



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

**CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES DO GENE TLR9 (rs5743836 E rs187084),
ASSOCIADAS AO PERFIL DE CITOCINAS EM INDIVÍDUOS VACINADOS COM A
CORONAVAC**

WESLEY BARBOSA DE CASTRO

MANAUS

2024



WESLEY BARBOSA DE CASTRO

CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES DO GENE TLR9 (rs5743836 E rs187084), ASSOCIADAS AO PERFIL DE CITOCINAS EM INDIVÍDUOS VACINADOS COM A CORONAVAC

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA), da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

MANAUS

2024

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

-
- C355c Castro, Wesley Barbosa de
Caracterização das variantes do gene tlr9 (rs5743836 e rs187084), associado ao perfil de citocinas em indivíduos vacinados com a CoronaVac. / Wesley Barbosa de Castro. - 2024.
79 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Adriana Malheiro Alle Marie.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Manaus, 2024.
1. imunidade inata. 2. covid-19. 3. vacinação. 4. variação gênica .
5. coronavac . I. Marie, Adriana Malheiro Alle. II. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada. III. Título
-

WESLEY BARBOSA DE CASTRO

**CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES DO GENE TLR9 (rs5743836 E rs187084),
ASSOCIADAS AO PERFIL DE CITOCINAS EM INDIVÍDUOS VACINADOS COM A
CORONAVAC**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Educação
da Universidade Federal do Amazonas
como exigência para obtenção do título de
Mestre em Educação.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Malheiro
Alle Marie

APROVADO EM: 19/11/2024

BANCA EXAMINADORA

Adriana Malheiro Alle Marie

Orientador Prof.^a Dr.^a
Presidente da banca

Aya Sadahiro

Prof. Dr.
Membro Interno do PPGE

Rafaella Oliveira dos Santos

Prof. Dr.
Membro externo

DEDICATÓRIA

Ao meu único amor verdadeiro, Ana Célia Barbosa que me concedeu a vida com saúde e muito amor até seu último suspiro, que embora, não esteja mais presente fisicamente, te sinto ao meu lado, sinto todo teu amor dentro de mim e te carrego por onde eu for, em todas as minhas conquistas você sempre estará presente, minha mãe, meu eterno amor.

À minha avó Zelita, que tanto admiro, pela humildade, simplicidade e força, por tudo que fez por mim até hoje e continua fazendo, que me ensina a ser uma pessoa melhor com sua sabedoria e fé, com toda sua simplicidade, é o ser humano mais maravilhoso de coração bondoso que eu já conheci nesta vida.

Dedico a minha tia/madrinha Albejamere que tanto me auxiliou nos estudos e se tornou fonte de inspiração para minha caminhada acadêmica, com foco e dedicação e sem deixar de perder a humildade, gratidão e respeito ao próximo, se tornou a mulher que tanto admiro e amo. Obrigado por existir e por ser mais uma das grandes mulheres que tenho a honra de ter na minha história de vida.

Aos meus amigos que fiz ao decorrer do mestrado e os que mantenho até hoje, sou grato pela força, confiança e por me fazer acreditar no meu potencial, sou feliz em saber que posso contar com cada um, obrigado por toda motivação e apoio.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por me fazer acreditar todos os dias que eu iria conseguir alcançar mais uma conquista na minha carreira acadêmica e profissional;

Aos familiares, que mesmo de forma singela me deram apoio e demonstraram orgulho ao me ver conquistando mais um sonho;

A minha orientadora Dra. Adriana Malheiro, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa. Sou grato imensamente pela confiança e sua dedicação profissional, por compartilhar conhecimento e ser um ser humano incrível;

Sou imensamente grato a todos da fundação HEMOAM/UFAM pelo apoio, respeito e amizade que tenho o prazer de levar no peito;

Aos amigos da turma do mestrado que foram essenciais no meu crescimento como pesquisador;

Ao programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA), ao todo seu corpo docente pelo esforço e profissionalismo no auxílio do conhecimento;

À Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de cursar o mestrado no programa de pós-graduação;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto;

Aos colaboradores e voluntários da pesquisa, obrigado pela cooperação neste projeto, sem essa colaboração, este estudo não teria sido possível;

Enfim, sou grato a todos que de forma direta ou indireta fazem e se sentem parte desta conquista, meu muito obrigado.

EPÍGRAFE

*“O objetivo final da ciência é fazer avançar nosso conhecimento do mundo...
O cientista formula perguntas sobre o que não é conhecido ou compreendido e tenta
respondê-las.”*

(Ernst Mayr)

RESUMO

Introdução: A covid-19 é uma doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2, responsável pela última pandemia, declarada em março de 2020. Levou a óbito cerca de 7 milhões de pessoas em todo o mundo, no Brasil, mais de 700 mil óbitos foram confirmados pela doença. A imunização contra a covid-19 segue em andamento, sendo a principal estratégia de profilaxia disponível contra o vírus. Mundialmente mais de 13 bilhões de doses vacinais já foram administradas, no Brasil mais de 500 milhões de doses de vacinas já foram aplicadas na população. Estudos diversos avaliam a resposta imune e eficácia das vacinas contra a covid-19, a fim de entender os mecanismos imunológicos desencadeados pelos imunizantes. A resposta imune induzida pela vacina pode sofrer a influência de diversos fatores, que variam de ambientais e genéticos, portanto, tal importância de estudar esses polimorfismos, variações de nucleotídeo único em genes de vias da resposta imune que podem estar associados a diferenças de resposta apresentadas pelos indivíduos imunizados.

Objetivos: O presente estudo tem como objetivo analisar possíveis influências de polimorfismos de nucleotídeo único no gene do receptor TLR9 (rs5743836 e rs187084), que possam estar associados ao perfil de citocinas em indivíduos vacinados com a CoronaVac. **Material e Métodos:** Para este estudo foram coletadas amostras de 170 servidores da Fundação HEMOAM. As amostras foram coletadas em três tempos: T0 ou pré-vacinação (n=170), T1 60 dias após a segunda dose (n=170) e T2 90 dias após a segunda dose (n=170), para genotipagem (PCR-RFLP) e análise de citocinas (Citometria de Fluxo). **Resultados:** Nos colaboradores deste estudo ocorreu um aumento significativo dos níveis séricos das citocinas de perfil Th1 (IL-6), Th2 (IL-4) e Th17 (IL-17) e regulatórias (IL-10) quando comparados ao tempo T0 aos tempos T1 e T2, os indivíduos portadores dos genótipos homozigotos C/C, C/T e T/T de ambas as variantes tiveram uma magnitude significativa de citocinas, visto que o genótipo C/C de *TLR9* 1486 observamos no tempo T1 uma maior concentração frente aos outros genótipos. **Conclusão:** Esses resultados sugerem que possivelmente esteja ocorrendo um equilíbrio do perfil Th1 (IL-6) e regulatórias (IL-10) nos indivíduos vacinados com a CoronaVac, evitando assim um curso mais grave da doença.

PALAVRAS-CHAVE: Imunidade Inata; covid-19; Vacinação; Variação genética; CoronaVac.

ABSTRACT

Introduction: COVID-19 is an infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus, responsible for the last pandemic, declared in March 2020. It has killed approximately 7 million people worldwide; in Brazil, more than 700,000 deaths have been confirmed due to the disease. Immunization against COVID-19 is ongoing and is the main prophylaxis strategy available against the virus. Worldwide, more than 13 billion vaccine doses have already been administered; in Brazil, more than 500 million vaccine doses have already been applied to the population. Several studies have evaluated the immune response and efficacy of COVID-19 vaccines in order to understand the immunological mechanisms triggered by the immunizers. The immune response induced by the vaccine can be influenced by several factors, ranging from environmental to genetic, hence the importance of studying these polymorphisms, single nucleotide variations in genes of immune response pathways that may be associated with differences in response presented by immunized individuals.

Objectives: This study aims to analyze possible influences of single nucleotide polymorphisms in the TLR-9 receptor gene (rs5743836 and rs187084), which may be associated with the cytokine profile in individuals vaccinated with CoronaVac.

Material and Methods: For this study, samples were collected from 170 employees of the HEMOAM Foundation. Samples were collected at three time points: T0 or pre-vaccination (n=170), T1 60 days after the second dose (n=170) and T2 90 days after the second dose (n=170), for genotyping (PCR-RFLP) and cytokine analysis (Flow Cytometry).

Results: In the collaborators of this study, there was a significant increase in the serum levels of Th1 (IL-6), Th2 (IL-4) and Th17 (IL-17) and regulatory (IL-10) cytokines when compared to time T0 to times T1 and T2, carriers of the homozygous genotypes C/C, C/T and T/T of both variants had a significant magnitude of cytokines, since the C/C genotype of TLR9 1486 we observed at time T1 a greater concentration compared to the other genotypes.

Conclusion: These results infer that a balance of the Th1 (IL-6) and regulatory (IL-10) profile is possibly occurring in individuals vaccinated with CoronaVac, thus avoiding a more severe course of the disease.

KEYWORDS: Innate Immunity; covid-19; Vaccination; Genetic variation; CoronaVac.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura esquemática do vírus SARS-CoV-2 causador da COVID-19. ..	17
Figura 2 - Ciclo de replicação viral	20
Figura 3 - Detecção de PAMPs por TLRs.....	28
Figura 4 - Localização genômica das variantes rs5743836 e rs187084 no gene TLR9.	30
Figura 5 - Análise da variante TLR9 – 1486CT em indivíduos vacinados com a CoronaVac por PCR-RFLP.	38
Figura 6 - Panorama de Mediadores Imunológicos dos Perfis Th1, Th2 e Th17	45
Figura 7 - Magnitude de Aumento das Citocinas de Acordo com os Tempos T1 e T2.	46
Figura 8 - Magnitude de Aumento das Citocinas de Acordo com os Perfis Th1, Th2 e Th17.	46
Figura 9 - Variante TLR9 – 1486 (rs 187084) concentração e comparação de citocinas de acordo com os perfis Th1, Th2 e Th17 em tempos diferentes.	48
Figura 10 - Variante TLR9 – 1237 (rs5743836) concentração e comparação de citocinas de acordo com os perfis Th1, Th2 e Th17 em tempos diferentes.	49
Figura 11 - Magnitude de Aumento das Citocinas de Acordo com as variantes (1237) rs5743836.....	50
Figura 12 - Magnitude de Aumento das Citocinas de Acordo com as variantes (-1486) rs187084	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição do gene, referência dos SNPs e primers utilizados na genotipagem.	40
Tabela 2 - Características demográficas da população de estudo. Distribuição por gênero e idade.....	43
Tabela 3 - Eventos adversos relatados após a administração da vacina	44
Tabela 4 - Descrição das variantes estudadas.....	47
Tabela 5 - Equipe de Pesquisa	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDAS

CMV	Citomegalovírus
CTL	Células T Citotóxicas
DAMP	Padrão Molecular Associado a Danos
DCs	Células Dendríticas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina 2
GC	Centro Germinativo
IFN-γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
INF- α	Interferon Alfa
LPS	Lipopolissacarídeo
LRR	Repetições Ricas em Leucinas
MHC II	Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II
MyD88	Fator de Diferenciação Mielóide 88
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Células Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrão Molecular Associado ao Patógeno
PBS	Phosphate buffered saline (Solução tampão de fosfato)
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA_m	Ácido Ribonucleico Mensageiro
SDRA	Síndrome do Desconforte Respiratório Agudo
SUS	Sistema Único de Saúde
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TCR	Receptor de Célula T
TFh	Célula T Folicular Auxiliar

Th	Linfócitos T helper (auxiliares)
TIR	Receptor Toll Interleucina-1
TIRAP	Domínio TIR Contendo Proteína Adaptadora
TLR	Receptor Toll Like (similar a Toll)
TMPRSS2	Protease Transmembranar serina 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAM	Translocação Associado a Proteína de Membrana 1
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (Adaptador indutor de IFN- β contendo domínio TIR)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	DOENÇA CORONAVÍRUS 2019 (COVID-19): ASPECTOS GERAIS E ETIOLOGIA	16
2.2	EPIDEMIOLOGIA	18
2.3	CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL	19
2.4	TRANSMISSÃO, SINTOMAS E DIAGNÓSTICO	21
2.5	RESPOSTA IMUNE NA COVID-19	22
2.6	VACINAS	23
2.7	RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR VACINAS	25
2.8	RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLRs)	26
2.9	VARIANTES rs5743836 e rs187084 TLR-9	29
3	JUSTIFICATIVA	31
4	OBJETIVOS	33
4.1	OBJETIVO GERAL	33
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5	MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1	ASPECTOS ÉTICOS	35
5.2	MODELO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	35
5.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO, NÃO-INCLUSÃO E EXCLUSÃO	35
5.4	FLUXOGRAMA: DEMONSTRATIVO DAS ETAPAS DO PROJETO	36
5.5	COLETAS DAS AMOSTRAS	37
5.6	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA	37
5.7	GENOTIPAGEM PCR-RFLP	37
5.8	DOSAGEM DE CITOCINAS POR CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA) ...	41
5.9	ANÁLISE DOS RESULTADOS	41
6	RESULTADOS	43
6.1	DADOS DEMOGRÁFICOS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EPIDEMIOLÓGICAS	43
6.2	PERFIL PANORÂMICO DA RESPOSTA IMUNE DE MEDIADORES IMUNOLÓGICOS DOS PERFIS TH1, TH2 E TH17 EM INDIVÍDUOS VACINADOS COM A CORONAVAC	44
6.3	FREQUÊNCIA DAS VARIANTES DE INTERESSE	47
6.4	ANÁLISE DAS VARIANTES DO GRUPO DE VACINADOS DE ACORDO COM O PERFIL TH1, TH2 E TH17	48

6.5	ANÁLISE DE CITOCINAS DE ACORDO COM O GENÓTIPO DE CADA VARIANTE.....	50
7	DISCUSSÃO.....	53
8	CONCLUSÃO.....	60
9	EQUIPE DE PESQUISA.....	61
10	CRONOGRAMA.....	62
11	REFERÊNCIAS.....	63
12	ANEXOS	69

Introdução e Revisão
Bibliográfica

1 INTRODUÇÃO

A pandemia da covid-19 causada pelo vírus SARS-CoV-2, surgiu em meados de dezembro de 2019 em Wuhan, na província de Hubei, China. Desde seu início, o número de casos cumulativos de infecções ocasionado pelo vírus passa de 700 milhões, com aproximadamente 6 milhões de óbitos registrados mundialmente. No Brasil, os números de casos somam mais 38 milhões com mais de 700 mil óbitos confirmados (OPAS et al, 2023).

A campanha de vacinação contra a covid-19 teve início em dezembro de 2020 e hoje conta com mais de 13 bilhões de doses vacinais administradas mundialmente, com o número de doses aplicadas no Brasil passando de 500 milhões (OMS et al., 2023)

Desde o início da campanha de vacinação contra a covid-19, diversos estudos sobre a eficácia e resposta imune mediada pelas vacinas vêm sendo realizada, com o intuito de melhor elucidar os mecanismos imunológicos desencadeados, bem como a proteção oferecida pelos imunizantes (BARROS et al, 2020).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa ativada em resposta aos estímulos vacinais, sendo os receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PRRs), um dos seus principais mecanismos de ação (SILVA et al., 2021). Os receptores do tipo Toll (TLR), exercem um papel fundamental no reconhecimento e ativação da resposta imune frente à infecção ou vacinação contra o vírus SARS-CoV-2, levando a uma cascata de sinalização moleculares e ativação de respostas imunológica específica (FILHO et al., 2021). Diversos fatores intrínsecos e extrínsecos influenciam na forma como estes respondem ao estímulo vacinal (VIEIRA et al., 2020).

Estudos de associação de variações genéticas em genes da resposta imune inata com a predisposição, suscetibilidade ou proteção frente a covid-19 vêm sendo descritos na literatura. Variantes genéticas em genes dos TLR já foram associados à prognóstico ruim e favorável em diversas doenças infecciosas e imunológicas (SUGAHARA; FERREIRA; PRANCIC, 2021). Diante disso, o presente estudo tem como objetivo analisar relação de determinados polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene do receptor TLR9 (rs5743836 e rs187084), que possa estar associado ao perfil de citocinas, em indivíduos vacinados com a CoronaVac.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOENÇA CORONAVÍRUS 2019 (COVID-19): ASPECTOS GERAIS E ETIOLOGIA

A covid-19 é uma infecção que afeta principalmente a trato respiratório superior e inferior. A doença é altamente contagiosa, apresenta alta taxa de mortalidade e sua fisiopatologia ainda não está totalmente esclarecida. O dano pulmonar, juntamente com a desregulação imunológica generalizada, são os principais componentes da patogênese da COVID-19. Os primeiros casos surgiram em dezembro de 2019, em Wuhan, China, sendo então relatados como uma pneumonia grave, causada por um agente infeccioso até então desconhecido. Posteriormente, descobriu-se que o agente infeccioso era um novo beta coronavírus (β CoV), denominado coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), devido à sua semelhança filogenética com o SARS-CoV (ABUFARES, 2022).

Os coronavírus são conhecidos desde a década de 60 e fazem parte da ordem *Nidovirales*, família de vírus *Coronaviridae* e subfamília *Orthocoronavirinae*. Apresentam em sua estrutura externa projeções de proteínas que se assemelham a uma coroa, de onde descende o seu nome (HUN et al., 2021). Os CoVs (Coronavírus) possuem cerca de 60 - 140 nm de diâmetro e são revestidos por proteínas e possuem como material genético um RNA de fita simples de polaridade positiva, onde é facilmente transcrito após chegar na célula hospedeira (BORGES et al., 2020).

Os coronavírus são divididos em quatro gêneros principais: Alfa, Beta, Gama e Delta que infectam tanto os seres humanos, como os animais. Nos gêneros Alfa e Beta encontram-se as cepas que mais acometem humanos, em sua maioria, causando infecções leves do trato respiratório, como os HCoV, NL63 e 229E, pertencentes ao gênero Alfa (VIEIRA et al., 2020).

Ao todo são conhecidas sete espécies de betacoronavirus que infectam seres humanos, e é neste gênero que se encontram as principais cepas emergentes de importância médica, como o SARS-CoV-1, que levou a epidemias de síndrome respiratória aguda grave em 2002 e 2003, tendo origem na China e afetando mais de 30 países, o MERS-CoV, que em 2012 ocasionou epidemias de

síndrome respiratória do Oriente Médio na Arábia Saudita e em 2019 o SARS-CoV-2, responsável pela última pandemia de covid-19 (VIEIRA et al., 2020; PALÚ et al., 2021).

O novo *betacoronavírus* compartilha 79% de similaridade genômica com o SARS-CoV e 50% com MERS-CoV, tendo a capacidade de se replicar no trato respiratório superior e inferior e causar pneumonia fatal (KUMAR et al., 2020). Com o decorrer dos anos, estudos relacionam as mutações dos Coronavírus a partir do surgimento de animais infectados, gerando novas cepas e causando novas infecções (NAGAMINE; SOUZA; CHAVES, 2021).

Sua estrutura genômica é composta por 14 quadros de leituras abertas (ORFs), 16 proteínas não estruturais (nsp 1-16) as quais compõem o complexo replicase, um terço restante é composto por 9 proteínas assessoriais e 4 proteínas estruturais: S (spike), E (envelope), M (membrana) e N (nucleocapsídeo), onde a proteína S é mediadora da entrada do SARS-CoV-2 nas células alvo (Figura 1) (HARRISON; LIN; WANG, 2020) (SHEREEM et al., 2020) (REDONDO et al., 2021).

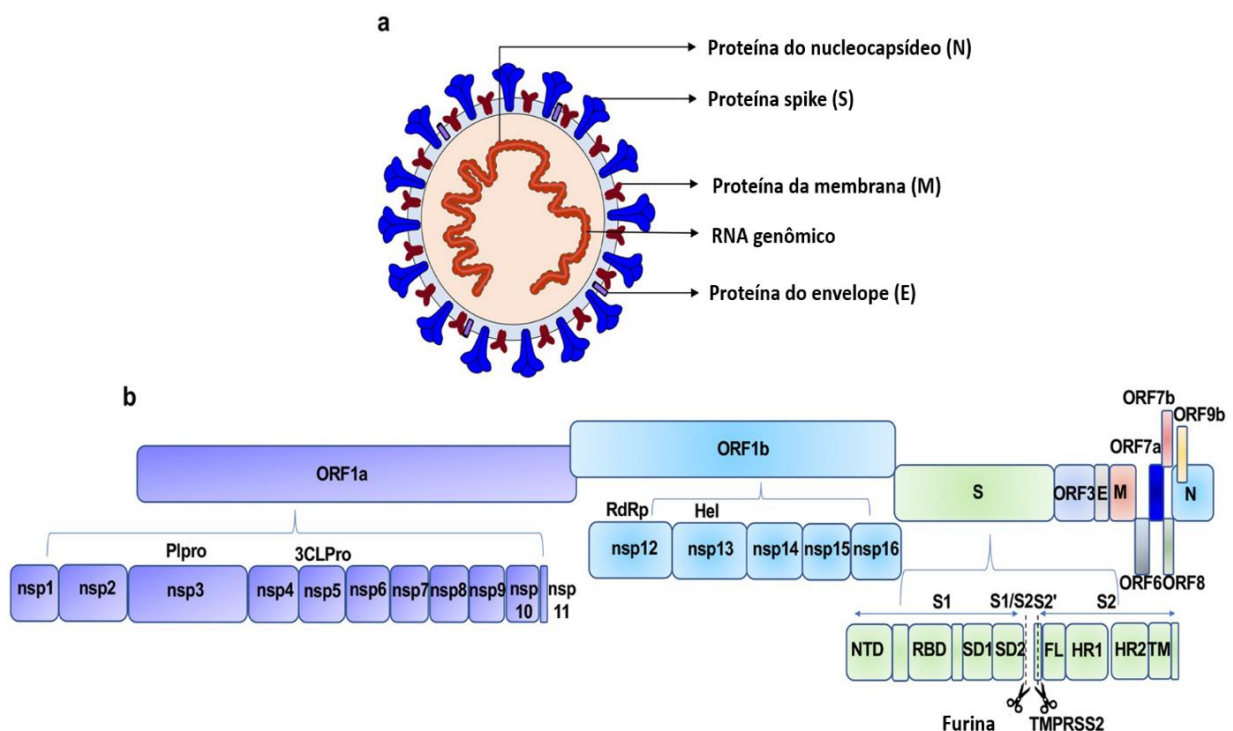


Figura 1 - Estrutura esquemática do vírus SARS-CoV-2 causador da COVID-19.

Estrutura esquemática do vírus SARS-CoV-2 causador da COVID-19. SARS-CoV-2 é revestido por quatro proteínas estruturais que incluem a proteína Spike (S), proteína de membrana (M), proteína Nucleocapsídeo (N) e proteína de envelope (E). (b) Seu

genoma é composto por ORF1a-ORF1b-S-ORF3-E-M-ORF6-ORF7 (7a e 7b) -ORF8-ORF9b-N em ordem. Dezesesseis proteínas não estruturais (nsp1–11, 12–16) são codificadas por ORF1a e ORF1b, respectivamente, e nove proteínas acessórias foram delineadas.

Fonte: Traduzido de Zhang et al., 2021

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Ao final de dezembro de 2019, uma grande ocorrência de pneumonia de causa desconhecida na China, levou a um alarme mundial. Investigações epidemiológicas constataram que o agente causador da infecção, era um vírus pertencente à família dos Coronavírus e estudos filogenéticos traçaram uma familiaridade genômica de 80% com o *betacoronavirus* SARS-CoV, sendo denominado posteriormente de SARS-CoV-2 (BITAR e STEINMETZ, 2020). Estudos do material genético viral, apontam fortemente para a origem zoonótica com semelhança genômica de 90% com coronavírus de morcegos, (VIEIRA et al., 2020) (CAVALCANTE; ABREU, 2020).

Inicialmente, Wuham (China), se tornou o epicentro da doença, com altos índices de casos graves e mortes, poucos meses depois a transmissão do vírus se espalhou para mais de 200 países, com mais de 1,7 milhões de casos confirmados e 110 mil óbitos registrados (HELMY et al., 2020) (MARTIN et al., 2020).

A ausência de vacinas e tratamentos disponíveis, unida a alta propagação e sustentabilidade biológica do vírus, fez com que em 11 março de 2020, fosse declarada situação de pandemia de covid-19, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), (SOUTO, 2020, SHEREEN et al., 2020).

Em 3 anos desde seu início, o número de casos cumulativos de infecções pelo vírus soma mais de 700 milhões em todo o mundo, com aproximadamente mais de 6 milhões de óbitos confirmados pela doença. No Brasil, o número de casos de infecções cumulativas pelo vírus passa de 37 milhões com mais de 700 mil óbitos registrados (WHO., et al 2023).

A não interrupção do processo de transmissão viral fez com que o vírus SARS-CoV-2 sofresse mutações, como exemplo a variante gama, também conhecida como P.1, a principal responsável pela segunda onda de COVID-19 no Brasil, tendo impactos devastadores (SILVA et al, 2021) (MICHELON, 2021). Manaus, a capital do

Amazonas, cidade que iniciou e sucumbiu primeiramente a esse processo, levando ao colapso do serviço de saúde pública e privada, caracterizada principalmente, pela falta de oxigênio, ocasionando a morte de vários indivíduos, apontando o estado do Amazonas como um dos maiores índices de casos e mortes pela covid-19 (BARRETO et al., 2021) (FARIA et al., 2021) (MENEZES; FONSECA; FERREIRA, 2020).

2.3 CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL

O vírus entra na célula hospedeira através da interação da proteína S com a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2). O processo de entrada se inicia com a ancoragem e ligação da proteína S, localizada na superfície de membrana do vírus, com o receptor de membrana celular, a enzima ECA-2 (VIEIRA, et al., 2020). A subunidade S1 da proteína S, se liga ao domínio de peptidase do receptor celular ECA-2, gerando uma conformação trimétrica ECA-2-S1-S2, resultando na liberação de enzimas proteolíticas pela célula hospedeira (JACKSON, C.B et al., 2022).

Assim, a Serina Protease Transmembranar do tipo II (do inglês *type II transmembrane serine protease* - TMPRSS2), cliva a subunidade S1, levando a endocitose viral ou fusão de membrana e entrada do vírus na célula, (ZHANG et al., 2020). A absorção de SARS-CoV-2 pelas células hospedeiras não depende apenas da ligação da proteína S do vírus ao receptor ECA-2, também requer a ativação da proteína S pela TMPRSS2. Logo, sua atividade mútua é necessária para a entrada do vírus na célula hospedeira (PALÚ, I.A. 2021) (LIMA; SOUSA; LIMA, 2020).

Após a formação do complexo ECA2-S1-S2, as partículas virais são absorvidas por endossomos e a subunidade S1 é clivada pela enzima catepsina-L, ocasionando a fusão das duas membranas (LIU et al., 2020). Já dentro dos endossomos o vírus libera o RNA de fita simples de polaridade positiva, permitindo a produção de estruturas proteicas, necessárias para a sua replicação viral. As partículas virais geradas são transportadas na junção do retículo endoplasmático na qual é encaminhada para complexo de Golgi pelo compartimento intermediário de onde seguem em vesículas se complexando à membrana citoplasmática, em que são liberadas por brotamento, como mostrado na figura 2 (BRITO, et al. 2020).

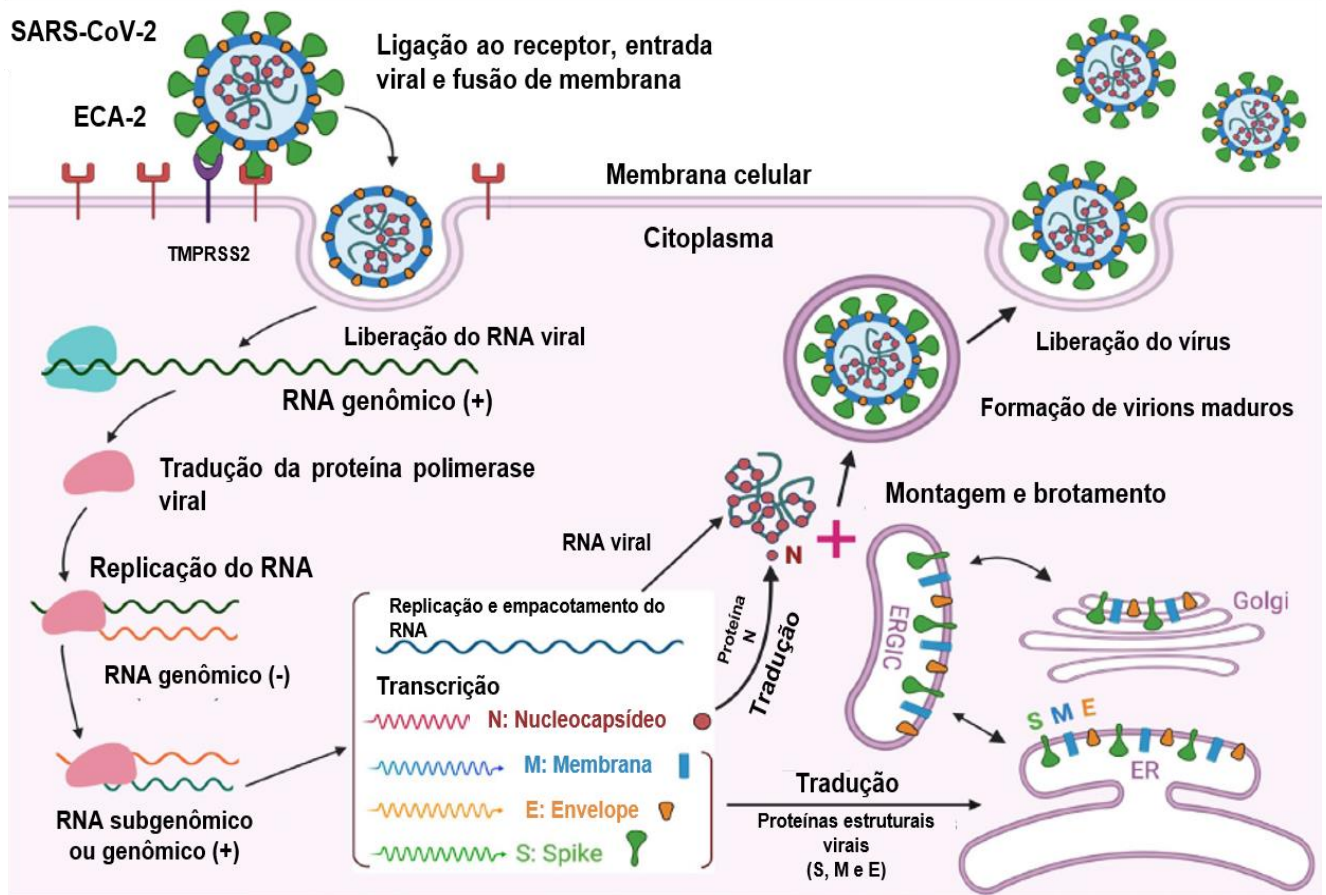


Figura 2 - Ciclo de replicação viral.

O ciclo de replicação do SARS-COV-2 inicia através da ligação de sua proteína de superfície (S) com a ECA-2. O RNA viral é liberado no citoplasma e traduzido, replicado e transcrito. Proteínas N, M, E, S e RNA viral são posteriormente montados no compartimento intermediário ER-Golgi (ERGIC) para formar virions maduros e liberados por exocitose para infectar outras células.

Fonte: Traduzido e adaptado de Jiang, et al., 2020

2.4 TRANSMISSÃO, SINTOMAS E DIAGNÓSTICO

A infecção pelo SARS-CoV-2 ocorre de um indivíduo infectado para outro, por meio de gotículas de saliva, tosse, espirro ou através de objetos ou superfícies contaminadas, seguido de interação com mucosas como olhos, boca e nariz, (ISER et al., 2020). O período de incubação do vírus varia de 3 a 5 dias podendo ocorrer a transmissão do 7 ao 8 dia de infecção, sendo que, indivíduos com infecção assintomática também podem transmitir o vírus, (OLIVEIRA; MATOS; SIQUEIRA, 2020) (CAVALCANTE; ABREU, 2020).

Os sinais e sintomas mais comuns são febre, tosse seca, coriza, dor de garganta e dificuldade respiratória. Estudos evidenciam que 80% das pessoas que se infectam com o vírus, são assintomáticas ou apresentam sintomas leves da doença, se recuperando assim, sem a necessidade de tratamentos específicos, (SOUZA, et al., 2020). No entanto, em torno de 20% dos casos precisam de assistência hospitalar, cuidados intensivos devido a manifestação grave ocasionada pela covid-19, o que leva principalmente à síndrome respiratória e pneumonia, que acomete cerca de 5% dos pacientes, (SOUZA et al., 2020).

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), que se manifesta nas formas graves da covid-19, tem maior incidência em indivíduos com comorbidades e adultos acima dos 60 anos. Nesses indivíduos é comum o aparecimento de doenças de base e supressão imunológica devido a imunossenescência, fazendo dessa população um dos principais grupos de riscos com elevado número de óbitos (OLIVEIRA; MATOS; SIQUEIRA, 2020); (MOREIRA, 2021).

A infecção pelo vírus SARS-CoV-2, pode desencadear diversas complicações, dentre elas, a chamada tempestade de citocinas, levando o paciente a maiores agravos, como quadros de hiper coagulabilidade e disfunções em múltiplos órgãos, (OZCEYLAN e ALÇTUNTAS, 2021). Nesses casos se observa o acometimento extrapulmonar, em que a manutenção do processo infeccioso leva à resposta imunes desreguladas com intensa liberação de citocinas pró-inflamatórias, se tornando sistêmico, atingindo assim, outros órgãos, (ALVAREZ e VIGIL, 2020).

O exame RT-qPCR é considerado o padrão ouro e referência para

identificação da presença do vírus por meio de vias respiratórias. Recomenda-se a realização logo nos primeiros dias dos sintomas, pois é quando o indivíduo possui carga viral relativamente mais alta, possibilitando assim identificar o genoma do vírus. O exame é realizado por meio da introdução de um swab na cavidade nasal e oral (nasofaringe e orofaringe), visando obter células epiteliais do trato respiratório superior possivelmente contaminadas pelo vírus, (NASCIMENTO et al., 2020) (SALIAN et al., 2020).

Vale ressaltar que resultados negativos não excluem a possibilidade deste indivíduo estar no período de incubação da infecção, quando a carga viral pode estar abaixo do limite de detecção do teste (FERNANDES et al., 2022).

Com o avanço da pandemia, houve aumento expressivo da procura por métodos de diagnósticos para a covid-19, os testes sorológicos identificam anticorpos (IgM, IgA e IgG), na qual são gerados como parte da resposta imune do indivíduo contra o SARS-CoV-2 (YÜCE; FILIZTEKIN; OZKAYA, 2020). Esses anticorpos são possíveis de serem detectados somente após a primeira semana do início dos sintomas clínicos, com maior probabilidade na segunda semana da infecção. Os testes sorológicos para detecção de anticorpos específicos contra as proteínas virais são feitos por ELISA, por ele, pode-se afirmar ou refutar o contato prévio com o vírus, (RAI et al., 2021).

2.5 RESPOSTA IMUNE NA COVID-19

O processo inflamatório desencadeado pela imunidade inata leva à ativação da resposta imune adaptativa, mediada pelos linfócitos T e B. Essa resposta caracteriza-se pela produção de anticorpos específicos e pela formação de células de memória, fundamentais para o controle das infecções virais e para a eficácia das vacinas. (SETTE e CROTTY, 2021).

O sistema imune inato tem papel primordial na fisiopatologia da covid-19, sendo essencial para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. O vírus é reconhecido por receptores de reconhecimento padrão (PRR), como por exemplo, receptores do tipo Toll (*Toll Like Receptors*), possuindo capacidade de reconhecer os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs), sobre células lesadas durante uma infecção, liberando

inúmeros mediadores químicos, como citocinas e quimiocinas, células imunes como macrófagos e células dendríticas (DCs), assim como os Interferons (IFNs) I e III, IL-6, TNF α , L-1 β e IL-8 que induzem o recrutamentos de células inatas e adaptativas no controle da infecção, (SILVA et al., 2021), (FERRAZ et al., 2011).

Estudos têm demonstrado a relação de pacientes com pneumonia grave associada a covid-19 com a ativação elevada de neutrófilos, aumentando inflamação pulmonar, secreções de mucosas espessas nas vias aéreas, maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias, dano pulmonar e microtrombose, assim leucocitose e neutrofilia são características da infecção aguda, onde a neutrofilia prediz pior prognóstico em pacientes com covid-19 (LI et al., 2020).

Os linfócitos têm um papel fundamental na infecção viral, ativados por T CD4+. Os linfócitos B produzem anticorpos específicos e orquestram respostas a outras células imunes, os T CD8+ tem uma ação citotóxica sobre as células infectadas, (SETTE e CROTTY, 2021). A redução dessas populações celulares na infecção pelos SARS-CoV-2, pode estar associado à cronificação da doença nos pacientes com covid-19. A indução à resposta viral, Th1, Th2 e Th17, levam à secreção de importantes citocinas nesse processo. Estudos relatam redução de linfócitos T reguladores e linfócitos B em pacientes em situação mais grave da doença, o que pode explicar a exacerbação da quantidade de citocinas pró-inflamatórias nesses pacientes. Consequentemente, pode-se observar aumento na atividade citotóxica de T CD8+ intensificando esse processo inflamatório e diminuição de T CD4+. Ao reduzir os níveis de interleucinas (IL-6, IL-10 e TNF) consequentemente há um aumento da relação linfócitos (T CD8+/T CD4+) (BONJORNIO, et al., 2020).

2.6 VACINAS

A imunização contra a COVID-19 teve início mundialmente em dezembro de 2020. Atualmente, existe uma ampla variedade de vacinas que apresentam tecnologias variadas, eficazes e seguras no controle da covid-19, A campanha de imunização no Brasil teve início em fevereiro de 2021 com a vacina de vírus inativado CoronaVac. (LOPES; LAZZARETTI; SMIDERLE, 2021), (CASTRO, 2021).

Existem quatro vacinas disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS) para imunização contra o vírus SARS-CoV-2. A vacina Oxford- AstraZeneca, na qual utiliza

a tecnologia de vetor viral do adenovírus recombinante de chimpanzé, deficiente para replicação, que expressa a glicoproteína S do SARS-CoV-2, (BEE et al., 2022).

A vacina BNT162b2 (Pfizer-BioNTech), é uma das vacinas que se encontram disponível no SUS, qual se utiliza a tecnologia de mRNA com o nucleosídeo modificado em nanopartículas lipídicas, permitindo que o RNA entre nas células hospedeiras para a produção da proteína S do vírus SARS-CoV-2, (PATEL et al., 2022).

Outra importante vacina disponível contra a covid-19 é a Janssen, produzida pela Johnson & Johnson, que utiliza a técnica de vetor viral de um adenovírus humano recombinante e com incapacidade de replicação (BEE et al., 2022).

Nesta tecnologia, os genes adenovírus, que atribuem características infecciosas e prejudiciais aos seres humanos são removidos, e substituídos por genes virais já conhecidos. No caso da vacina Janssen, o gene retirado impede o adenovírus de autorreplicar-se e de causar qualquer manifestação patológica induzida pelo vírus, (BEE et al., 2022).

A CoronaVac foi a primeira vacina que teve seu uso autorizado no Brasil. É uma vacina de tecnologia de vírus inativado após o uso de substâncias químicas, (formaldeído e beta-propiolactona), e administrada via intramuscular, com aplicação de no mínimo duas doses, (JIN et al., 2022). Estudos realizados no Brasil mostraram que duas doses com intervalo de 14 dias, tiveram eficácia de 51%, tendo sua eficácia mantida em todos os grupos de estudo independente da infecção prévia, (FILHO et al., 2022); (JIN et al., 2020).

Estudos demonstram que a produção de anticorpos neutralizantes diminuem ao longo do tempo, por isso a implementação da terceira dose de reforço, buscando potencializar a imunidade, o que resultou na melhora da eficácia da CoronaVac acerca de 98% em casos graves no que diz respeito às variantes (JIN et al., 2020).

Um estudo no qual avaliou uma dose de reforço da CoronaVac em 40 voluntários, demonstrou que a ativação de células T CD4+ com o decorrer das semanas aumentou, sugerindo que a CoronaVac pode estimular respostas T CD4+ após a dose de reforço sustentadas ao longo tempo, tendo também um ligeiro aumento na produção de interferon gama (IFN- γ), o que implica em uma melhor resposta humoral e neutralização ao SARS-CoV-2 (SCHULTZ et al., 2022).

Estudos indicam que as quatro vacinas aprovadas pela ANVISA têm alto potencial no combate à covid-19, na redução de agravos em quadros clínicos e

mortalidade, mas são necessários estudos que possam garantir melhor embasamento sobre a durabilidade da resposta imune e seus mecanismos moleculares, visando uma melhor compreensão na administração das doses, (FILHO et al., 2022).

2.7 RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR VACINAS

A resposta imune desencadeada pelo organismo após a administração de uma vacina, é denominada imunidade ativa ou imunidade adquirida. Assim, dois tipos principais de células do sistema imune são ativados: célula B, que produz anticorpos para combater o vírus, e as células T que destrói células infectadas. Com a resposta do sistema imunológico à vacina, há uma queda nos níveis de anticorpos, mas algumas células B e T permanecem para combater futuras infecções (ABUFARES et al., 2022).

Então, o sistema imunológico é ativado, as células T CD4⁺ dependem do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC-II), peptídeo antígeno (AP) – MHC-II (complexo principal de histocompatibilidade), para assim se diferenciar em células T auxiliares (células Th) (LI et al., 2022). As células T CD8⁺ dependem do complexo molecular de classe I e se diferenciam em linfócitos T citotóxicos (CTL). Por meio das células Th as células B são ativadas para produzir anticorpos. Após a estimulação do antígeno as células B e T formam células de memória correspondente para proteger o indivíduo da infecção pelo mesmo patógeno, memória essa que pode durar por vários anos. Algumas vacinas podem proteger receptores da invasão viral e/ou induzir respostas de células Th1 e respostas persistentes no centro germinativo humano, proporcionando assim uma proteção mais eficiente (LI et al., 2022).

Com o reconhecimento do AP- MHC-II e do receptor de célula T (TCR), as T CD4⁺ distribuídas nos órgãos linfoides podem se diferenciar em Th1, quais secretam várias citocinas, como interleucinas 2 (IL-2), interferon gama (INF- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que regulam a expressão de receptores relacionados (IL-2R). Após a ligação de IL-2 e IL-2R, ocorre a proliferação de células T e a ativação de célula T CD-8⁺ é promovida. As células T CD-8 ativadas se diferenciam em CTL impulsionando ainda mais a respostas celular (ABUFARES et al., 2022), (JIN et al., 2022).

Quando ocorre a eliminação da infecção, os sinais acionados nas respostas contra o patógeno não mais existem, as respostas celulares são reduzidas, levando o sistema imunológico a homeostase (ABBAS, 2019).

Além das respostas das células T, as células T auxiliares foliculares (células T_{fh}) induzidas por vacinas de mRNA, podem desencadear células B do centro germinativo específicas e eficazes (GC – B – células). A interação de células B e T podem ativar células T_h, qual movem-se para folículos linfáticos, que se diferenciam em células T_{fh}, onde as células B ativadas se proliferam e se dividem formando então os centros germinativos (WANG et al., 2022) (LI et al., 2022).

Com o auxílio das T_{fh}, o que leva a mutações pontuais de alta frequência na região variável do gene do anticorpo das células B do centro germinativo, ocasionando a troca do gene de anticorpo, formando células B de memória e células plasmáticas, levando a produção de anticorpo de alta afinidade. Estudos tem revelado que a resposta de células B do centro germinativo sobre vacinas de mRNA tem se mostrado satisfatória principalmente após a segunda dose (LI et al., 2022).

E essencial a produção contínua de células B do centro germinativo para produção de células plasmáticas de vida longa. Quando temos células B do centro germinativo que não são transformadas em células plasmáticas, elas se tornam células de memória, onde estarão preparadas de forma a produzir anticorpos específicos para defender o organismo daquele antígeno, com auxílio de células T_h de memória quando encontram o mesmo antígeno (ABUFARES et al., 2022) (SOUZA et al., 2010).

Ou seja, respostas de células B do centro germinativo induzidas por uma vacina, pode levar a produção de anticorpos neutralizantes e persistente, acarretando uma forte imunidade humoral (WANG et al., 2022)

2.8 RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLRs)

Os receptores do tipo Toll-like (TLRs) são uma família de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), os quais são a base da resposta imune inata (SADIK et al., 2015). Os TLRs participam de diversos mecanismos celulares, no reconhecimento de PAMPs e DAMPs, e estão expressos em diversas células do

sistema imune inato como: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (DCs), células naturais Killer (NK), mastócitos, basófilos e eosinófilos (YU & FENG, 2018), (DELNESTE et al.,2007). Sua ativação leva a uma cascata de sinalização como mecanismo de defesa do hospedeiro e na reparação tecidual, ocasionando uma liberação de várias citocinas inflamatórias e moduladores imunológicos (Wang et al.,2015), (BARRAT et al., 2005).

As respostas ativadas pelo hospedeiro por meio dos TLRs de forma excessiva perturba a homeostase imunológica por ação inflamatória exacerbada de citocinas e quimiocinas, podendo levar o desenvolvimento e progressão de muitas doenças, como as chamadas doenças autoimunes (Komurcu et al.,2016). Estudos relatam que os reguladores relacionados à sinalização dos TLRs representam um alto potencial para medidas terapêuticas (GAO et al.,2017).

Os TLRs são proteínas transmembranas, 20 a 27 repetições ricas em leucinas (LRRs) extracelulares para reconhecimentos de PAMPs/DAMPs, tendo domínios transmembranares e intracelulares, possuem um domínio TIR (toll-interleucina 1 – IL-1), para ativação das vias de transdução de sinal a jusante (GAO et al.,2017).

Os domínios extracelulares possuem porções de glicano que servem como locais de ligação, mas esses reconhecimentos mediados por glicanos ainda não estão claros. As principais características que distinguem os TLRs estão relacionadas em sua especificidade do ligante, vias de transdução de sinal e sua localização (SINGH et al.,2014).

Os TLRs são localizados nos compartimento de membrana celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10) expressos na superfície da célula e temos os TLRs intracelulares (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) localizados no retículo endoplasmático (RE), endossomos e lisossomos (Figura 3). Eles são expressos em todos os sistemas imunológicos do inato ao adaptativo e em células não imune como células epiteliais e endoteliais e fibroblastos (DELNESTE et al.,2007), (WITTIG et al., 2015).

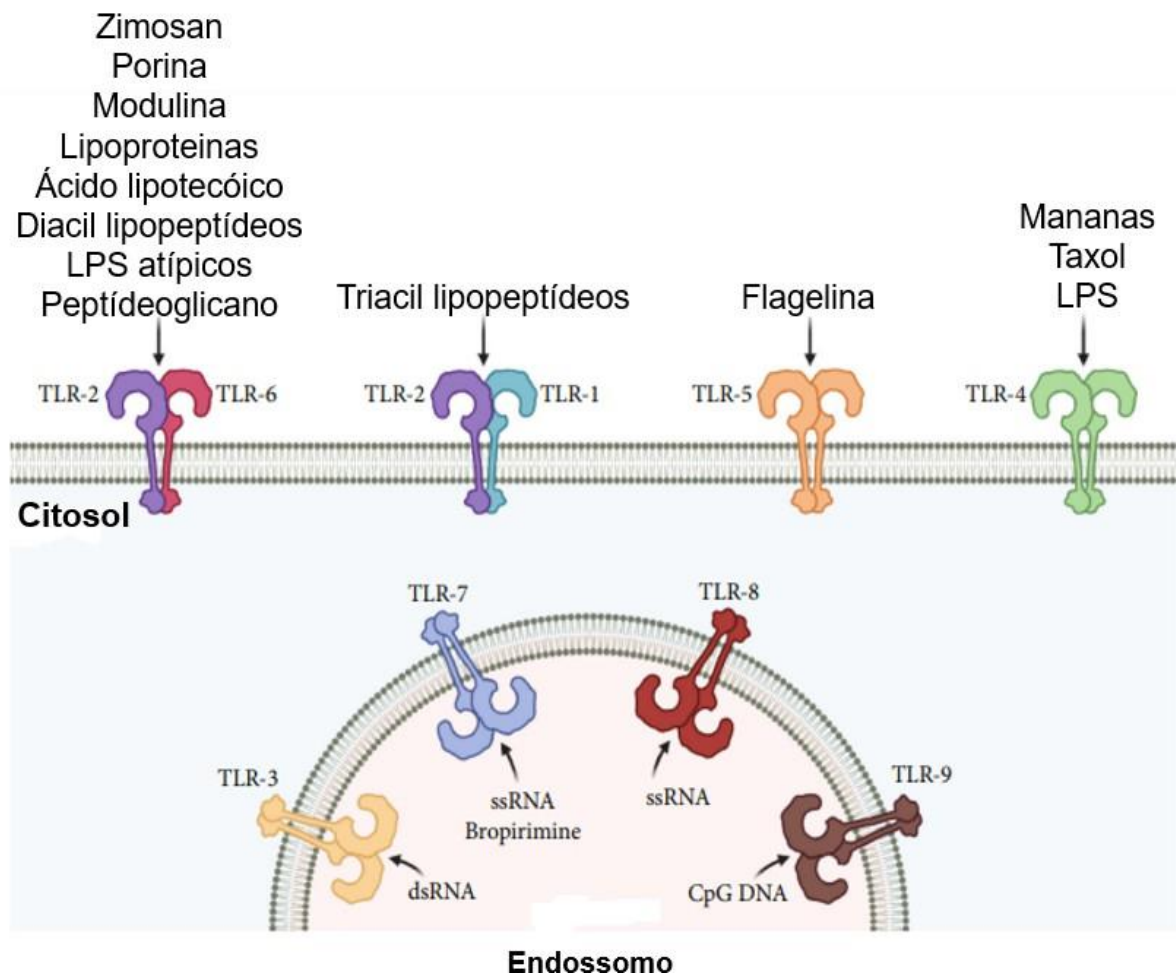


Figura 3 - Detecção de PAMPs por TLRs.

Fonte: Traduzido de SAMEER; NISSAR, 2021

O TLR9 fica localizado no compartimento de membrana intracelular dos endossomos e lisossomos, e em humanos há maior expressão em células B e células dendríticas plasmocitóides, todavia após sua ativação celular é possível observar o TLR9 em neutrófilos, monócitos e células T. No entanto, diferentes autores tem mostrado a expressão do TLR9 em células epiteliais respiratórias, (WITTIG et al., 2015).

Assim, o TLR9 reconhece vírus dsDNA, como o citomegalovírus de camundongo (MCMV) e os vírus herpes simples 1 e 2 e os genomas de protozoários, incluindo *Trypanosoma cruzi* (BLASIUS1; BEUTLER, 2010).

Os ligantes clássicos do TLR-9 são DNA de origem viral ou bacteriana, além de oligonucleotídeos CpG não metilados sintéticos, no entanto, estudos demonstram

que o TLR9 é capaz de reconhecer DNA endógeno, ocasionando o aumento da resposta inflamatória, (LEORATTI et al., 2008).

2.9 VARIANTES RS5743836 E RS187084 TLR-9

Por meio das vias de TLRs, como exemplo TLR9/MyD88 uma cascata de mediadores inflamatórios e diversos tipos de células podem ser desencadeados, como IFNs tipo 1, TNFa, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 e ativação de Th1 e Th17, linfócitos, células B, células dendríticas, neutrófilos e plaquetas, os quais tem uma alta possibilidade de estarem envolvidos na tempestade de citocinas, condições trombóticas, condições patológicas em múltiplos órgãos em pacientes com complicações mais graves da covid-19 (BEZEMER; GARSSSEN, 2020).

Condições de saúde do hospedeiro podem regular positivamente a expressão de TLR9, o que contribuiu para inflamação mediada por esse receptor elucidando a gravidade da resposta imune na infecção pelo SARS-CoV-2, um paciente em um estado pro-inflamatório pode levar a suscetibilidade para ativação da via TLR9, levando a alteração de expressão desse receptor nas células (XABREGAS et al., 2022).

O gene *TLR9* se localiza no braço curto do cromossomo 3 (3p21.2) codificando uma proteína de 1.032 resíduos de aminoácidos com peso molecular de 115,8 kDa (Figura 5). A variante rs5743836 tem sido associada a doenças imunomediadas e uma maior incidência de infecção adquirida em UTI, devido a uma predisposição genética levando a um ganho de função do TLR9 (DING et al, 2022).

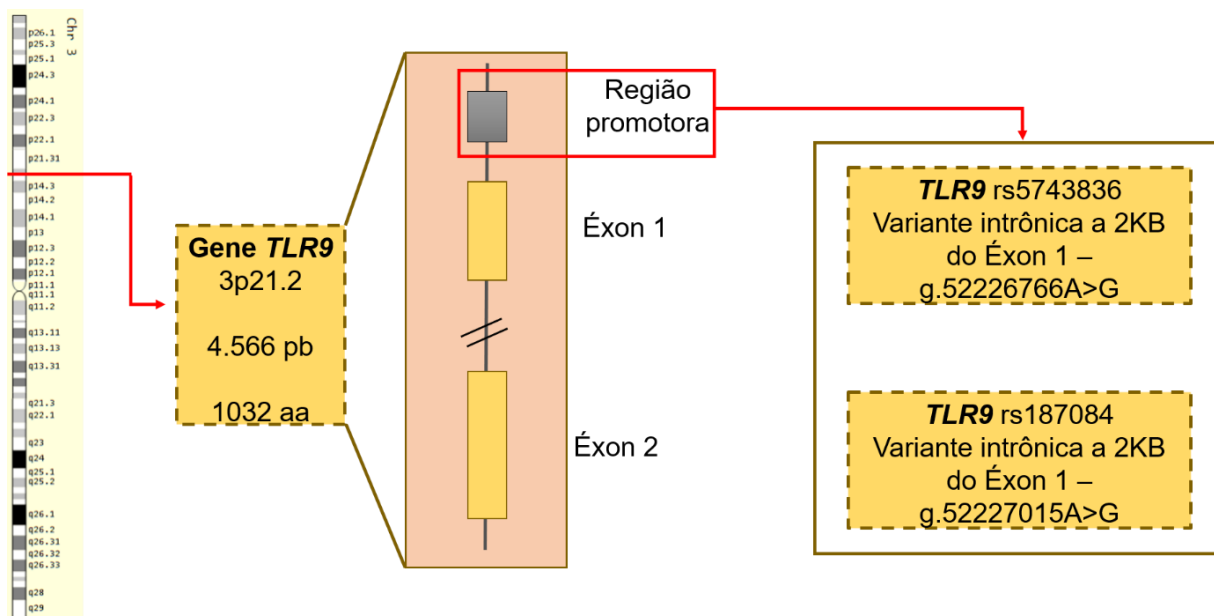


Figura 4 - Localização genômica das variantes rs5743836 e rs187084 no gene *TLR9*.

Fonte: Autoria própria, 2023 (Não publicado)

O polimorfismo *TLR9*-1237T/C cria um método de amplificação de sinalização *TLR9*/IL-6 gerando uma desregulação na ativação e proliferação de células B após estímulos CpG. Além disso o polimorfismo rs187084 do *TLR9* está associado a doenças como reumáticas, neoplasias, tuberculose pulmonar, onde serviu como base para nível de risco de pacientes internados relevantes para desenvolvimento de sepse e perda de função em pacientes críticos (BEZEMER; GARSSSEN, 2020).

Estudos evidenciam que o *TLR9* pode contribuir para o desenvolvimento e agravamento de SDRA. Um estudo realizado com pacientes em estado grave mostrou níveis elevados do ativador de *TLR9*, associados ao SDRA e mortalidade, tendo maior incidência em pacientes com polimorfismo relacionado ao aumento de expressão de *TLR9* (FAUSTO et al., 2020).

Todavia os TLRs são vistos como moléculas para auxiliar em novas terapias estratégicas, para controlar e prevenir o desenvolvimento de doenças que sofrem forte influência dos SNPs genéticos e os efeitos que eles trazem na modulação imunológica (EL-ZAYATE et al., 2019).

3 JUSTIFICATIVA

Embora os receptores do tipo Toll (TLRs) desempenhem papel fundamental na defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos, diversos estudos demonstram que polimorfismos nesses receptores podem alterar sua função e contribuir para o desenvolvimento ou agravamento de diferentes doenças. Diversos estudos têm demonstrado associação entre esses polimorfismos e a suscetibilidade à sepse, à asma, às infecções causadas pelo vírus sincicial respiratório (RSV) e à covid-19, associando esses polimorfismos a formas mais graves da doença e ao aumento da mortalidade hospitalar. No TLR9 estudos evidenciam que este polimorfismo seja um fator de risco, nos quais em certos casos foram observadas diferenças na amplificação na sua sinalização, levando a uma cascata de eventos inflamatórios, além de ter uma associação à doenças como, reumática, cânceres e pulmonar. Pesquisas relatam que as diferenças em pacientes em casos mais grave da covid-19 pode resultar, em parte, da predisposição genética, onde se observou diferenças inerentes no sistema imunológico. Dessa forma, este estudo tem como objetivo avaliar a influência dessas variantes na produção de citocinas em profissionais da saúde imunizados com a CoronaVac.

Objetivos

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar a influência das variantes no gene TLR9 sobre o perfil de citocinas em indivíduos vacinados com CoronaVac.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil sociodemográfico e os eventos adversos após a vacinação;
- Determinar a frequência das variantes rs5743836 e rs187084 na população de estudo;
- Analisar a produção de citocinas Th1, Th2, Th17 e regulatórias nos tempos T0 (pré-vacina) T1 e T2 após a segunda dose da vacinação;
- Investigar a associação entre as variantes estudadas e a produção de citocinas nestes indivíduos.

Material e métodos

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo faz parte de um projeto maior, coordenado pela Dra. Adriana Malheiro Alle Marie, intitulado: Análise da resposta imune e eficácia da vacina contra a covid-19 em profissionais da saúde da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas sob o seguinte número de CAEE: 42728021.0.0000.0009 e parecer: 4.526.128.

5.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo, longitudinal retrospectivo, com uma análise em três momentos (T0, T1 e T2) com profissionais da área da saúde da Fundação HEMOAM, vacinados contra a covid-19 (CoronaVac).

A amostragem é composta por 170 servidores no tempo T0 (pré-vacina) T1 e T2 todos considerados clinicamente saudáveis no momento da coleta e que haviam recebido o imunizante da CoronaVac contra a covid-19, maiores de 18 anos, que aceitaram participar deste estudo, assinando o TCLE e preenchendo o questionário sociodemográfico.

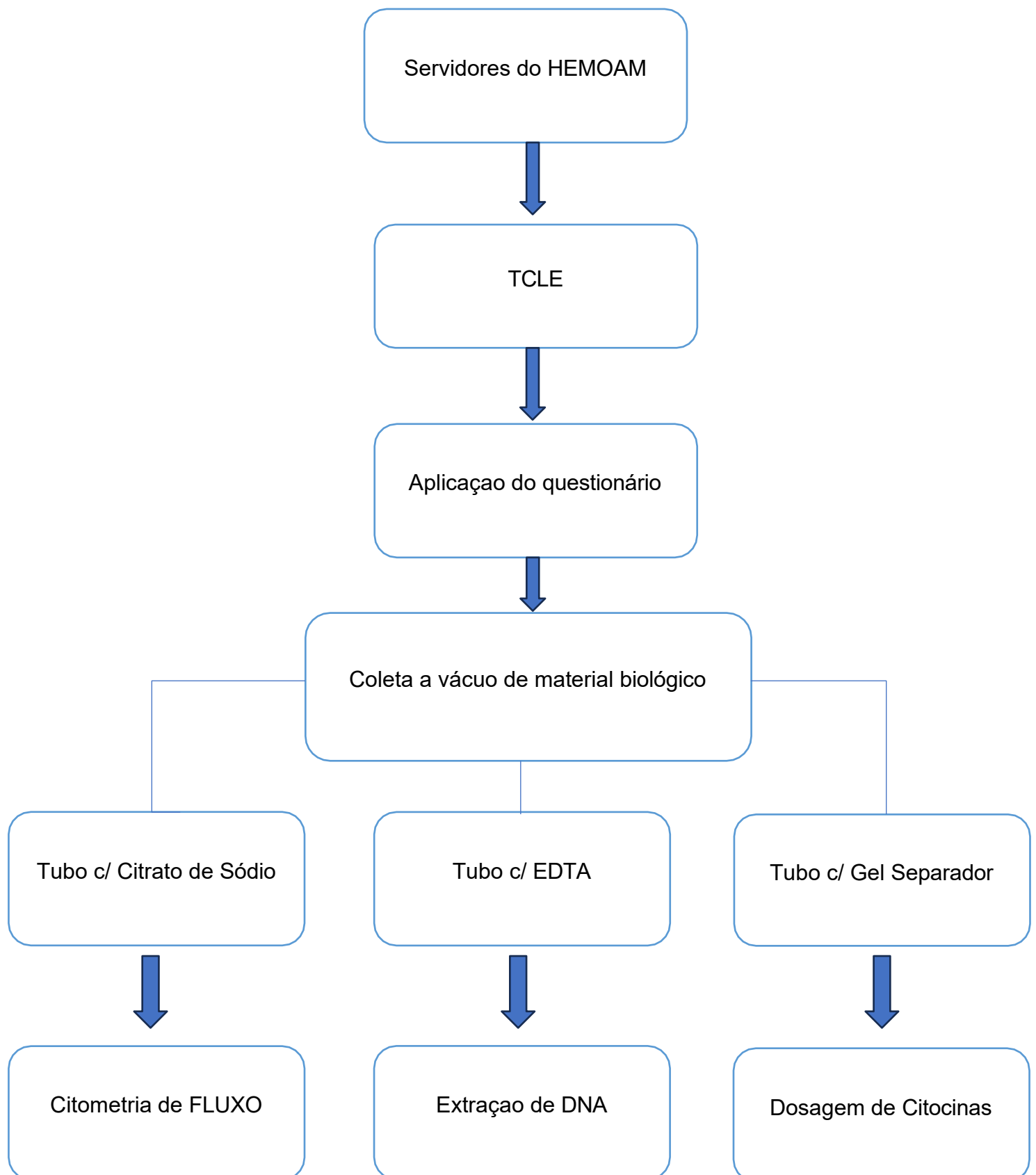
5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO, NÃO INCLUSÃO E EXCLUSÃO

CrITÉrios de inclusÃO: IndivÍduos saudÁveis, servidores da FundaçÃo HEMOAM, que receberam o imunizante da CoronaVac, de acordo com os critÉrios de vacinaçÃo do MinistÉrio da SaÍde, maiores de 18 anos que aceitaram preencher o questionÁrio demogrÁfico.

CrITÉrios de NÃo inclusÃo: servidores que no momento da coleta relataram a infecçÃo por covid-19, grÁvidas, pacientes com comorbidades ou outra doençA sintomÁtica.

CrITÉrios de exclusÃo: indivÍduos que participaram inicialmente, mas no decorrer do estudo desistiram ou suas amostras foram insuficientes para os experimentos.

5.4 FLUXOGRAMA: DEMONSTRATIVO DAS ETAPAS DO PROJETO



5.5 COLETAS DAS AMOSTRAS

As amostras para este estudo foram obtidas por punção venosa distribuídas em 2 tubos contendo EDTA e gel separador, para procedimentos destinadas à análise dos polimorfismos do TLR 9 e quantificação de citocinas.

As amostras foram processadas no laboratório multidisciplinar da Fundação HEMOAM, onde o soro e o plasma foram separados e congelados a -80°C até o momento de serem processadas.

5.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A extração do DNA genômico das amostras de sangue coletadas na Fundação HEMOAM, foi feita utilizando o reagente BRAZOL, com 200µL de amostra de sangue, adicionado a 400µL de Brazol e 100µL de clorofônio e centrifugado a 12 minutos a 10.000 rpm em T.A (Temperatura ambiente a 20°C). Após a adição de 500µL de etanol 100%, seguido de centrifugação e então após o descarte do sobrenadante, é levado ao banho seco a 56°C por 10 minutos, logo após adicionado a cada microtubo 100µL de água destilada estéril (H₂Odd).

O material genético foi quantificado em equipamento NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc) para análise da concentração dos ácidos nucleicos e seu grau de pureza, o DNA foi armazenado a -80°C até a realização da reação em cadeia de polimerase (PCR).

5.7 GENOTIPAGEM PCR-RFLP

Os polimorfismos nos genes dos receptores do tipo *Toll* foram genotipados pela técnica de PCR-RFLP descritas por Leoratti et al., (2008), Ramasawmy et al., (2009) e costa et al., (2017).

Para a genotipagem das variantes, foi utilizado mix, com volume total de 25 μ L, contendo: 4 μ L de DNA genômico em uma concentração de 50 a 200ng, adicionado a 21 μ L do Mix da PCR para a seguinte variante do TLR-9 (1237C/T – 1486C/T) contendo 15,3 μ L de H₂O ultrapura; 2,5 μ L de tampão 10x; 1,0 μ L de MgCl₂; 1.0 μ L de dNTPs; 0,5 μ L de primer forward e reverse e 0,2 de Taq DNA polimerase para a variante 1237C/T e 1486C/T. O processo de amplificação foi realizado no termociclador Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Em seguida foram utilizados 15,0 μ L de produto da PCR aos 10 μ L do Mix para a reação de restrição com a respectiva enzima, diluída em tampão enzimático de acordo com as instruções do fabricante. Os primers, as condições de ciclagem para PCR e as endonucleases de restrição estão descritas na tabela 01. Os fragmentos gerados pela PCR-RFLP foram separados por eletroforese em gel de agarose a 4% dissolvidos em 100ml de TBE 1X, adicionado a 2,0 μ L de brometo e visualizados em luz ultravioleta (UV) no aparelho de fotodocumentação molecular Imager Gel Doc™ XR (Bio-Rad Corporation, Hercules, CA, EUA), como demonstrados nas Figuras 5. Descrição dos genes, referências dos SNPs e primers utilizados na genotipagem estão descritos na tabela 01.

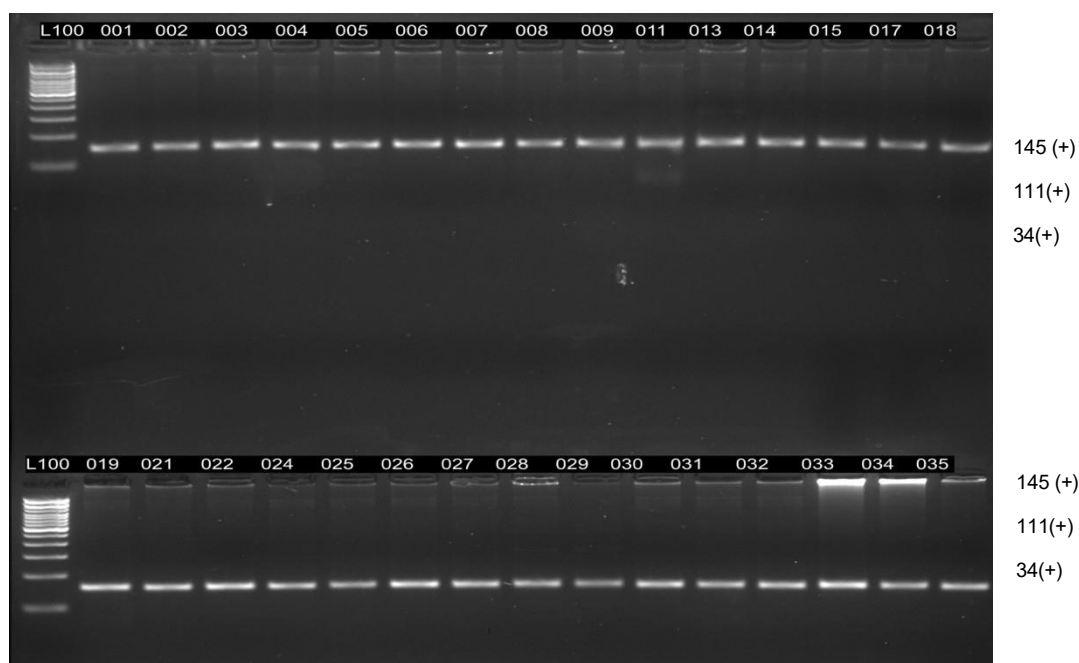


Figura 5- Análise da variante TLR9 – 1486CT em indivíduos vacinados com a CoronaVac por PCR-RFLP.

Alelo selvagem do gene TLR9 – 1486C/T (145pb), alelo variante (111 e 34pb). Poço 1: Peso molecular de 100pb. Eletroforese em gel de agarose 2,0% corado com

brometo de etídio.

Tabela 1 - Descrição do gene, referência dos SNPs e primers utilizados na genotipagem.

Variantes	Iniciadores	Protocolo de PCR	Enzimas de Restrição	Alelos e Fragmentos (bp)
<i>TLR9</i> – 1237 C/T (rs5743836)	F: 5'-CTGCTTGCAGTTGACTGTGT-3' R: 5'-ATGGGAGCAGAGACATAATGGA-3'	95°C for 5min, 40x (95°C for 30s, 59°C for 30s, 72°C for 45s), 72°C for 7min	<i>BstNI</i>	C: 135 T: 108+60+48+27
<i>TLR9</i> – 1486C/T (rs187084)	E: 5'TATCGTCTTATTCCCCTGCTGGAATGT-3' R: 5'TGCCCAGAGCTGACTGCTGG-3'	95°C for 5min, 40x (95°C for 30s, 59°C for 30s, 72°C for 45s), 72°C for 7min	<i>AflIII</i>	C: 145 T: 111+34

5.8 DOSAGEM DE CITOCINAS POR CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA)

As dosagens de citocinas das amostras dos servidores foram realizadas pela técnica de citometria de fluxo, utilizando o Kit Cytometric Bead Array (CBA) com o kit BDTM Human Th1/Th2/Th17 Cytokine (marca BD® Biosciences, San Diego, CA, USA), seguindo as orientações descritas pelo fabricante.

As citocinas quantificadas foram IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL17A. O Kit BDTM CBA utiliza uma série de partículas (microesferas ou beads) de tamanho conhecido e com intensidade de fluorescência distinta para detectar simultaneamente, por meio de partículas recobertas por anticorpos específicos, as várias citocinas solúveis. Cada bead de captura está conjugada com um anticorpo específico para cada citocina. A detecção das citocinas presentes na amostra foram realizadas através de anticorpos conjugados ao fluorocromo ficoeritrina (PE) que fornecem um sinal fluorescente em proporção a quantidade de citocina da amostra ligada a bead.

Os complexos formados de bead de captura + citocina da amostra + anticorpo de detecção foram quantificados através da Citometria de Fluxo. A intensidade da Fluorescência PE de cada complexo revela a concentração em pg/mL de cada citocina. Para a aquisição das amostras foi utilizado o Citômetro de Fluxo FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

Para o cálculo das concentrações em pg/mL e Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de cada citocina foi utilizado o software FCAP-ArrayTM (v3.0.1).

5.9 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados foram tabulados em planilhas no software Microsoft Excel, para confecção de tabelas e gráficos. As variáveis categóricas são expressas em valor absoluto (n) e frequência relativa (%). O software GraphPad Prism (versão 9.0.1) foi utilizado para a análise estatística e foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para variáveis contínuas, utilizamos o teste de Mann-Whitney (para dois grupos), e o teste de Kruskal-Wallis (para três grupos ou mais). Todas as análises foram realizadas considerando um intervalo de confiança de 95%, e as diferenças observadas foram consideradas estatisticamente significativas quando

-

$p < 0,05$.

Resultados

6 RESULTADOS

Participaram do estudo 170 profissionais da saúde, avaliados em três momentos: T0 (pré-vacinação), T1 (60 dias após a segunda dose) e T2 (90 dias após a segunda dose da CoronaVac). Todos os participantes tinham idade superior a 18 anos e encontravam-se clinicamente saudáveis no momento da primeira coleta.

6.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS

A população do estudo foi composta por 170 indivíduos, sendo 116 (68,2%) do sexo feminino e 54 (31,8%) do sexo masculino. A mediana da idade foi de 46 anos (IIQ: 33,0–57,0) entre as mulheres e de 40,5 anos (IIQ: 32,8–49,3) entre os homens (Tabela 2).

Tabela 2 - Características demográficas da população de estudo. Distribuição por gênero e idade.

	Mulheres	Homens
Idade, mediana, (IQR)	46.00 (33.00 - 57.00)	40.50 (32.75 - 49.25)
	Feminino	Masculino
Sexo, n (%)	116 (68,2%)	54 (31,8%)

Apesar das vacinas aprovadas contra a covid-19 se demonstrarem seguras em ensaios clínicos, as reações adversas existem e podem variar de acordo com as características clínicas do indivíduo. Segundo Li et al (2022), as reações podem incluir: febre, dor de cabeça, fadiga, dor no local da injeção e náuseas. Fatos que colaboram com o nosso estudo quando relacionamos os eventos adversos causados após a administração vacinal na população estuda neste projeto.

Os eventos adversos mais frequentemente relatados após a administração da CoronaVac foram: dor no local da aplicação (14,1%), cefaleia (8,2%), febre (5,2%), calafrios (4,7%), dor de garganta (2,9%) e tosse (1,2%) (tabela 3).

Entre os participantes, 94 (55,2%) relataram infecção prévia por SARS-CoV-2 antes da primeira dose da vacina, enquanto apenas oito (4,7%) referiram reinfeção após a vacinação.

Tabela 3 - Eventos adversos relatados após a administração da vacina.

REAÇÕES ADVERSAS	n DE PESSOAS (n=170)	%
Febre	9	5,2%
Dor no local	24	14,1%
Cefaleia	14	8,2%
Tosse	2	1,2%
Calafrios	8	4,7%
Dor na garganta	5	2,9%
Infecção prévia	94	55,2%
Reinfecção após vacinação	8	4,7%

6.2 PERFIL DAS CITOCINAS TH1, TH2 E TH17 EM INDIVÍDUOS VACINADOS COM A CORONAVAC.

A resposta imune foi avaliada por meio da quantificação das citocinas representativas dos perfis Th1, Th2 e Th17 nos três momentos do estudo (T0, T1 e T2). Foi avaliado o perfil panorâmico da resposta imunológica Th1, Th2 e Th17, relacionados ao tempo de vacinação T0, T1 e T2 sobre as citocinas envolvidas nas respostas pró inflamatórias (IL-6, TNF, IFN- γ , IL-17) e regulatórias/crescimento (IL-4, IL-10, IL12), ou seja, análise de cada citocina inflamatória e regulatória dentro de cada tempo, onde comparamos T0 (coleta pré-vacinação) com T1 (primeira coleta após segunda dose), T0 com T2 (segunda coleta após a segunda dose) e T1 com T2.

Então, a partir da concentração desses mediadores imunológicos, sabe-se que a uma mudança nessa concentração de acordo com o grupo, tendo o T1 com a maior concentração quando comparado ao T0, ou seja, apresenta maior concentração de

mediadores imunológicos, com comparações estatisticamente significantes, e quando comparamos o tempo T2 com o T0 também temos esta significância, porém entre os dois tempos T1 e T2 não obtivemos uma significância expressiva (Figura 7).

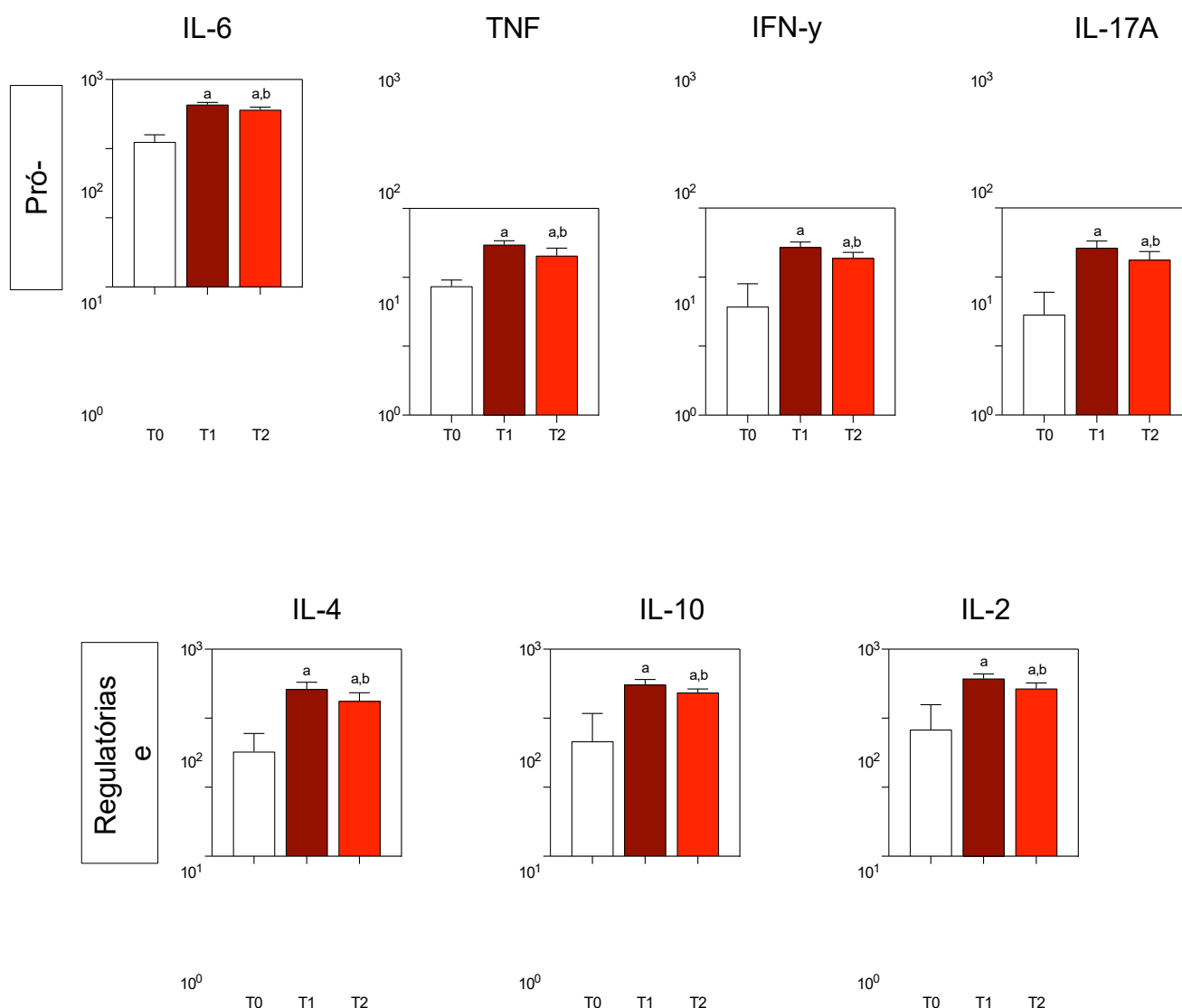


Figura 6 - Panorama de Mediadores Imunológicos dos Perfis Th1, Th2 e Th17.
Fonte: Elaborado pelo autor, 2023 (Não publicado).

Então, é possível observar que teve um aumento significativo principalmente após o estímulo da primeira dose, assim procuramos saber qual a magnitude desse aumento, o que pode variar de acordo com o tempo, então o gráfico abaixo demonstra quantas vezes aumentou referente aos tempos T1 e T2 ao tempo T0, a magnitude do aumento dessas citocinas é maior no tempo T1 quando comparados

ao T2, esse aumento na concentração do mediador pode variar de acordo com a citocina.

De modo geral houve um aumento de todas as citocinas principalmente no T1 em comparação com o tempo T0, e esse aumento se manteve no tempo T2, mesmo com menor concentração sérica relacionado ao T1 (Figura 7/8).

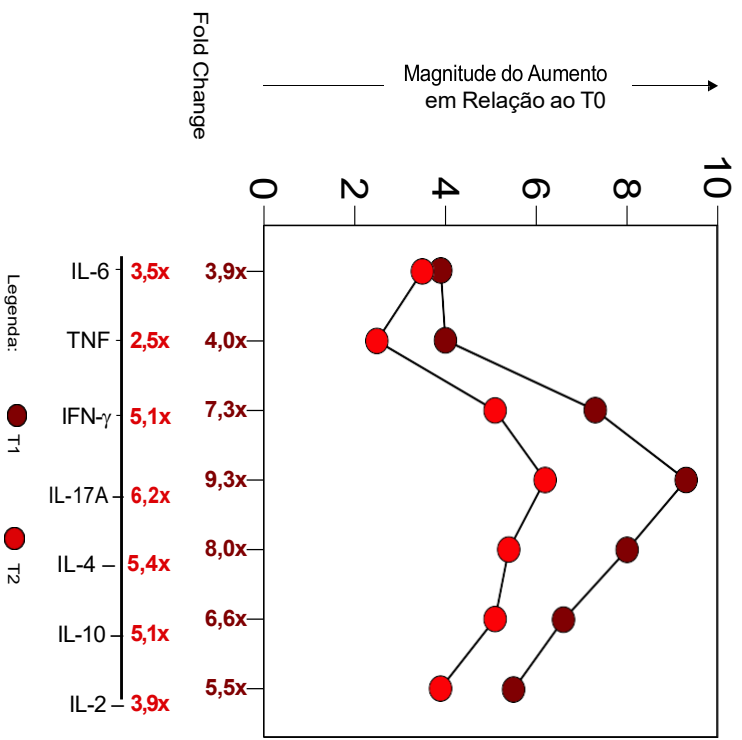


Figura 7 - Magnitude de Aumento das Citocinas de Acordo com os Tempos T1 e T2.

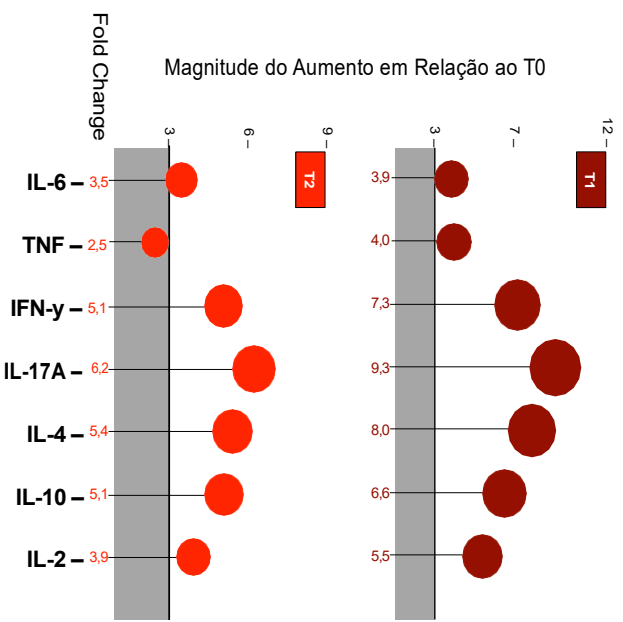


Figura 8 - Magnitude de Aumento das Citocinas de Acordo com os Perfis Th1, Th2 e Th17.

6.3 FREQUÊNCIA DAS VARIANTES DE INTERESSE

Para esta análise nós usamos o (n) de cada grupo e tiramos a percentagem (%) para todos os indivíduos, com intuito de analisar as proporções de genótipos alelos e para cada polimorfismo de nucleótido único. A frequência genotípica do *TLR9* (1237) *rs5743836* encontrada nos colaboradores do grupo de vacinados (N=124) mostrou que 64,5% são homozigotos com genótipo C/C, 30,6% são heterozigotos com genótipo C/T, 4,8% são homozigotos para o genótipo T/T, com uma representatividade de 79,8% do alelo C e 20,2% para alelo T. A análise de genotípica do *TLR9* (-1486) *rs187084* encontrado nos colaboradores vacinados (n=170) mostrou que 61,2% são homozigotos com genótipos C/C, 24,1% são heterozigotos com genótipos C/T, 14,7% são homozigotos com genótipo T/T, com 73,2% com alelo C e 26,8% com alelo T. Todas as frequências dos polimorfismos estudados estão resumidas na tabela 4.

Tabela 4 - Descrição das variantes estudadas.

Variante, genótipo ou alelo	Grupo Vacinado (n=124)
<i>TLR9</i> (-1237) <i>rs5743836</i>	
CC	80 (64,5%)
CT	38 (30,6%)
TT	6 (4,8)
C	198 (79,8%)
T	50 (20,2%)
Variante, genótipo ou alelo	Grupo Vacinado (n=170)
<i>TLR9</i> (-1486) <i>rs187084</i>	
CC	104 (61,2%)
CT	41 (24,1%)
TT	25 (14,7%)
C	249 (73,2%)
T	91 (26,8%)

6.4 ANÁLISE DAS VARIANTES DO GRUPO DE VACINADOS DE ACORDO COM O PERFIL TH1, TH2 E TH17

Nós também analisamos a concentração dos mediadores por genótipo e por tempo, as análises deste gráfico são as comparações de genótipos semelhantes, porém em tempos diferentes. Na variante TLR9/1486 em comparação entre os tempos T1 e T2 estatisticamente não houve nenhuma significância, mas quando comparamos com os genótipos do T0 em relação aos outros tempos percebemos que há um aumento significativo sobre os valores de concentração de citocinas em todos os genótipos, porém não foi possível determinar se à uma genótipo que favoreça o aumento dessa citocina, uma vez que houve um aumento de todas as citocinas dos tempos T1 e T2 quando comparamos ao tempo T0.

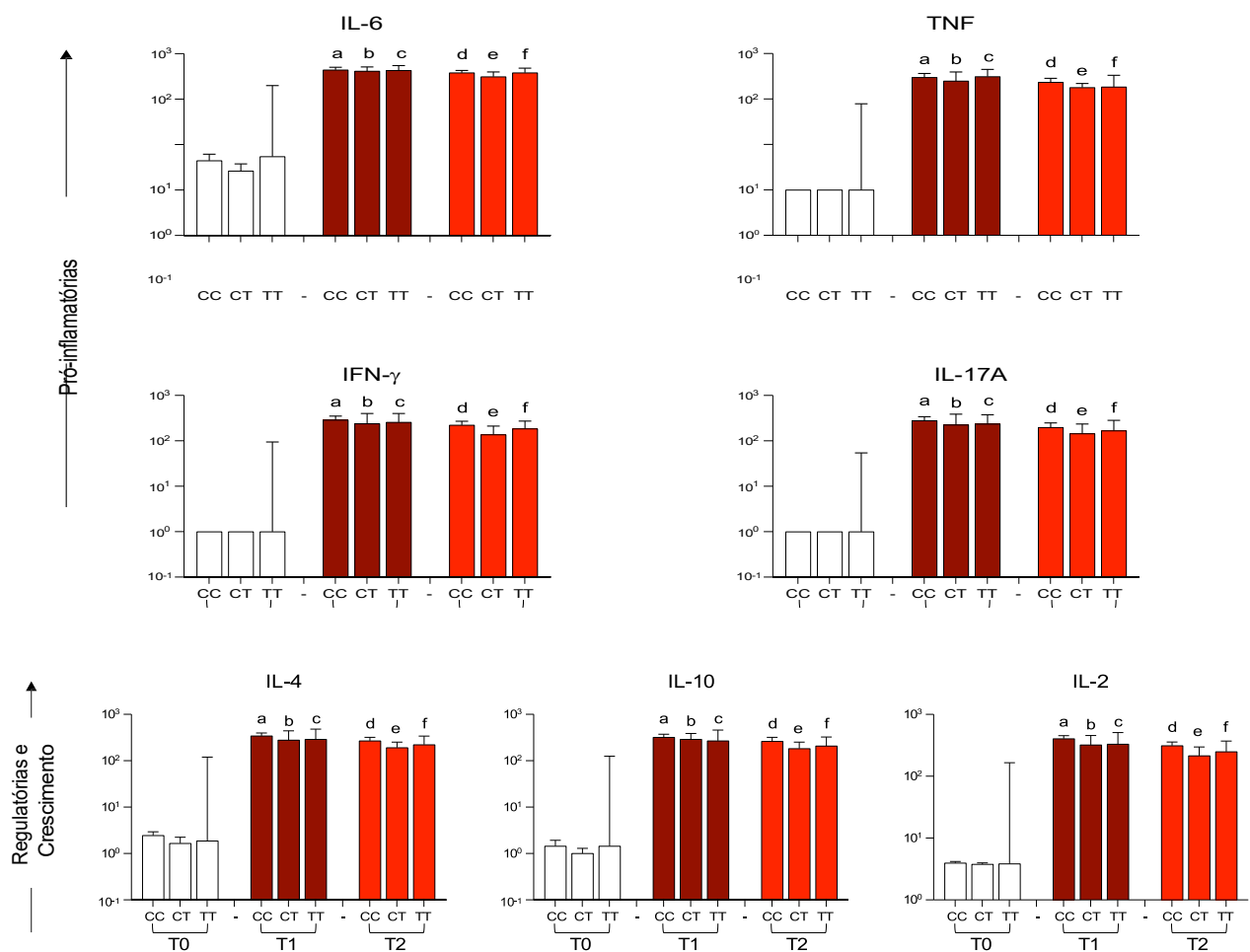


Figura 9 - Variante TLR 9 – 1486 (rs 187084) concentração e comparação de citocinas de acordo com os perfis Th1, Th2 e Th17 em tempos diferentes.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023 (Não publicado).

Na variante TLR9/1237 ao analisar as concentrações de citocinas dos tempos T0 com os tempos T1 e T2 foi possível observar uma notável significância estatística, tanto para as citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, todavia quando comparamos os tempos T1 e T2 não temos essa significância entre os dois tempos.

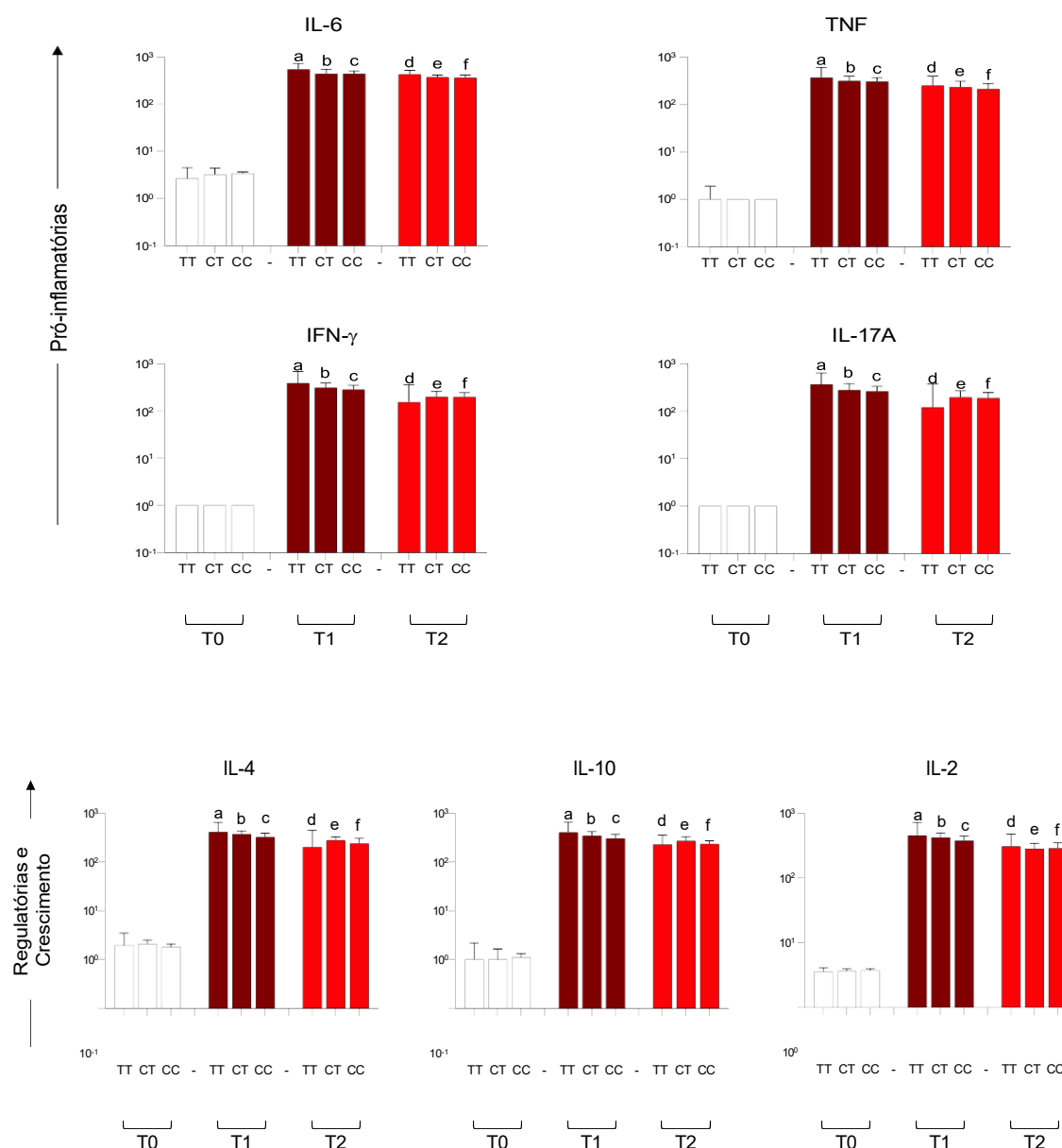


Figura 10 - Variante TLR 9 – 1237 (rs5743836) concentração e comparação de citocinas de acordo com os perfis Th1, Th2 e Th17 em tempos diferentes.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023 (Não publicado).

6.5 ANÁLISE DE CITOCINAS DE ACORDO COM O GENÓTIPO DE CADA VARIANTE

Também analisamos o aumento da magnitude das citocinas de acordo com as variantes (TLR9 – 1237 rs5743836) em comparação ao tempo T0 sobre os tempos T1 e T2, observamos que houve um aumento significativo no genótipo homozigoto C/C na concentração das respectivas citocinas: IL-17A de 281,7x (T1) 198,8x (T2); INF- γ 290,3x (T1) 223,1x (T2); IL-4 140,1x (T1) 109,9x (T2); TNF 301,7x (T1) 234,5x (T2); IL-10 221,9x (T1) 181,4x (T2); IL-2 102,6x (T1) 79,1x (T2); e IL-6 99,0x (T1) 85,5x (T2), por tanto observamos que os indivíduos com o genótipo C/C apresentaram uma maior concentração de IL-17A, INF- γ e IL-2 para os tempos T1 e T2. Em relação aos indivíduos com genótipo heterozigoto C/T temos uma maior concentração de IL-10 288,8x (T1) 182,0x (T2); IL-4 169,2x (T1) 115,5x (T2) e IL-6 156,5x (T1) 118,1x (T2). Para as concentrações de indivíduos com genótipo homozigoto T/T notamos que para o tempo T1 a citocina que teve maior magnitude foi TNF 313,2x e para o tempo T2 ela apresenta uma concentração de 185,9x ambas comparadas com o T0, porém quando comparamos esse mesmo genótipo entre o mesmo tempo (T2) observamos que para o tempo T2 ela se mantém em maior concentração no genótipo homozigoto C/C.

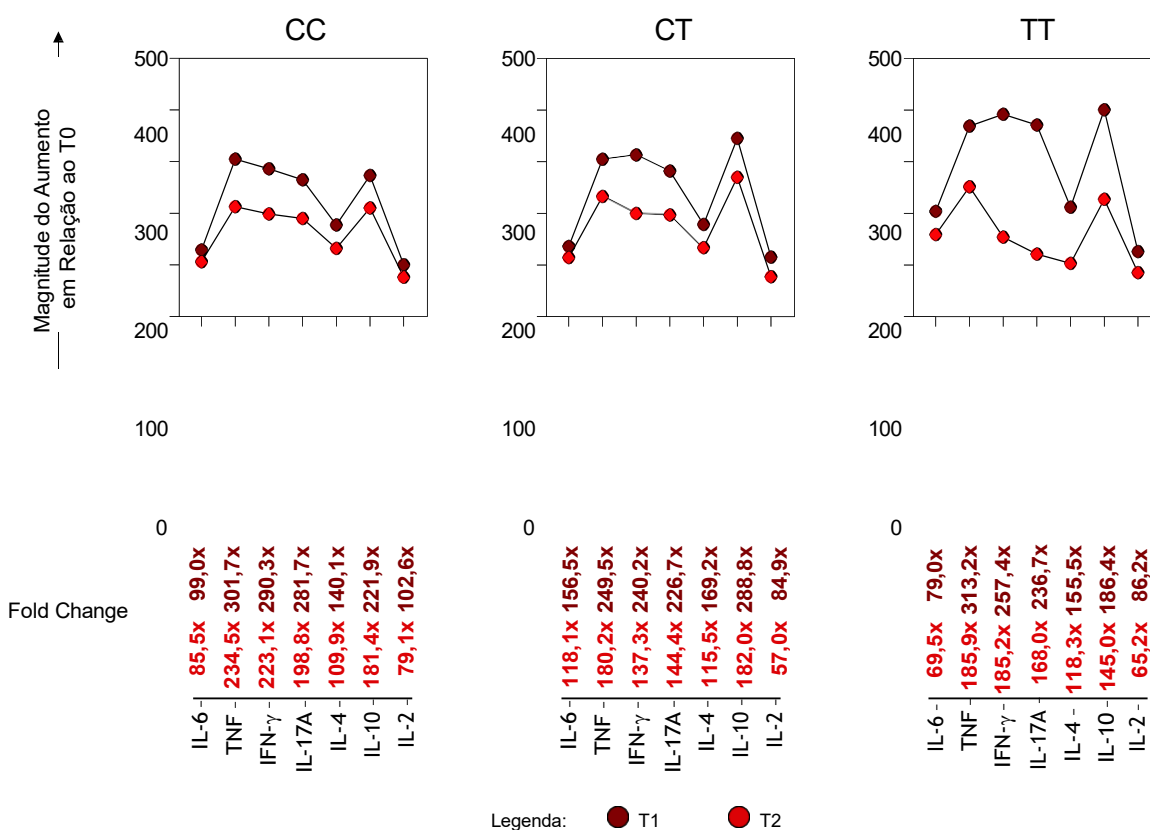


Figura 11 - Magnitude de Aumento das Citocinas de Acordo com as variantes (1237) rs5743836.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023 (Não publicado).

Avaliamos também a magnitude das citocinas para a variante (TLR9 -1486 rs187084) sobre os tempos T1 e T2 em relação ao tempo T0. Para o genótipo homozigoto C/C no tempo T1 as concentrações para todas as citocinas de interesse (IL-6, TNF, IFN- γ , IL-17A, IL-4, IL-10, IL-2) apresentaram uma maior magnitude com relação aos outros genótipos, como destaque a IL-10 com 400,7x a mais de contração quando comparado ao T0. Para o genótipo homozigoto T/T, também observamos contrações significativas em ambos os tempos em comparação ao T0: IL-6 128,8x (T1) 106,3x (T2); TNF 304,6x (T1) 213,1x(T2); IFN- γ 286,0x (T1) 198,8x (2); IL-17A 264,6x (T1) 190,2x (T2); IL-4 177,4x (T1) 132,1x (T2); IL-10 273,2x (T1) 210,7x (T2) e IL-2 100,3x (T1) 76,6x (T2). Os indivíduos com o genótipo heterozigoto C/T apresentaram concentrações séricas de citocinas significantes quando comparados ao T0, IL-6 135,9x (T1) 114,8x (T2); TNF 304,6x (T1) 233,1 (T2); IFN- γ 313,2x (T1) 200,2x (T2); IL-17A 281,7x (T1) 197,3x (T2); IL-4 178,6x (T1) 134,1x (T2); IL-10 345,4x (T1) 270,4x (T2) e IL-2 115,2x (T1) 77,6x (T2). Diante desses dados podemos observar que os colaboradores deste estudo com genótipo C/C após a primeira coleta da segunda dose, apresentaram maiores concentrações de citocinas quando comparamos ao T0 e relativamente com maior magnitude sobre os genótipos T/T e C/T quando olhamos para o tempo T1. No entanto após a indução da vacina da CoronaVac aos colaboradores deste estudo é possível afirmar que houve uma indução da resposta imune com uma contração significativa de dosagem de citocinas em todos os indivíduos para ambos os genótipos, concentração está medida após 90 dias depois da segunda dose do imunizante da CoronaVac.

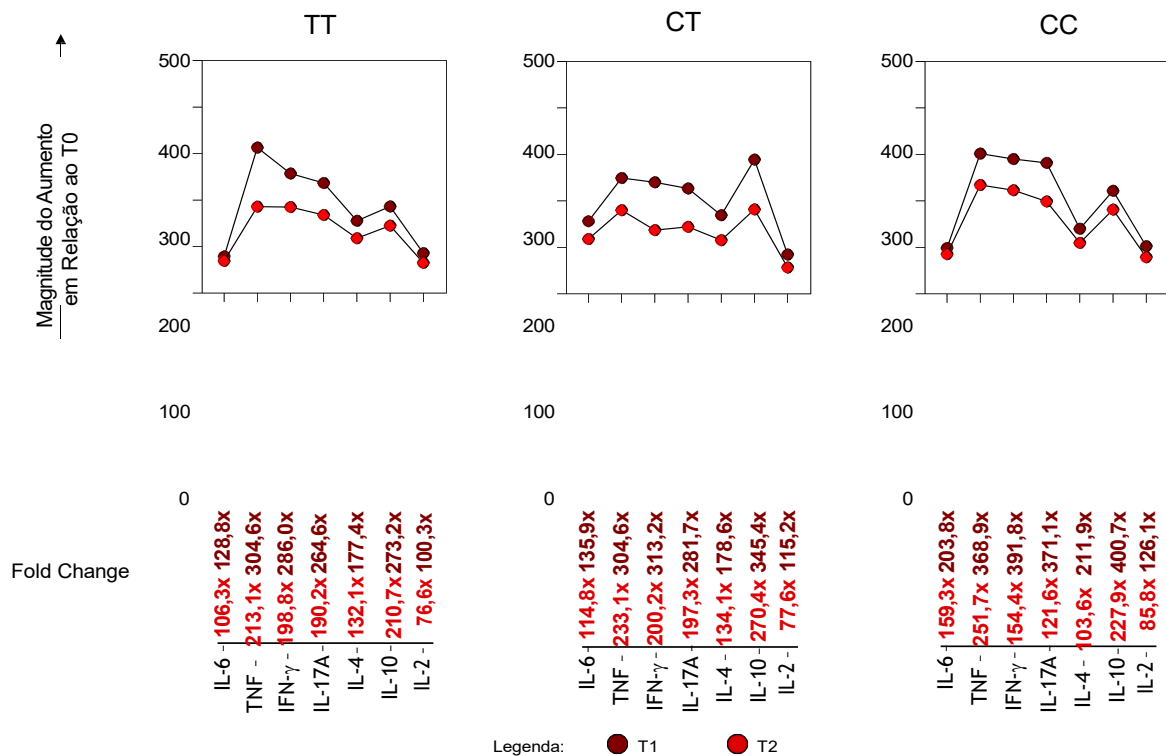


Figura 12 - Magnitude de Aumento das Citocinas de Acordo com as variantes (-1486) rs187084.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023 (Não publicado).

Discussão

7 DISCUSSÃO

A covid-19, causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2) que é transmitida principalmente por gotículas respiratórias e tem alvo células epiteliais ciliadas na cavidade nasal, traqueia e pulmões, por meio do receptor celular da enzima conversora de angiotensina 2 (ACER 2). Após o surto da doença várias estratégias para o enfrentamento do impacto global foram implementadas, incluindo a introdução de vacinas capazes de minimizar os impactos causado pela covid-19, todavia estudos se fazem necessário para melhor entendimento da resposta imune frente as vacinas e sua durabilidade.

Os sintomas mais comuns observados nos colabores de nosso estudo foram febres, dor no local, cefaleia, calafrios e dor na garganta. Um estudo realizado por Riad et al. (2021) com 780 profissionais da saúde apresentaram pelo menos um desses efeitos colaterais após a administração da CoronaVac, relatando também que as mulheres apresentaram maior suscetibilidade aos efeitos colaterais quando comparados aos homens, ou seja, são efeitos adversos comuns frente a uma vacina feita a partir de um vírus inativado.

Todavia, na covid-19 os homens tiveram maior taxa de infecção assim relata Souza et al., evidenciando na sua população de estudo, indivíduos do sexo masculino com manifestações mais severas da doença, com pior desfecho clínico e maior grau de transmissibilidade (SILVA et al., 2021). O que pode ser explicado também devido os homens terem maior frequência de hábitos ligados a uso de cigarros e bebidas alcoólicas, que ligados a comorbidades e/ou alguma outra infecção como pelo próprio SARS-CoV-2 pode acarretar em uma maior vulnerabilidade.

Corroborando também com os achados de Medrado et al (2020), que relata que em um estudo realizado em fevereiro de 2020 com 99 participantes em um hospital de Wuhan, 68% dos infectados eram do sexo masculino.

Apesar dos colaboradores deste estudo não apresentarem sinais de gravidade da doença, estudos recentes relatam associação da resposta imune referente a idade. Tarzerji et al (2022), relataram que a morte em idosos está associada a

diminuição da função do sistema imunológico. Visto que a maior taxa de mortalidade está entre pessoas acima dos 60 anos, como relatado em diversos estudos e documentado com o decorrer que a pandemia foi se alastrando.

Pessoas acima dos 60 anos de idade foram uma das primeiras a receberem os imunizantes contra a covid-19, apesar do Brasil ser um país que possui o SUS, ter um Programa Nacional de Vacinação de Imunização do Ministério da Saúde, o Brasil se destaca como um dos países mais afetados pela covid-19, estando entre os três países com maiores números de óbitos (COSTA et al., 2022).

As altas taxas de mortalidade em sua maior parte, está associado aos indivíduos acima de 60 anos de idade o que ligado à presença de comorbidade leva a indícios de letalidade maior neste grupo (MACHADO et al., 2020).

A resposta imune frente a patogénese da covid-19 gera anticorpos rapidamente ao individuo algumas horas após a Infecção. Os mecanismos imunológicos no controle da doença são mediados pela imunidade inata e adaptativa (SETTE e CROTTY, 2021). Logo após o início dos sintomas, foi descoberto que há uma produção de anticorpos neutralizantes, embora as relações de magnitude dos anticorpos se correlacionam com a gravidade da doença, condições relacionadas a comorbidades e idade também podem interferir sobre a concentração dos anticorpos (SUTHAR, 2024).

Após ocorrer a infecção do individuo pelo SARS-COV-2, o vírus normalmente consegue evadir ou retardar uma resposta imune inata intracelular, uma resposta tardia de interferon (INF-I) e (INF-III) resulta em uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, um infiltrado celular extenso no trato respiratória, causando danos pulmonar no individuo (LOWERY et al., 2021).

Todavia, grande parte da população infectada pelo vírus causador da covid-19 ou que teve um estímulo vacinal, desencadeia uma resposta bem-sucedida pela imunidade inata intracelular, com eficiência de INFs e mediadores imunológicos, ou seja, uma resposta controlada eficiente (SETTE e CROTTY, 2021). Fato este que conseguimos observar em nosso estudo.

Entretanto, um atraso na ativação da resposta imune inata, observado principalmente em casos moderados de covid-19, pode favorecer o controle da infecção sem o desenvolvimento de minifestações clínicas relevantes, resultando em um quadro assintomático. Esse achado é consistente com as estimativas que indicam

que aproximadamente 40% dos indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 permanecem assintomáticos (ORAN e TOPOL., 2020).

Nosso grupo de estudo os quais receberam estímulo vacinal contra a covid-19 relatam os mesmos efeitos colaterais. Por tanto mesmo esses indivíduos que foram expostos ao vírus ou tiveram estímulo vacinal não necessitam de hospitalização, mesmo que haja um atraso temporal, as respostas de células T e anticorpos ocorreram relativamente rápida tendo assim o controle da infecção (LOWERY et al., 2021).

Os mediadores imunológicos dos colaboradores do nosso estudo evidenciaram diferenças estatisticamente significativas nos níveis de INF- γ , IL-17A e IL-4 ao longo dos momentos analisados, quando correlacionados ao tempo após a vacinação contra a covid-19. Tais diferenças mantiveram-se significativas mesmo após 90 dias da segunda coleta. Esses achados indicam uma resposta vacinal controlada, na qual as respostas pró-inflamatória e anti-inflamatória permaneceram em relativo equilíbrio. De modo semelhante, Ruang et al. (2020) relataram que pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 apresentaram alta concentração de interferon gama provavelmente devido à ativação de células Th1, além de um aumento de citocinas Th2, como IL-4, que exerce papel supressor sobre a infiltração celular.

Sabendo que a vacina CoronaVac é composta por um vírus inativado e tem como objetivo simular uma infecção, nossos dados mostraram menor produção de IL-6 em comparação com outras citocinas, enquanto a produção de IL-4 e IL-10 apresentou magnitude semelhante. Esses achados sugerem um perfil de citocinas balanceado, sem evidências de efeitos adversos severos entre os colaboradores.

Um estudo realizado com 452 pacientes infectados com sars-cov-2, relaciona o aumento sérico de IL-6 e IL-10 com a gravidade da doença, o que condiz com pior quadro clínico desses pacientes (GASTÉLUM et al., 2021) (QIN et al., 2020). No entanto, observamos uma estabilidade na produção de IL-6 e IL10 nos dois tempos após a imunização da nossa população de estudo.

Os colaboradores vacinados deste estudo, apresentaram níveis séricos de citocinas IL-6, IL-2, INF- γ (ambas do perfil Th1), IL-4 (perfil Th2), IL17A (perfil Th17)

e IL-10 (Regulatória), superiores ao tempo T0 para variante TLR9 - 1486, estatisticamente significativa. Os níveis séricos de citocinas quando comparadas entre os tempos T1 e T2 não apresentaram diferença estatística significativa, mas o T2 manteve-se estatisticamente relevante ao T0.

Normalmente espera-se um aumento de níveis séricos de citocinas após um estímulo vacinal, podendo haver efeitos colaterais relativamente leve, como observado no nosso estudo. Muitos estudos correlacionam IL-6 citocina essa pró-inflamatória com a gravidade doença (ROSATI et al., 2023), (Huang et al., 2020). Em nossos achados, nenhum efeito colateral grave foi observado em nenhum dos tempos de vacinação, indicando que a uma eficiência na primeira e segunda dose, com uma produção de citocinas pro-inflamatórias e regulatórias dentro do esperado após a administração do imunizante, dados esses que corrobora com os achados de JIN et al, (2022).

Quando correlacionamos os gráficos no nosso estudo para variante TLR9 - 1237, sobre os tempos analisados, observamos que as citocinas pro-inflamatórias (IL6, TNF, INF- γ , IL-17) e regulatórias (IL-2, IL-4, IL-10) mantiveram-se estáveis após a adesão do imunizante nos tempos T1 e T2. Os estudos de JIN et al., (2022) que avalia a eficácia do imunizante da CoronaVac, realizado em três países Turquia, Brasil e Indonésia, obtiveram uma média de eficácia da vacina dos grupos de 67,7% para prevenção da covid-19 assintomática, ou seja, em comparação dos que receberam placebo, a CoronaVac de duas doses diminuiu os riscos de covid-19 em 67,7%.

No nosso estudo tivemos uma imunogenicidade frente ao imunizante da CoronaVac, após 90 dias da coleta da segunda dose, com o perfil imunológico pela resposta vacinal continuo e relevante.

Estudos com evidências crescentes deixam claro que as respostas imunes inatas, especialmente por via de sinalização pelo TLR, são responsáveis por mediar respostas imunes a diversos patógenos, incluindo o sars-cov-2, pois ativam diversos fatores da imunidade inata, como citocinas pro-inflamatórias e regulatórias (KATRINLI et al., 2018).

Em um estudo realizado por Pascoal et al., 2020 onde eles trazem a importância dos PRR, especificamente os receptores do tipo Toll (TLR's), na qual a ativação desses receptores provoca diferentes respostas biológicas subsequente de

proteínas adaptadoras variadas (MyD88, TIRAP, TRIP e TRAM), por meio de uma cascata de eventos levando a então tempestade de citocinas. E que uma resposta exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo a IL-6 está associado ao curso grave da doença.

Os TLR's são de fato receptores importantes, e cada vez mais estudos relatam a importância desses receptores no controle de diversas doenças. KATRINLI et al., realizaram um estudo onde eles associaram o gene *TLR9* ($-1237T \rightarrow C$) (*rs5743836*) no controle imunológico espontâneo do vírus da hepatite B, onde observaram neste estudo que a presença do genótipo TT para esta variante foi um dos mais presente em pacientes com o vírus da hepatite B.

No entanto, outro estudo feito por ASLAM et al., (2018) avaliando a associação da variante do gene TLR9 (*rs5743836*), em pacientes do Paquistão infectados com vírus da hepatite C (HCV), com um (n) 500 pacientes, desses 400 com o vírus HCV e 100 indivíduos saudáveis (controle), concluindo que pacientes com variante TLR9 (*rs5743836*) pode não apresentar risco molecular a uma infecção pelo vírus HCV.

Ou seja, a variante de acordo com a doença em questão pode apresentar uma maior magnitude de risco a uma infecção, das respostas moleculares desencadeada pela variante TLR9 (*rs5743836*), podendo ser usado a partir de um estudo detalhado como alvo terapêutico, assim o receptor TLR-9 pode ter um papel fundamental na patogênese da covid-19 (BEZEMER e GARSEN, 2021).

Um estudo realizado por VAKIL et al., (2022) onde ele avalia a variabilidade genética individual, com citocinas pró-inflamatórias de diversos receptores, inclusive de receptores do tipo Toll, onde ele associa o gene *TLR9* (*rs187084*) à infecção por HCV e à admissão na UTI. Nesse mesmo estudo ele levanta a questão de que este gene pode auxiliar no combate a covid-19, em que uma combinação com medicamentos usado na terapia contra a doença, pode contribuir na melhora dos pacientes, pois o TLR9 participa de forma controversa em complicações pulmonares.

Outro estudo realizado com 224 pacientes em vulnerabilidade, revelou que altos níveis do ativador TLR9, mtDNA, se associam à SDRA e mortalidade, sendo mais forte em pacientes com a variante associada com aumento de expressão TLR9 (FAUST et al., 2020). Outros estudos já trazem evidências sobre o papel protetor que o TLR9 pode trazer em casos de asma alérgica e rinite (KLINE E KRIEG, 2008).

A diversas controversas sobre o verdadeiro papel do TLR9 em diversas doenças, inclusive na covid-19. Considerando esse estudo, variantes genéticas e imunidade inata podem alterar ou definir a susceptibilidade e o prognóstico da covid19. Para uma doença relativamente nova é preciso mais estudos que direcionem o papel dessas variantes na covid-19. Estudos futuros envolvendo diferentes plataformas vacinais, populações com maior diversidade genética e análises funcionais da expressão do TLR9 poderão ampliar a compreensão dos mecanismos pelos quais esses polimorfismos influenciam a resposta imunológica induzida pela vacinação contra a covid-19.

Conclusão

8 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram níveis séricos de citocinas: IL-6, TNF, IFN- γ , IL-17A, IL-4, IL-10 e IL-2, significantes elevados após administração do imunizante da CoronaVac, (tanto dentro dos 60 dias (T1), quanto dos 90 dias (T2) após a segunda dose da vacina) quando comparados ao tempo T0.

Mesmo não tendo uma significância expressiva quando comparamos os tempos T1 (60 dias) e T2 (90 dias) após a segunda dose da vacina, no que diz respeito a magnitude sérica das citocinas de interesse, porém quando olhamos para genótipo T/T observamos que neste genótipo a estimulação vacinal se sobressaiu ao analisarmos a primeira coleta após os 60 dias da imunização.

Os resultados da análise do gene *TLR9* (1237/1486) frente a imunização contra a covid-19 pela CoronaVac nos tempos observados após a imunização, resultam no desempenho efetivo do indivíduo aos estímulos vacinas imunológicas por uma resposta inflamatória equilibrada, com efeitos colaterais sem danos significativos ao indivíduo.

Apesar dos resultados descritos, não foi possível identificar qual genótipo estaria influenciando o aumento da concentração desses mediadores, uma vez que, em ambas as variantes, foram observados aumentos expressivos nas concentrações de mediadores após o estímulo vacinal.

Embora este estudo apresente resultados relevantes, algumas limitações devem ser consideradas. A população avaliada foi composta por profissionais da saúde de uma única instituição, o que pode limitar a generalização dos resultados para outras populações. Além disso, foram investigadas apenas duas variantes do gene *TLR9*, não sendo possível excluir a influência de outros polimorfismos envolvidos na resposta imune à vacinação.

Todavia mais estudos são necessários para um melhor embasamento dessas variantes, visando no auxílio em terapias mais eficazes afim de conter a doença em todos os estágios e no melhoramento das repostas frente aos diversos imunizante disponível no combate a COVID-19, que ainda é uma realidade atual.

9 EQUIPE DE PESQUISA

NOME	FORMAÇÃO	INSTITUIÇÃO	ATIVIDADE DESENVOLVIDA
Wesley Barbosa de Castro	Biólogo	UFAM	Mestrando
Dra. Adriana Malheiro Alle Marie	Bióloga	UFAM/PPGIBA	Orientador (a)
Dr. Walter Luiz Lima Neves	Biomédico	UFAM/HEMOAM	Colaborador
Dr. Alysson Guimarães	Enfermeiro	UFAM/PPGIBA	Colaborador
Dra. Andreia Tarragô Monteiro	Farmacêutica	HEMOAM/PPGH	Colaborador
Juliana Miranda	Biomédica	UFAM	Colaborador
Larissa Nunes	Bióloga	UEA	Colaborador
Msc. Geyse Adriana da S. Soares	Biomédica	UFAM	Colaborador
Msc. Wivian da Conceição C.Silva	Biomédica	UFAM	Colaborador
Jaeanne Fabian Guimaraes da Silva	PAIC	FAMETRO	Colaborador

10 CRONOGRAMA

[illegible]

11 REFERÊNCIAS

1. (BEZEMER e GARSSSEN, TLR9 and COVID-19: A Multidisciplinary Theory of a Multifaceted Therapeutic Target. 2021 Jan 15;11:601685.
2. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 2019 Elsevier Editora Ltda.
3. AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. © 2001 Nature Publishing Group <http://immunol.nature.com>
4. ALESSANDRO SETTE E SHANE CROTTY. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. Volume 184, Issue 4, 18 February 2021, Pages 861-880.
5. ÁLVAREZ, José L. G. e VIGIL, José L. G. Guidelines for clinical management of SARS-CoV-2 infection. *Gac Med Mex*. 2020.
6. ASLAM, N. et al. Analysis of toll-like receptors-9 (TLR9) gene polymorphism (rs5743836) in Pakistani patients with HCV. *Pak J Pharm Sci* 2018 Nov;31(6 (Supplementary):2709-2714.
7. BARRAT FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, Chang B, Duramad O, Coffman RL. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*. 2005. 17;202(8):1131-9;
8. BARRETO, I.C.H.C et al. Colapso na saúde em Manaus: o fardo de não aderir às medidas não farmacológicas de redução da transmissão da COVID-19, RIO DE JANEIRO, V. 45, N. 131, P. 1126-1139, OUT-DEZ 2021.
9. BARROS LM, Galindo Neto NM, Sá GG, Pereira JC, Barbosa LU, Oliveira Neto JG, et al Estudos experimentais sobre COVID-19: panorama da produção científica mundial. *Acta Paul Enferm*. 2020; 33:1-9.
10. BEE, G.R. Vaccines against COVID-19 available in Brazil. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v.8, n.1, p.6246-6263 jan. 2022.
11. BITAR, S.; STEINMETZ, W. A. Scenarios for the Spread of COVID-19 in Manaus, Northern Brazil, 2020.

12. BLASIUS, A. L.; BEUTLER, B. Intracellular Toll-like Receptors. Immunity 32, March 26, 2010 ^a2010 Elsevier Inc.
13. BONJORNO, L.P. et al. Imunopatologia Induzida por COVID-19: Avaliação da resposta imune inata e adaptativa. Revista paulista de reumatologiasp.2020.
14. BORGES, A. A.; SUZUKAWA, A. A.; ZANLUCA, C.; SANTOS, C. N. D. dos. SARS-CoV-2: origem, estrutura, morfogênese e transmissão. Salvador: Edufba, 2020. v. 1.
15. BRITO, et al. Mecanismos imunopatológicos envolvidos na infecção por SARS-CoV-2, São Paulo, 2020.
16. CASTRO, Rosana. Vacinas contra a COVID-19: o fim da pandemia. Revista de Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, v. 31(1), e310100, 2021.
17. CAVALCANTE, J.R; ABREU, A.J.L.; COVID-19 no município do Rio de Janeiro: análise espacial da ocorrência dos primeiros casos e óbitos confirmados. Epidemiol. Serv. Saude, Brasília, 29(3):e2020204, 2020.
18. DELNESTE Y, BEAUVILLAIN C, Jeannin P (2007) Innate immunity: structure and function of TLRs. Med Sci (Paris) 23(1):67–73.
19. FARIA N, Claro IM, Candido D, Franco LAM, Andrade PS, Coletti TM, et al. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings. Virological Prepr [Internet] 2021; Disponível em: <https://virological.org>.
20. Faust HE, Reilly JP, Anderson BJ, Ittner CAG, Forker CM, Zhang P., et al. (2020). Os níveis de DNA mitocondrial plasmático estão associados à SDRA em pacientes com trauma e sepse. Chest 157 (1), 67–76. 10.1016/j.chest.2019.09.028.
21. FERRAZ, E.G. et al. Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. RGO - Rev Gaúcha Odontol., Porto Alegre, v.59, n.3, p.483-490, jul./set., 2011.
22. FILHO et al.; Vacina contra o coronavírus (COVID-19; SARS-CoV-2) no Brasil: um panorama geral. 2021.
23. FILHO, A.S.V., et al Vacinas para COVID-19: Uma revisão de literatura. Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.8, n.1, p.1880-1901jan. 2022.

24. Gao W, Xiong Y, Li Q, Yang H (2017) Inhibition of Toll-like receptor signaling as a promising therapy for inflammatory diseases: a journey from molecular to nano therapeutics. *Front Physiol* 8:508–517.

25. GAO, B. & Tsan, MF. Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor release by murine macrophages. *J. Biol. Chem.* 278(1): 174- 179, 2003.

26. GUIMARAES, J.G.E.S., ASSOCIAÇÃO ENTRE RESPOSTA Th1 e Th2 E A GRAVIDADE DA SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE POR SARS-CoV-2. Trabalho de dissertação, Recife 2023.

27. GUSEV et al. SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.* 2022.

28. HARRISON, Andrew G.; LIN, Tao.; WANG, Penghua. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology*, December 2020.

29. HELMY et al. The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control, 2020.

30. HU, Ben et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19, 2021.

31. HUANG, C., et al Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Volume 395, Issue 10223, 15–21 February 2020, Pages 497-506.

32. ISER et al. Suspected COVID-19 case definition: a narrative review of the most frequent signs and symptoms among confirmed cases. *Epidemiol. Serv. Saude*, Brasília, 29(3):e2019354, 2020.

33. JACKSON, C.B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *naTure RevleWS*, 2022.

34. KANGARSHAHI et al. THE PROTEINS OF SARS- CoV-2 AND THEIR FUNCTIONS. *Mil. Med. Sci. Lett. (Voj. Zdrav. Listy)* 2021, 90(4), 172-190.

35. Kline JN, Krieg AM (2008). Ativação do receptor Toll-like 9 com oligodeoxinucleotídeos CpG para terapia de asma. *Drug News Perspect.* 21 (8), 434–439. 10.1358/dnp.2008.21.8.1272133.

36. KUMAR et al. SARS-CoV-2-specific virulence factors in COVID-19. *J Med Virol.* 2021.

37. LEORATTI FMS, Farias L, Alves FP, Suarez-Múti MC, Coura JR, Kalil J, et al. Variants in the toll-like receptor signaling pathway and clinical outcomes of malaria. *J Infect Dis.* 2008;198(5):772–80.

38. LI, Peng et al. Transmission of COVID-19 in the terminal stages of the incubation period: A familial cluster, 2020.

39. LIMA, L.N.G.C.; SOUSA, M.S.; LIMA, K.V.B.; The genomic discoveries of SARS-CoV-2 and their implications for the COVID-19 pandemic; 2020.

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

41. LOPES; LAZZARETTI; SMIDERLE, COVID-19: The Efficacy of Pioneer Vaccines. *Archives of Health, Curitiba*, v.2, n.4, p.909-912special edition, jul. 2021.

42. MARTIN, P. S. et al. História e epidemiologia da COVID-19. *J Med* 2020.

43. MEDRADO B. et al. Men, masculinity and the new coronavirus: sharing gender issues in the first phase of the pandemic. DOI: 10.1590/1413-81232020261.35122020.

44. MENEZES, Emily. Riscos, vulnerabilidades e proteção no enfrentamento da COVID-19 no Amazonas: notas reflexivas. *Revista Arquivos Científicos (IMMES)*. Macapá, AP, Ano 2020, v. 3, n. 2, p. 35-45 - ISSN 2595-4407.

45. MICHELON, C.M. Principais variantes do SARS-CoV-2 notificadas no Brasil, 2021.

46. MOREIRA, R.S. Latent class analysis of COVID-19 symptoms in Brazil: results of the PNAD-COVID19 survey. *Cad. Saúde Pública* 2021.

47. NAGAMINE, B. P.; SOUZA, H. P. O. D.; CHAVES, C. T. O. P.. Aspectos genéticos do SARS-COV-2. *Health of Humans*, v.3, n.1, p.29-34, 2021.

48. NASCIMENTO, C.B.C., et al. SARS-CoV-2 e COVID-19: aspectos fisiopatológicos e imunológicos, estratégias de diagnóstico e desenvolvimento de vacinas. *Ribeirão Preto*, v. 1, n. 2, 2020.

49. OLIVEIRA, M.S.; MATOS, A.R.; SIQUEIRA, M.M. Conhecendo o SARS-CoV-2 e a COVID-19, 2020.

50. OZCEYLAN e ALÇTUNTAS. Relationship between initial symptoms and prognosis of patients with COVID-19, 2021.

51. PALÚ, I.A. Entendendo a importância da estrutura do vírus causador da nova doença por coronavírus (COVID-19). ISSN 1980-734195Connectionline n.25 –2021 (DOI:10.18312/connectionline.v0i25.1581).

52. RAID, A., et al. Prevalência e fatores de risco dos efeitos colaterais da CoronaVac: Um estudo transversal independente entre profissionais da saúde da Turquia. J. Clin. 2021, 10(12), 2629; <https://doi.org/10.3390/jcm10122629>.

53. REDONDO et al. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns, 2021.

54. Sadik NA, Shaker OG, Ghanem HZ, Hassan HA, Abdel-Hamid AH (2015) Single-nucleotide polymorphism of Toll-like receptor 4 and interleukin-10 in response to interferon-based therapy in Egyptian chronic hepatitis C patients. Arch Virol. 160(9):2181–2195.

55. SALIAN, V.S et al. COVID-19 Transmission, Current Treatment, and Future Therapeutic Strategies. Molecular Pharmaceutics, 2020.

56. SETTE e CROTTY. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. Cell 184, February 18, 2021.

57. SHEREEM, M. A. et al. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. Journal of Advanced Research 24 (2020).

58. SILVA CA; et al. Imunopatogênese no desenvolvimento da COVID-19. Revista Saúde & Ciência online, v. 9, n. 1, (janeiro a abril de 2021). p. 85-102.

59. Singh K, Kant S, Gupta SK, Singh VK (2014) Toll-like receptor 4 polymorphisms and their haplotypes modulate the risk of developing diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. Mol Vision 20:704–713.

60. SORDI et al. O papel da imunidade inata na COVID-19. Rev Cienc Saude, 2020.

61. SOUZA, A.R. et al. Meanings and perspectives of men on what they lived during the COVID-19 pandemic Sentidos y significados atribuidos por hombres a lo vivido en la pandemia de COVID-19. Rev Esc Enferm USP · 2021;55:e03763.

62. SOUZA, G. O, Sales BN, Rodrigues AMX, Rocha GMM & Oliveira GAL (2020). Epidemiological evolution of COVID-19 in Brazil and worldwide, Research, Society and Development.

63. SUTHAR., et al. Rapid Generation of Neutralizing Antibody Responses in COVID-19 Patients. Volume 1, Issue 3, 23 June 2020, 100040.

64.TAHA, S.I. et al. Comparison of COVID-19 characteristics in Egyptian patients according to their Toll-Like Receptor-4 (Asp299Gly) polymorphism. Article received 29 October, 2021; accepted 6 January, 2022.

65.TARRAGÔ, Andrea Monteiro; Influência dos polimorfismos nos genes dos receptores tlr4 etlr9 no desenvolvimento da fibrose hepática associada à infecção pelo vírus da hepatite c. Universidade Federal do Amazonas. 2018.

66.TARZERZI, S.S. et al. Global data analysis and risk factors associated with morbidity and mortality of COVID-19. Gene Reports 26 (2022) 101505.

67.TOMÁS, Sunil. The Structure of the Membrane Protein of SARS-CoV-2 Resembles the Sugar Transporter SemiSWEET. Pathogens and Immunity, v. 5, n. 1, p. 342, 2020. Disponível em: . Acesso em: 4 mai. 2023.

68. IEIRA et al., INFECÇÃO POR SARS-COV-2. Atualização em aspectos clínicos, epidemiológicos e moleculares, 2020.

69.Wang Y, Song E, Bai B, Vanhoutte PM. Toll-like receptors mediating vascular malfunction: lessons from receptor subtypes. Pharm & Therap 2015. In press.

70.WHO. COVID-19 Weekly Epidemiological Update 42 [Internet]. World Health Organization. 2023. p. 1-28. Disponível em: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/weekly_epidemiological_update_22.pdf.

71.WITTIG, B. et al. MGN1703, an immunomodulator and toll-like receptor 9 (TLR-9) agonist: From bench to bedside. Critical Reviews in Oncology/Hematology 94 (2015) 31–44.

72.World health statistics 2023: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals.

73.ZHANG, J.J. et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. Allergy, v. 75, n. 7, p. 1730-1741, 2020.

12 ANEXOS

QUESTIONÁRIO E FICHA DE CADASTRO INDIVIDUAL:

Projeto: “Análise da resposta imune e eficácia da vacina contra COVID-19 em profissionais da saúde da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas”

Nome:

Sexo: M () F () Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: _____ anos

Nome _____ da _____ mãe:

Local de Nascimento: _____ UF:

Cor de Pele: Branco () Pardo () Negro () Escolaridade:

Profissão: _____ E-mail:

Estado Civil: Solteiro () Amigado () Casado () Divorciado () Separado () Viúvo () a quanto tempo () Possuem Filhos: Sim () Não () Quantos: _____

Endereço: _____ N°: ____ Bairro: _____ Telefone:

Município: _____ UF: _____ Tipo de Moradia: _____

Quantas pessoas residem: _____ Poço: Sim () Não () Esgoto: (Tipo)

Tipo Sanguíneo Grupo ABO: O () A () AB () B () Rh: Positivo () Negativo () Peso: _____ kg Altura: _____ cm Tem alguma comorbidade? Sim () Não () Qual (is)? Hipertensão arterial () Diabetes Mellitus tipo II () Obesidade () Cardiopatia () Doença renal () DPOC () outras doenças () _____ _____ _____ DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica; VNI: Ventilação não-invasiva.	Já teve COVID-19? () Sim () Não Início dos sintomas: ____ / ____ / ____ Final dos sintomas: ____ / ____ / ____ Quais foram os sintomas? Dor em orofaringe () cefaleia () tosse seca () astenia () perda do paladar () perda do olfato () dispneia () dor abdominal () diarreia () vômitos () Outros Sintomas: _____ _____ _____ _____ Tomografia alterada: Sim () Não () Não fez () Internou Sim () Não () Recebeu oxigênio Sim () Não () Cateter nasal () VNI () Ventilação mecânica () Qual ferramenta de diagnóstico? () RT-PCR (do nariz) () Teste rápido IgM/IgG () Teste do antígeno	Teve quadro de reinfecção? Sim () Não () Se sim, quando: ____ / ____ / ____ Qual exame de diagnóstico: () RT-PCR (do nariz) ____ / ____ / ____ () Teste rápido IgM/IgG ____ / ____ / ____ () Teste do antígeno ____ / ____ / ____ Alguém da sua família foi acometido (a) pela COVID-19? Sim () Não () Quantas pessoas? _____ Qual o parentesco? _____ _____ _____ Alguém da sua família foi a óbito por COVID-19? Sim () Não () Em uma escala de 1 a 5, qual a gravidade da pandemia atualmente? () 1 () 2 () 3 () 4 () 5 1 = Não grave; 5 = Muito grave
--	--	--

Qual vacina tomou? () CoronaVac (chinesa) () AstraZeneca (Oxford + Butantan) () Pfizer/BioNTech () Sputnik (Vacina russa Gamaleya) Já tomou outra vacina da COVID-19? Sim () Não () Qual? _____ Data da 1º dose: __ / __ / ____ Data da 2º dose: __ / __ / ____ Apresentou reação à vacina? Sim () Não () Qual reação? Febre () Dor no local () cefaleia () tosse () dispneia () calafrios () dor de garganta () diarreia () perda de paladar () perda do cheiro () vômito () parada respiratória () choque anafilático () disfunção renal () disfunção hepática () disfunção neurológica () Outros sintomas: _____ _____ _____	Faz uso regular de medicamento ? Sim () Não () Qual (ais)? 1. _____ _____ Dose: _____ Quanto tempo: _____ 2. _____ _____ Dose: _____ Quanto tempo: _____ Outros: _____ _____ _____ _____ Alcoolismo Sim () Não () Quantos/ Dia _____ Fumante Sim () Não () Quant. Tempo _____ Quant/Dia _____ _____	Vacinação em dia? Sim () Não () Não sabe () Tomou vacina para tuberculose (BCG) nos últimos 3 anos? Sim () Não () Tomou outra vacina recentemente (90 dias)? Sim () Não () Tomou vacina contra influenza em 2020? Sim () Não () Já apresentou alguma reação a qualquer tipo de vacina? Sim () Não ()
--	---	--

Você teve febre há menos de 7 dias? Sim () Não () Teve alguma doença em menos de 7 dias? Sim () Não ()	Faz uso de drogas ilícitas? Sim () Não () Tipo _____ — Quant. Temp. _____	
--	--	--

Descreva como foi o processo da doença para você:

O que você pensa sobre a pandemia que estamos vivendo?

Qual setor você trabalha no HEMOAM?

Você trabalha na atenção direta a pacientes ou acompanhantes? Sim () Não ()

Você trabalha na atenção direta ao doador? Sim () Não ()

Você trabalha com atendimento ao público? Sim () Não ()

Qual carga horária? _____

() Regime de plantão () Diariamente

Trabalha em outro local/instituição hospitalar? Se sim, qual?

Neste outro local, trabalha na atenção direta a pacientes com COVID-19? Sim
() Não ()

Você trabalha com atendimento ao público?

Sim () Não ()

Qual carga horária? () Regime de plantão () Diariamente

Você se vacinou por vontade própria?

Sim () Não ()

Se “não”, quais os motivos que levaram você a não querer se vacinar?

Quais medidas preventivas você acha importante permanecer após a vacinação?	Uso de máscaras ()	Uso de álcool em gel 70 % ()	Lavagem das mãos ()	Não acho importante ()
	() Outras:			

Como você tem se informado sobre a vacina?	Especialista da área ()	Literatura (artigos e livros) ()	Amigos/familiares ()	Rede sociais ()
	Jornal, TV ou rádio ()	Informes de instituições de saúde ()		

Nome do entrevistador:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Centro de Pesquisa: Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) e Universidade Federal do Amazonas.

Projeto: Análise da resposta imune e eficácia da vacina contra COVID-19 em profissionais da Saúde da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

Pesquisador Principal: Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

Telefone de contato: (92) 99114-9478

Convidamos o Sr. a participar da pesquisa sobre a avaliação da resposta imune e eficácia da vacina contra COVID-19 em profissionais da Saúde. O objetivo desta pesquisa é avaliar a produção de anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 vacinal, analisando a memória imunológica para células T e B antes da vacinação e nos meses 1, 3, 6 e 12 após a aplicação das duas doses da vacina.

A sua participação é voluntária e se não concordar em participar ou alterar a sua decisão e retirar o consentimento a qualquer momento do estudo, o seu acompanhamento não será prejudicado. Será possível fazer todas as perguntas que quiser em qualquer momento do estudo. Você tem todo o tempo que quiser para decidir e discutir a situação com pessoas de sua confiança.

Para sua participação há necessidade do preenchimento do questionário de rotina para doação de amostras de sangue (equivalente a quatro colheres cheias), verificação de peso e pressão arterial. Além disso, serão realizados o teste rápido IgM/IgG anti-SARSCoV-2 para verificar se você já teve contato com o coronavírus. Você não poderá participar do estudo caso você esteja apresentando sintomas clínicos da COVID ou tenha recebido transfusão nos últimos 12 meses.

Você será entrevistado por um membro da equipe do projeto para registro de informações sobre os seus dados pessoais, clínicos além do histórico de doenças prévias e comorbidades. Se você estiver de acordo em participar do estudo, será coletada uma amostra de seu sangue para a verificação da presença de anticorpos que protegem contra o Coronavírus e/ou presença do SARS-CoV-2. Além disso, com a sua entrada no estudo, informamos que iremos realizar novas avaliações e coleta de amostras de sangue nos meses 1, 3, 6 e 12 após a aplicação das duas doses da vacina, totalizando 5 entrevistas e coleta de amostras.

Você não terá qualquer custo ou qualquer forma de pagamento/remuneração por sua participação neste estudo. Solicitamos ainda sua autorização para armazenarmos uma amostra de seu sangue e plasma para uma

nova avaliação se for necessário e outros exames que não estejam previstos aqui, mas que sejam necessários para o estudo. O sangue coletado ficará armazenado no biorrepositório da Fundação HEMOAM para futuras análises e avaliações ligadas ao projeto. No caso de amostra insuficiente, quebra do tubo, hemólise, o senhor será avisado para que retorne ao HEMOAM para realizar nova coleta de sangue para a realização dos exames.

Se você sofrer algum dano ou intercorrência, deverá falar para alguém da equipe da pesquisa imediatamente ou em caso de emergência, poderá contatar diretamente Dra. Adriana Malheiro Alle Marie, pesquisadora do estudo, através do telefone (92) 99114-9478. Nós lhe daremos toda assistência integral e gratuita e que for necessária para garantir seu bem-estar. Os membros da equipe do projeto de pesquisa irão garantir que você receba assistência imediata caso tenha quaisquer tipos de danos, diretos ou indiretos, imediatos ou tardios, sofridos no decorrer de sua participação na pesquisa, previsto ou não neste documento.

Os riscos de participação neste projeto estão relacionados ao desconforto ao responder as perguntas do questionário e da punção da veia para coleta das amostras. Durante a coleta de sangue o senhor poderá sentir tremores e dormências nos lábios, desconforto no local da coleta e uma mancha vermelha poderá aparecer no local, mas é uma reação normal a coleta de amostras.

Os benefícios de sua participação estão direcionados ao auxílio no entendimento da eficácia da vacina contra o COVID-19 e o que ela produz no corpo das pessoas, além de ser possível identificar proteínas que possam estar associados a resposta eficiente do organismo ao vírus. Essa pesquisa não trará nenhum tipo de benefício direto ou remuneração de nenhuma espécie para os participantes deste projeto, mas irão ajudar a entender a eficácia da vacina contra infecções no futuro.

Os exames e procedimentos realizados exclusivamente com fins de pesquisa não implicarão qualquer custo para você. Os acompanhamentos após a primeira coleta continuarão sendo realizados na Fundação HEMOAM. Se necessário, você receberá um ressarcimento pelos gastos relacionados à sua participação no estudo. Apesar de não haver compensação financeira, ao assinar este termo de consentimento você não renunciará a nenhum dos seus direitos legais, garantidos na regulamentação brasileira de pesquisa envolvendo seres humanos, sendo um de seus direitos a solicitação de indenização.

Você pode ser excluído do estudo se os pesquisadores considerarem oportuno ou se você solicitar, tanto por razões de segurança, por qualquer desconforto que ocorra ou por considerar que você não está cumprindo os procedimentos solicitados pela equipe do estudo. Em todos os casos, você receberá uma explicação adequada do motivo que ocasionou a sua retirada do estudo. Além disso, o estudo também pode ser cancelado por razões administrativas. Ao assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, você se compromete a cumprir com os procedimentos do estudo que foram explicados.

Para obter mais informações sobre este estudo ou para qualquer informação adicional sobre os seus direitos como participante, ou se você quiser fazer uma reclamação, por favor, entre em contato com o pesquisador responsável do estudo: Dra. Adriana Malheiro Alle Marie, no endereço Av. Constantino Nery, 4397, Bloco E, 1º andar, Chapada, Manaus - AM; telefone (92) 99114-9478; e-mail malheiroadriana@yahoo.com.br.

Em caso de dúvidas, denúncias ou reclamações sobre a sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM); e-mail: cep@hemoam.am.gov.br; endereço: na Av. Constantino Nery, 4397 Chapada, Bloco A, 2º andar, Sala 13 (CEP-HEMOAM), Chapada, Manaus - AM; telefone: (92) 3655-0114. O horário de funcionamento do CEP é de 8 às 14 horas, de segunda à sexta-feira.

Eu,

_____ informo que li este documento ou ele foi lido para mim, fico ciente e concordo em fazer a doação. Além disso, eu:

- Tive a oportunidade de tirar dúvidas sobre o estudo.
- Recebi informações suficientes sobre o estudo.
- Serei informado regularmente sobre qualquer informação que possa afetar a minha disponibilidade em continuar a minha participação no estudo.
- Autorizo o acesso às minhas informações confidenciais.
- Autorizo o processamento de minhas informações e amostras.
- Entendo que receberei uma via deste termo.
- Entendo que a minha participação é voluntária.
- Entendo que posso retirar o meu consentimento e concluir a minha participação:
 1. Em qualquer momento
 2. Sem dar qualquer explicação
 3. Sem que prejudique meu tratamento posterior

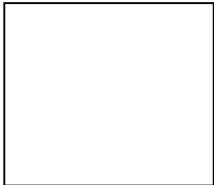
Ofereço livremente o meu acordo para participar deste estudo e dou o meu consentimento para acessar e usar os meus dados nas condições descritas neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

() SIM () NÃO

Concordo que as amostras serão armazenadas para um biorrepositório e autorizo contato, caso necessário, para futuros estudos que possam ocorrer, aprovados pelo CEP e, quando necessário, pela CONEP.

() SIM () NÃO

____/____/____.
Assinatura do Doador

Local

_____,

____/____/____.
Assinatura da Testemunha

Local

_____,

Adriana Malheiro Alle Marie

_____, ____/____/____.

Assinatura do Pesquisador /
Local Equipe da Pesquisa