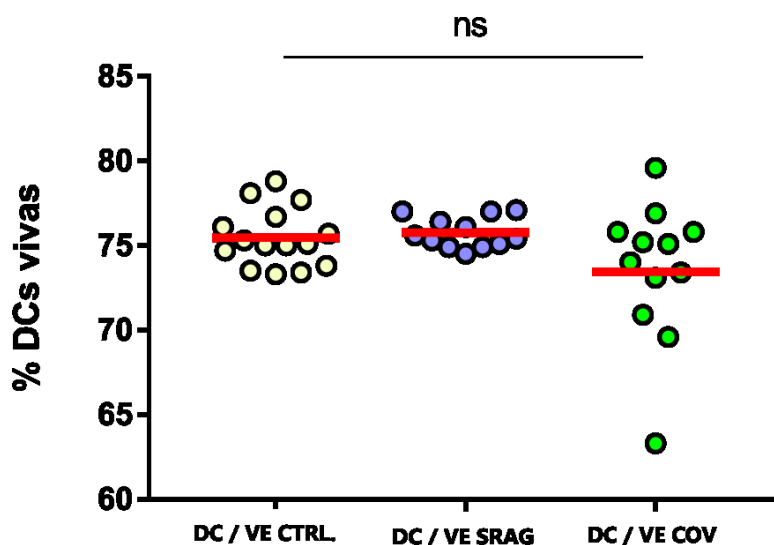


Figura 21 – Viabilidade de mo-DC's nos grupos analisados. Não houve diferença estatística entre a viabilidade de mo-DC's analisadas e estimuladas com VEs de grupo controle (DC / VE CTRL), SRAG (DC / VE SRAG) e COVID-19 (DC / VE COV). Em todos os grupos a viabilidade foi maior de 60%.

Foi realizada análise das frequências e MFI (Intensidade Média de Fluorescência) dos marcadores fenotípicos das mo-DC's sob efeito de VEs de doadores saudáveis (DC/VE CTRL), SRAG (DC/VE SRAG) e COVID (DC/VE COV) como demonstrado nas figuras 22 e 23. A frequência de mo-DC's não estimuladas com VEs (SVE) expressando HLA-DR, CD80 e CD11c, assim como, os níveis de expressão (MFI) de HLA-DR, CD80, CD86 e CD11c nestas células foram maiores quando comparadas com os grupos estimulados por VEs CTRL, SRAG e COV (Figuras 22 e 23). As análises de mo-DC's não estimuladas por VEs foram realizadas a partir um único controle com o sangue do mesmo doador de monócitos, portanto não houve comparação estatística com os demais grupos. Observou-se que o grupo que representa as mo-DC's SVE apresentaram pontos fora da dispersão entre os grupos tratados com VEs sugerindo uma possível maturação mais efetiva de mo-DC's neste grupo. Nos grupos tratados com VEs, a frequência de mo-DC's expressando CD14, PD-L1 e CD80 foi similar (Figura 22 A, B e C, respectivamente). A frequência de mo-DCs expressando CD86 foi diminuída no grupo DC/VE COV comparado com os grupos DC/VE CTRL e DC/VE SRAG (Figura 22 D). A frequência de mo-DC's expressando HLA-DR e CD11c é menor no grupo DC/VE COV comparado com DC/VE CTRL (Figura 22 E e F, respectivamente). Foram avaliados também os níveis de expressão (MFI) das moléculas CD14, PD-L1, CD80,

CD86, HLA-DR e CD11c (Figura 23). Encontramos que as mo-DC's tem maior expressão de CD14 no grupo DC/VE COV comparado com DC/VE SRAG (Figura 23 A). A expressão de PDL-1 e CD80 pelas mo-DC's foi similar entre os grupos tratados com VEs do grupo controle, SRAG e COVID-19 (Figura 23 B e C). A molécula CD86 que é um marcador co- estimulatório e foi menos expressa nas DC/VE COV comparado com as DC/VE CTRL e DC/VE SRAG (Figura 23 D). A molécula responsável pela apresentação antigênica HLA-DR (MHC-II) também está menos expressa em DC/VE COV comparado com DC/VE CTRL (Figura 23 E) indicando um certo grau de imaturidade destas células. Por outro lado, a expressão de CD11c foi maior tanto em DC/VE SRAG quanto em DC/VE COV comparados ao grupo DC/VE CTRL (Figura 23 F), indicando que possivelmente a COVID-19 influencia na maturação e fenótipo de mo-DC's e sugere que as DC's após exposição aos antígenos de doenças respiratórias agudas adquirem maior capacidade de captação, visto que o CD11c está relacionado com o aumento da fagocitose *in vitro* quando ligado à proteína do complemento (CR3) (BILSLAND *et al.*, 1994; VORUP –JENSEN *et al.*, 2007) .

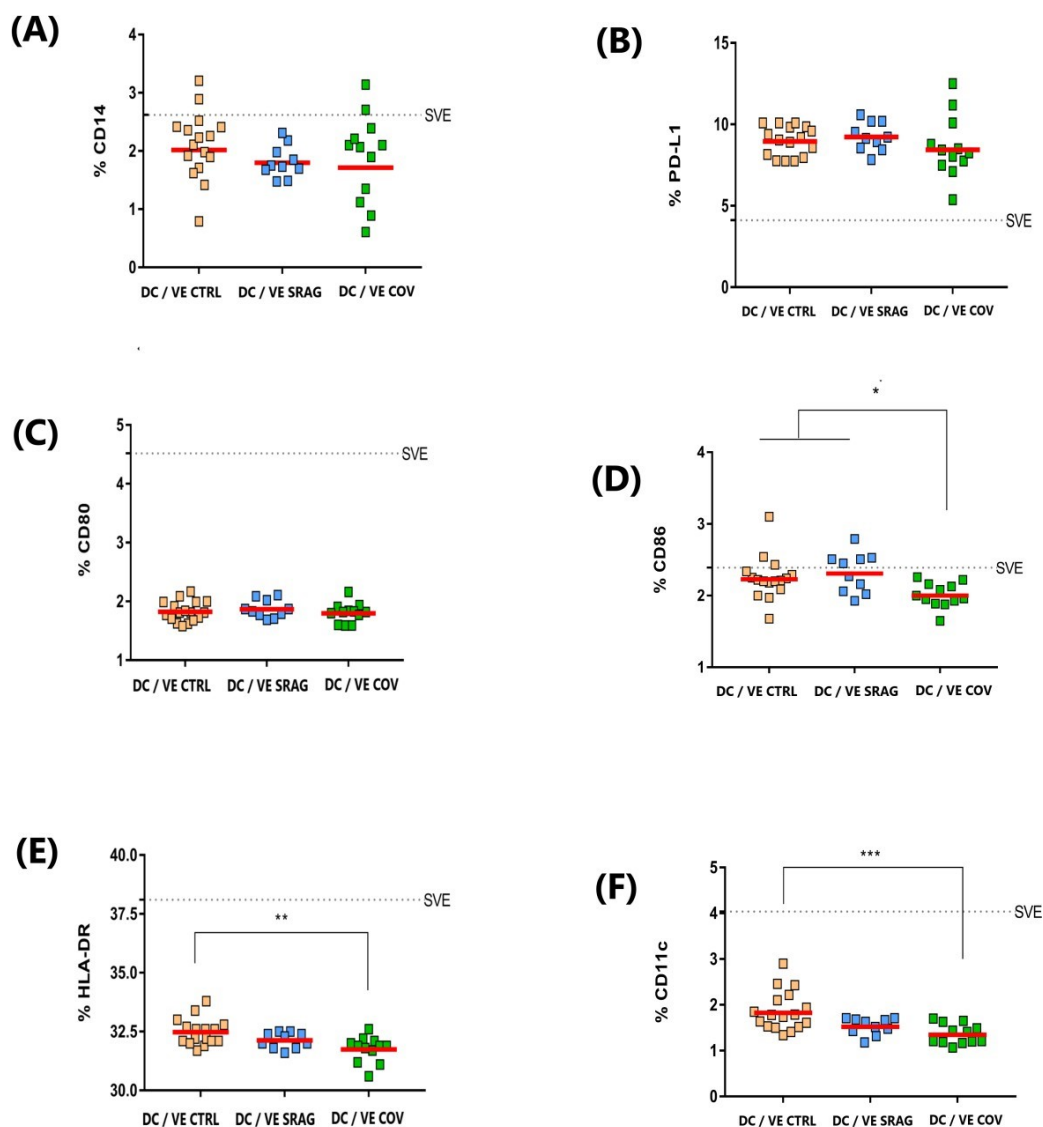


Figura 22 – Frequência e expressão de marcadores em mo-DC's. As Mo-DCs foram diferenciadas com as citocinas IL-4 e GM-CSF (50ng/mL) cultivadas sob influência de VEs isoladas de grupo controle (DC / VE CTRL.), SRAG (DC / VE SRAG) e COVID-19 (DC / VE COV) logo no primeiro dia de diferenciação. A linha tracejada representada nos gráficos indica a frequência de mo-DC's expressando cada marcador avaliado na ausência de VEs (SVE). (A) Frequência de mo-DC's CD14⁺. (B) Frequência de mo-DC's PD-L1⁺. (C) Frequência de mo-DC's CD80⁺. (D) Frequência de mo-DC's CD86⁺. (E) Frequência de mo-DC's HLA-DR⁺. (F) Frequência de mo-DC's CD11c⁺. As análises foram realizadas pelo teste estatístico ANOVA seguidas pelo teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. A linha vermelha nos gráficos representa a média geométrica entre as amostras de cada grupo.

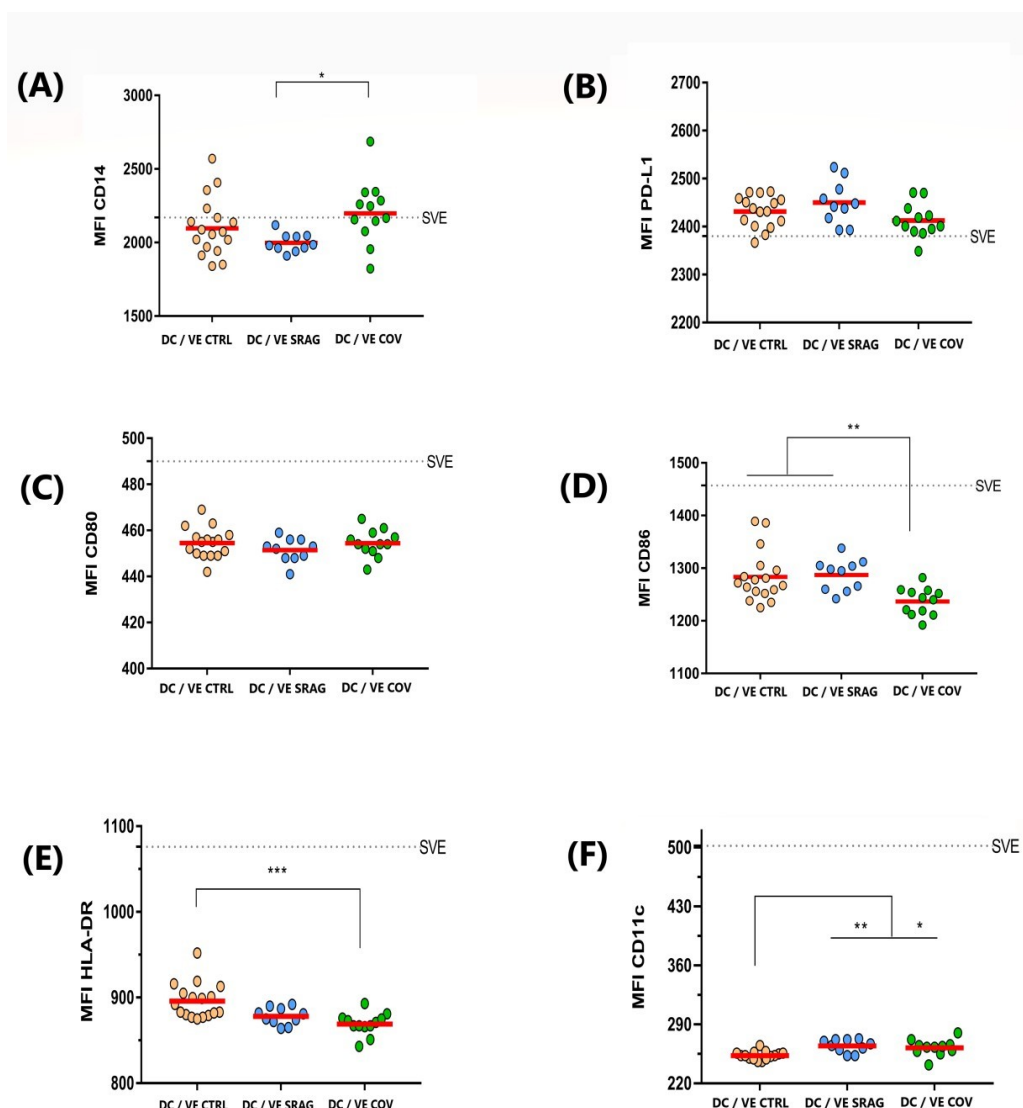


Figura 23 – Análise dos níveis de expressão dos marcadores em mo-DC's. As Mo-DCs foram diferenciadas com as citocinas IL-4 e GM-CSF (50ng/mL) cultivadas sob influência de VEs isoladas de grupo controle (DC / VE CTRL.), SRAG (DC / VE SRAG) e COVID-19 (DC / VE COV) logo no primeiro dia de diferenciação. A linha tracejada representada nos gráficos indica o nível de expressão (MFI) de cada marcador avaliado em mo-DC's na ausência de VEs (SVE) (A) MFI de CD14 expresso em mo-DC's. (B) MFI de PD-L1 expresso em mo-DC's. (C) MFI de CD80 expresso em mo-DC's. (D) MFI de CD86 expresso em mo-DC's. (E) MFI de HLA-DR expresso em mo-DC's. (F) MFI de CD11c expresso em mo-DC's. As análises foram realizadas pelo teste estatístico ANOVA seguidas pelo teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. A linha vermelha nos gráficos representa a média geométrica entre as amostras de cada grupo. MFI (intensidade média de fluorescência).

As DC's foram descobertas e descritas pela primeira vez na década de 70, pela equipe do professor Ralph Steinmann. Essas células possuem uma grande importância na conexão entre a imunidade inata e adquirida, e a partir de sua descoberta, cada vez mais têm sido

estudadas suas funções como, por exemplo, seu papel em infecções diversas e autoimunidade. As DC's são células apresentadoras de antígeno profissionais que reconhecem antígenos através de seus receptores de reconhecimento padrão (PRR's) como os TLR's, processando-os e após estímulos que desencadeiam sua maturação (PAMP's ou DAMP's), se tornam muito eficazes em apresentar e estimular linfócitos T naïve, gerando respostas imunes específicas e direcionadas ao patógeno (ABBAS *et al.*, 2014; GRANUCCI *et al.*, 2008). Células dendríticas ativadas mudam o seu fenótipo conforme o estímulo recebido podendo apresentar aumento da molécula de MHC-II, responsável pela apresentação antigênica, assim como, de moléculas co-estimulatórias como CD86, CD80, CD40 e o receptor de quimiocina CCR7 se tornando uma DC inflamatória, com maior capacidade de migração para os linfonodos (HEMMI, AKIRA., 2005; NAKANO *et al.*, 2009; SEGURA, AMIGORENA., 2013), como também podem apresentar papel tolerogênico, com a supressão de seus marcadores de ativação, regulando a resposta imune. No presente trabalho, observaram-se altos níveis de expressão de marcadores fenotípicos de mo-DC's maduras em mo-DC's SVE mesmo quando comparadas ao grupo controle (DC/VE CTRL). Sabe-se que as VEs usadas neste estudo derivam-se de doadores distintos do indivíduo doador de monócitos, portanto, as VEs já se apresentam como alogênicas carregando potenciais antígenos diversos como as próprias moléculas HLA-DR derivadas de seus doadores e podem potencialmente causar imunomodulação mesmo na ausência de condições patológicas.

DC's com fenótipo tolerogênico tendem a menor expressão de marcadores co-estimulatórios e MHC-II, produção de citocinas anti-inflamatórias (TGF β , IL-10) e super-regulação de moléculas inibitórias (PD-L1, CD95L) e possível indução de apoptose em linfócitos T (LIU, CAO., 2015; MORANTE-PALACIOS *et al.*, 2021). Na literatura ainda não há uma definição concisa entre a denominação de DC's tolerogênicas ou reguladoras, sendo ambos os termos usados para se referir a DC's que possuem fenótipo “imaturo” capazes de estimular supressão da resposta inflamatória de algumas formas, como menor estímulo de células T imaturas devido a perda de capacidade de migração, deleção ou diminuição de sua capacidade de desencadear o segundo sinal de resposta através de co-estimulação (B7), indução de apoptose em linfócitos, bem como a secreção de citocinas anti-inflamatórias que atuarão no microambiente impedindo a resposta e ativação de linfócitos (ANDERSON *et al.*, 2008; PASSERI *et al.*, 2021). As DC's reguladoras apresentam menores níveis de MHC II e marcadores co-estimulatórios, maiores níveis de CD11b, secreção de IL-10 e TGF β e a capacidade de indução de células T reguladoras, no entanto não há um consenso acerca de um fenótipo estabelecido para esta população de DC's (LI *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2020).

Atualmente, estudos mostram que DC's tolerogênicas já são associadas ao câncer inibindo uma resposta antitumoral pela supressão de linfócitos T (MA *et al.*, 2012; SHURIN *et al.*, 2013). Como uma estratégia de escape do sistema imune, alguns patógenos levam a uma desregulação da resposta resolutiva levando a cronificação de algumas doenças, por exemplo, o vírus da hepatite C, vírus do herpes simplex (HSV), como também o HIV, que atuam impedindo diretamente a maturação de DC's e consequentemente seu padrão de secreção de citocinas pró-inflamatórias (CHENTOUFI *et al.*, 2012; PACANOWISKI *et al.*, 2001; SAROBE *et al.*, 2003). No contexto de doenças causadas por parasitas como a infecção por *Leishmania* e *Trypanossoma*, estudos mostram que as DC's tolerogênicas podem desempenhar um importante papel para a manutenção do estágio crônico das doenças desencadeadas por estes agentes etiológicos sendo induzidas a promover a expansão de Tregs *in vitro* e produzir citocinas anti-inflamatórias, respectivamente (KAUTZ-NEU *et al.*, 2011; PONCINI *et al.*, 2008; SCHMIDT *et al.*, 2012).

No contexto da infecção pelos Coronavírus como o MERS-CoV (PROMPETCHARA *et al.*, 2020) e SARS-CoV-2 já se é estabelecido que algumas linhagens de DC's desenvolvem uma disfunção de sua maturação com a sub regulação de marcadores co-estimulatórios e MHC-II na presença da doença, que pode ser atribuída a uma estratégia de evasão viral, embora, segundo Bocherding e colaboradores (2021), essas células não sofram impedimento em sua migração para os linfonodos (BORCHERDING *et al.*, 2021; BORGES *et al.*, 2021; CHU *et al.*, 2014; SPIEGEL *et al.*, 2006; ZIEGLER *et al.*, 2005). As VEs adicionadas na diferenciação de monócitos em células dendríticas podem carrear algumas moléculas que potencialmente tenham influência na modulação dessas células como os miRNAs. Alguns estudos têm mostrado que miRNA's e longos RNA's não codificantes (lncRNA's) possuem capacidade de impedimento da maturação em DC's, como o lncDC e os miRNA'S: miR-155, miR-27, miR-22, miR-146-a, sendo todos estes miRNA's relatados, já encontrados em VEs/exossomos em estudos prévios (BAI *et al.*, 2012; CEPPI *et al.*, 2009; DUNAND- SAUTHIER *et al.*, 2011; DUECK *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2019; MIN *et al.*, 2012; NAHAND *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2014; YE *et al.*, 2021; ZHENG *et al.*, 2021), enquanto maiores níveis do miR-30b é encontrado em DC's regulatórias (SU *et al.*, 2013). Em dados prévios derivados do nosso grupo de estudos, os miRNA's miR-197-3p e miR-21- 5p foram encontrados super regulados em VEs de pacientes apresentando infecção por SARS-CoV-2 em quadros moderado e grave de COVID-19 pertencentes ao mesmo grupo de amostras usadas no presente trabalho (dados não publicados). Segundo Shadbad *et al.* (2022), o miR-197-3p está associado com a inibição de PD-L1 em células dendríticas associadas ao

câncer de pulmão, diminuindo sua capacidade de estimular a exaustão de linfócitos T CD8⁺ via ligação PD-1/PD-L1. O miR-21-5p é um miRNA com efeito imunomodulatório já estabelecido. Segundo Cui *et al.* (2017) este miRNA está relacionado com a regulação negativa de IL-12 gerando disfunção de monócitos e macrófagos em infecção por bactérias do gênero *Brucella*, como também o aumento do marcador PD-1 em linfócitos, influenciando na capacidade de combate à infecção. Este miRNA também esteve relacionado à degradação do gene de CCR7, impedindo a migração de células dendríticas e sua função, assim como, há relação de sua superexpressão com o aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias como TGFβ e IL-10 (SMIGIELSKA-CZEPIEL *et al.*, 2013). O miR21-5p também apresentou-se sub-regulado em DC's maduras nos achados de REIS *et al.* (2018).

Yang *et al.* (2020) demonstram que as mo-DCs sofrem uma redução em sua viabilidade quando infectadas *in vitro* com SARS-COV-2, revelando efeito citopático da doença nesta linhagem celular, no entanto, este aspecto não foi observado no presente trabalho, na presença de VEs (Figura 21). Nossos achados que revelam uma menor quantidade e níveis de expressão do marcador CD86 sob o efeito de VEs derivadas da COVID-19, corroboram com achados de Zhou *et al.* (2020) que observaram menor expressão de marcadores co-estimulatórios em DC's, assim como diminuição nos níveis de Interferon nas DC's em pacientes com a doença em fase aguda e convalescentes. A sepse, condição provocada em muitos dos casos severos da COVID-19, também pode apresentar relação com o caráter fenotípico imaturo de células dendríticas (CAO, YU, CHAY, 2019; PASTILLE *et al.*, 2016).

4.4 Análise funcional das mo-DC's geradas sob o estímulo de vesículas extracelulares.

As mo-DC's tratadas com as VEs foram então co-cultivadas com linfócitos T CD4⁺ CD8⁺ obtidos por meio de sorteamento de linfócitos alogênicos (derivados de outro doador), a fim de avaliar a resposta imune adaptativa através do padrão de citocinas produzidas, assim como, pelo fenótipo de células T mediante uma reação leucocitária mista (MLR). A MLR é uma técnica de estimulação linfocitária por aloantígenos expressos pelas DC's em seus MHCs como o HLA em humanos, visando avaliar o padrão de resposta imune desencadeada pelas DC's e a capacidade das populações de linfócitos em responder ao estímulo. Deste modo, a MLR tornou-se um método muito eficaz na avaliação de indução de resposta primária desde a

década de 80. A capacidade proliferativa de linfócitos e a produção de células T citotóxicas se mostram mais evidentes na reação mista do que estímulo direto por antígenos específicos (KNIGHT *et al.*, 2011; MACATONIA *et al.*, 1989).

Como representado na Figura 10 em Materiais e Métodos, foi usada uma estratégia de análise de gates da citometria de fluxo partindo da marcação de células vivas (VIVID⁻) e células CD3⁺ para suceder com as próximas análises derivadas de cada painel. Não houve diferença significativa na viabilidade de células T em co-cultivo com mo-DC's quando comparadas entre os grupos (Figura 24). Os linfócitos T CD3⁺ vivos de todos os grupos tiveram uma baixa frequência (média geométrica abaixo de 20%), o que pode ser atribuído aos métodos de obtenção e separação, assim como, a própria indução da reação leucocitária mista (MLR).

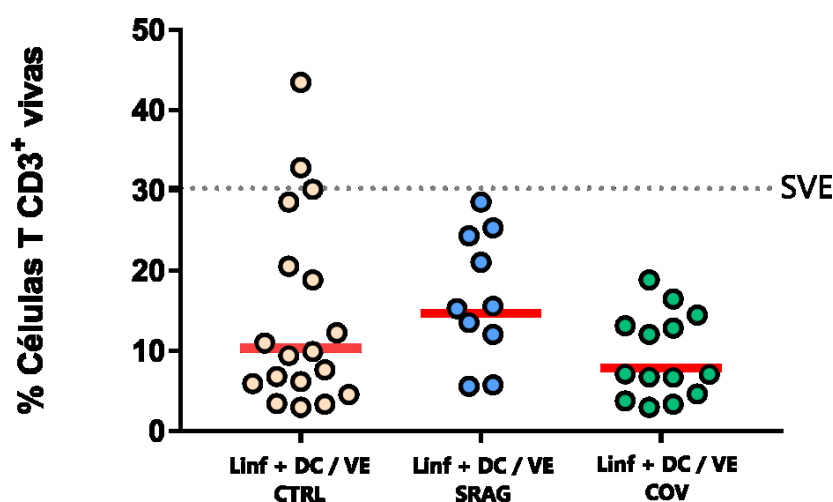
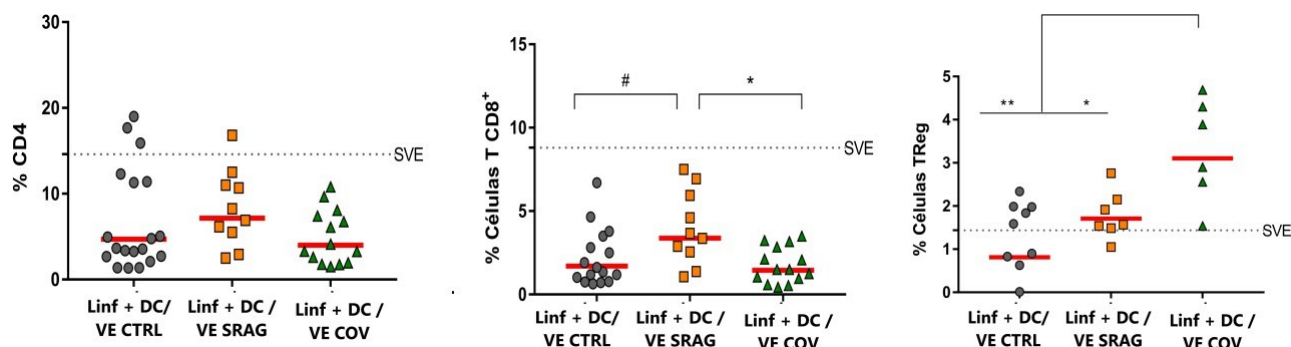


Figura 24 - Representação gráfica da viabilidade de células T CD3⁺. Frequência de células T CD3⁺ VIVID⁻ provenientes da cultura de MLR entre linfócitos T e mo-DC's tratadas com VEs de voluntários saudáveis (Linf + DC / VE CTRL), SRAG (Linf + DC / VE SRAG) ou COVID-19 (Linf + DC / VE COV), na proporção de 10:1. Fonte: Acervo pessoal.

Em nossos achados, observamos que a frequência de linfócitos T CD4⁺ é similar entre os grupos após a MLR (Figura 25 A). No entanto, a frequência de linfócitos T CD8⁺ é maior no grupo Linf + DC/VE SRAG comparado com os grupos Linf + DC/VE CTRL e Linf + DC/VE COV (Figura 25 B). Por outro lado, o grupo Linf + DC/VE COV tem maior frequência de células Tregs comparado tanto com Linf + DC/VE CTRL quanto com Linf + DC/VE SRAG (Figura 25 C) demonstrando um potencial papel das VEs de pacientes com COVID-19 na modulação do perfil das mo-DC's e consequentemente na regulação da

resposta imune adaptativa sugerindo um possível mecanismo alternativo de escape viral. Nas populações de TRegs houve um menor n amostral devido a baixas contagens celulares nas análises realizadas, portanto as análises sucederam-se apenas quando o número de células era igual ou maior que 100 células.

Figura 25 – Frequências de populações de linfócitos T CD4⁺ CD8⁺ e TRegs. No co-cultivo realizado foram



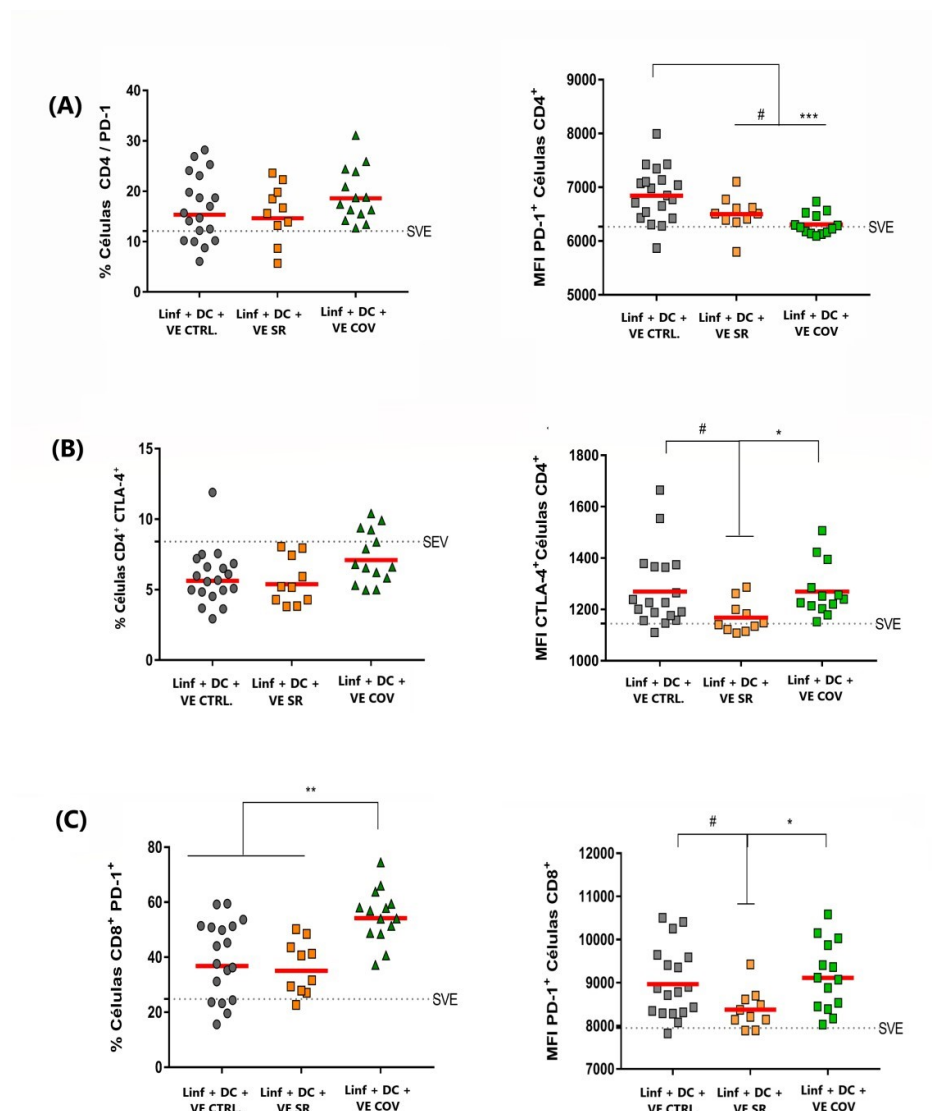
plaqueados 1×10^5 linfócitos por poço com 1×10^4 mo-DC's (10:1). Após o 5º dia as células foram marcadas e adquiridas por citometria de fluxo e em seguida analisadas baseadas em suas frequências (%). Os eixos y dos gráficos mostram os grupos analisados com linfócitos alogênicos + mo-DC's tratadas com VEs de grupo controle (Linf + DC / VE CTRL) ou SRAG (Linf + DC / VE SRAG) ou COVID (Linf + DC / VE COV), respectivamente. As análises foram realizadas pelo teste estatístico ANOVA (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001) seguidas pelo teste de Mann-Whitney (# p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001).

No contexto da COVID-19 é bem estabelecido que pode haver redução nas contagens de T CD8⁺ de acordo com o grau de severidade da doença (PEÑALOZA *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2024; ZHANG, WU., 2020). Em doenças infecciosas com origem no trato respiratório que podem ser incluídas na classificação da SRAG, a resposta de linfócitos T CD8⁺ se torna de extrema importância devido à sua atuação frente ao clearance viral com a ativação de linfócitos T citotóxicos específicos, até a sua capacidade de formação de memória levando à recuperação das infecções (CARBONE, 2023; DOHERTY *et al.*, 1997; SCHMIDT e VARGA, 2018). O aumento desta população de células pôde ser observado em nosso trabalho, onde houve maior produção de T CD8⁺ após o co-cultivo com mo-DC's estimuladas com VEs de indivíduos classificados como SRAG. As VEs podem exercer um papel fundamental para manutenção do estímulo de linfócitos T como, por exemplo, através de seu efeito prévio em células dendríticas. Este aspecto pode ser discutido após nossas evidências de modulação no fenótipo e consequentemente, na função das células dendríticas que podem ter se tornado pouco capazes de estimular uma resposta efetiva de linfócitos T CD8⁺, assim como, a produção de linfócitos T reguladores pode ocasionar redução funcional de T CD8⁺.

(YANG *et al.*, 2024). Vários estudos têm sido conduzidos nos últimos anos mostrando a capacidade de DCregs induzirem a produção de Tregs e alguns mecanismos que contribuem para a produção/diferenciação destas células, como por exemplo, a produção de IL-10 e TGF-beta por DC's e a diferenciação de DC's *in vitro* estimuladas por ácido retinóico gerando uma linhagem capaz de estimular Tregs (CARRIER *et al.*, 2007; DAWICKI *et al.*, 2017; GORDON *et al.*, 2014; NESS *et al.*, 2021; RITPRAJAK *et al.*, 2019; SCHULKE, 2018; THOMSON *et al.*, 2016). A relação entre DCregs e Tregs possui um efeito feedback já evidenciado por Shevach (2009), onde células T reguladoras (Fox-p3⁺) podem manter a imaturidade e reduzir o nível de expressão de moléculas apresentadoras de antígenos em APCs. Sendo assim, em nossos resultados, a maior frequência de linfócitos Treg pode ser atribuída ao estímulo produzido por DC's com fenótipo regulador/tolerogênico.

Em seguida, verificou-se a expressão das moléculas PD-1 e CTLA-4 nas células T CD4, CD8 e Tregs. PD-1 é uma conhecida molécula inibitória em linfócitos, impedindo sua ativação por meio de sua ligação com seu ligante em APCs (PDL-1). CTLA-4 exerce papel regulatório em linfócitos sendo antagonista de CD28 e induz a tolerância periférica. Devido às condições da MLR, envolvendo linfócitos alogênicos, o marcador PD-1 foi muito frequente em linfócitos no geral apresentando uma média acima de 10% em todas as condições experimentais. Além disso, observamos diferenças importantes na frequência ou MFI de PD-1 pelos linfócitos T CD4, CD8 e Tregs. Apesar de não haver diferenças na frequência de células T CD4 PD1⁺, nota-se uma diminuição na MFI de PD-1 em células T CD4 no contexto de Linf + DC / VE SRAG e Linf + DC / VE COV comparado com Linf + DC / VE CTRL (Figura 26 A). Somando-se a isso, encontramos aumento na frequência de linfócitos T CD8 PD1⁺ no grupo Linf + DC / VE COV comparados com os demais grupos Linf + DC / VE CTRL e Linf + DC / VE SRAG (Figura 26 C). Ainda, o MFI de PD1 nos linfócitos T CD8 proveniente do grupo Linf + DC / VE COV e Linf + DC / VE CTRL é maior comparado com Linf + DC / VE SRAG (Figura 26 C). Apesar de não haver diferenças na frequência de células Tregs PD1⁺ entre os grupos, a MFI de PD1 das Tregs do grupo Linf + DC / VE COV é menor comparado com o Linf + DC / VE SRAG (Figura 26 E). A frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando PD-1 foi consideravelmente maior quando expostos às Mo-DC's reguladas por VEs de portadores da COVID-19, demonstrando tendência à exaustão celular nestas células. O CTLA-4 é uma importante molécula regulatória expressa em linfócitos T, após a MLR o grupo Linf + DC / VE COV apresentou maior frequência de células T CD4 e CD8 CTLA-4⁺ comparado com os demais grupos Linf + DC / VE CTRL e Linf + DC / VE SRAG (Figura 26 B e D, respectivamente). Mas quando verificamos o nível de expressão de CTLA-4 em cada

célula, encontramos menor expressão de CTLA-4 nos linfócitos T CD4 do grupo Linf + DC / VE SRAG comparado com os demais grupos Linf + DC / VE CTRL e Linf + DC / VE COV (Figura 26 B), e com relação ao MFI de CTLA-4 em linfócitos T CD8 não houve diferença entre os grupos analisados (Figura 26 D). Estes achados corroboram com a hipótese de indução de regulação imunológica derivada destas VEs isoladas de infectados por SARS- CoV-2. Com relação as células Treg, não encontramos diferenças importantes na frequência de Tregs CTLA-4⁺ ou na MFI de CTLA-4 das Tregs entre os grupos avaliados (Figura 26 F).



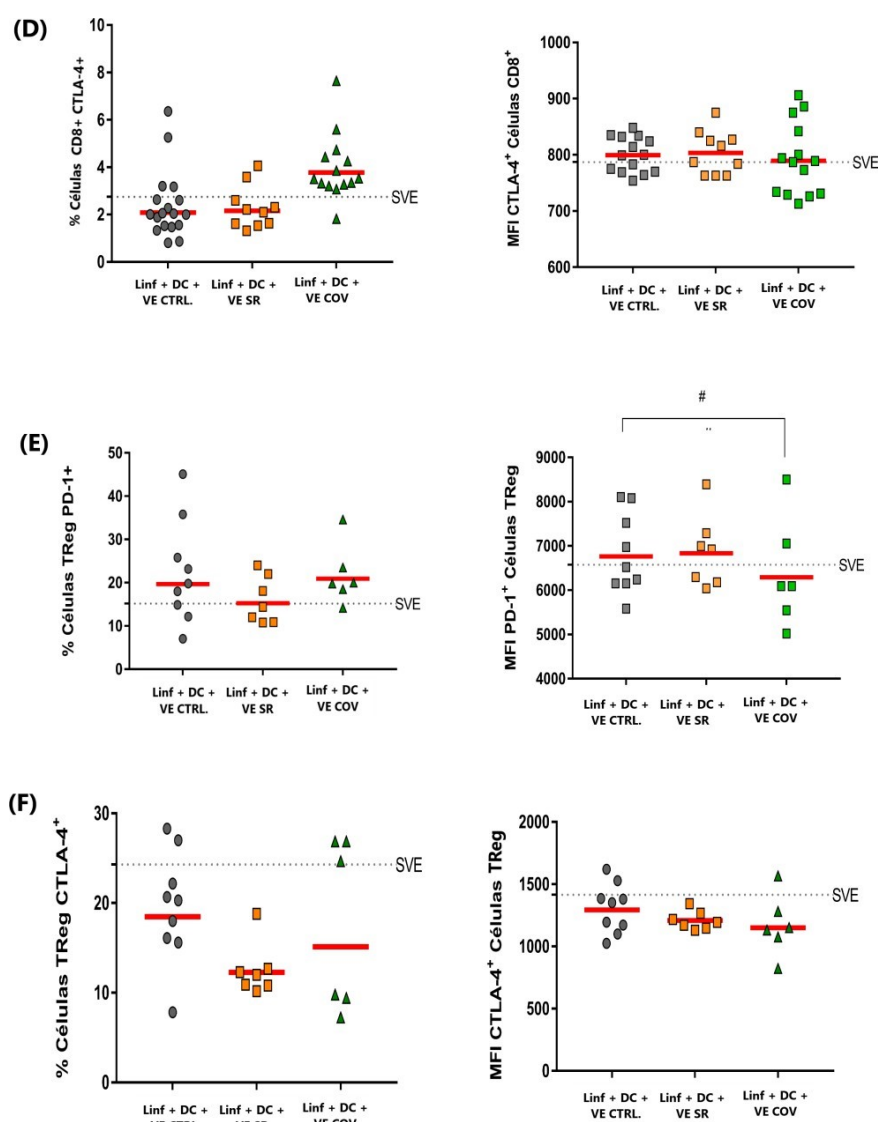


Figura 26 – Expressão de CTLA-4 e PD-1 em linfócitos T CD4, CD8 e Tregs em co- cultivo com mo-DC's.

Para realização da MLR foram plaqueados 1×10^5 de linfócitos por poço com 1×10^4 mo-DC's (10:1). Após o 5º dia de co-cultivo, as células foram marcadas e adquiridas por citometria de fluxo e em seguida analisadas baseadas em suas frequências (%) e padrões de expressão de marcadores (MFI). Os eixos y dos gráficos mostram os grupos analisados com linfócitos alogênicos + mo-DC's tratadas com VEs de grupo controle (Linf + DC / VE CTRL) ou SRAG (Linf + DC / VE SRAG) ou COVID (Linf + DC / VE COV), respectivamente. As análises foram realizadas pelo teste estatístico ANOVA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) seguidas pelo teste de Mann-Whitney (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$).

Neste trabalho foi avaliado o padrão de expressão de marcadores como PD-1 e CTLA-4 nas subpopulações de linfócitos alogênicos co-cultivados com mo-DC's após estímulo com VEs de grupo controle, SRAG e COVID-19 (Figura 26). O marcador PD-1 (*Programmed Cell Death 1*) é uma importante proteína de checkpoint imunológico em linfócitos. Sua função principal é inibitória quando associada ao seu ligante em APC's, o PD-L1, deste modo, atua impedindo a resposta efetora específica de linfócitos T contra antígenos, levando estas células à exaustão imunológica e consequentemente, podendo levar à morte celular. Esta proteína é amplamente importante no contexto do câncer pois atualmente o uso de seus inibidores é uma das estratégias usadas no combate às células tumorais. (CHINAI *et al.*, 2015; RIELLA *et al.*, 2021; SUNSHINE, TAUBE. 2015). Em células T CD4⁺ houve uma diminuição geral na expressão deste marcador na presença de VEs derivadas de indivíduos portadores de SRAG e COVID-19, evidenciando uma possível atividade efetora aumentada nestas células em resposta à infecção viral, por outro lado, há um aumento na frequência de T CD8⁺ expressando PD-1 no grupo de DC's com VEs derivadas da COVID-19, sugerindo que VEs de COVID-19 podem ter modulado as mo-DC's de maneira que induza a exaustão das células T citotóxicas. Paralelo a este achado, os níveis de expressão (MFI) de PD-1 em T CD8⁺ no grupo estimulado com VEs de SRAG está diminuído em relação ao grupo controle e COVID-19, o que pode indicar que no contexto de SRAG não COVID-19 a atividade funcional das células T citotóxicas não está comprometida. No presente estudo, as células Tregs apresentam menor expressão de PD-1 evidenciando seu grau de ativação. Na COVID-19, o eixo PD-1/PD-L1 se encontram desregulados e há potencial aumento na exaustão de linfócitos em pacientes com casos severos da doença (BELLESI *et al.*, 2020; DIAO, CHEN. 2020; R BONAN *et al.*, 2022). Segundo HU *et al.* (2021), em pacientes recuperados de COVID-19, após um ano pode haver a presença de células T CD4⁺ INF γ ⁺ PD-1⁺ gerando exaustão desta linhagem após estímulos repetidos de reinfecção na ausência ou presença de sintomas. Moléculas carregadas por exossomos e microvesículas também podem promover sinalização em linfócitos estimulando-os a expressar determinadas proteínas. Referente à proteína PD-1, Cheng *et al.* (2022) mostram que lncNDEPD1 (um RNA longo não codificante) é capaz de se ligar ao miR-3619-5p e juntos inibem a degradação do mRNA de PDCD1 e consequentemente aumentam os níveis de PD-1 nos linfócitos. Tian *et al.* (2022) também concluíram que o RNA circular circ001678 abriga o miR-326 que estimula a produção da proteína ZEB1, importante para o estímulo de imuno checkpoints, como PD-1.

A proteína CTLA-4 é um receptor com função inibitória em linfócitos T com especificidade a receptores da família B7 em APC's (CD80, CD86) e é importante na

manutenção da tolerância periférica por ser o principal regulador negativo de resposta imune de células T (TEFT *et al.*, 2006). Já é estabelecido que células T ativadas e na ausência de expressão de CTLA-4 se tornam mais responsivas após estímulo, com níveis de proliferação aumentados, secreção de INF γ , IL-4, GM-CSF, dentre outros (TIVOL *et al.*, 1995). CTLA-4 e CD28 são proteínas homólogas e compartilham dos mesmos ligantes naturais (família B7), porém, CTLA-4 possui uma afinidade muito maior com seus ligantes do que CD28 revelando um mecanismo natural de controle e manutenção da homeostase (LINSLEY *et al.*, 1994). Dentre os membros da família B7, CD80 possui uma maior afinidade com CTLA-4 (inibitório) e CD86 com o receptor CD28 (estimulatório) (COLLINS *et al.*, 2002; MERWE, DAVIS. 2003). Sendo assim, nossos achados sugerem que a baixa expressão de CD86 em mo-DC's sob estímulo de VEs derivadas de pacientes com COVID-19, assim como, a maior frequência na expressão de CTLA-4 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ alogênicos estão relacionados e reforçam a hipótese de indução de regulação por meio dessas VEs. A presença de CTLA-4 também pode ser um fator impeditivo para a maturação de DC's em estágio imaturo, o que revela um efeito que se retroalimenta, pois a presença de DC's em estágio imaturo também mantém a estabilidade de células T reguladoras (MORTEZAEE, MAJIDPOOR. 2020; ZHANG *et al.*, 2020). Atualmente estudos têm sido conduzidos acerca do papel de potenciais inibidores de *imuno checkpoint* no contexto da COVID-19 (TORKI *et al.*, 2023). Ochoa *et al.* (2023) revelam que pacientes com insuficiência de CTLA-4 não desenvolveram o estado severo da doença. Condizente aos nossos achados, na COVID-19, CTLA-4 também se mostra positivamente regulado principalmente quando associado a estágios mais agravados (ZAHARAN *et al.*, 2022), aspecto observado em nosso trabalho que incluem casos de óbitos pela doença.

Segundo Morelli *et al.* (2004), DC's imaturas se mostram mais capazes de realizar internalização exossomal do que DC's maduras, o que torna a via de comunicação destas células mais facilitada através da sinalização estabelecida por VEs, como também, favorece a manutenção da regulação periférica. Através dos resultados obtidos no presente trabalho, a partir da regulação motivada pela presença de VEs de pacientes com COVID-19 moderada e grave em células dendríticas derivadas de monócitos há um efeito cascata onde as Mo-DC's são impedidas de seu amadurecimento completo nestas condições e desencadeiam o estímulo de uma sublinhagem de linfócitos T reguladores, assim como, afetam diretamente a atividade efetora de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

A produção de IL-10 foi avaliada nas populações de linfócitos Tregs com o objetivo de observar se houve modulação funcional destas células através do co-cultivo com mo-DC's

moduladas com VEs sob diferentes condições. Houve aumento na frequência de Tregs produtoras de IL-10 em MLR de linfócitos T alogênicos com mo-DC's sob estímulo com VEs do grupo SRAG comparado as mo-DC's estimuladas com VEs do grupo controle, porém o mesmo não foi observado quando utilizado VEs grupo COVID-19 (Figura 27 A). E não encontramos diferenças nos níveis de produção de IL-10 pelas Tregs entre os grupos avaliados (Figura 27 B).

Com o objetivo de se entender sobre os possíveis efeitos causados nos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ alogênicos co-cultivados com as mo-DC's neste trabalho, houve a análise da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-2, IFN γ e TNF e a citocina anti-inflamatória IL-10 pelos linfócitos T. Não encontramos diferenças na frequência de células T CD4 IL-2⁺ ou IL-10⁺, ou na MFI de IL-2 ou IL-10 produzidos pelos linfócitos T CD4 nos grupos avaliados (Figura 28 A e B, respectivamente). Apesar de não haver diferença entre os grupos com relação à frequência de células T IFN γ ⁺ ou TNF⁺, observamos que a expressão de IFN γ e TNF pelos linfócitos T está diminuída no grupo Linf + DC / VE COV comparado aos grupos Linf + DC / VE SRAG e Linf + DC / VE CTRL em linfócitos T CD4⁺, respectivamente (Figura 28 A e B, respectivamente). Além disso, apesar de não haver diferença entre os grupos com relação à frequência de linfócitos T CD8 IL-2⁺, encontramos que a expressão de IL-2 pelas células T CD8 está diminuída no grupo Linf + DC / VE COV comparado aos grupos Linf + DC / VE CTRL (Figura 29 A). Por fim, com relação à frequência ou nível de expressão das citocinas IL-10, IFN γ e TNF pelas células T CD8 não encontramos diferenças entre os grupos analisados (Figura 29 B, C e D, respectivamente).

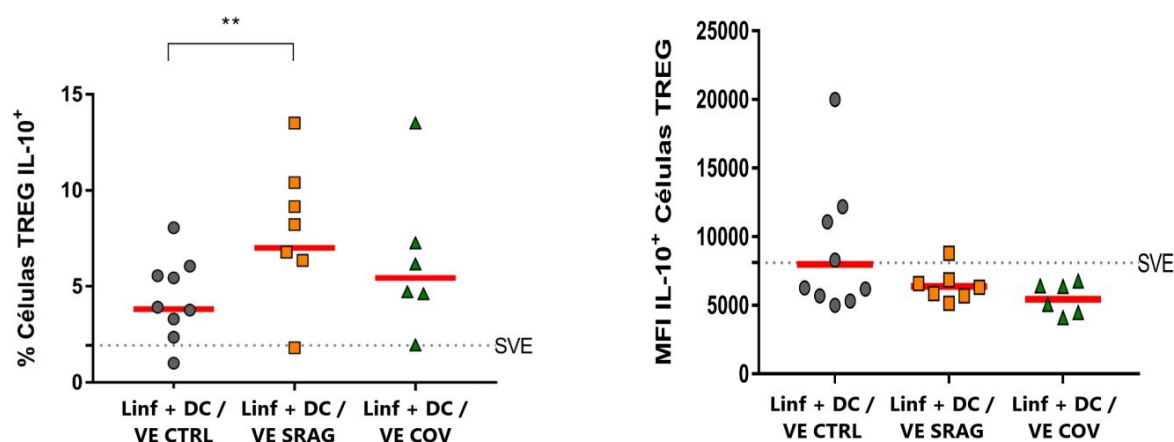


Figura 27 – Produção de citocina IL-10 em linfócitos Tregs. Para avaliação da produção de citocina IL-10 pelas Tregs, no 5º dia da MLR, com 1×10^5 de linfócitos alogênicos e 1×10^4 mo-DC's (10:1) por poço, foi adicionado Brefeldina A (BFA) nas últimas 12 horas de cultivo. Em seguida, as células foram marcadas, adquiridas por citometria de fluxo e analisadas baseadas em suas frequências (%) e padrões de expressão de marcadores (MFI). Os eixos y dos gráficos mostram os grupos analisados com linfócitos alogênicos + mo-DC's tratadas com VEs de grupo controle (Linf + DC / VE CTRL) ou SRAG (Linf + DC / VE SRAG) ou COVID (Linf + DC / VE COV), respectivamente. As análises foram realizadas pelo teste estatístico ANOVA (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) seguidas pelo teste de Mann-Whitney (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$).

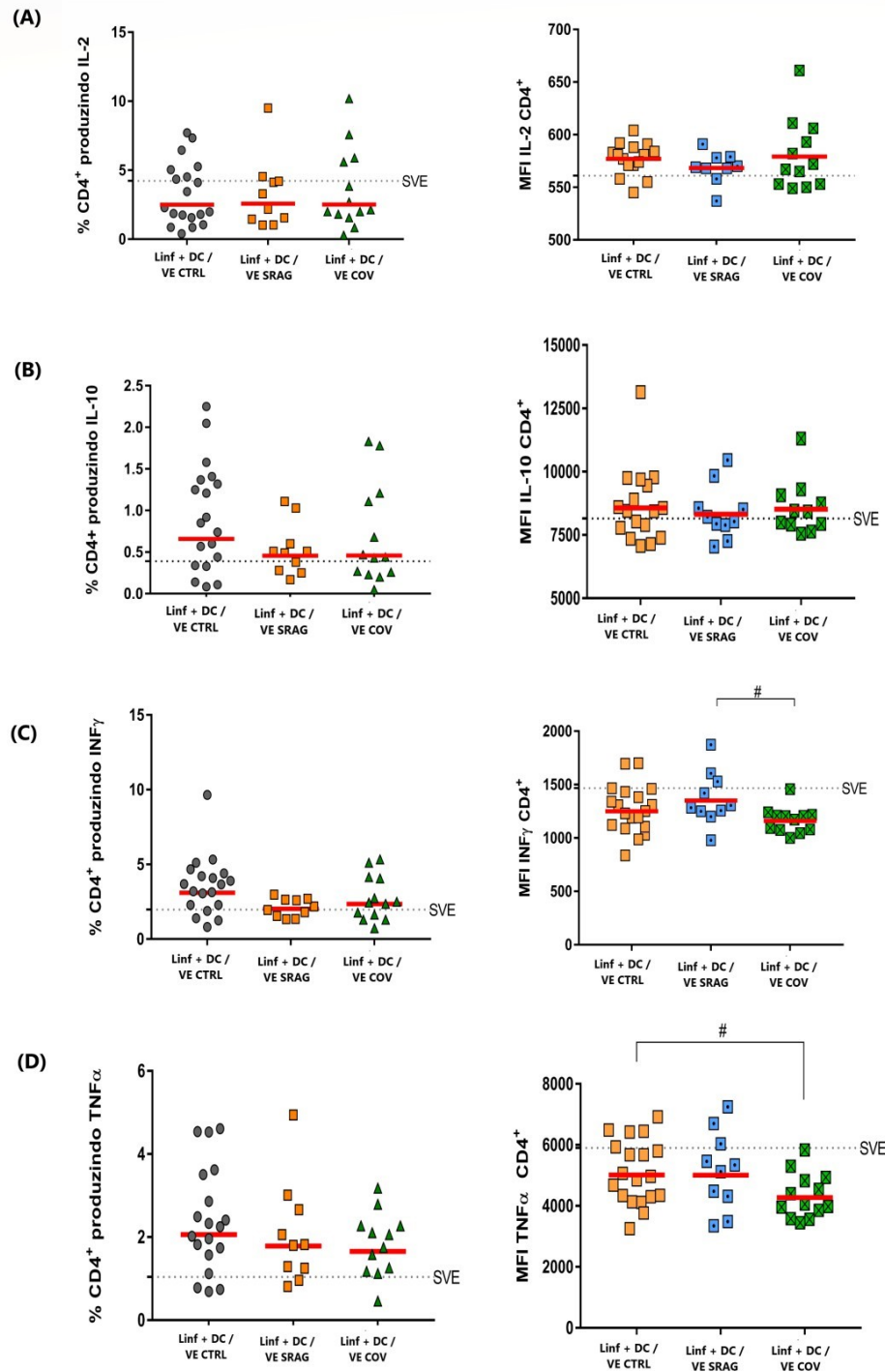


Figura 28 – Produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺. Para avaliação da produção de citocina IL-2 (A), IL-10 (B), IFN_γ (C) e TNF_α (D) pelos linfócitos T CD4⁺, no 5º dia da MLR, com 1×10^5 de linfócitos alogênicos e 1×10^4 mo-DC's (10:1) por poço, foi adicionado Brefeldina (BFA) nas últimas 12 horas. Em seguida, as células foram marcadas, adquiridas por citometria de fluxo e analisadas baseadas em suas frequências (%) e padrões de expressão de marcadores (MFI). Os eixos y dos gráficos mostram os grupos analisados com linfócitos alogênicos + mo-DC's tratadas com VEs de grupo controle (Linf + DC / VE CTRL) ou SRAG (Linf + DC / VE SRAG) ou COVID (Linf + DC / VE COV), respectivamente. As análises foram realizadas pelo teste estatístico ANOVA (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001) seguidas pelo teste de Mann-Whitney (# p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001).

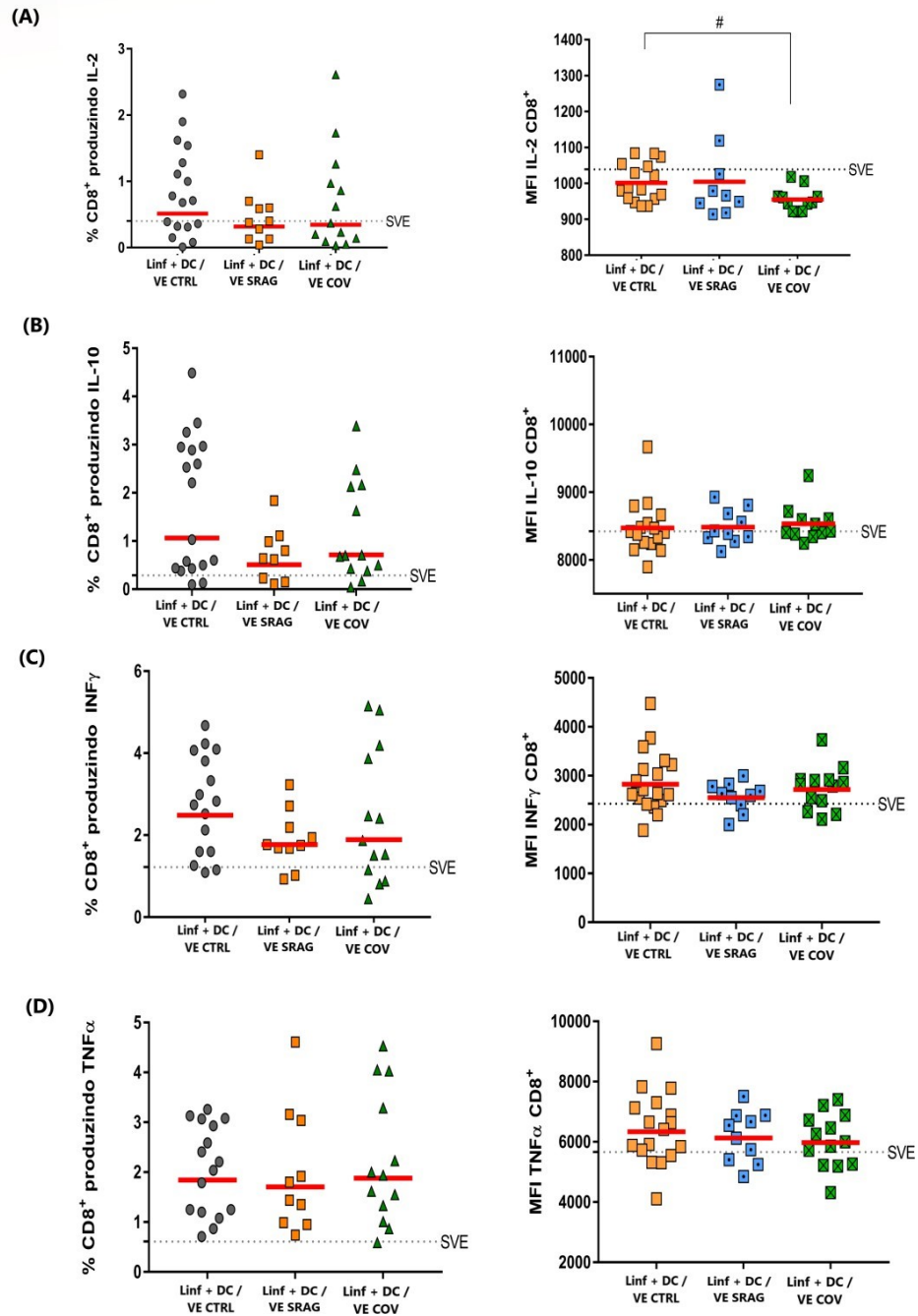


Figura 29 – Produção de citocinas por linfócitos T CD8⁺. Para avaliação da produção de citocina IL-2 (A), IL-10 (B), IFN γ (C) e TNF (D) pelos linfócitos T CD8, no 5º dia da MLR, com 1×10^5 de linfócitos alogênicos e 1×10^4 mo-DC's (10:1) por poço, foi adicionado Brefeldina (BFA) nas últimas 12 horas. Em seguida, as células foram marcadas, adquiridas por citometria de fluxo e analisadas baseadas em suas frequências (%) e padrões de expressão de marcadores (MFI). Os eixos y dos gráficos mostram os grupos analisados com linfócitos alogênicos + mo-DC's tratadas com VEs de grupo controle (Linf + DC / VE CTRL) ou SRAG (Linf + DC / VE SRAG) ou COVID (Linf + DC / VE COV), respectivamente. As análises foram realizadas pelo teste estatístico ANOVA (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001) seguidas pelo teste de Mann-Whitney (# p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001).

A produção de IL-10 em linfócitos Treg é uma das formas de supressão dessas células que ao secretar citocinas anti-inflamatórias, retroalimentam o estímulo de células reguladoras, assim como, suprimem a proliferação de linfócitos efetores (FUJIO *et al.*, 2017; SEEPATHOMNARONG *et al.*, 2022). Nossos achados evidenciaram um aumento na produção de IL-10 em Tregs oriundas da MLR com DC's tratadas com VEs de SRAG mostrando que na presença de infecções respiratórias há um potencial aumento de produção desta citocina, contribuindo para o equilíbrio da resposta inflamatória, porém o mesmo não pôde ser notado no grupo tratado com VEs de COVID-19, evidenciando que este componente regulador é importante para limitar imunopatologias e sugerindo que a ausência deste mecanismo pode ter contribuído para o estado moderado e grave nos pacientes com COVID- 19.

Atualmente se sabe que muitas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 e TNFs se encontram positivamente reguladas na COVID-19 principalmente associadas ao recrutamento e secreção em células do sistema imune inato como os neutrófilos e macrófagos (AKBARI *et al.*, 2020; HASANVAND, 2020). Nossos achados revelam que comparado à presença de VEs derivadas de outras doenças respiratórias, os linfócitos T CD4⁺ estimulados com VEs de pacientes com COVID apresentaram menores expressões de INF γ evidenciando diminuição da capacidade efetora nesta população. INF γ no contexto de infecções virais, é uma potente citocina anti-viral e seus níveis tendem a ser aumentados quando na presença de infecção (HUANG *et al.*, 2005), porém, seus níveis em pacientes com COVID-19 grave pode se tornar comprometido e até mesmo diminuído (GRIFFIN *et al.*, 2021; GADOTTI *et al.*, 2020; HOU *et al.*, 2020; LOPEZ *et al.*, 2020), enquanto que em estágio precoce da COVID- 19 estes níveis tendam a ser aumentados (GADOTTI *et al.*, 2020). Rha *et al.* (2021) relatam a baixa produção de INF γ relacionados à infecção por COVID-19 quando comparado ao vírus Influenza. Segundo Clementi *et al.* (2021), a capacidade de evasão do sistema imune já é associada a infecções virais pela família dos Coronavírus, que por sua vez, apresenta produção alterada de INFs durante a sua replicação. Nossos resultados também revelaram uma diminuição da produção da citocina TNF α em linfócitos T CD4⁺ co-cultivadas com DC/VE COV. Este resultado se contrapõe a recentes pesquisas acerca do papel de TNF α na infecção por SARS-CoV-2, pois, esta é uma importante citocina encontrada aumentada em pacientes com COVID-19, assim como, seus níveis de expressão no soro estão diretamente relacionados com o grau de gravidade da doença, sendo associada a IL-6 em diversos estudos como marcadores de predição de severidade (CHEN *et al.*, 2020; QIN *et al.*, 2020; NI *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2020). No entanto, aqui observamos que linfócitos T CD4⁺ apresentaram

altos níveis de CTLA-4 sendo potencialmente induzidos ao impedimento de suas funções efectoras o que pode explicar a diminuição de TNF e INF γ .

Em linfócitos T CD8⁺ co-cultivados com as mo-DC's sob estímulo de VEs derivadas da COVID-19, houve uma menor expressão de IL-2 comparado com o grupo controle. IL-2 é uma importante citocina inflamatória que possui uma importante função na maturação e ativação de linfócitos T, assim como, estimula outras células do sistema imune. Nos linfócitos ativados, a produção e secreção de IL-2 também atua diretamente na maturação de plasmócitos (células B de memória) (HUSSEL *et al.*, 1996; OPENSHAW *et al.*, 2003). Em linfócitos T CD8⁺, a produção está relacionada a evolução de um fenótipo de memória nestas células, assim como, resistência à exaustão, sendo assim, estas células desenvolvem um efeito protetivo evitando comprometimento de suas funções (KAHAN *et al.*, 2022). Nossos resultados corroboram com o observado por Kahan *et al.*, pois a possibilidade de haver uma menor produção de IL-2 nestas células pode estar correlacionada com o aumento dos níveis de PD-1, ou seja, quanto maior a exaustão celular, menor a produção de IL-2. Segundo Thornton *et al.* (1998), a alta absorção de IL-2 é necessária para o pleno funcionamento de Tregs, via seu receptor CD25, o que torna diminuída a disponibilidade desta citocina em células T efectoras periféricas, sendo o mRNA de IL-2 inibido nestas células. Esta observação também pode explicar o fato de, em nosso trabalho, as contagens de Tregs estarem aumentadas no ambiente estimulado por VEs derivados da COVID. As demais citocinas produzidas por linfócitos T e analisadas no presente trabalho não tiveram sua expressão alterada em comparações entre os grupos estudados. Embora tenha havido aumento na frequência de Tregs no grupo estimulado com VEs de pacientes com COVID-19, não foi detectada produção alterada de IL-10 por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, no entanto, a produção dessa citocina não foi avaliada nas mo-DC's.

O objetivo principal deste trabalho foi a avaliação dos potenciais aspectos imunorregulatórios de VEs derivadas do plasma de pacientes com COVID-19 em células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DC's) *in vitro*, e, deste modo, revela-se através das evidências encontradas que tal objetivo e seus desdobramentos foram contemplados como representado no Quadro 1.

Quadro 1 – Objetivos e suas evidências demonstradas no presente estudo.

Objetivos Específicos	Evidências
Isolar VEs a partir de plasma de pacientes com COVID-19, SRAG e doadores saudáveis (grupo controle).	As amostras de plasma foram pré selecionadas através do banco de dados do laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG seguindo os critérios de inclusão e exclusão descritos nos métodos do presente trabalho. A obtenção de VEs foi realizada através da técnica de ultracentrifugação do material seguido de filtração em filtro 0,22 µm.
Quantificar e caracterizar as VEs purificadas a partir do plasma de pacientes (COVID-19 e SRAG) e doadores saudáveis por análise de rastreamento de nanopartículas, <i>western blot</i> e microscopia eletrônica de transmissão, respectivamente.	A presença de vesículas foi validada por meio de sua caracterização, como confirmação dos marcadores CD9 e TSG101 por meio da técnica de <i>western blot</i> , assim como, visualizadas por microscopia eletrônica de transmissão e criomicroscopia. Seu tamanho médio e dispersão foram também evidenciados pela análise de rastreamento de nanopartículas. A concentração aproximada obtida de cada grupo foi cerca de 1×10^8 partículas/ml.
Avaliar e comparar entre os grupos o fenótipo de mo-DC's diferenciadas <i>in vitro</i> a partir de monócitos de doador saudável (mo-DCs) após tratamento com VEs de pacientes com COVID-19 (DC/VE COV), SRAG (DC/VE SRAG) e grupo controle (DC/VE CTRL), separadamente.	O perfil de células dendríticas foi avaliado através da técnica de citometria de fluxo, onde evidenciou-se a modulação de alguns marcadores após a exposição a VEs derivadas de pacientes com COVID-19, revelando que nessa condição há indução de um fenótipo mais imaturo, com baixa expressão de HLA-DR e da molécula co-estimulatória CD86.
Avaliar e comparar entre os grupos a atividade funcional das mo-DC's através da análise do perfil fenotípico de linfócitos T alogênicos co-cultivados com DC/VE COV, DC/VE SRAG ou DC/VE CTRL.	O perfil fenotípico de linfócitos T alogênicos co-cultivados com Mo-DC's expostas à VEs de pacientes com COVID-19 revelou um padrão regulador com maiores frequências de linfócitos Treg e menores níveis de PD-1 nas Tregs, frequências elevadas de linfócitos T CD8 PD-1+, maior frequência de linfócitos T (CD4 e CD8) CTLA-4+. Menor de produção de INFγ e TNF pelos linfócitos T CD4+ e diminuição de IL-2 em T CD8+.

Fonte: Autoria própria

5. CONCLUSÕES

As células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DC's) diferenciadas sob o estímulo de VEs de pacientes com COVID-19 têm seu fenótipo alterado, com menor expressão de HLA-DR e CD86, indicando um estado imaturo e possivelmente regulador. Mo-DC's diferenciadas sob estímulo de VEs derivadas de pacientes SRAG não apresentaram mudanças quanto aos níveis de marcadores responsáveis por apresentação antigênica e co-estimulação, o que nos conduz a hipótese de que as alterações encontradas em mo-DC's expostas as VEs de pacientes com COVID-19 moderado e grave causam alterações fenotípicas importantes, provavelmente induzidas por potenciais moléculas carregadas por estas vesículas, como longos RNAs não codificantes e miRNAs. Os linfócitos T alogênicos co-cultivados com as mo-DC's estimuladas com VEs de pacientes com COVID-19 apresentaram maior frequência de células T reguladoras, revelando uma possível modulação induzida por mo-DC's com o fenótipo regulador, capazes de induzir a formação de Tregs. Além disso, mo-DC's diferenciadas na presença de VEs de COVID-19 modularam a resposta adaptativa efetora de modo regulador, como observado pelas células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando maiores níveis de CTLA-4, assim como caráter de exaustão observado pela elevada frequência de linfócitos T CD8 PD-1⁺ e a menor produção de IL-2 pelas células T CD8. (Figura 30).

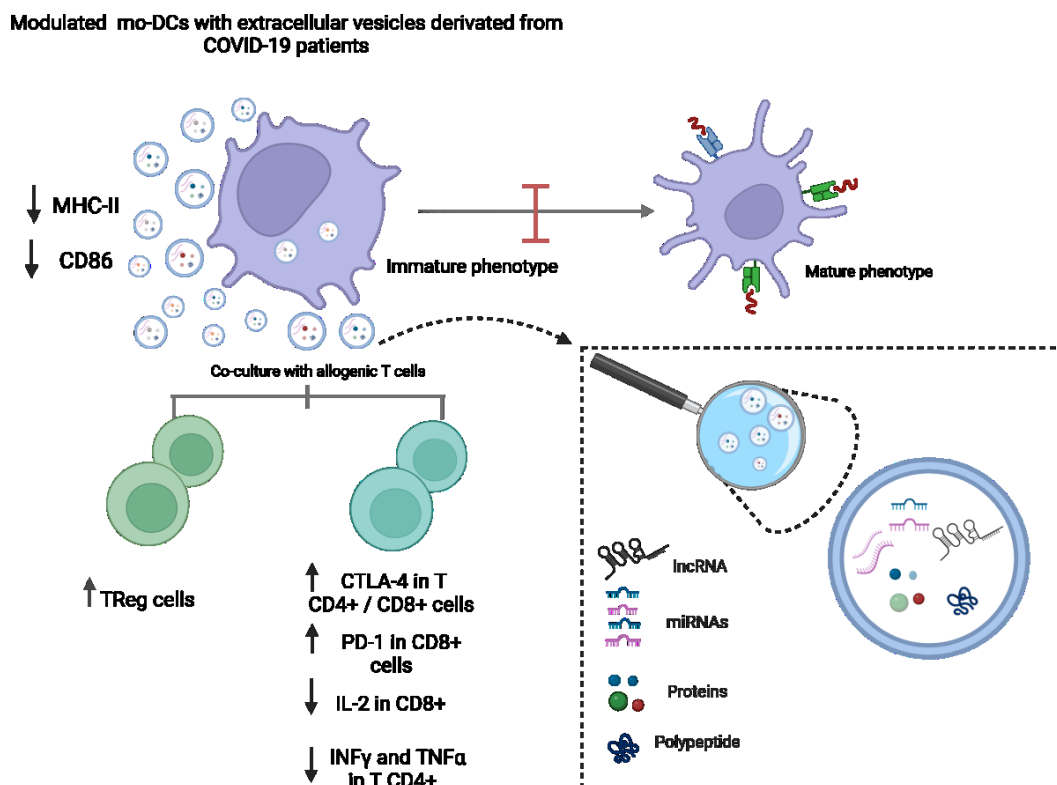


Figura 30 – Desenho conclusivo do estudo. Verificou-se que células dendríticas derivadas de monócitos (mo-DC's) sob a influência de VEs derivadas de pacientes com COVID-19 moderado e grave foram moduladas a apresentarem fenótipo imaturo, potencialmente tolerogênico, com baixa expressão de MHC-II (HLA-DR) e CD86 e induzirem o aumento de células T reguladoras, bem como, estimularem fenótipo de exaustão em linfócitos T CD8⁺ e sinais de tolerância periférica em T CD4⁺ e CD8⁺. Diversas moléculas e peptídeos podem estar envolvidos no processo de sinalização através de vesículas, como lncRNA's e miRNAs.

Diante do exposto, conclui-se que as VEs derivadas do plasma de pacientes com COVID-19 moderado e grave são capazes de induzir modulação de resposta imune como um potencial mecanismo de escape viral de SARS-CoV-2.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Basic immunology: functions and disorders of the immune system**. Elsevier Health Sciences, 2014.

AKBARI, Hamed *et al.* The role of cytokine profile and lymphocyte subsets in the severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a systematic review and meta-analysis. **Life sciences**, v. 258, p. 118167, 2020.

ALBERRO, Ainhoa *et al.* Extracellular vesicles in blood: sources, effects, and applications. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 15, p. 8163, 2021.

ALLAN, Rhys S. *et al.* Epidermal viral immunity induced by CD8 α ⁺ dendritic cells but not by Langerhans cells. **Science**, v. 301, n. 5641, p. 1925-1928, 2003.

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

ANDERSON, Amy E. *et al.* LPS activation is required for migratory activity and antigen presentation by tolerogenic dendritic cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, n. 2, p. 243-250, 2009.

ANDERSON, Meagan E.; SIAHAAN, Teruna J. Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors. **Peptides**, v. 24, n. 3, p. 487-501, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Vacinas - COVID-19**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/ptbr/assuntos/paf/coronavirus/vacinas#:~:text=Atualmente%20existem%20quatro%20formas%20para,farmac%C3%AAuticos%20e%20institui%C3%A7%C3%B5es%20de%20pesquisa>. Acesso em: 19 jun. 2022.

ARRAUD, Nicolas *et al.* Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 12, n. 5, p. 614-627, 2014.

ASHOUB, Muhammad Hossein *et al.* Extracellular microvesicles: biologic properties, biogenesis, and applications in leukemia. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 479, n. 2, p. 419-430, 2024.

BAI, Yi *et al.* Integrin CD11b negatively regulates TLR9-triggered dendritic cell cross-priming by upregulating microRNA-146a. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 11, p. 5293-5302, 2012.

BARBERIS, Elettra *et al.* Circulating exosomes are strongly involved in SARS-CoV-2 infection. **Frontiers in molecular biosciences**, p. 29, 2021.

BELZ, Gabrielle; MOUNT, Adele; MASSON, Frederick. Dendritic cells in viral infections. **Dendritic cells**, p. 51-77, 2009.

BELLESI, Silvia *et al.* Increased CD95 (Fas) and PD-1 expression in peripheral blood T lymphocytes in COVID-19 patients. **British journal of haematology**, v. 191, n. 2, p. 207- 211, 2020.

BILSLAND, C. A.; DIAMOND, Michael S.; SPRINGER, Timothy A. The leukocyte integrin p150, 95 (CD11c/CD18) as a receptor for iC3b. Activation by a heterologous beta subunit and localization of a ligand recognition site to the I domain. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 152, n. 9, p. 4582-4589, 1994.

BORCHERDING, Lukas *et al.* Impaired dendritic cell homing in COVID-19. **Frontiers in medicine**, v. 8, p. 761372, 2021.

BORGES, Rodrigo Cerqueira; HOHMANN, Miriam Sayuri; BORGHI, Sergio Marques. Dendritic cells in COVID-19 immunopathogenesis: insights for a possible role in determining disease outcome. **International Reviews of Immunology**, v. 40, n. 1-2, p. 108-125, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Covid-19: Anvisa aprova vacina da Pfizer para crianças entre 6 meses e 4 anos**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/covid-19-anvisa-aprova-vacina-da-pfizer-para-criancas-entre-6-meses-e-4-anos> Acesso em: 04 fev. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde incorpora primeiro medicamento para casos leves de Covid-19 no SUS**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/maio/ministerio-da-saude-incorpora-primeiro-medicamento-para-casos-leves-de-covid-19-no-sus> Acesso em: 19 jun. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nova estratégia de vacinação contra Covid-19 começa a valer em 1º de janeiro**. Disponível em: <https://agenciagov.ebc.com.br/noticias/202312/nova-estrategia-de-vacinacao-contracovid-19-comeca-a-valer-em-1o-de-janeiro> Acesso em: 05 fev. 2024.

BRAUN, Julian *et al.* SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. **Nature**, v. 587, n. 7833, p. 270-274, 2020.

BUDDEN, Christina F. *et al.* Inflammasome-induced extracellular vesicles harbour distinct RNA signatures and alter bystander macrophage responses. **Journal of extracellular vesicles**, v. 10, n. 10, p. e12127, 2021.

CARBONE, Francis R. Unique properties of tissue-resident memory T cells in the lungs: implications for COVID-19 and other respiratory diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 23, n. 5, p. 329-335, 2023.

CARRIER, Yijun *et al.* Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF- β T cell-transgenic mice. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 1, p. 179-185, 2007.

CASCELLA, Marco *et al.* Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). **Statpearls [internet]**, 2022.

CECHIM, Giovana, and Jose AB Chies. In vitro generation of human monocyte-derived dendritic cells methodological aspects in a comprehensive review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2019.

CEPPI, Maurizio *et al.* MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 106, n. 8, p. 2735-2740, 2009.

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

CHENG, Shaoyan *et al.* Long Noncoding RNA lncNDEPD1 Regulates PD-1 Expression via miR-3619-5p in CD8⁺ T Cells. **The Journal of Immunology**, v. 208, n. 6, p. 1483-1492, 2022.

CHENTOUFI, Aziz Alami *et al.* The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript inhibits phenotypic and functional maturation of dendritic cells. **Viral Immunology**, v. 25, n. 3, p. 204-215, 2012.

CHEONG, Cheolho *et al.* Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209⁺ dendritic cells for immune T cell areas. **Cell**, v. 143, n. 3, p. 416-429, 2010.

CHINAI, Jordan M. *et al.* New immunotherapies targeting the PD-1 pathway. **Trends in pharmacological sciences**, v. 36, n. 9, p. 587-595, 2015.

CHOUDHURI, Kaushik *et al.* Polarized release of T-cell-receptor-enriched microvesicles at the immunological synapse. **Nature**, v. 507, n. 7490, p. 118-123, 2014.

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

CHUTIPONGTANATE, Somchai; MORROW, Ardythe L.; NEWBURG, David S. Human milk extracellular vesicles: a biological system with clinical implications. **Cells**, v. 11, n. 15, p. 2345, 2022.

CLEMENTI, Nicola *et al.* Viral respiratory pathogens and lung injury. **Clinical microbiology reviews**, v. 34, n. 3, p. 10.1128/cmr. 00103-20, 2021.

COLLINS, Alison V. *et al.* The interaction properties of costimulatory molecules revisited. **Immunity**, v. 17, n. 2, p. 201-210, 2002.

COLOMBO, Marina; RAPOSO, Graça; THÉRY, Clotilde. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 30, p. 255-289, 2014.

CONITEC. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde. **Tecnologias e Diretrizes para tratamento e prevenção da Covid-19**. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/assuntos/tecnologias-e-diretrizes-para-tratamento-e-prevencao-da-covid-19> Acesso em: 04 jun. 2023.

CUI, Beibei *et al.* Brucella Omp25 upregulates miR-155, miR-21-5p, and miR-23b to inhibit interleukin-12 production via modulation of programmed death-1 signaling in human monocyte/macrophages. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 267299, 2017.

DALOD, Marc, Rabie Chelbi, Bernard Malissen, and Toby Lawrence. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. **The EMBO journal** v. 33, p.1104-1116, 2014.

DAWICKI, Wojciech *et al.* Therapeutic reversal of food allergen sensitivity by mature retinoic acid-differentiated dendritic cell induction of LAG3+ CD49b- Foxp3- regulatory T cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 5, p. 1608-1620. e3, 2017.

DIAO, Bo; CHEN, Yongwen. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 544639, 2020.

DIAS, Marcos VS; COSTA, Cristina S.; DASILVA, Luis LP. The ambiguous roles of extracellular vesicles in HIV replication and pathogenesis. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 393384, 2018.

DOHERTY, Peter C. *et al.* Effector CD4+ and CD8+ T-cell mechanisms in the control of respiratory virus infections. **Immunological reviews**, v. 159, n. 1, p. 105-117, 1997.

DUECK, Anne *et al.* A miR-155-dependent microRNA hierarchy in dendritic cell maturation and macrophage activation. **FEBS letters**, v. 588, n. 4, p. 632-640, 2014.

DUNAND-SAUTHIER, Isabelle *et al.* Silencing of c-Fos expression by microRNA-155 is critical for dendritic cell maturation and function. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 117, n. 17, p. 4490-4500, 2011.

ELKORD, Eyad, Paul E. Williams, Howard Kynaston, and Anthony W. Rowbottom. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. **Immunology** v. 114, no. 2 p. 204-212, 2005.

FERREIRA, Débora; MOREIRA, João Nuno; RODRIGUES, Lígia R. New advances in exosome-based targeted drug delivery systems. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 172, p. 103628, 2022.

FOOT, Natalie J.; KUMAR, Sharad. The role of extracellular vesicles in sperm function and male fertility. **New Frontiers: Extracellular Vesicles**, p. 483-500, 2021.

FORDJOUR, Francis K. *et al.* A shared, stochastic pathway mediates exosome protein budding along plasma and endosome membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 10, 2022.

FRANCISCHETTI, Emilio A.; FRANCISCHETTI, Aloísio; DE ABREU, Virginia G. A Emergência de um Novo Modulador Cardiovascular - A 2ª enzima de conversão da Angiotensina 2 (ECA2). **Revista da SOCERJ**, v. 18, n. 1, p. 36-40, 2005.

FUJIO, Keishi; YAMAMOTO, Kazuhiko; OKAMURA, Tomohisa. Overview of LAG-3-expressing, IL-10-producing regulatory T cells. **Emerging Concepts Targeting Immune Checkpoints in Cancer and Autoimmunity**, p. 29-45, 2017.

GADOTTI, Ana Carolina *et al.* IFN- γ is an independent risk factor associated with mortality in patients with moderate and severe COVID-19 infection. **Virus research**, v. 289, p. 198171, 2020.

GAMBARDELLA, Jessica *et al.* Exosomal microRNAs drive thrombosis in COVID-19. **MedRxiv**, 2020.

GIDARO, Antonio *et al.* Platelet Microvesicles, Inflammation, and Coagulation Markers: A Pilot Study. **Hematology Reports**, v. 15, n. 4, p. 684-695, 2023.

GONÇALVES-PEREIRA, Marcela Helena *et al.* Dysfunctional phenotype of systemic and pulmonary regulatory T cells associate with lethal COVID-19 cases. **Immunology**, v. 168, n. 4, p. 684-696, 2023.

GORDON, John R.; MA, Yanna; CHURCHMAN, Laura. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 72731, 2014.

GRANUCCI, F.; ZANONI, I.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 1683-1697, 2008.

GRIFFIN, Daniel O. *et al.* Cytokine storm of a different flavour: The different cytokine signature of SARS-CoV-2, the cause of COVID-19, from the original SARS outbreak. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 24, p. 90-92, 2021.

HABAS, Khaled *et al.* Resolution of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Expert review of anti-infective therapy**, v. 18, n. 12, p. 1201-1211, 2020.

HADJADJ, Jérôme *et al.* Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. **Science**, v. 369, n. 6504, p. 718-724, 2020.

HASANVAND, Amin. COVID-19 and the role of cytokines in this disease. **Inflammopharmacology**, v. 30, n. 3, p. 789-798, 2022.

HESSVIK, Nina Pettersen; LLORENTE, Alicia. Current knowledge on exosome biogenesis and release. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 2, p. 193-208, 2018.

HOLCAR, Marija *et al.* Enrichment of plasma extracellular vesicles for reliable quantification of their size and concentration for biomarker discovery. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 21346, 2020.

HOU, Hongyan *et al.* Immunologic memory to SARS-CoV-2 in convalescent COVID-19 patients at 1 year postinfection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 148, n. 6, p. 1481-1492. e2, 2021.

HOU, Hongyan *et al.* Using IL-2R/lymphocytes for predicting the clinical progression of patients with COVID-19. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 201, n. 1, p. 76-84, 2020.

HU, Zongqiang *et al.* Exosome-derived circCCAR1 promotes CD8⁺ T-cell dysfunction and anti-PD1 resistance in hepatocellular carcinoma. **Molecular Cancer**, v. 22, n. 1, p. 55, 2023.

HUANG, Kao-Jean *et al.* An interferon- γ -related cytokine storm in SARS patients. **Journal of medical virology**, v. 75, n. 2, p. 185-194, 2005.

HUSSELL, Tracy *et al.* Th1 and Th2 cytokine induction in pulmonary T cells during infection with respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology**, v. 77, n. 10, p. 2447-2455, 1996.

JARJOUR, Nicholas N; MASOPUST, David; JAMESON, Stephen C. T cell memory: understanding COVID-19. **Immunity**, v. 54, n. 1, p. 14-18, 2021.

JEPPESEN, Dennis K. *et al.* Extracellular vesicles and nanoparticles: Emerging complexities. **Trends in Cell Biology**, 2023.

JIANG, Kangfeng *et al.* Peripheral circulating exosome-mediated delivery of miR-155 as a novel mechanism for acute lung inflammation. **Molecular Therapy**, v. 27, n. 10, p. 1758- 1771, 2019.

JU, Yichen *et al.* The role of exosome and the ESCRT pathway on enveloped virus infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 9060, 2021.

KAHAN, Shannon M. *et al.* Intrinsic IL-2 production by effector CD8 T cells affects IL-2 signaling and promotes fate decisions, stemness, and protection. **Science immunology**, v. 7, n. 68, p. eabl6322, 2022.

KARPMAN, Diana; STÅHL, Anne-lie; ARVIDSSON, Ida. Extracellular vesicles in renal disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 13, n. 9, p. 545-562, 2017.

KAUTZ-NEU, Kordula *et al.* Langerhans cells are negative regulators of the anti-Leishmania response. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 5, p. 885-891, 2011.

KNIGHT, Stella C.; BEDFORD, Penelope A.; STAGG, Andrew J. Mixed leukocyte reactions. **Measuring Immunity: Basic Science and Clinical Practice**, p. 350, 2011.

- KORNILOV, Roman *et al.* Efficient ultrafiltration-based protocol to deplete extracellular vesicles from fetal bovine serum. **Journal of extracellular vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1422674, 2018.
- KOUREMBANAS, Stella. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. **Annual review of physiology**, v. 77, p. 13-27, 2015.
- KOVACS, Agnes *et al.* ACE2 drives dendritic cell function and neuroantigen specific immune responses. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 29, p. S19, 2013.
- KURACHI, Makoto. CD8⁺ T cell exhaustion. In: **Seminars in immunopathology**. Springer Berlin Heidelberg, 2019. p. 327-337.
- LÄSSER, Cecilia; ELDH, Maria; LÖTVALL, Jan. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 59, p. e3037, 2012.
- LI, Haiyan S. *et al.* miR-22 controls Irf8 mRNA abundance and murine dendritic cell development. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e52341, 2012.
- LI, Qian *et al.* Pulmonary stromal cells induce the generation of regulatory DC attenuating T-cell-mediated lung inflammation. **European journal of immunology**, v. 38, n. 10, p. 2751-2761, 2008.
- LIEW, Felicity *et al.* Large scale phenotyping of long COVID inflammation reveals mechanistic subtypes of disease [preprint]. **medRxiv**, doi: <https://doi.org/10.1101/2023.06.07.23291077> , 2023.
- LINSLEY, Peter S. *et al.* Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. **Immunity**, v. 1, n. 9, p. 793-801, 1994.
- LIU, Jingyuan *et al.* Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts severe illness patients with 2019 novel coronavirus in the early stage. **MedRxiv**, 2020.
- LIU, Kang; NUSSENZWEIG, Michel C. Origin and development of dendritic cells. **Immunological reviews**, v. 234, n. 1, p. 45-54, 2010.
- LONG, Quan-Xin *et al.* Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. **Nature medicine**, v. 26, n. 6, p. 845-848, 2020.
- LOW, Zheng Yao *et al.* SARS-CoV-2 non-structural proteins and their roles in host immune evasion. **Viruses**, v. 14, n. 9, p. 1991, 2022.
- LYONS, A. Bruce; PARISH, Christopher R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. **Journal of immunological methods**, v. 171, n. 1, p. 131-137, 1994.
- MA, Yang *et al.* Tumor associated regulatory dendritic cells. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2012.

- MACATONIA, Steven E. *et al.* Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro. **The Journal of experimental medicine**, v. 169, n. 4, p. 1255-1264, 1989.
- MAKIGUCHI, Tomonori *et al.* Serum extracellular vesicular miR-21-5p is a predictor of the prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. **Respiratory research**, v. 17, p. 1-15, 2016.
- MARAR, Carolyn; STARICH, Bartholomew; WIRTZ, Denis. Extracellular vesicles in immunomodulation and tumor progression. *Nature immunology*, v. 22, n. 5, p. 560-570, 2021.
- MARINELLI, Oliviero *et al.* ICOS-L as a potential therapeutic target for cancer immunotherapy. *Current Protein and Peptide Science*, v. 19, n. 11, p. 1107-1113, 2018.
- MATHIEU, Mathilde *et al.* Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 4389, 2021.
- MCGONAGLE, Dennis *et al.* The role of cytokines including interleukin-6 in COVID-19 induced pneumonia and macrophage activation syndrome-like disease. **Autoimmunity reviews**, v. 19, n. 6, p. 102537, 2020.
- MERWE, P. Anton van der; DAVIS, Simon J. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. **Annual review of immunology**, v. 21, n. 1, p. 659-684, 2003.
- MIN, S. *et al.* TGF- β -associated miR-27a inhibits dendritic cell-mediated differentiation of Th1 and Th17 cells by TAB3, p38 MAPK, MAP2K4 and MAP2K7. **Genes & Immunity**, v. 13, n. 8, p. 621-631, 2012.
- MODERBACHER, Carolyn R. *et al.* Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity. **Cell**, v. 183, n. 4, p. 996- 1012. e19, 2020.
- MOON, H. G. *et al.* Lung epithelial cell-derived extracellular vesicles activate macrophage-mediated inflammatory responses via ROCK1 pathway. **Cell death & disease**, v. 6, n. 12, p. e2016-e2016, 2015.
- MORANTE-PALACIOS, Octavio *et al.* Tolerogenic dendritic cells in autoimmunity and inflammatory diseases. **Trends in immunology**, v. 42, n. 1, p. 59-75, 2021.
- MORELLI, Adrian E. *et al.* Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. **Blood**, v. 104, n. 10, p. 3257-3266, 2004.
- MORTEZAEI, Keywan; MAJIDPOOR, Jamal. Extracellular vesicle-based checkpoint regulation and immune state in cancer. **Medical Oncology**, v. 39, n. 12, p. 225, 2022.
- NAHAND, Javid Sadri *et al.* The role of miR-146a in viral infection. **IUBMB life**, v. 72, n. 3, p. 343-360, 2020.

NAKANO, Hideki *et al.* Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. **Nature immunology**, v. 10, n. 4, p. 394-402, 2009.

NESS, Sara; LIN, Shiming; GORDON, John R. Regulatory dendritic cells, T cell tolerance, and dendritic cell therapy for immunologic disease. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 633436, 2021.

NI, Ming *et al.* Characteristics of inflammatory factors and lymphocyte subsets in patients with severe COVID-19. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 11, p. 2600-2606, 2020.

OCHOA, Sebastian *et al.* Management and outcome of COVID-19 in CTLA-4 insufficiency. **Blood Advances**, v. 7, n. 19, p. 5743-5751, 2023.

OKABAYASHI, Tamaki *et al.* Cytokine regulation in SARS coronavirus infection compared to other respiratory virus infections. **Journal of medical virology**, v. 78, n. 4, p. 417-424, 2006.

OPAS. **Folha Informativa sobre COVID-19**. 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/covid19>. Acesso em: 19 jun. 2022.

OPAS. Recomendações para estratégias nacionais de testagem para SARS-CoV-2 e capacidades diagnósticas. **Orientação provisória**. 25 de junho de 2021. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/54449>. Acesso em: 19 jun. 2022.

OPENSHAW, Peter JM; DEAN, Gillian S.; CULLEY, Fiona J. Links between respiratory syncytial virus bronchiolitis and childhood asthma: clinical and research approaches. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 22, n. 2, p. S58-S65, 2003.

PACANOWSKI, Jérôme *et al.* Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 98, n. 10, p. 3016-3021, 2001.

PACES, Jan *et al.* COVID-19 and the immune system. **Physiological research**, v. 69, n. 3, p. 379, 2020.

PAHO. Pan American Health Organization. **Coronavirus disease (COVID-19): Variants of SARS-COV-2**. Disponível em: <https://www.paho.org/en/coronavirus-disease-covid-19-variants-sars-cov-2-qa> . Acesso em: 11 jul. 2023.

PAHO. Pan American Health Organization. **Frequently Asked Questions: COVID-19 vaccines**. Disponível em: <https://www.paho.org/en/covid-19-vaccines/frequently-asked-questions-covid-19-vaccines> Acesso em: 12 jul. 2023.

PALMON, Philip A.; JACKSON, Daniel J.; DENLINGER, Loren C. COVID-19 infections and asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 10, n. 3, p. 658-663, 2022.

PARK MD. Macrophages: a Trojan horse in COVID-19? **Nat Rev Immunol** 20: 351, 2020.

PASTILLE, Eva *et al.* Modulation of dendritic cell differentiation in the bone marrow mediates sustained immunosuppression after polymicrobial sepsis. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 2, p. 977-986, 2011.

PEDERSEN, Shona *et al.* Circulating microvesicles and exosomes in small cell lung cancer by quantitative proteomics. **Clinical proteomics**, v. 19, n. 1, p. 1-14, 2022.

PEDRIOLI, Giona *et al.* Extracellular vesicles as promising carriers in drug delivery: considerations from a cell biologist's perspective. **Biology**, v. 10, n. 5, p. 376, 2021.

PEÑALOZA, Hernán F.; LEE, Janet S.; RAY, Prabir. Neutrophils and lymphopenia, an unknown axis in severe COVID-19 disease. **PLoS pathogens**, v. 17, n. 9, p. e1009850, 2021.

PESCE, Elisa *et al.* Exosomes recovered from the plasma of COVID-19 patients expose SARS-CoV-2 spike-derived fragments and contribute to the adaptive immune response. **Frontiers in immunology**, v. 12, 2021.

PLASSMEYER, Matthew *et al.* Caspases and therapeutic potential of caspase inhibitors in moderate–severe SARS-CoV-2 infection and long COVID. **Allergy**, v. 77, n. 1, p. 118-129, 2022.

PONCINI, Carolina Verónica *et al.* Trypanosoma cruzi induces regulatory dendritic cells in vitro. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 6, p. 2633-2641, 2008.

PROMPETCHARA, Eakachai; KETLOY, Chutitorn; PALAGA, Tanapat. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. **Asian Pacific journal of allergy and immunology**, v. 38, n. 1, p. 1-9, 2020.

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

R BONAM, Srinivasa; HU, Haitao; BAYRY, Jagadeesh. Role of the PD-1 and PD-L1 axis in COVID-19. **Future Microbiology**, v. 17, n. 13, p. 985-988, 2022.

RASHID, Farooq *et al.* Roles and functions of SARS-CoV-2 proteins in host immune evasion. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 940756, 2022.

REIS, Monica *et al.* Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate dendritic cell maturation and function. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 416500, 2018.

RECORD, Michel *et al.* Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell–cell communication and various pathophysiologicals. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 1, p. 108-120, 2014.

RHA, Min-Seok *et al.* PD-1-expressing SARS-CoV-2-specific CD8⁺ T cells are not exhausted, but functional in patients with COVID-19. **Immunity**, v. 54, n. 1, p. 44-52. e3, 2021.

RIELLA, Leonardo V. *et al.* Role of the PD-1 pathway in the immune response. **American Journal of Transplantation**, v. 12, n. 10, p. 2575-2587, 2012.

RITPRAJAK, Patcharee; KAEWRAEMRUAEN, Chamraj; HIRANKARN, Nattiya. Current paradigms of tolerogenic dendritic cells and clinical implications for systemic lupus erythematosus. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1291, 2019.

ROBBIANI, Davide F. *et al.* Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 437-442, 2020.

SALDANHA, Mariana Sousa Vieira *et al.* Vesículas extracelulares circulantes de pacientes com câncer de mama induzem células dendríticas tolerogênicas modulando GSK3 via miRNA. 2020.

SALLUSTO, Federica and Antonio Lanzavecchia. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **The Journal of experimental medicine** v. 179, p. 1109-1118, 1994.

SANARICO, Nunzia, *et al.* Human monocyte-derived dendritic cells differentiated in the presence of IL-2 produce proinflammatory cytokines and prime Th1 immune response. **Journal of leukocyte biology** v. 80 p. 555-562, 2006.

SARESELLA, M. *et al.* The PD-1/PD-L1 pathway in human pathology. **Current molecular medicine**, v. 12, n. 3, p. 259-267, 2012.

SAROBE, Pablo *et al.* Hepatitis C virus structural proteins impair dendritic cell maturation and inhibit in vivo induction of cellular immune responses. **Journal of virology**, v. 77, n. 20, p. 10862-10871, 2003.

SATO, Katsuaki; YAMASHITA, Naohide; MATSUYAMA, Takami. Human peripheral blood monocyte-derived interleukin-10-induced semi-mature dendritic cells induce anergic CD4⁺ and CD8⁺ T cells via presentation of the internalized soluble antigen and cross-presentation of the phagocytosed necrotic cellular fragments. **Cellular immunology**, v. 215, n. 2, p. 186-194, 2002.

SCHMIDT, Susanne V.; NINO-CASTRO, Andrea C.; SCHULTZE, Joachim L. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 274, 2012.

SCHÜLKE, Stefan. Induction of interleukin-10 producing dendritic cells as a tool to suppress allergen-specific T helper 2 responses. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 347534, 2018.

SEEPATHOMNARONG, Purilap *et al.* Regulatory T cells decreased during recovery from mild covid-19. **Viruses**, v. 14, n. 8, p. 1688, 2022.

SEGURA, Elodie; AMIGORENA, Sebastian. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. **Trends in immunology**, v. 34, n. 9, p. 440-445, 2013.

SERRANO-PERTIERRA, Esther *et al.* Characterization of plasma-derived extracellular vesicles isolated by different methods: a comparison study. **Bioengineering**, v. 6, n. 1, p. 8, 2019.

SETTE, Alessandro; CROTTY, Shane. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. **Cell**, v. 184, n. 4, p. 861-880, 2021.

SHADBAD, Mahdi Abdoli *et al.* A scoping review on the significance of programmed death-ligand 1-inhibiting microRNAs in non-small cell lung treatment: A single-cell RNA sequencing-based study. **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. 1027758, 2022.

SHEVACH, Ethan M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 636-645, 2009.

SCHMIDT, Megan E.; VARGA, Steven M. The CD8 T cell response to respiratory virus infections. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 357939, 2018.

SHLOMOVITZ, Inbar *et al.* Proteomic analysis of necroptotic extracellular vesicles. **Cell death & disease**, v. 12, n. 11, p. 1059, 2021.

SHURIN, Galina V.; MA, Yang; SHURIN, Michael R. Immunosuppressive mechanisms of regulatory dendritic cells in cancer. **Cancer Microenvironment**, v. 6, p. 159-167, 2013.

SIMONS, Mikael; RAPOSO, Graça. Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication. **Current opinion in cell biology**, v. 21, n. 4, p. 575-581, 2009.

SKOG, Johan *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nature cell biology**, v. 10, n. 12, p. 1470-1476, 2008.

SMIGIELSKA-CZEPIEL, Katarzyna *et al.* Dual role of miR-21 in CD4+ T-cells: activation-induced miR-21 supports survival of memory T-cells and regulates CCR7 expression in naive T-cells. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e76217, 2013.

SPIEGEL, Martin *et al.* Interaction of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus with dendritic cells. **Journal of general virology**, v. 87, n. 7, p. 1953-1960, 2006.

STEINMAN, Ralph M; HEMMI, Hau. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. **From innate immunity to immunological memory**, p. 17-58, 2006.

STEINMAN, Ralph M. *et al.* The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 191, n. 3, p. 411-416, 2000.

STADLER, Konrad *et al.* SARS—beginning to understand a new virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 209-218, 2003.

STUFFERS, Susanne *et al.* Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. **Traffic**, v. 10, n. 7, p. 925-937, 2009.

SU, Xiaoping *et al.* miRNomes of haematopoietic stem cells and dendritic cells identify miR-30b as a regulator of Notch1. **Nature communications**, v. 4, n. 1, p. 2903, 2013.

SUN, Hua-Bao *et al.* The changes of the peripheral CD4⁺ lymphocytes and inflammatory cytokines in Patients with COVID-19. **PLoS One**, v. 15, n. 9, p. e0239532, 2020.

SUN, Jiumeng *et al.* COVID-19: epidemiology, evolution, and cross-disciplinary perspectives. **Trends in molecular medicine**, v. 26, n. 5, p. 483-495, 2020.

SUNSHINE, Joel; TAUBE, Janis M. Pd-1/pd-l1 inhibitors. **Current opinion in pharmacology**, v. 23, p. 32-38, 2015.

TANG, Jinyi *et al.* Respiratory mucosal immunity against SARS-CoV-2 after mRNA vaccination. **Science immunology**, v. 7, n. 76, p. eadd4853, 2022.

TANG-HUAU, Tsing-Lee; SEGURA, Elodie. Human in vivo-differentiated monocyte- derived dendritic cells. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2019. p. 44-49.

TEFT, Wendy A.; KIRCHHOF, Mark G.; MADRENAS, Joaquín. A molecular perspective of CTLA-4 function. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, p. 65-97, 2006.

TERRERI, Sara *et al.* Persistent B cell memory after SARS-CoV-2 vaccination is functional during breakthrough infections. **Cell host & microbe**, v. 30, n. 3, p. 400-408. e4, 2022.

THÉRY, Clotilde *et al.* Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Current protocols in cell biology**, v. 30, n. 1, p. 3.22. 1-3.22. 29, 2006.

THÉRY, Clotilde *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of extracellular vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018.

THOMSON, Angus W. *et al.* Prospective clinical testing of regulatory dendritic cells in organ transplantation. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 174193, 2016.

THORNTON, Angela M.; SHEVACH, Ethan M. CD4⁺ CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. **The Journal of experimental medicine**, v. 188, n. 2, p. 287-296, 1998.

TIAN, Qi *et al.* Immunomodulatory functions of the circ_001678/miRNA-326/ZEB1 axis in non-small cell lung cancer via the regulation of PD-1/PD-L1 pathway. **Human Molecular Genetics**, v. 31, n. 23, p. 4094-4106, 2022.

TIVOL, Elizabeth A. *et al.* Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. **Immunity**, v. 3, n. 5, p. 541-547, 1995.

TIWARI, Anil *et al.* Mini review: Current trends and understanding of exosome therapeutic potential in corneal diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 684712, 2021.

TORKI, Ensiye *et al.* The kinetics of inhibitory immune checkpoints during and post- COVID-19: the knowns and unknowns. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 23, n. 7, p. 3299-3319, 2023.

USMAN, Waqas Muhammad *et al.* Efficient RNA drug delivery using red blood cell extracellular vesicles. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 2359, 2018.

VALADI, Hadi *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature cell biology**, v.9, n. 6, p. 654-659, 2007.

VAN COILLIE, Samya; WIERNICKI, Bartosz; XU, Jie. Molecular and cellular functions of CTLA-4. **Regulation of Cancer Immune Checkpoints: Molecular and Cellular Mechanisms and Therapy**, p. 7-32, 2020.

WANG, Pin *et al.* The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation. **Science**, v. 344, n. 6181, p. 310-313, 2014.

VAN NIEL, Guillaume; D'ANGELO, Gisela; RAPOSO, Graça. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 19, n. 4, p. 213-228, 2018.

VORUP-JENSEN, Thomas *et al.* Binding between the integrin $\alpha X\beta 2$ (CD11c/CD18) and heparin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30869-30877, 2007.

WELSH, Joshua A. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. **Journal of extracellular vesicles**, v. 13, n. 2, p. e12404, 2024.

WILLMS, Eduard *et al.* Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 22519, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Clinical management of COVID-19 patients: living guideline. 2021.** Disponível em: <https://app.magicapp.org/#/guideline/j1WBYn/rec/L0z8gb> . Acesso em: 18 jun. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Coronavirus disease (COVID-19): Dexamethasone. 2021.** Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19-dexamethasone> Acesso em: 19 jun. 2022.

XIA, Bingqing *et al.* Extracellular vesicles mediate antibody-resistant transmission of SARS-CoV-2. **Cell discovery**, v. 9, n. 1, p. 2, 2023.

XIE, Jin *et al.* Critical roles of Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling and inactivation of p38 MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells. **Experimental hematology**, v. 33, n. 5, p. 564-572, 2005.

YAMADA, Mitsuhiro. Extracellular vesicles: Their emerging roles in the pathogenesis of respiratory diseases. **Respiratory Investigation**, v. 59, n. 3, p. 302-311, 2021.

YÁÑEZ-MÓ, María *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of extracellular vesicles**, v. 4, n. 1, p. 27066, 2015.

YANG, Dong *et al.* Attenuated interferon and proinflammatory response in SARS-CoV-2–infected human dendritic cells is associated with viral antagonism of STAT1 phosphorylation. **The Journal of infectious diseases**, v. 222, n. 5, p. 734-745, 2020.

YANG, Yuanting *et al.* The characterization of CD8+ T-cell responses in COVID-19. **Emerging Microbes & Infections**, v. 13, n. 1, p. 2287118, 2024.

YE, Zhinan *et al.* Serum exosomal microRNA-27-3p aggravates cerebral injury and inflammation in patients with acute cerebral infarction by targeting PPAR γ . **Inflammation**, v. 44, p. 1035-1048, 2021.

YE, Zi-Wei *et al.* Zoonotic origins of human coronaviruses. **International journal of biological sciences**, v. 16, n. 10, p. 1686, 2020.

YONG, Shin Jie. Long COVID or post-COVID-19 syndrome: putative pathophysiology, risk factors, and treatments. **Infectious diseases**, v. 53, n. 10, p. 737-754, 2021.

ZAHARAN, Asmaa M. *et al.* Increased percentage of apoptotic and CTLA-4 (CD152) expressing cells in CD4+/CD8+ cells in COVID-19 patients. **Medicine**, v. 101, n. 38, p. e30650, 2022.

ZHAN, Chaoning *et al.* Exosomes and other extracellular vesicles in oral and salivary gland cancers. **Oral diseases**, v. 26, n. 5, p. 865-875, 2020.

ZHANG, Haipeng; WU, Ti. CD4+ T, CD8+ T counts and severe COVID-19: a meta-analysis. **The Journal of infection**, v. 81, n. 3, p. e82, 2020

ZHANG, Huan-ping *et al.* Recent developments in the immunopathology of COVID-19. **Allergy**, v. 78, n. 2, p. 369-388, 2023.

ZHANG, Tao; WU, Qunfu; ZHANG, Zhigang. Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. **Current biology**, v. 30, n. 7, p. 1346-1351. e2, 2020.

ZHANG, Xiangyue *et al.* Human regulatory dendritic cells develop from monocytes in response to signals from regulatory and helper T cells. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 550243, 2020.

ZHANG, Xiaoman *et al.* Comparison of serum and plasma as a source of blood extracellular vesicles: Increased levels of platelet-derived particles in serum extracellular vesicle fractions alter content profiles from plasma extracellular vesicle fractions. **PLoS One**, v. 17, n. 6, p. e0270634, 2022.

ZHANG, Yiwen *et al.* The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 23, p. e2024202118, 2021.

ZHANG, Yuan *et al.* Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. **Cell & bioscience**, v. 9, n. 1, p. 1-18, 2019.

ZHAO, Fanfan *et al.* Extracellular vesicles from Zika virus-infected cells display viral E protein that binds ZIKV-neutralizing antibodies to prevent infection enhancement. **The EMBO Journal**, v. 42, n. 6, p. e112096, 2023.

ZHENG, Yuanfang *et al.* RETRACTED: Exosomal miR-22-3p from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells protects against lipopolysaccharid-induced acute lung injury. 2021.

ZHOU, Runhong *et al.* Acute SARS-CoV-2 infection impairs dendritic cell and T cell responses. **Immunity**, v. 53, n. 4, p. 864-877. e5, 2020.

ZIEGLER, Thedi *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus fails to activate cytokine-mediated innate immune responses in cultured human monocyte-derived dendritic cells. **Journal of virology**, v. 79, n. 21, p. 13800-13805, 2005.

ANEXO

Parecer consubstanciado da CONEP

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação da evolução cronológica de IgM e IgG em pacientes com SARS-CoV-2 e aplicação clínica dos ensaios rápidos de detecção combinada IgM-IgG e de detecção antigênica

Pesquisador: Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 2

CAAE: 30428720.3.0000.5091

Instituição Proponente: Instituição Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.979.661

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos contendo as Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1531987.pdf 14/04/2020) e do Projeto Detalhado.

INTRODUÇÃO

Os três surtos sem precedentes de infecções emergentes por coronavírus humano (HCoV) no início do século XXI destacaram a necessidade de disponibilidade imediata, precisa e rápida de testes de diagnóstico. Os métodos de diagnóstico laboratorial para infecções por coronavírus humano evoluíram substancialmente, com o desenvolvimento de novos ensaios e com a disponibilidade de testes atualizados para os emergentes. Os métodos laboratoriais mais recentes são rápidos, altamente sensíveis e específicos, e estão substituindo gradualmente os padrões moleculares. Este trabalho visa avaliar o potencial diagnóstico de métodos laboratoriais disponíveis para coronavírus no Brasil, concentrando-se na doença de coronavírus 2019 (COVID-19) com surto inicial em Wuhan, China. O novo SARS-CoV-2 pode causar doenças respiratórias letais. Testes sorológicos anti-SARS-CoV-2 incluem o ELISA, a imunofluorescência e a imunocromatografia e estão disponíveis como kits comerciais. Os mesmos estão sendo utilizados para vários fins, incluindo

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

investigações epidemiológicas, avaliação da cinética de anticorpos e avaliação da viabilidade de terapias. Estudos anteriores relatam a importância do entendimento do perfil IgM/IgG contra SARS-CoV, no entanto, o perfil traçado pelo novo SARS-CoV-2 ainda não foi definido, em especial, quando o mesmo é comparado ao uso de medicamentos corticosteróides e outros novos protocolos terapêuticos. O entendimento desta resposta humoral é particularmente importante neste momento quando determinações foram feitas pelo Ministério da Saúde e pela OMS quanto ao uso de testes rápidos indiretos IgM/IgG e testes rápidos de detecção antigênica direta. Até o momento, a OMS relatou 462.684 casos confirmados e 20.834 mortes por SARS-CoV-2 em todo o mundo, tendo o vírus neste momento uma taxa de letalidade de 4,5%. Nas Américas, foram registradas até o dia 26 de março de 2020, 75.712 casos confirmados e 1.065 mortes. Após seu primeiro isolamento, vários testes de diagnóstico laboratorial foram desenvolvidos. Testes moleculares como RT-PCR e de sequenciamento estão sendo usados no diagnóstico para dados compulsórios de registro, enquanto testes sorológicos e testes rápidos estão limitados a ambientes de investigação ou vigilância. Recentemente, vários testes rápidos foram aprovados pelos órgãos de vigilância sanitária em todos os continentes, assim como no Brasil. A maior parte destes testes envolve métodos de duas fases para detecção de anticorpos IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 e, uma pequena parcela envolve a detecção antigênica de proteínas virais. Comparativamente aos testes moleculares, a acurácia dos testes rápidos no que inclui sensibilidade e especificidade diagnóstica, tende a ser inferior. Mas os últimos apresenta vantagens inúmeras em relação aos primeiros, como baixo custo, poucos minutos para a liberação do resultado, possibilidade de ser utilizado em qualquer local incluindo farmácias e drogarias, não estando restrito a ambiente hospitalar ou centros de referência em diagnóstico. Ainda, pelo grande surto e número de casos suspeitos, os centros de referência em diagnóstico para SARS-CoV-2 não estão conseguindo atender a demanda e os resultados estão demorando para além do tempo necessário de 48 horas para liberação de laudo diagnóstico, chegando em até 8 dias, o que agrava e muito o cenário de saturação do sistema de saúde e internações. Visando o crescimento exponencial no número de casos a serem diagnosticados para SARS-CoV-2 nos próximos dias e meses e buscando esclarecer a aplicabilidade e o potencial de uso dos testes rápidos disponíveis no Brasil, este trabalho se propõe a determinar o perfil longitudinal de 300 pacientes internados no Hospital da Baleia. Em primeiro momento, será determinada a titulação de IgM e IgG e momentos de pico máximo, soroconversão e manutenção da resposta humoral utilizando ELISA in house, para posterior avaliação do potencial diagnóstico e a confiabilidade de testes rápidos disponíveis no Brasil.

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

HIPÓTESE

Os níveis séricos em série de IgM e IgG específicos para SARS-CoV-2 permanecem por até 3 meses? O período de soroconversão para IgG e o período de alcance de níveis máximos de IgM e IgG condiz com a janela diagnóstica proposta pelos testes rápidos? Pacientes com co-morbidades, co-infecções virais e que estão recebendo protocolos terapêuticos distintos tem perfil humoral diferente? Testes rápidos aprovados no Brasil apresentam eficiência diagnóstica acurada?

METODOLOGIA

1. Obtenção de amostras humanas

Trezentos pacientes com diagnóstico molecular confirmado para SARS-CoV-2 internados e em tratamento no Hospital da Baleia no período de abril a junho de 2020 serão convidados a participar da pesquisa e serão acompanhados durante 3 meses. Serão obtidas amostras de sangue periférico e swab de nasofaringe a cada 3 dias desde o 1º dia de internação até o 15º, seguido de uma coleta por mês durante 3 meses, totalizando 8 coletas por paciente. Amostras de sangue periférico no volume de 10 ml serão coletadas pela equipe médica do Hospital da Baleia por punção venosa, obedecendo normas de segurança, e serão centrifugadas a 3.000 g/5 min para coleta do soro, que será armazenado a 4°C por 12 horas ou a -20°C até uso. A coleta de swab de orofaringe será feita com abaixador de língua para pressionar gentilmente a língua. Simultaneamente, o swab estéril é pressionado e rolado sobre as tonsilas e atrás da úvula (faringe posterior), evitando tocar na língua, mucosa bucal e úvula. O swab é fechado dentro de tubo estéril que será armazenado a temperatura ambiente por até 12 horas ou a -20°C até uso. Nos momentos de coleta, são anotadas nos tubos a identificação dos pacientes, a data e a hora da coleta.

2. Determinação do perfil longitudinal de anticorpos

O perfil longitudinal dos anticorpos IgM e IgG será determinado por ELISA in house com amostras de sangue periférico. Esta ELISA será feita com placas de 96 poços de fundo chato de poliestireno de alta adsorção. Estas placas serão sensibilizadas com 0,5 ug/ml de SARS-CoV2/2019-nCoV Spike/RBD Protein e SARS-CoV-2/2019-nCoV Nucleocapsid Protein diluídas em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 por aproximadamente 16 h a 4°C. Em seguida, a placa será lavada 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween e bloqueada com 2,5% de proteínas do leite por 2 h a 37°C. As amostras de soro de pacientes serão adicionadas e incubadas por 1 h a temperatura ambiente. A placa será lavada novamente e o anticorpo anti-IgG ou anti-IgM humano conjugado a

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

peroxidase será adicionado e mesma será incubada por 1 h a temperatura ambiente. A reação será revelada por TMB e a densidade óptica determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm. Este ensaio determinará a curva longitudinal de resposta humoral específica para IgM e IgG, o período de soroconversão para IgG, o período em que os níveis máximos de IgM e IgG é atingido e sua persistência.

3. Avaliação de desempenho de testes rápidos anti-SARS-CoV-2 disponíveis para uso no Brasil.

Amostras de sangue e swab de nasofaringe serão direcionadas as análises de testes rápidos disponíveis para uso no Brasil para determinação da capacidade e da janela diagnóstica destes testes. Serão avaliados testes de detecção combinada IgM-IgG, como:

- 1) Coronavírus 2019-nCoV IgG/IgM, MedTeste;
- 2) COVID-19 IgG/IgM ECO Teste, EcoDiagnostica;
- 3) DPP IgM/IgG, BioManguinhos Fiocruz, e do teste rápido de detecção direta: ECO F COVID-19 Ag, EcoDiagnostica.

A realização de cada teste seguirá rigorosamente as instruções dos fabricantes. A manutenção da capacidade diagnóstica dos testes avaliados será, ainda, determinada quanto à relação com a presença de co-morbidades, co-infecções virais e de acordo com os medicamentos utilizados durante a internação. Relatórios médicos e prontuários serão utilizados para acompanhamento de informações pessoais, sintomas, protocolos de tratamento, resultados do diagnóstico molecular, co-morbidades e co-infecções virais.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes com diagnóstico molecular confirmado para SARS-CoV-2 internados e em tratamento no Hospital da Baleia no período de abril a junho de 2020 que aceitem participar do estudo e suas condições e assinem o TCLE serão incluídos.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVOS GERAIS

Determinar por ELISA in house níveis séricos em série de IgM e IgG específicos para o SARS-CoV-2 em 300 pacientes com SARS-CoV-2 internados e em tratamento no Hospital da Baleia, utilizando SARS-CoV-2/2019-nCoV Spike/RBD Protein e SARS-CoV-2/2019-nCoV Nucleocapsid Protein.

Determinar o período de soroconversão para IgG, o período em que os níveis máximos de IgM e IgG será atingido e sua persistência.

Agrupar pacientes de acordo com a presença ou ausência de co-morbidades, co-infecções virais e de acordo com os protocolos terapêuticos adotados, em especial no que se refere ao uso de

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

anti-inflamatórios corticosteróides e novos medicamentos.

Comparar os dados obtidos ao desempenho dos ensaios rápidos de detecção combinada IgM-IgG em amostras de sangue e de detecção antigênica em amostras de swab de nasofaringe que estão em fase inicial de uso comercial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

As amostras de sangue periférico e swab orofaringe serão obtidas por equipe médica do Hospital da Baleia capacitada para os procedimentos citados. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma e leve dor localizada. A coleta de swab orofaringe é indolor e não gera desconforto. Os pesquisadores deste projeto farão contato com os pacientes para apresentação do projeto e do consentimento livre e esclarecido. Este contato se dará nos primeiros 3 dias de internação do paciente. O projeto será apresentado ao paciente em linguagem acessível com explicações claras e esclarecedoras, com as informações mais importantes do protocolo de pesquisa, não escondendo possíveis riscos e desconfortos. Os pesquisadores farão também a leitura conjunta do TCLE com o participante, de maneira que ele possa tomar sua decisão de forma justa e sem constrangimentos. Os pesquisadores integrantes deste projeto se comprometem a manter em sigilo todas as informações coletadas no banco de dados dos pacientes. Nome dos pacientes, números de identificação de prontuários, datas de nascimento, excetuando-se a citação do ano, naturalidade, plano de saúde, telefones e endereços eletrônicos serão omitidos de qualquer documento, planilha e publicação decorrente deste trabalho.

BENEFÍCIOS

Considerando a atual pandemia por SARS-CoV-2 e sua expansão crescente no Brasil e no mundo, estudos como este são fundamentais neste momento. Estudos anteriores relatam a importância do entendimento do perfil IgM/IgG contra SARS-CoV, no entanto, o perfil traçado pelo novo SARS-CoV-2 não foi definido, em especial, quando o mesmo é comparado ao uso de medicamentos corticosteróides e outros novos protocolos terapêuticos. O entendimento desta resposta humoral irá demonstrar os momentos de detecção inicial, detecção máxima e de redução dos anticorpos, assim como o tempo de detecção dos antígenos virais antes, durante e após os protocolos de tratamento. Esta compreensão é importante para o atual diagnóstico, o desenvolvimento de vacinas e para dados epidemiológicos. Ainda, indicarão a capacidade diagnóstica e a relação entre os laudos dos ensaios rápidos disponíveis no Brasil para determinação indireta e direta em

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

pacientes infectados por SARS-CoV-2.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo irá descrever os perfis longitudinais de anticorpos IgM e IgG em pacientes infectados por SARS-CoV-2 com amostras coletadas no início da internação até 90 dias do aparecimento dos sintomas. Para isso, trezentos pacientes com diagnóstico confirmado para SARS-CoV-2 internados e em tratamento no Hospital da Baleia no período de abril a junho de 2020 serão convidados a participar e serão acompanhados durante 3 meses. Serão obtidas amostras de sangue periférico e swab de nasofaringe a cada 3 dias desde o 1º dia de internação até o 15º, seguido de uma coleta por mês durante 3 meses.

Previsão do número de participantes de pesquisa a serem incluídos no estudo: 300.

Financiamento: Fundação Oswaldo Cruz.

Início previsto: abril de 2020.

Término previsto: setembro de 2020.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise das respostas ao Parecer Consubstanciado nº 3.964.505 emitido em 10/04/2020:

1. No documento "Anexo_4_projetoCovid19", é informado que "Serão obtidas amostras de sangue periférico e swab de nasofaringe a cada 3 dias desde o 1º dia de internação até o 15º, seguido de uma coleta por mês durante 3 meses."

Solicita-se esclarecimento se haverá armazenamento de amostras. Caso afirmativo, solicita-se adequação do protocolo de pesquisa conforme disposto na Resolução CNS nº 441 de 2011 e na Portaria MS nº 2201 de 2011. Solicita-se, ainda, especificar por quanto tempo as amostras serão armazenadas (se for o caso) após o término do estudo e o destino das amostras após o período de armazenamento.

RESPOSTA: Haverá armazenamento de amostras por 2 anos contados a partir da data da coleta. Sendo assim, o protocolo de pesquisa foi adequado de forma a conter esta informação, a justificativa da necessidade de manutenção, o tempo de armazenamento, e o destino das amostras após este período. Estes esclarecimentos estão inseridos no "Anexo_4_projetoCovid19" que compreende o projeto com as alterações (versão limpa) e no "Anexo4_ProjetoCovid19_AlteraçõesCorVermelha" que compreende o projeto com as alterações

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

assinaladas em vermelho na página 5 item "Metodologia proposta", subitem "1. Obtenção de amostras humanas". Este subitem está transcrito a seguir: "1. Obtenção de amostras humanas. Trezentos pacientes com diagnóstico molecular confirmado para SARSCoV-2 internados e em tratamento no Hospital da Baleia no período de abril a junho de 2020 serão convidados a participar da pesquisa e serão acompanhados durante 3 meses. Serão obtidas amostras de sangue periférico e swab de nasofaringe a cada 3 dias desde o 1º dia de internação até o 15º, seguido de uma coleta por mês durante 3 meses, totalizando 8 coletas por paciente. As amostras coletadas serão armazenadas por dois anos contados a partir da data da coleta em biorepositório do grupo de pesquisa para o caso de necessidade de repetições nos ensaios propostos neste projeto. As amostras não serão utilizadas para outras análises que não estejam descritos neste documento. Transcorridos os dois anos, as amostras armazenadas serão descartadas conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o TCLE, respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do participante da pesquisa. O descarte se dará da seguinte forma: os resíduos contaminados com SARS-CoV-2 serão manejados de acordo com as determinações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que determina que todo resíduo deve ser acondicionado em sacos de cor branco leitoso, impermeáveis, de material resistente à ruptura e vazamento contidos no seu interior, não ultrapassando 2/3 de sua capacidade. Esses sacos serão identificados pelo símbolo de substância infectante. Durante toda etapa de gerenciamento, os sacos permanecerão dentro de recipientes de acondicionamento tampados em sala exclusiva para armazenamento temporário de resíduos biológicos, conforme especificado na RDC/ANVISA nº 222/2018. A Fiocruz possui projeto de gerenciamento de resíduos biológicos e contrato com empresa especializada que tem a responsabilidade de coletar os resíduos e assegurar a eliminação das características de periculosidade do resíduo com tratamento específico, de forma que todo o processo atende aos padrões de qualidade ambiental e de saúde pública. Após tratamento, os resíduos passarão a ser considerados resíduos do grupo D, para fins de disposição final. Amostras de sangue periférico no volume de 10 ml serão coletadas pela equipe médica do Hospital da Baleia por punção venosa, obedecendo normas de segurança, e serão centrifugadas a 3.000 g/5 min para coleta do soro, que será armazenado a 4°C por 12 horas ou a -20°C para tempo superior a 12 horas. A coleta de swab de orofaringe será feita com abaixador de língua para pressionar gentilmente a língua. Simultaneamente, o swab estéril é pressionado e rolado sobre as tonsilas e atrás da úvula (faringe posterior), evitando tocar na língua, mucosa bucal e úvula. O swab é fechado dentro de tubo estéril com solução fisiológica estéril que será armazenado a temperatura ambiente por até 12 horas ou a -20°C para tempo

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

superior a 12 horas. Os tubos com swabs devem ser embalados individualmente em sacos plásticos com zip. Nos momentos de coleta, são anotadas nos tubos a identificação dos pacientes, a data e a hora da coleta. O transporte das amostras biológicas até a unidade da Fiocruz será realizado com gelo reciclável em caixa de isopor fechada com fita crepe contendo somente as amostras para pesquisa de Coronavírus/Influenza."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.2. Na página 6 de 10, item "Riscos", lê-se: "Os pesquisadores deste projeto EM NENHUM MOMENTO ENTRARÃO EM CONTATO DIRETO COM OS PACIENTES." (destaque nosso). Solicitam-se esclarecimentos sobre como ocorrerá o processo de consentimento livre e esclarecido, em que momento e de que maneira os pesquisadores farão o convite ao futuro participante da pesquisa/responsável legal para participar e fornecerão todas as informações para o melhor esclarecimento sobre a pesquisa proposta.

RESPOSTA: Os pesquisadores deste projeto farão contato com os pacientes para apresentação do projeto e do consentimento livre e esclarecido. Este contato se dará nos primeiros 3 dias de internação do paciente. O projeto será apresentado ao paciente em linguagem acessível com explicações claras e esclarecedoras, com as informações mais importantes do protocolo de pesquisa, não escondendo possíveis riscos e desconfortos. Os pesquisadores farão também a leitura conjunta do TCLE com o participante, de maneira que ele possa tomar sua decisão de forma justa e sem constrangimentos. Esta informação foi inserida no "Anexo_4_projetoCovid19" que compreende o projeto com as alterações (versão limpa) e no "Anexo4_ProjetoCovid19_AlteraçõesCorVermelha" que compreende o projeto com as alterações assinaladas em vermelho na página 6 item "Riscos". Este subitem está transcrito a seguir: "Riscos. As amostras de sangue periférico e swab orofaringe serão obtidas por equipe médica do Hospital da Baleia capacitada para os procedimentos citados. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma e leve dor localizada. A coleta de swab orofaringe é indolor e não gera desconforto. Os pesquisadores deste projeto farão contato com os pacientes para apresentação do projeto e do consentimento livre e esclarecido. Este contato se dará nos primeiros 3 dias de internação do paciente. O projeto será apresentado ao paciente em linguagem acessível com explicações claras e esclarecedoras, com as informações mais importantes do protocolo de pesquisa, não escondendo possíveis riscos e desconfortos. Os pesquisadores farão também a leitura conjunta do TCLE com o participante, de maneira que ele possa tomar sua decisão de forma justa e sem constrangimentos. Os pesquisadores integrantes

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

deste projeto se comprometem a manter em sigilo todas as informações coletadas no banco de dados dos pacientes. Nome dos pacientes, números de identificação de prontuários, datas de nascimento, excetuando-se a citação do ano, naturalidade, plano de saúde, telefones e endereços eletrônicos serão omitidos de qualquer documento, planilha e publicação decorrente deste trabalho."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

2.1. Não consta a garantia de assistência integral e gratuita, pelo tempo que for necessário, em caso de danos decorrentes direta ou indiretamente pela participação no estudo. Ressalta-se que é de responsabilidade do pesquisador, do patrocinador do estudo e das instituições participantes, a prestação de assistência integral e acompanhamento do participante da pesquisa que vier a sofrer tais danos, conforme o item II.3.2 da Resolução CNS nº 486 de 2012. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: A informação sobre a garantia de assistência integral e gratuita ao participante que sofrer danos decorrentes direta ou indiretamente pela participação no estudo foi incluída no documento "Anexo5_TCLECovid19" que compreende o TCLE com as alterações (versão limpa) e no "Anexo5_TCLECovid19_AlteraçõesCorVermelha" que compreende o TCLE com as alterações destacadas na cor vermelha. O item está transcrito a seguir: "Prezado Senhor/Prezada Senhora, O grupo de pesquisa Diagnóstico e Terapia de Doenças Infecciosas e Câncer da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz está realizando um estudo de interesse para o diagnóstico e controle da doença causada pelo novo coronavírus. Se você quiser participar desse estudo, solicitamos que autorize a coleta de 10 mL de seu sangue, a coleta de saliva para realizarmos exames laboratoriais e o acesso ao seu prontuário médico que ajudarão no diagnóstico rápido do novo coronavírus e na descoberta de formas de controlar a pandemia. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma (roxo) e leve dor localizada. Entretanto, a coleta será feita por profissional capacitado e com grande experiência. Será utilizado material descartável de boa qualidade (como agulhas e tubos a vácuo). A coleta de saliva, por sua vez, é indolor e não causa nenhum desconforto bastando fazer uma raspagem de cotonete no interior de sua boca. As coletas serão feitas a cada 3 dias durante 15 dias enquanto você estiver no hospital e, depois, 1 vez por mês durante 3 meses quando o equipe de saúde irá até sua casa realizar a coleta. O material coletado ficará guardado na Fiocruz para uso exclusivo neste estudo e será descartado após 2 anos da data da coleta. Toda informação obtida nessa pesquisa é considerada

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conepeg@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

confidencial. Sua participação é totalmente voluntária e caso você não queira participar não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento. Você também pode desistir da participação em qualquer momento da pesquisa, caso assim resolva. Você não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração por sua participação. A assinatura desse termo de consentimento garante a assistência integral e gratuita, pelo tempo que for necessário, em caso de complicações e danos decorrentes da sua participação no estudo. Você terá acesso a todos os resultados derivados desse estudo. Você e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma via com você e a outra com o pesquisador responsável."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.2. Solicita-se que conste no TCLE o tipo e grau de acesso aos resultados dos exames por parte do participante de pesquisa, com opção de tomar ou não conhecimento dessas informações (Resolução CNS nº 340 de 2004, item V.1.d).

RESPOSTA: A informação sobre acesso aos resultados dos exames por parte do participante de pesquisa foi incluída no documento "Anexo5_TCLECovid19" que compreende o TCLE com as alterações (versão limpa) e no "Anexo5_TCLECovid19_AlteraçõesCorVermelha" que compreende o TCLE com as alterações destacadas na cor vermelha. O item está transcrito a seguir: "Prezado Senhor/Prezada Senhora, O grupo de pesquisa Diagnóstico e Terapia de Doenças Infecciosas e Câncer da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz está realizando um estudo de interesse para o diagnóstico e controle da doença causada pelo novo coronavírus. Se você quiser participar desse estudo, solicitamos que autorize a coleta de 10 mL de seu sangue, a coleta de saliva para realizarmos exames laboratoriais e o acesso ao seu prontuário médico que ajudarão no diagnóstico rápido do novo coronavírus e na descoberta de formas de controlar a pandemia. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma (roxo) e leve dor localizada. Entretanto, a coleta será feita por profissional capacitado e com grande experiência. Será utilizado material descartável de boa qualidade (como agulhas e tubos a vácuo). A coleta de saliva, por sua vez, é indolor e não causa nenhum desconforto bastando fazer uma raspagem de cotonete no interior de sua boca. As coletas serão feitas a cada 3 dias durante 15 dias enquanto você estiver no hospital e, depois, 1 vez por mês durante 3 meses quando o equipe de saúde irá até sua casa realizar a coleta. O material coletado ficará guardado na Fiocruz para uso exclusivo neste estudo e será descartado após 2 anos da data da coleta. Toda informação obtida nessa pesquisa é considerada confidencial. Sua participação é totalmente voluntária e caso você não queira participar não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento.

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

Você também pode desistir da participação em qualquer momento da pesquisa, caso assim resolva. Você não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração por sua participação. A assinatura desse termo de consentimento garante a assistência integral e gratuita, pelo tempo que for necessário, em caso de complicações e danos decorrentes da sua participação no estudo. Você terá acesso a todos os resultados derivados desse estudo. Você e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma via com você e a outra com o pesquisador responsável."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.3. Solicitam-se esclarecimentos se a coleta de material feita uma vez por mês durante três meses será realizada na casa do participante ou se ele terá que se deslocar. Solicita-se incluir no TCLE que, quando for necessário seu deslocamento em função do estudo, será garantido o ressarcimento das despesas do participante da pesquisa e de seu acompanhante com o estudo. Salienta-se que os itens ressarcidos não são apenas aqueles relacionados a transporte e alimentação, mas a todo gasto decorrente da participação no estudo (Resolução CNS nº 486 de 2012, itens II.21 e IV.3.g).

RESPOSTA: A coleta de amostras biológicas dos participantes do estudo em período posterior a internação será feita na residência do mesmo, evitando-se assim que o participante tenha que sofrer qualquer deslocamento para este fim. Esta informação foi incluída no documento "Anexo5_TCLECovid19" que compreende o TCLE com as alterações (versão limpa) e no "Anexo5_TCLECovid19_AlteraçõesCorVermelha" que compreende o TCLE com as alterações destacadas na cor vermelha. O item está transcrito a seguir: "Prezado Senhor/Prezada Senhora, O grupo de pesquisa Diagnóstico e Terapia de Doenças Infecciosas e Câncer da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz está realizando um estudo de interesse para o diagnóstico e controle da doença causada pelo novo coronavírus. Se você quiser participar desse estudo, solicitamos que autorize a coleta de 10 mL de seu sangue, a coleta de saliva para realizarmos exames laboratoriais e o acesso ao seu prontuário médico que ajudarão no diagnóstico rápido do novo coronavírus e na descoberta de formas de controlar a pandemia. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma (roxo) e leve dor localizada. Entretanto, a coleta será feita por profissional capacitado e com grande experiência. Será utilizado material descartável de boa qualidade (como agulhas e tubos a vácuo). A coleta de saliva, por sua vez, é indolor e não causa nenhum desconforto bastando fazer uma raspagem de cotonete no interior de sua boca. As coletas serão feitas a cada 3 dias durante 15 dias enquanto você estiver no hospital

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

e, depois, 1 vez por mês durante 3 meses quando o equipe de saúde irá até sua casa realizar a coleta. O material coletado ficará guardado na Fiocruz para uso exclusivo neste estudo e será descartado após 2 anos da data da coleta. Toda informação obtida nessa pesquisa é considerada confidencial. Sua participação é totalmente voluntária e caso você não queira participar não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento. Você também pode desistir da participação em qualquer momento da pesquisa, caso assim resolva. Você não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração por sua participação. A assinatura desse termo de consentimento garante a assistência integral e gratuita, pelo tempo que for necessário, em caso de complicações e danos decorrentes da sua participação no estudo. Você terá acesso a todos os resultados derivados desse estudo. Você e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma via com você e a outra com o pesquisador responsável."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.4. No projeto detalhado, página 8 de 10, é informado que "Os dados individuais e clínicos dos pacientes participantes deste estudo serão obtidos de relatórios médicos e prontuários." Se houver intenção de consultar o prontuário, essa informação deverá estar claramente expressa no TCLE, bem como a anuência do participante da pesquisa para o acesso e uso dos seus dados registrados no prontuário. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: A informação sobre o acesso ao prontuário médico de cada participante, bem como anuência do mesmo para acesso e uso dos seus dados foi incluída no "Anexo5_TCLECovid19" que compreende o TCLE com as alterações (versão limpa) e no "Anexo5_TCLECovid19_AlteraçõesCorVermelha" que compreende o TCLE com as alterações destacadas na cor vermelha. O item está transcrito a seguir: "Prezado Senhor/Prezada Senhora, O grupo de pesquisa Diagnóstico e Terapia de Doenças Infecciosas e Câncer da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz está realizando um estudo de interesse para o diagnóstico e controle da doença causada pelo novo coronavírus. Se você quiser participar desse estudo, solicitamos que autorize a coleta de 10 mL de seu sangue, a coleta de saliva para realizarmos exames laboratoriais e o acesso ao seu prontuário médico que ajudarão no diagnóstico rápido do novo coronavírus e na descoberta de formas de controlar a pandemia. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma (roxo) e leve dor localizada. Entretanto, a coleta será feita por profissional capacitado e com grande experiência. Será utilizado material descartável de boa qualidade (como agulhas e tubos a vácuo). A coleta de saliva, por sua vez, é indolor e não causa nenhum desconforto bastando fazer uma raspagem de cotonete no interior de

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

sua boca. As coletas serão feitas a cada 3 dias durante 15 dias enquanto você estiver no hospital e, depois, 1 vez por mês durante 3 meses quando o equipe de saúde irá até sua casa realizar a coleta. O material coletado ficará guardado na Fiocruz para uso exclusivo neste estudo e será descartado após 2 anos da data da coleta. Toda informação obtida nessa pesquisa é considerada confidencial. Sua participação é totalmente voluntária e caso você não queira participar não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento. Você também pode desistir da participação em qualquer momento da pesquisa, caso assim resolva. Você não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração por sua participação. A assinatura desse termo de consentimento garante a assistência integral e gratuita, pelo tempo que for necessário, em caso de complicações e danos decorrentes da sua participação no estudo. Você terá acesso a todos os resultados derivados desse estudo. Você e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma via com você e a outra com o pesquisador responsável."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1531987.pdf	14/04/2020 09:26:41		Aceito
Outros	Anexo5_TCLECovid19_Alteracoes.pdf	14/04/2020 09:25:58	Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz	Aceito
Outros	Anexo4_ProjetoCovid19_Alteracoes.pdf	14/04/2020 09:25:26	Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz	Aceito
Outros	CartaResposta.pdf	14/04/2020 09:24:48	Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anexo5_TCLECovid19.pdf	14/04/2020 09:22:25	Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz	Aceito

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Anexo4_ProjetoCovid19.pdf	14/04/2020 09:18:44	Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz	Aceito
Declaração de concordância	Anexo3_CartaHospitalDaBaleia.pdf	01/04/2020 10:42:12	Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anexo2_CartaFiocruz.pdf	31/03/2020 07:55:07	Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz	Aceito
Folha de Rosto	Anexo1_FolhadeRosto.pdf	31/03/2020 07:54:36	Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 19 de Abril de 2020

Assinado por:

Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador(a))

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

