



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



RODRIGO CESAR ABREU DE AQUINO

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE PROFISSIONAIS DE SAÚDE EXPOSTOS A
PACIENTES ACOMETIDOS PELA COVID-19.**

Recife
2022

RODRIGO CESAR ABREU DE AQUINO

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE PROFISSIONAIS DE SAÚDE EXPOSTOS A
PACIENTES ACOMETIDOS PELA COVID-19.**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de
doutor em Ciências Biológicas

Área de concentração: Sistemas
Biológicos

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo

Recife

2022

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Aquino, Rodrigo César Abreu de

Resposta imunológica de profissionais de saúde expostos a pacientes acometidos pela COVID-19 / Rodrigo César Abreu de Aquino. – 2022.

94 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Viroses. 2. COVID-19. 3. Imunidade. I. Melo, Cristiane Moutinho Lagos de (orientadora). II Título.

616.961

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-209

RODRIGO CESAR ABREU DE AQUINO

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE PROFISSIONAIS DE SAÚDE EXPOSTOS A
PACIENTES ACOMETIDOS PELA COVID-19.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 30/09/2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Antônio Carlos de Freitas (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Anna Jéssica Duarte Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Evônio de Barros Campelo Júnior (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse Trabalho a todos os profissionais de saúde, em destaque aqueles que participaram como voluntários e colaboradores da pesquisa, que honraram sua profissão para atuar no enfrentamento da pandemia causada pela COVID-19. Aqueles que abriram mão do convívio com suas famílias, para protegê-los do inesperado, para generosamente cuidar do familiar de alguém. Em especial os profissionais de saúde que na sua luta diária acabaram morrendo por conta da COVID-19 ou perdendo algu[em que tanto amava. Dedico também a minha família, que esteve sempre ao meu lado acreditando naquilo que eu escolho fazer na vida, e em especial minha esposa, Tatiane Venâncio de França, minha Filha, Maria Luiza França de Abreu, e minha mãe, Marcia Verônica de Moraes Abreu, pela paciência constante comigo. Dedico também a minha orientadora e amiga, a professora Cristiane Moutinho Lagos de Melo, que Deus colocou no meu caminho como anjo da guarda, tutora e confidente de muitas angústias que passei durante essa pandemia.

AGRADECIMENTOS

Gratidão é o sentimento que quero levar comigo nessa etapa concluída, pois sem as pessoas que cruzaram meu caminho durante o doutorado, eu jamais teria chegado ao fim. Algumas pessoas conhecidas de outros momentos da minha vida e muitos desconhecidos que se tornaram exemplos de conhecimento e profissionalismo para mim. Ganhei amigos e ídolos que levarei no meu coração para sempre.

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família, que me apoiou nessa decisão de voltar a estudar e que foi meu amparo e refúgio durante essa louca aventura de fazer um doutorado durante a pandemia. Agradeço a minha esposa Tatiane Venâncio que soube compreender os meus momentos de cansaço físico, exaustão mental e dor no corpo e alma, pois sabia que eu precisava estudar e trabalhar como enfermeiro, e que isso tomava de mim mais forças do que poderia dar. Agradeço a minha filha Maria Luiza, que mesmo na sua inocência e infantilidade, soube me alegrar nos momentos pesados e compreender os momentos que eu estava ausente. Muitas vezes precisei assistir aula com ela, pois devido isolamento social, éramos nós dois em um louca nova rotina. Agradeço também a minha mãe, Marcia Abreu, que nunca mediu esforços para me ajudar, que sempre se prontificava em dividir conosco a responsabilidade do cuidar da nossa filha e que sem ela eu jamais teria tido momentos de repouso.

Agradeço também a equipe do **Laboratório de Análises Imunológicas e Antitumorais (LAIA)**, que me acolheu de portas abertas como minha casa e que me proporcionou aprendizados que jamais imaginaria ter. Aos amigos que fiz, como Georon Ferreira, que com seu jeito doce e tranquilo me ajudou nas dificuldades das disciplinas que cursamos juntos, além de sempre estar disponível para me ajudar naquilo que era novo para mim. Guilherme Souza, que com seu jeito acelerado e super prestativo, se tornou meu grande preceptor, me mostrando e ensinando a usar equipamentos que jamais havia visto na vida. Bárbara Barros, sempre gentil, didática e explicativa, conseguiu traduzir para mim a linguagem tão complexa da imunologia. Uma professora em toda sua linda essência. Ao Leonardo Oliveira, que com seu astral animado e sua energia positiva, esteve comigo nas etapas finais da pesquisa, tornando as rotinas muito mais leves e agradáveis.

A minha admirável orientadora, Cristiane Moutinho, que surgiu na minha vida

como uma colega de trabalho e que anos depois me acolhe de braços abertos na sua equipe, entendendo minhas qualidades e deficiências. Agradeço muito a ela pela paciência que teve comigo para me ensinar sobre imunologia, área que eu sabia de forma superficial, pela compreensão com minha vida corrida e cheia de atividades e pela generosidade em se doar constantemente aos seus alunos/amigos/companheiros de vida. Nunca foi fácil fazer parte desse time de pessoas tão inteligentes e dinâmicos, mas a cada dia, a Professora Cristiane soube ir me moldando e me inserindo nas atividades, me fazendo acreditar que era possível e estando ao meu lado em todos os momentos que precisei dela. Se eu não desisti no meio do caminho (e tive muitos motivos para isso) eu devo isso a ela! Meu eterno agradecimento.

Agradeço a equipe do Hospital das Clínicas-UFPE em especial a todos os colaboradores, profissionais e residentes que de alguma forma contribuíram para execução da pesquisa. Aos profissionais do Laboratório de Análises clínicas, aos profissionais da enfermaria DIP e UTI-Covid do Hospital das Clínicas, e em nome de todos eles, agradeço a enfermeira e amiga Aparecida Virgínia Teles e aos Professores Evônio Campelo e Arione Vieira. Agradeço a Amanda Mota, Bruno Melo e professora Tereza Cartaxo do Instituto de Ciências Biológicas da UPE por todo auxílio para execução desse trabalho, muito obrigado. Muito obrigado pela ajuda nesse trabalho, vocês também fazem parte disso.

Agradeço ao Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) por todo apoio e acesso aos recursos tecnológicos que subsidiaram parte da pesquisa. Em especial a Anna Jéssica e ao coordenador do Laboratório, o Professor Antonio Carlos, muito obrigado pelo acolhimento.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas – UFPE, pela oportunidade de ingresso e poder ter tido o privilegio de me formar através desse tão conceituado e respeitado programa. Agradeço aos professores Thiago Napoleão e Marcia Vanusa, e extendo aos demais docentes, todo meu respeito e gratidão pelos ensinamentos que me foram dados.

E por fim, porém tão importante quanto aos demais supra citados, agradeço aos 50 profissionais de saúde que se dispuseram a se voluntariar como participantes da pesquisa. Profissionais que viveram todo o medo da pandemia, e assim como eu, trabalhou para que nenhuma vida fosse perdida sem antes ter sido tentado salvar.

RESUMO

O estudo descreve as características clínicas, laboratoriais e imunológicas da infecção por SARS-CoV-2 em profissionais de saúde de um hospital no Nordeste do Brasil antes da fase de vacinação. Para isso, foram investigados 50 profissionais que trabalharam durante a pandemia de COVID-19 com pacientes infectados. Dados sociodemográficos, clínicos e epidemiológicos foram obtidos para caracterização da população. Amostras de sangue foram coletadas e utilizadas para investigação de parâmetros laboratoriais e imunológicos. Os resultados mostraram que a maioria dos trabalhadores são mulheres, com idade superior a 50 anos, e atuavam como técnicos de enfermagem. Aproximadamente 56% dos trabalhadores, predominantemente assintomáticos, foram considerados positivos pelos testes RT-PCR e/ou anti-SARS-CoV-2-imunoglobulina, apresentaram aumento dos níveis de hematócrito, neutrófilos, linfócitos NK e fibrinogênio, sugerindo um quadro inflamatório pulmonar leve status. Os achados imunológicos também mostraram um aumento na produção de IL-17 e um perfil Th2/Th17/Th22 seguido de alta titulação para IgM e IgG anti-SARS-CoV-2. Esses dados revelam a importância de estudos com profissionais de saúde para investigar se a exposição contínua ao vírus pode resultar em ativação crônica do sistema imunológico e/ou dano pulmonar nesse grupo-alvo.

Palavras-chave: COVID-19; inflamação; Profissionais de saúde; Th2/Th17/Th22.

ABSTRACT

The study describes the clinical, laboratory and immunological characteristics of SARS-CoV-2 infection in healthcare workers at a hospital in Northeast Brazil before the vaccination phase. For this, 50 professionals who worked during the COVID-19 pandemic with infected patients were investigated. Sociodemographic, clinical and epidemiological data were obtained to characterize the population. Blood samples were collected and used to investigate laboratory and immunological parameters. The results showed that most workers are women, aged over 50 years, and worked as nursing technicians. Approximately 56% of the workers, predominantly asymptomatic, were considered positive by the RT-PCR and/or anti-SARS-CoV-2-immunoglobulin tests, showed increased levels of hematocrit, neutrophils, NK lymphocytes and fibrinogen, suggesting a mild pulmonary inflammatory condition. status. Immunological findings also showed an increase in IL-17 production and a Th2/Th17/Th22 profile followed by high serology for anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG. These data reveal the importance of studies with health professionals to investigate whether continuous exposure to the virus can result in chronic activation of the immune system and/or lung damage in this target group.

Keywords: COVID-19; Healthcare workers; inflammation; Th2/Th17/Th22.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
4	METODOLOGIA	26
5	RESULTADOS	31
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÕES	40
	REFERÊNCIAS	41
	APÊNDICE A- QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS	53
	APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	54
	APÊNDICE C – ARTIGO ORIGINAL ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	55
	APÊNDICE D– ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO	84
	APÊNDICE E– ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO COMO CO-AUTOR	86
	APÊNDICE F– CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO COMO CO-AUTOR	87
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	89

1 INTRODUÇÃO

A família Coronaviridae possui um histórico de epidemias registradas em anos passados, como a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), com uma taxa de mortalidade de cerca de 10% (8098 casos e 774 mortes), e a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS), cerca de 34% (2494 casos e 858 mortes), sendo os únicos representantes da família Coronavírus identificadas em humanos até então (Gorbalenya et al., 2020; Murdoch, 2020).

Atualmente, um novo representante dessa família, chamado SARS-CoV-2, vírus causador da doença do coronavírus 2019 (COVID-19), que surgiu na China e atualmente é considerada como surto mais grave de pneumonia dos últimos 100 anos, atingindo mais de 200 países ao redor do mundo (Gorbalenya *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020a; Lu *et al.*, 2020; Melo *et al.*, 2020). Até setembro de 2022, a doença atingiu cerca de 612 milhões de casos e 6,5 milhões de mortes em todo o mundo, de acordo com o Painel COVID-19 do Centro de Ciência e Engenharia de Sistemas (CSSE) da Universidade Johns Hopkins. Dados do Brasil para o mesmo mês, apontaram mais de 34 milhões de casos acumulados e mais de 685 mil óbitos pelo vírus (Fiocruz, 2022; JHU, 2022).

A transmissibilidade da COVID-19 deve-se à alta carga viral no trato respiratório superior, mesmo entre pacientes assintomáticos, o que a distingue de outras doenças respiratórias (Aronset al., 2020; Li et al., 2020b). A disseminação do vírus pode ocorrer através do contato direto com superfícies contaminadas, aerossóis e gotículas respiratórias (Chan et al., 2020). No curso da infecção a pessoa infectada pode não apresentar sintomas (assintomáticos) ou desenvolver diferentes manifestações clínicas, como pneumonia leve, dispneia, hipóxia, envolvimento pulmonar em exames de imagem, insuficiência respiratória, choque sistêmico ou falência multi-órgãos (Buitrago-Garcia et al., 2020; De Souza Silva et al., 2020; Furukawa et al., 2020; Merad e Jerome, 2020).

No início da pandemia, devido ao desconhecimento da fisiopatologia da doença, à insuficiência de vacinas para todas as pessoas e tratamentos direcionados, as estratégias de distanciamento social e uso de máscaras foram consideradas as intervenções mais eficientes para o controle da disseminação do vírus (Fu et al., 2020; Nguyen et al., 2020). Com o início da vacinação para o COVID-19 em todo o mundo, os governos priorizaram grupos de alto risco, para contaminação, agravamento e/ou

morte, para receber o imunizante na etapa inicial de disponibilização. A princípio, esses grupos de alto risco incluíram os profissionais de saúde, idosos (especialmente aqueles com comorbidades crônicas), e aqueles que atuavam em serviços essenciais, avançando aos poucos para os demais grupos da sociedade (Brasil, 2021).

O Brasil se manteve durante toda a pandemia com um elevado número de casos e mortes em comparação com o restante do mundo, apresentando cerca de 70% da população economicamente ativa com baixo apoio financeiro e que não podia ficar em casa. Da mesma forma, a recomendação "fique em casa" não se aplicou às equipes de saúde, especialmente aos trabalhadores que tratam dos pacientes com COVID-19 em serviços de atenção básica, atendimento de emergência e unidades hospitalares (Melo et al., 2020; Bampoe et al., 2020; Porta-Etessam et al., 2020). Assim, os profissionais de saúde são particularmente suscetíveis à infecção devido à sua exposição aos fluidos biológicos dos pacientes (Behrens et al., 2020; Santos et al., 2021).

Em todo o mundo, milhares de profissionais de saúde se afastaram das suas atividades profissionais, seja por uma provável suspeita de contaminação pelo vírus, ou devido ao desenvolvimento da doença, onde muitos destes morreram. Na China, cerca de 29% dos profissionais de saúde foram infectados pelo COVID-19 durante os primeiros meses da pandemia (Wang et al., 2020a). Ao mesmo tempo, Espanha e Itália tiveram 22% e 20% dos profissionais de saúde infectados, respectivamente (Arons et al., 2020; Suárez-García et al., 2020). Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde, dos profissionais de saúde infectados em todas as américas, o Brasil teve 54% dos contaminados, o que corresponde a 307 mil profissionais. Sendo os mais afetados os profissionais de enfermagem, sobretudo, técnicos e auxiliares (OPAS, 2020).

A pandemia desencadeada pelo novo Coronavírus impactou, e continua afetando, o trabalho de diversos profissionais da saúde, desempenhando cuidados aos infectados e na contenção da disseminação do vírus. Em todo o mundo, os trabalhadores que permanecem atuando na linha de frente, têm sofrido um preço alto na luta contra este novo vírus, pois muitos são infectados, podendo contaminar seus familiares ou pessoas de seu convívio, evoluindo inclusive para óbito. Assim, essa pesquisa busca descrever os aspectos clínicos e imunológicos de profissionais de saúde expostos, durante a pandemia, a pacientes com COVID-19, no decorrer da manifestação da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Descrever os aspectos clínicos e imunológicos de profissionais de saúde expostos a pacientes com COVID-19, no decorrer da manifestação da doença, durante o surto pandêmico em uma unidade hospitalar do Nordeste do Brasil.

2.2 ESPECÍFICOS

- Traçar um perfil clínico-epidemiológico dos profissionais de saúde envolvidos no estudo;
- Investigar o perfil imunológico pela produção de citocinas e imunoglobulinas no soro dos profissionais de saúde;
- Investigar as respostas inflamatórias através de marcadores bioquímicos;
- Analisar o perfil de expressão gênica das vias imunológicas prevalentes nos profissionais de saúde.
- Realizar análise de polimorfismo dos profissionais de saúde

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 A PANDEMIA PELO SARS-COV-2/COVID-19

3.1.1 Aspectos epidemiológicos

Em dezembro de 2019 na cidade de Wuhan na China, identificou-se uma nova cepa do coronavírus, o SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2). A doença causada por esse novo coronavírus é chamada de COVID-19, ou Doença do Coronavírus 2019 (Gorbalenya *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020a; Lu *et al.*, 2020; Melo *et al.*, 2020). A detecção de casos de COVID-19 não ocorreu da mesma forma em todos os países, em alguns países desenvolvidos, o número de casos permaneceu estável ou flutuou. No entanto, em outros o número de casos de infectados aumentou rapidamente, e cuidados específicos foram necessários (Grasseli, Pesenti e Cecconi, 2020; Phua *et al.*, 2020).

A pandemia de coronavírus infectou mais de 612 milhões de pessoas e matou mais de 6,5 milhões em todo o mundo até setembro de 2022 (Figura 1). O epicentro da pandemia mudou constantemente, iniciando na China, passando depois para Europa e nos EUA e em seguida para países em desenvolvimento como a Índia e o Brasil, estando, atualmente, estes três últimos países ocupando o ranking de casos, respectivamente. (Bloomberg, 2022; WHO, 2021; JHU, 2022).

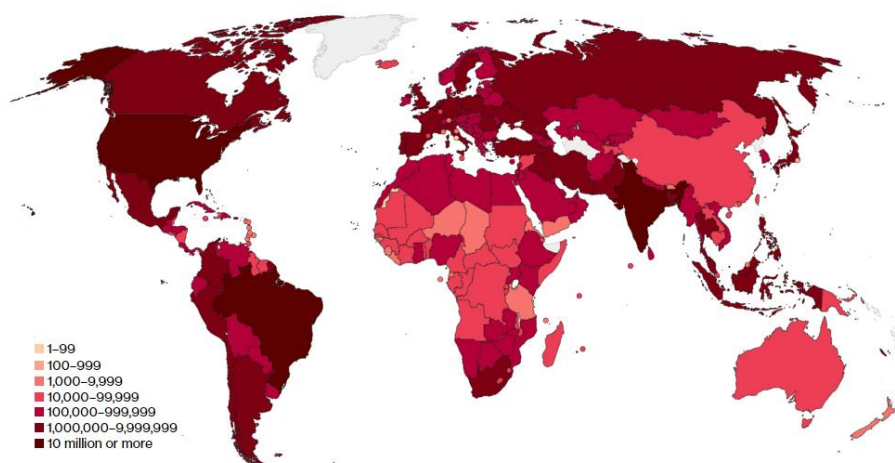


Figura 1 - Distribuição mundial dos casos confirmados de COVID-19 até agosto de 2022.

Fonte: [bloomberg.com/graphics/2022-coronavirus-cases-world-map/](https://www.bloomberg.com/graphics/2022-coronavirus-cases-world-map/).

Acerca do número de pessoas que se recuperaram após infecção pela COVID-19 (Figura 2), considerando o número absoluto de casos, subtraído pelos óbitos absolutos e em acompanhamento, Até junho de 2022, estima-se que 97,1% das

peças infectadas pelo vírus no mundo se recuperaram. Os Estados Unidos foram o país com o maior número de recuperados (83.155.928 ou 15,9%), seguido por Índia (42.646.584 ou 8,2%), Brasil (30.339.765 ou 5,8%), França (29.416.993 ou 5,6%) e Alemanha (26.191.437 ou 5,0%) (Brasil, 2022).

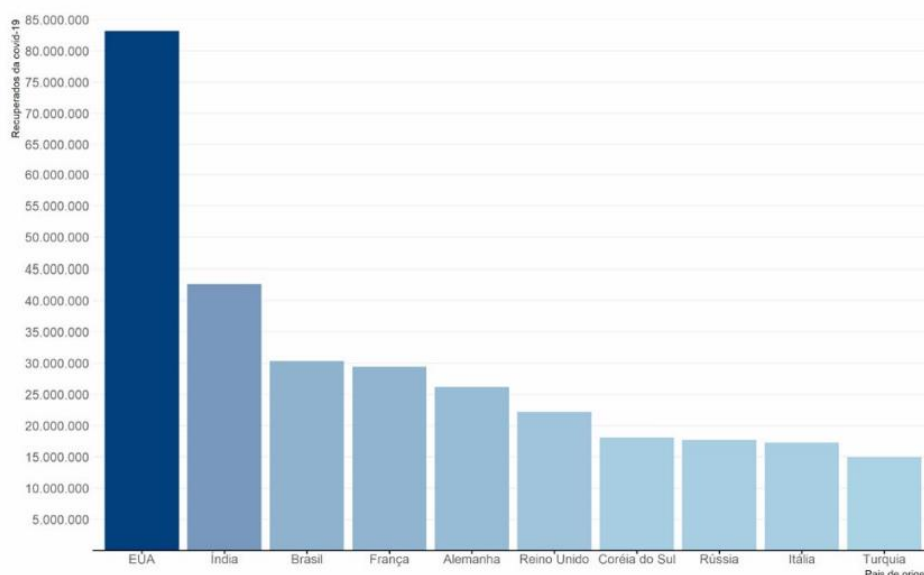


Figura 2- Distribuição dos casos recuperados de covid-19 entre os países com o maior número de recuperados, até junho de 2022.

Fonte: Our World in Data – <https://ourworldindata.org/coronavirus>

O primeiro caso no território brasileiro ocorreu no estado de São Paulo, em 26 de fevereiro de 2020, onde um homem de 61 anos que chegou de viagem da Itália, apresentou os sintomas característicos da doença. Dois dias depois, já havia mais de 180 casos suspeitos em 16 estados brasileiros. O maior registro de casos novos notificados no Brasil em um único dia (298.408 casos) ocorreu no dia 3 de fevereiro de 2022 e de novos óbitos (4.249 óbitos), em 8 de abril de 2021. Ressalta-se que a data informada de notificação pode não representar o dia real de ocorrência dos eventos, mas exprime o período no qual os dados foram divulgados nos sistemas de informação do Ministério da Saúde. (Brasil, 2022).

Considerando os dados acumulados de casos e óbitos, desde 26 de fevereiro de 2020 até 18 de junho de 2022, Espírito Santo apresentou a maior incidência do País, 26.493 casos/100 mil habitantes, enquanto a maior taxa de mortalidade foi registrada no Rio de Janeiro, que apresentou 425,9 óbitos/100 mil habitantes (Brasil, 2022).

Inicialmente, as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil foram

alinhadas com as instruções da Organização Mundial de Saúde – OMS, para prevenir a disseminação do vírus na população. Após a adoção das recomendações de diagnóstico e testagem dos suspeitos da doença pelos profissionais de saúde, os critérios de avaliação do Ministério da Saúde foram alterados, e novos dados epidemiológicos passaram a ser publicados diariamente. Porém por falta de verbas públicas, desinteresse governamental e escassez de insumos apenas os casos graves que avançaram para a hospitalização ou reclusão para cumprimento de quarentena foram testados com kits específicos (De Melo *et al.*, 2020; De Castro *et al.*, 2021).

O teste diagnóstico para COVID-19 passou a ser realizado por meio de uma abordagem em duas frentes que são a detecção direta do RNA viral ou os testes baseados no rastreio pelo sistema imunológico para detectar antígenos virais ou anticorpos. O teste mais comum para detectar o RNA viral é por meio da transcrição reversa e amplificação de DNA por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), onde são usadas amostras de esfregaços naso-orofaríngeos para a detecção do SARS-CoV-2 (Vanderberg *et al.*, 2020; Falzone *et al.*, 2021; Habibzadeh *et al.*, 2021). Os genes S (spike), N (nucleocapsídeo) e E (envelope) são usados como alvos nos ensaios de RT-qPCR em combinação com a fase de leitura aberta 1 (ORF1) e a RNA polimerase dependente de RNA (Watson, Whiting e Brush, 2020).

Existem ainda testes de detecção rápida de antígenos disponíveis para análise do SARS-CoV-2. O teste de anticorpos permite a caracterização de respostas imunes humorais individuais a infecções atuais e anteriores, visando respostas de IgG, IgA e IgM, os quais estão sendo atualmente usados em ambientes clínicos. Para a detecção do SARS-CoV-2 para os ensaios baseados em antígenos/anticorpo utiliza-se amostras de esfregaços nasofaríngeos, sangue total ou soro (Falzone *et al.*, 2021; Habibzadeh *et al.*, 2021).

3.1.2 Aspectos fisiopatológicos da COVID-19

A família Coronaviridae é subdividida com base em caracteres genotípicos e sorológicos em quatro gêneros: *Alfacoronavírus* (α), *Betacoronavírus* (β), *Gammacoronavírus* (γ) e *Deltacoronavírus* (δ), sendo que os coronavírus identificados que podem infectar humanos pertencem aos dois primeiros gêneros (Bermingham *et al.*, 2012; ZAKI *et al.*, 2012; Agca, Saglik e Ener, 2021). Fazem parte do grupo dos coronavírus o SARS-CoV-2 juntamente com os vírus SARS-CoV e MERS-CoV,

classificados na família Coronaviridae, na ordem Nidovirales, os quais são conhecidos por possuírem os maiores genomas de RNA entre os vírus. Esses três vírus possuem um genoma de RNA de fita simples de sentido positivo (+ssRNA) variando em tamanho de 26 a 32 kb. (Adams e Carstens, 2012; King *et al.*, 2011; Khailany, Safdar e Ozaslan, 2020).

Na sua morfologia viral apresenta uma proteína glicosilada N-ligada transmembrana do tipo I (150–200 kDa) que consiste em 1273 aminoácidos e exibe vários graus de conservação entre os Coronaviridae, denominada de proteína S (Cagliani *et al.*, 2020). Após a síntese, três cadeias polipeptídicas da proteína S se associam, formando uma assembléia homotrimérica, que consiste em subunidades S1 e S2, onde juntas apresentam vários domínios funcionais, de N a C-terminais como segue: domínio N-terminal (NTD), motivo de ligação ao receptor (RBM) contendo domínio de ligação ao receptor (RBD), furina sítio de clivagem (S1/S2, que provavelmente será clivado pela protease TMPRSS2), peptídeo de fusão (FP), hélice central (CH), domínio de conexão (CD), domínio de repetição de heptade (HR1/2), domínio transmembranar (TM) e cauda citoplasmática (CT). O RBD/S1 sofre uma transição conformacional *down-to-up* durante a interação com o receptor enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) ligado à membrana, facilitando o reconhecimento e a ligação celular (Moreira *et al.*, 2020; Forouzesh e Mishra, 2021; Kishimoto *et al.*, 2021; Li e Buck, 2021; Nguyen *et al.*, 2021).

O vírus SARS-CoV-2 infecta o hospedeiro por meio de células ciliadas e caliciformes na região nasofaríngea, através das vias aéreas superiores, utilizando essas células para sua replicação e posterior proliferação para outras regiões do corpo (WALLS *et al.*, 2020). Além disso, a ECA2 é um dos receptores, presentes nessas células, que permitem a entrada do vírus e favorecem a fusão do vírus com as membranas celulares (Hoffmann *et al.*, 2020; Ou *et al.*, 2020). Após a fusão vírus-célula alvo mudanças conformacionais na proteína S do vírus permite que o vírus entre completamente nas células. Estando dentro da célula, o vírus irá posteriormente liberar seu material genético (+ssRNA) no citoplasma e usará os compostos celulares para traduzir as proteínas virais (Simmons *et al.*, 2013; De Souza Silva *et al.*, 2020; Melo *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021).

Após a liberação do material genético viral pelo nucleocapsídeo o (+ssRNA) serve como mRNA funcional em relação a ORF1a e ORF1b que codificam a poliproteína pp1a (440-500 kDa) e pp1ab (740-810 kDa), respectivamente (FINKEL *et*

al., 2021; V'KOVSKI *et al.*, 2021). Esses dois polipeptídeos passam por processamento autoproteolítico produzindo 16 nsps, que juntos formam o complexo de replicação-transcrição (CRT) para a síntese de RNA viral. Este CRT funcional resulta na formação de um conjunto aninhado de sgRNAs (RNA guia simples) via transcrição descontínua (BHATT *et al.*, 2021; KISS *et al.*, 2021). A formação do CRT acarreta a síntese de múltiplas cópias do RNA viral de sentido negativo ($(-)$ ssRNA), no qual serve como modelo intermediário (Sola *et al.*, 2015; Romano *et al.*, 2020).

As células epiteliais nasais presentes na região nasofaríngea, exibem elevada expressão de ECA2, seguidas por células alveolares produtoras de surfactante tipo 2 no trato respiratório inferior. Isso implica que o trato respiratório, especialmente a região superior, é um importante repositório para a colonização do vírus no início da infecção (Chand *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2021). Achados histopatológicos demonstram que a patologia predominante nos tecidos pulmonares de pacientes com COVID-19 grave é o dano alveolar difuso (Fox *et al.*, 2020; Yazdanpanah *et al.*, 2020; Ranucci *et al.*, 2020).

As alterações laboratoriais da COVID-19 incluem desde linfopenia com depleção de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, até prolongamento do tempo de protrombina e elevação dos marcadores lactato desidrogenase, D-dímero, alanina transaminase, proteína C reativa, e creatinina quinase (Huang *et al.*, 2020; Wang; Grunewald; Perlman, 2020). Os pacientes infectados podem manifestar ainda, imunodeficiência celular, ativação de fatores de coagulação, lesão do miocárdio, lesão hepática, lesão renal, lesão no sistema nervoso central e periférico e lesão gastrointestinal (NHCC, 2020). No curso da infecção, os pacientes podem evoluir assintomáticos ou desencadear manifestações clínicas, como febre, anosmia (perda do olfato), ageusia (perda do paladar), dispneia, tosse sem expectoração, hipóxia, insuficiência respiratória, choque sistêmico e falência de múltiplos órgãos (Buitrago-Garcia *et al.*, 2020; De Souza Silva *et al.*, 2020; Furukawa *et al.*, 2020; Merad e Jerome, 2020).

Radiografias e tomografias computadorizadas do tórax mostram envolvimento pulmonar, com sombras irregulares bilaterais ou opacidade, tipo “vidro fosco”, nos pulmões de pacientes moderados e graves. Observa-se que a maioria dos pacientes com COVID-19 com sintomas leves/moderados podem transitar rapidamente para estados graves ou críticos se não houver cuidado imediato em unidade hospitalar (Chen *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

3.1.3 Resposta imunológica à infecção

Quando em contato com o RNA viral, as células epiteliais e macrófagos ativam os receptores Toll-like (TLR) (3 e/ou 7) em endossomos e sensores de RNA citosólico (RIG-I e MDA-5), causando eventos celulares antivirais mediados por fatores associados ao receptor de TNF (TRAF), suprimindo as respostas pró-inflamatórias precoces de interferon tipo I (IFN-I) e estimulando outras citocinas efetoras pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α . Além disso, o SARS-CoV-2 também inibe a ativação de fatores de transcrição STAT em resposta à ativação do receptor de interferon tipo I (IFNR), o que limita ainda mais os mecanismos de resposta antiviral comumente observados em outras infecções (Merad e Martin, 2020; Park e Iwasaki, 2020; Ziegler *et al.*, 2020).

A dinâmica da COVID-19 ocorre em uma supressão do programa antiviral imunológico clássico, cujos vírions inibem a sinalização de IFN tipo I em macrófagos infectados, com uma expressão pró-inflamatória das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α , desencadeando uma hiperinflamação e a síndrome da tempestade de citocinas. Os macrófagos teciduais expressam menos ECA2 o que os tornam menos propensos a serem infectados por essa via (Blanco-Melo *et al.*, 2020; Hadjadj *et al.*, 2020; Negro, 2020).

Em uma pesquisa com análise do plasma sanguíneo de 41 pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI) com COVID-19, foram encontrados elevados níveis das interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1, MIP-1A, MIP1-B, PDGF, TNF- α e VEGF caracterizando o fenômeno da tempestade de citocinas e promovendo a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), todos os pesquisados também apresentaram pneumonia como co-infecção, 1/3 destes foram internados na UTI e seis indivíduos evoluíram a óbito (Huang *et al.*, 2020). Outro estudo multicêntrico retrospectivo de 150 pacientes com COVID-19 na China demonstrou que 68 indivíduos que evoluíram a óbito apresentavam níveis mais elevados de IL-6 (Ruan *et al.*, 2020). Além disso, Gao e colaboradores (2020) avaliaram 43 pacientes na China e também relataram altos níveis de IL-6 no soro de 33 pacientes graves, apontando a IL-6 como a principal citocina envolvida na tempestade de citocinas.

Nesse contexto, em decorrência da tempestade de citocinas (que também atuam na regulação da atividade dos neutrófilos) nas vias aéreas de pacientes com

COVID-19, observou-se DNA extracelular, em parte oriundo de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) liberados em resposta a infecções pulmonares persistentes (Mao *et al.*, 2020). A formação excessiva dos NETs favorece a produção de muco espesso e viscoso, que dificulta o fluxo ventilatório, facilita a colonização de bactérias, diminuindo a função respiratória do paciente (Fox *et al.*, 2020; Mozzini e Girelli, 2020). A evidente neutrofilia também traz como consequência a formação de trombos microvasculares pela liberação de NETs por neutrófilos misturados a plaquetas, evidenciados no exame post-mortem dos pulmões de pacientes com COVID-19, e em aspirados traqueais de pacientes intubados em UTI (Levi e Hunt, 2020; Middleton *et al.*, 2020; Skendros *et al.*, 2020; Van Dam *et al.*, 2020).

No entanto, os imunocomplexos constituídos por anticorpos circulantes reconhecem as partículas virais e podem ser absorvidos pelos macrófagos por meio dos receptores Fc gama (FcγR), resultando em sua infecção. Esse mecanismo é conhecido como *aprimoramento dependente de anticorpos* (ADE), onde na COVID-19 tem demonstrado uma resposta (Negro, 2020; Tetro, 2020).

Os linfócitos são células da circulação sanguínea, porém podem ser atraídos para os locais inflamatórios e apresentar uma resposta imunológica aumentada. A progressão da COVID-19 demonstra um quadro de linfopenia periférica generalizada, mas associada ao aumento de linfócitos nos tecidos infectados. As células T desempenham um papel importante na imunidade antiviral, como as células T CD8⁺ e NK (natural killer), que são capazes de secretar uma série de moléculas como a perforina, a granzima e IFN-γ para eliminar as células infectadas. Além disso, as células T CD4⁺ regulam as células da imunidade inata e adaptativa, aumentando sua capacidade de eliminar diferentes patógenos (Mescher *et al.*, 2006; Ng, Snell e Brooks, 2013).

Além disso, a linfopenia associada a COVID-19 também é promovida pela redução das células NK em consequência do aumento da expressão de NKG2 (receptor de lectina tipo C), que pode estimular ou inibir a atividade citotóxica das células NK, sendo também um importante marcador de exaustão dessas células. Diversos estudos apontam a possível exaustão de células T (linfócitos T de fenótipo exaustivo), devido à persistência da infecção viral no hospedeiro, resultando em perda da produção de citocinas, apoptose de linfócitos (pelo aumento da expressão de PD-1 e CTLA-4) e redução da função imunológica (Walter e Petersen, 2017; Fenwick *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Diao *et al.*, 2020).

Nos indivíduos que desenvolveram síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) decorrente da síndrome hiperinflamatória promovida pela COVID-19, há um dano alveolar caracterizado por lesão segmentar difusa e severa da barreira alvéolo-capilar, onde os pneumócitos do tipo 2 têm demonstrado desempenhar um papel crítico na resposta imune inata. Nessas células ocorre então a indução da superprodução de citocinas, ativação de macrófagos residentes e recrutamento de células para o local da lesão (Ackermann *et al.*, 2020; Goshua *et al.*, 2020; Gupta *et al.*, 2020).

Com a superprodução de citocinas, aumenta a permeabilidade da membrana das paredes capilares em torno dos pneumócitos tipo 2 infectados, resultando na infiltração de fluido plasmático e redução da elasticidade nos alvéolos, devido à produção reduzida de surfactante, podendo causar edema abundante observado em análises patológicas. O dano alveolar difuso promove várias lesões, como (1) a liberação de mediadores pró-inflamatórios via macrófagos alveolares e células epiteliais pulmonares; (2) o comprometimento da função do surfactante nos tecidos pulmonares, diminuindo a complacência pulmonar e a estabilidade alveolar; (3) a indução da formação de membranas hialinas; (4) a promoção de descamação focal de pneumócitos alternando com hiperplasia de pneumócitos tipo II e formação de células sinciciais gigantes; (5) um aumento na permeabilidade do endotélio pulmonar devido à superexpressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e moléculas de adesão celular (CAMs); (6) estimulação da infiltração de neutrófilos e macrófagos inflamatórios e linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), resultando em dano tecidual; (7) promoção do aumento da produção de plaquetas, fibrinogênio e outros fatores protrombóticos e (8) impactos diretos no sistema caliceína-quinina (KKS) e no sistema renina-angiotensina (RAS), resultando em coagulação e/ou trombose. Além disso, o desenvolvimento de aglomerados focais de fibrina misturados com células inflamatórias mononucleares e células gigantes multinucleadas nos espaços aéreos resulta na formação de fibrose nos pulmões (Blanco-Melo *et al.*, 2020; Chua *et al.*, 2020; Islam *et al.*, 2020; Liao *et al.*, 2020; Polidoro *et al.*, 2020; Xiong *et al.*, 2020).

3.2 PROFISSIONAIS DE SAÚDE NA LINHA DE FRENTE PARA O ENFRENTAMENTO DA COVID-19

A Pandemia da COVID-19 afetou a vida das pessoas e, em muitos casos, alterou as rotinas de vida, como a perda de empregos e seus efeitos na redução de

renda das famílias, mudanças no modo de educação presencial para o à distância e as próprias relações entre as pessoas. A vulnerabilidade de grupos menos favorecidos pela falta de higienização e acesso a emprego e educação, promoveu quadros de ansiedade, depressão e síndrome do pânico (devido às medidas de restrição), além de atingir diretamente pela perda de vidas humanas. (Laato *et al.*, 2020; Maital e Barzani, 2020; Alzueta *et al.*, 2021).

Apesar desses fatos, em muitos países, a mitigação da doença, a preparação e as respostas foram implementadas. No entanto, essas medidas para lidar com os eventos da COVID-19 foram insuficientes e, em diversos países, como o Brasil, a doença prejudicou e sobrecarregou gravemente os sistemas de saúde (Grasseli, Pesenti e Cecconi, 2020; Phua *et al.*, 2020).

Para atender a crescente demanda de atendimentos e hospitalização, para os pacientes suspeitos da COVID-19, foram implementados no Brasil novos ambulatórios e hospitais de campanha, localizados em diferentes bairros das cidades. Assim como os serviço de saúde suplementar Brasileira, para aqueles que podiam arcar com os custos, utilizando clínicas particulares, ambulatórios e hospitais privados (Kaue *et al.*, 2020; De Melo *et al.*, 2020; CRUZ *et al.*, 2021).

Os profissionais de saúde estão na linha de frente no cuidado e são responsáveis por fornecer atendimento integral a todos os tipos de pacientes, atendidos nos serviços públicos, filantrópicos ou privados, nos diversos níveis da assistência. Suas atribuições no atendimento de pacientes com COVID-19 envolvem desde o acolhimento de pacientes e a detecção de casos suspeitos de infecções, até fornecendo tratamento essencial em uma unidade de emergência ou de terapia intensiva, assim como desempenhando papéis fundamentais na expansão dos serviços de atendimento, vacinação e ainda atuando com a família e comunidade (Borasio *et al.*, 2020; Xie *et al.*, 2020).

No Brasil, a força de trabalho na saúde durante a pandemia foi na sua maioria composta por mulheres (77,6%), sendo as equipes formadas majoritariamente por enfermeiros (58,8%), seguida pelos médicos (22,6%) e fisioterapeutas (5,7%), com as demais profissões correspondendo a 12,7%, com idades até 35 anos correspondendo a 38,4% e entre 36 e 50 anos (44%), no qual cerca de 25% de todos esses profissionais foram infectados pela COVID-19 (Fiocruz, 2021). Nos Estados Unidos, assim como em outros países, entre os profissionais de saúde na linha de frente do combate a COVID-19 a maioria também foi feminina (79%) e com idade média de 41

anos, o cargo de saúde em maior número foram os profissionais da enfermagem (56,48%) (Hughes *et al.*, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que desde o início da pandemia até 24 de maio de 2021, pelo menos 180.000 profissionais de saúde morreram de COVID-19 em todo o mundo (OMS, 2021). Na Itália, de um total de 162.004 casos de COVID-19 registrados até 16 de abril de 2020, 17.306 profissionais da saúde (10,7%) foram infectados no país. Na Espanha, mais de 5.400 profissionais de saúde (14%) foram infectados até o final de março de 2020, do total da infecção em todo o país. Nos Estados Unidos de acordo com relatório dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), dos 49.370 casos (de 12 de fevereiro a 9 de abril de 2020), 9.282 eram profissionais de saúde (19%). No Brasil, não há dados concretos descrevendo o total de infecções por COVID-19 entre os profissionais de saúde, devido as subnotificações dos casos (SANT'ANA *et al.*, 2020).

Em pesquisa do Conselho Federal de Medicina – CFM (2021), com médicos do Brasil, a pandemia causou impactos na vida pessoal ou profissional de 96% dos médicos pesquisados, seja nas horas que seriam dedicadas à família, ao lazer e descanso até a mudança na rotina de trabalho. O estresse foi relatado como principal impacto da pandemia por 22,9% dos médicos e percepções que incluem sensação de medo ou pânico, conforme indicaram, 14,6% deles, impactando no bem-estar dessa população, assim como nos demais profissionais da saúde, pois podem agravar quadros de ansiedade e levar ao aparecimento da síndrome de Burnout.

Na linha de frente do cuidado ao paciente com COVID-19, o maior contingente é o de profissionais da enfermagem, pelo fato do seu trabalho envolver contato direto com os pacientes, tornando-os mais vulneráveis à doença. A depressão está relacionada à ansiedade dos enfermeiros sobre sua saúde devido à infecção e estresse relacionado à carga de trabalho associada a pacientes com COVID-19. A outra razão que pode colocar os enfermeiros na linha de frente em risco de depressão é a preocupação com suas famílias e filhos (Renast, 2020; Fiocruz, 2021).

Segundo o Conselho Federal de Enfermagem – COFEN (2021), desde fevereiro de 2020 os profissionais de saúde do Brasil estão no enfrentamento da pandemia e as condições de trabalho, atrelado ao baixo investimento em formação e remuneração, tem levado à escassez internacional de profissionais, em sua maioria os da enfermagem. O estresse e as más condições de trabalho durante a pandemia resultou em um aumento do abandono da profissão. O Comitê Internacional da Cruz

alerta para a pressão prolongada sobre os profissionais de saúde, que estão muito próximos da exaustão.

Além disso, a escassez de recursos colocou os profissionais de saúde em situação crítica, como a falta de EPIs (Equipamentos de Proteção Individual) e leitos de cuidados intensivos. No Brasil 43,2% dos profissionais de saúde afirmam não se sentir protegidos no trabalho de enfrentamento da COVID-19, e o principal motivo, para 23% deles, está relacionado à falta, à escassez e à inadequação do uso de EPIs (64% revelaram a necessidade de improvisar equipamentos), sobrecarga de atividades e a limitação espacial da infraestrutura hospitalar (Sant'Ana *et al.*, 2020; Fiocruz, 2021). Esses mesmos problemas, mas de forma menos caótica, também foram apresentados nas pandemias da gripe A (Tzeng e Yin, 2006; Martin, 2011; Suter Peter, 2020).

3.2.1 O impacto da Pandemia COVID-19 na vida dos profissionais de saúde

A pandemia pela COVID-19 causa grande preocupação para a população, especialmente aos profissionais de saúde da linha de frente, que por estarem em contato próximo com pacientes infectados, estão expostos a um alto risco de contaminação e transmissão da doença para seus familiares, colegas de trabalho e a população em geral (Iqba; Chaudhuri, 2020; Pessa *et. al.*, 2020). Um aumento na carga de trabalho dos profissionais de saúde durante a pandemia foi relatado em vários países, porém a maioria dos profissionais de saúde não recebeu treinamento para prestar assistência aos pacientes com suspeita ou infecção pelo coronavírus, o que leva a ansiedade pelo medo do desconhecido (Cotrin *et. al.*, 2020; Liu *et. al.*, 2020).

As complicações relacionadas ao COVID-19 vão além dos sintomas que se manifestam na fase aguda da doença, onde após mais de um ano de pandemia em todo o mundo, os problemas associados à doença também cresceram na forma de sequelas psicológicas, neurológicas/motoras, cardiovasculares, inflamatórias, além de disfunções de órgãos periféricos como fígado, rins e trato respiratório, cujo principal tropismo viral é o pulmão, promovendo disfunção pulmonar significativa (Guillon *et al.*, 2020; Wostyn *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

Os surtos de doenças infecciosas são conhecidos por terem impacto desastroso no psicológico da população em geral, bem como nos profissionais de saúde. Estudos sobre surtos de SARS revelaram que os profissionais de saúde experimentaram reações agudas de estresse, ansiedade e depressão (Chew *et. al.*,

2020). Profissionais de saúde afirmam ainda, estar com dificuldades para dormir e relatam se sentir mais cansados do que o normal, desde o início da pandemia. Estudos mostram que esse grupo de trabalhadores apresentou grande prevalência de ansiedade e sintomas de depressão durante o período de atuação na pandemia de COVID-19 (Cotrin et. al, 2020; Xiong; Yi; Lin,2020). Em um inquérito com 906 profissionais de saúde convidados, dos principais hospitais de Cingapura e Índia, os sintomas mais comuns relatados foram cefaleia, dor de garganta, ansiedade, letargia e insônia, onde existe uma associação significativa entre a prevalência de sintomas físicos e sofrimento psíquico, que provavelmente é bidirecional (Chew et. al., 2020).

Os profissionais de saúde do combate a COVID-19 foram os mais afetados por transtornos psiquiátricos e que a sintomatologia somática culmina na análise de viés da psiconeuroimunologia (PNI) do COVID-19 (Lai et al. 2020; Zhang et al. 2020; Dai et al. 2020, 19 Wang et al. 2020). O aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo as interleucinas (IL) -1 β e IL-6 do trato respiratório, pode ser estimulada pela SARS, tal qual foi observado na depressão e em síndromes somáticas funcionais (Conti et al. 2020; Wang et al. 2020).

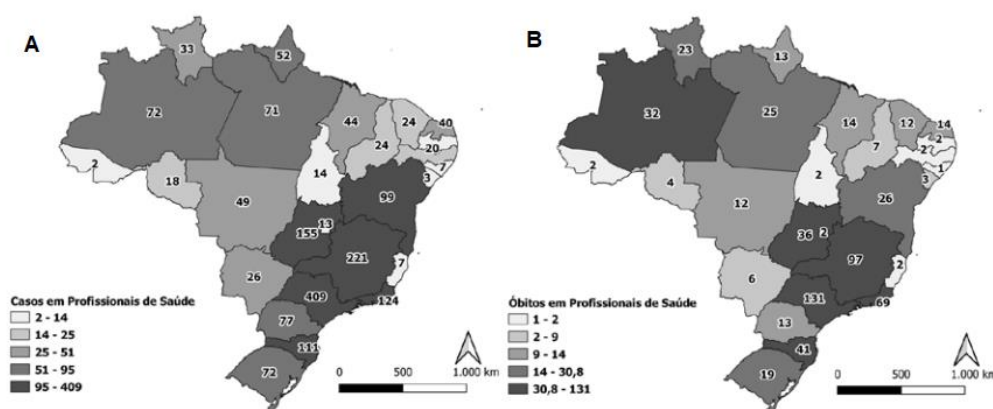
Os profissionais expostos a pacientes infectados com COVID-19 foram colocados sob enorme tensão, pressão e estresse, estando sujeitos a complicações emocionais e físicas que podem potencializar o desenvolvimento de doenças ocupacionais, levando ao afastamento, temporário ou permanente, das suas atividades profissionais. O afastamento do trabalho é uma forma de controle necessário para a mitigação da doença entre as pessoas e uma melhor recuperação do trabalhador. Assim, os trabalhadores da linha de frente apresentam maior risco de infecção e adoecimento, resultando em absenteísmo (Sim, 2020; Pereira et.al., 2021).

Por outro lado, os profissionais que não adoeceram pela COVID-19, observam o afastamento de colegas de profissão, o que leva a uma sobrecarga das atividades e exaustão, física e mental, pelos que permanecem ativos. Nesse sentido, proporcionar adequadas condições de trabalho é fundamental para a manutenção da saúde desses profissionais durante a pandemia (Theorell, 2020; Lotta, 2020; Vedovato et. al., 2021). A precarização das condições de trabalho, dimensionamento reduzido de trabalhadores e o medo iminente de morte foi relatado por diversos profissionais de saúde, em decorrência do disso, muitos estão pedindo demissão ou até mesmo, desistindo de suas carreiras profissionais (Vedovato et. al., 2021).

O Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde do Brasil, até junho de 2022

confirmou 137.546 casos de profissionais contaminados pelo vírus com maior prevalência entre os profissionais de enfermagem, somando 63.924 casos entre auxiliares, técnicos de enfermagem e enfermeiros. Em 2022, até o mês de junho, foram notificados 268 casos de SRAG hospitalizados em profissionais de saúde no SIVEP-Gripe. Entre as profissões com mais registros de casos SRAG hospitalizados pela COVID-19, 63 (35,6%) foram profissionais de enfermagem e 26 (14,7%), médicos. Os dados de casos e óbitos de em profissionais de saúde apresentados refletem um recorte dos casos graves nessas categorias e não apresentam o total dos acometidos pela doença no País (Brasil, 2022).

De acordo com pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, até fevereiro de 2021, 1292 profissionais foram mortos pela COVID-19, sendo 622 (48,1%) médicos, 200 enfermeiros (16,5%) e 470 (36,4%) de auxiliares e técnicos de enfermagem. Nos três primeiros meses de 2021, ocorreu um crescimento exponencial no número de óbitos, onde estima-se que a cada dia morreram cinco desses profissionais (Fiocruz, 2021). Entretanto, divergindo desses valores, o Governo Federal do Brasil declara que até junho de 2022, faleceram pela Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), tendo como causa a COVID-19, aproximadamente 650 profissionais de saúde em todo o país (Figura 3) (Brasil, 2022).



Fonte: SIVEP-Gripe. Dados atualizados em 16/8/2021 às 12h, sujeitos a revisões.

Figura 3- Casos (A) e óbitos (B) de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) por covid-19 em profissionais de saúde, segundo unidade federada de residência, até junho de 2022.

Fonte: Boletim Epidemiológico ESPECIAL: COVID-19 | Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde (Brasil, 2022).

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo foi desenvolvido a partir de dois desenhos. O primeiro trata-se de um estudo epidemiológico, de caráter transversal, do tipo seccional. O segundo trata-se de um estudo experimental, analítico do tipo descritivo.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS E LOCAL DE ESTUDO

O estudo é composto por 50 profissionais de saúde do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) que trabalharam durante todo o período de pandemia COVID-19 e que realizaram assistência direta a pacientes contaminados e internados para tratamento dos sintomas virais.

O local de estudo foi o Hospital das Clínicas (HC), unidade de saúde vinculada à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) que tem como objetivo oferecer atendimento médico e hospitalar à população nas mais diversas áreas. Reúne profissionais renomados e serve de campo de atuação para centenas de estudantes de nível técnico, graduação, residência profissional, mestrado e doutorado (Brasil, 2021). O hospital é ligado diretamente a Reitoria da UFPE, para efeito de supervisão e controle administrativo, e tem como função básica apoiar o ensino de graduação e pós-graduação, estando atualmente administrado pela Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH) (Brasil, 2021).

4.3 COLETA DE DADOS E AMOSTRA DE SANGUE

Para a caracterização da amostra, os dados sociodemográficos, clínicos e epidemiológicos dos profissionais de saúde foram coletados por meio de questionário (APÊNDICE A), que foram consolidados de forma agregada para controlar as flutuações aleatórias.

Da mesma forma, amostras de sangue para realização de análises laboratoriais e imunológicas foram coletadas em diferentes tubos (BD Vacutainer®) para testes hematológicos, coagulogramas, sorológicos, bioquímicos e imunológicos.

4.4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para obtenção das informações epidemiológicas, todos os profissionais voluntários de saúde que participaram deste estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (APÊNDICE B). Além disso, todos os

protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco (nº 4.206.047/2020; CAAE 30332120.8.3001.5191) (ANEXO A).

4.5 ANÁLISE DOS DADOS

4.5.1 Análise dos dados epidemiológicos

Os dados coletados através dos questionários foram categorizados em planilha do *software Excel* do pacote *Microsoft Office 2016*[®], as variáveis foram descritas por meio de razões e proporções e descritos em tabelas.

4.5.2 Análise laboratorial de amostras de sangue

Após a coleta do sangue dos profissionais de saúde, as amostras de sangue e soro foram encaminhadas ao Laboratório de Análises do HC-UFPE para realização das análises laboratoriais. O hemograma foi realizado em analisador hematológico Yumizen H2500[®], seguido da revisão das lâminas do esfregaço de sangue em microscópio óptico. O coagulograma foi analisado em analisador automático STA Compact Max[®]. O soro da amostra foi utilizado para avaliar os parâmetros sorológicos e bioquímicos por meio dos imunopainéis totalmente automatizados Architect i2000SR[®] e do analisador bioquímico automático CMD 800i (Wiener Lab[®]), respectivamente.

4.6 TESTES IMUNOLÓGICOS

4.6.1 Análise imunológica com amostras de soro

Os soros coletados foram utilizados para dosagens de citocinas e para detecção quantitativas de imunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 produzidas pela vacina. As citocinas humanas Th1/Th2/Th17 foram medidas com um kit Cytometric Bead Array (CBA) (BD Bioscience[®]) com todos os dados adquiridos pela plataforma de citometria Accuri e processados com o software BD Accuri[®].

A detecção quantitativa de IgG e IgM foi realizada por meio do kit Ichroma[™] COVID-19 Ab (Boditech Med Incorporated[®]) pela técnica de imunoensaio fluorescente. A detecção qualitativa de IgG e IgM foi realizada usando o kit de teste de anticorpos SARS-CoV-2 pelo ouro coloidal técnica de imunocromatografia (Lepu Technology[®]).

4.6.2 Análise imunológica com amostras de células – Ensaio de Imunofonotipagem

O isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), previamente coletado, foi realizado por centrifugação de PBMC (2,000 RPM, 30 min) sob gradiente de separação Ficoll (1,077 g/mL; GE Healthcare Life Sciences®), as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X (1.600 RPM, 10 min) e coradas com os anticorpos específicos. A marcação foi feita usando anti-CD3-FITC, anti-CD4-PercPCy5, anti-CD8-PE, anti-CD14-FITC, anti-CD19-FITC, anti-CD27-PECY7, anti-CD80-PE e HLA-DR-PercPCy5 (todos da BD Biosciences®). A aquisição das células foi realizada em 10.000 eventos em citômetro de fluxo FACSVerse (BD Biosciences®) e a análise dos dados de fluorescência foi realizada no software BD FACSuite®.

4.7 ENSAIO DE EXPRESSÃO GENÉTICA

4.7.1 Extração de RNA e síntese de CDNA

Extração de RNA total foi realizada, usando-se o PBMC isolado segundo o item 3.3.1, em uma concentração de células de 5×10^6 e homogeneizado usando-se 1 mL de Trizol líquido (Invitrogen®). A purificação do RNA total isolado foi realizada por meio do RNeasy® Mini Kit (QIAGEN®) seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do RNA foi assegurada por um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific® Wilmington, EUA) e eletroforese em gel de agarose a 1%. Em seguida, 1 µg de RNA purificado de qualidade adequada (um DO260/280 de 1,8 a 2,1 e subunidades de rRNA intactas - 28S e 18S) foi usado para sintetizar cDNA por meio do Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit para RT-qPCR com dsDNase (Thermo Scientific® Wilmington, EUA). Para cada amostra, foi preparada uma reação RT de controle negativo (sem enzima Transcriptase Reversa).

4.7.2 Desing dos primers e estimativa de eficiência para qPCR

Os *primers* usados para detectar os genes STAT4, JAK2, STAT6, STAT3 e FOXO4 foram projetados com base em estudos anteriores (Park *et al.*, 2019a; Park *et al.*, 2019b; Su *et al.*, 2014; Usui *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2018). Os genes de referência, ACTB e GAPDH, foram usados para a quantificação relativa. Esses genes foram previamente validados em amostras de PBMC (Eyerich *et al.*, 2009; Lewkowicz *et al.*, 2011; Mousset *et al.*, 2019). Mais detalhes dos *primers* podem ser vistos na Tabela 1. Foram usadas amostras de PBMC de pacientes SARS-CoV-2 positivos em estado de

UTI e células THP-1 para exemplificar uma condição de teste real.

Tabela 1 – Sequências de *primers* usados para avaliar as vias Th1, Th2, Th17 e Th22.

Primers	Sequência Nucleotídica	Tamanho	ID GenBank
STAT4		102pb	
Forward	5'-CCTGGGTGGACCAATCTGAA-3'		NM_001243835.2
Reverse	5'-CTCGCAGGATGTCAGCGAA-3'		
JAK 2		130pb	
Forward	5'-TCTGGGGAGTATGTTGCAGAA-3'		NM_001322195.2
Reverse	5'-AGACATGGTTGGGTGGATACC-3'		
STAT6		145pb	
Forward	5'-CAAAGCCCTAGTGCTGAAGAG-3'		NM_001178081.2
Reverse	5'-CTCCTGCTGTAGCTGGGAATA-3'		
STAT3		113pb	
Forward	5'-GGAGGAGGCATTCGGAAG-3'		NM_001384992.1
Reverse	5'-TCGTTGGTGTACACAGAT-3'		
FOXO4		180pb	
Forward	5'-CTTTCTGAAGACTGGCAGGAATGTG-3'		NM_001170931.2
Reverse	5'-GATCTAGGTCTATGATCGCGGCAG-3'		
ACTB		218pb	
Forward	5'-AAGAGAGGCATCCTCACCT-3'		NM_001101.5
Reverse	5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3'		
GAPDH		473pb	
Forward	5'-GAAGGCTGGGGCTCATTTG-3'		NM_001357943.2
Reverse	5'-TTAAAAGCAGCCCTGGTG-3'		

4.7.3 Avaliação da expressão por qPCR

A reação RT-qPCR foi realizada em um volume final de 10 µL utilizando o kit Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems®). Para a leitura, foi utilizado o equipamento AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies®) de acordo com os seguintes parâmetros: 95 °C por 20s para ativação da polimerase, 40 ciclos de 95 °C por 3s para desnaturação e 60 °C por 30s para anelamento e extensão. Em seguida, a média geométrica dos genes de referência (ACTB e GAPDH) foi usada para calcular a expressão relativa de todos os alvos (Livak e Schmittgen, 2001).

4.8 ENSAIO DE POLIMORFISMO

4.8.1 Extração de DNA genômico

As amostras biológicas consistiam de sangue periférico com anticoagulante EDTA. O DNA genômico foi extraído de leucócitos sanguíneos periféricos pelo método fenol-clorofórmio para análise molecular, adaptado de Sambrook e Russel (2001).

4.8.2 Determinação de polimorfismos -174 G/C IL-6 (rs 1800795), -197 G/A IL-17A (rs1974226), -511 C/T IL-1β (rs 16944), -308 G/A TNF-α (rs1800629)

O genotipagem foi realizado por PCR-RFLP. Os pares de sequência de primer usados para as amplificações e as respectivas referências são descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Sequência de oligonucleotídeos usada para detectar polimorfismos-174 G/C IL-6, -197 G/A IL-17A, -511 C/T IL-1 β , -308 G/A TNF- α por análise de PCR-RFLP.

Gene	Primers	Ciclo PCR	Enzima de Restrição	Ref.
IL-6	Alelo G Forward 5'- AGGCAATAGGTTTTGAGGGC -3'	94 °C – 2' 94 °C – 20" 58°C – 30"	35X Nla III	(Unfried, 2001)
	Alelo C Reverse 5'- TCCTCCCTGCTCCGATTCCG -3'	72 °C – 30" 72 °C – 2'		
IL-1 β	Alelo C Forward 5'- GTTTAGGAATCTTCCCACTT -3'	95°C – 5' 95°C – 1' 56°C – 1'	35X AvaI (Eco88I)	(Arman et al., 2006)
	Alelo T Reverse 5'- TGGCATTGATCTGGTTCATC -3'	72°C – 1' 72°C – 7'		
IL-17A	Alelo G Forward 5'- AACAGTAAGAATGAAAAGAGGACATGGT -3'	94 °C – 2' 94 °C – 20" 58 °C – 30"	30X EcoNI	(Wu et al., 2010a)
	Alelo A Reverse 5'- CCCCCAATGAGGTCATAGAAGAATC -3'	72 °C – 30" 72 °C – 2'		
TNF- α	Alelo G Forward 5'- AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT -3'	94°C – 3' 93°C – 1' 55°C – 1'	30X NcoI	(Cabrera et al., 1995)
	Alelo A Reverse 5'- TCCTCCCTGCTCCGATTCCG -3'	72°C – 1' 72°C – 5'		

4.8.3 Determinação do polimorfismo -1082 A/G do gene IL-10 (rs1800896)

A genotipagem foi realizada utilizando-se o método PCR-ASA - Alelo Específico. Os pares de sequência de primer usados para as amplificações e as respectivas referências são descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Sequência de Primer utilizada para análise do polimorfismo -1082 A/G IL-10 (rs1800896) por análise de PCR-ASA.

Gene	Primers	Ciclo PCR	Ref.
IL-10	Alelo A Forward 5'- CCTATCCCTACTTCCCCT -3'	94°C - 5 min 93°C - 1 min 60°C - 1 min	30X (Cavet et al., 1999)
	Alelo G Forward 5'- CCTATCCCTACTTCCCCC -3'		
CYP46	Generic 5'- CTTCTTCCACCCCATCT -3'	72°C - 1 min 72°C - 5 min	(Borroni et al., 2004)
	Reverse 5'- TAGAAACGAGTTTCCTGCC -3'		
	Forward 5'- GTGTGACCAGGTAACAGTCA -3'		

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste D'Agostino foi aplicado para testar a normalidade das hipóteses e as diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA) one-way com a confirmação do teste *t* de student. Para os resultados sobre a expressão dos genes foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Todos os resultados são expressos como a média dos valores dos grupos $\pm$ desvio padrão e analisados considerando o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Os gráficos foram processados pelo GraphPad Prism 9 Software®.

5 RESULTADOS

Os resultados sobre o perfil dos trabalhadores de saúde investigados mostraram que 80% são mulheres, 40% têm mais de 51 anos, 56% têm nível técnico e 46% são técnicos de enfermagem (ver Tabela 4). Além disso, 64% trabalham durante o dia, 86% com turno de 12 horas e 62% possuem dois ou mais empregos em outros serviços de saúde. Felizmente, 80% dos trabalhadores relataram que não possuem comorbidades relevantes (que são fatores de risco para o agravamento da COVID-19).

Tabela 4 - Perfil sociodemográfico, clínico e epidemiológico dos profissionais de saúde investigados expostos a pacientes infectados por SARS-CoV-2 no Hospital das Clínicas.

		N	%
Gênero	Mulheres	40	80
	Homens	10	20
Faixa etária (anos)	20-30 anos	2	4
	31-40 anos	15	30
	41-50 anos	13	26
	Acima de 51 anos	20	40
Escolaridade	Nível Técnico	28	56
	Nível Universitário	22	44
Ocupação	Técnico de Enfermagem	23	46
	Enfermeiro	12	24
	Técnico em Laboratório	5	10
	Farmacêutico	3	6
	Médico, incluindo residentes	3	6
	Fisioterapeuta	2	4
	Fonoaudiólogo	1	2
	Nutricionista	1	2
Turno de Trabalho	Dia	32	64
	Noite	18	36
Horas de Trabalho	6h/dia	5	10
	8h/dia	2	4
	12h/dia	43	86
Locais de Trabalho	Apenas 1	19	38
	2 ou mais	31	62
Fatores de Risco	Sem co-morbidades	40	80
	Doença cardiovascular / hipertensão	6	12
	Asma / Pneumopatia	2	4
	Diabetes Mellitus	1	2
	Obesidade	1	2

Os profissionais de saúde deste estudo foram divididos em dois grupos, o primeiro grupo (28/56%) foi composto por trabalhadores que testaram positivo para infecção por SARS-CoV-2 (com base em qualquer teste positivo, rt-PCR e/ou imunoglobulina teste). O segundo grupo (22/44%) foi composto por trabalhadores que apresentaram resultado negativo em todos os exames. Além disso, no grupo de

profissionais de saúde positivos, algumas pessoas (53,6%) apresentaram sintomas como diarreia (24%), dor de garganta (22%), tosse (18%), febre (14%), dispneia e outros (12%). Poucos sintomas, semelhantes aos da gripe, também foram observados em 23% dos profissionais de saúde negativos. Com o objetivo de avaliar a resposta sorológica contra o vírus SARS-CoV-2, realizamos dois testes rápidos (para detecção de imunoglobulinas anti-SARS-CoV-2). O intervalo de tempo entre dois testes foi de dois meses. Os resultados mostraram o aumento de IgG anti-SARS-CoV-2 nas amostras de sangue e podem ser vistos na Tabela 5.

Tabela 5: Imunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 presentes na sorologia dos profissionais de saúde positivos.

Imunoglobulina	1ª análise			2ª análise		
	IgM	IgG	IgM + IgG	IgM	IgG	IgM + IgG
Profissionais de saúde	28.6%	50%	21.4%	7.2%	71.4%	21.4%

O intervalo entre as análises foi de dois meses.

Os parâmetros sanguíneos dos profissionais de saúde foram avaliados comparando os resultados de indivíduos positivos e negativos. Embora os resultados tenham se mantido entre os valores de referência, um aumento discreto foi observado em parâmetros do grupo positivo. Dessa forma, observou-se que os profissionais de saúde positivos tiveram aumento estatístico nos parâmetros de hematócrito, leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos (Tabela 6). Os resultados bioquímicos mostraram que alguns parâmetros inflamatórios dos profissionais de saúde positivos também foram maiores em relação ao grupo negativo (Tabela 6).

Tabela 6: Análise dos parâmetros sanguíneos e bioquímicos dos profissionais de saúde.

	Valores de Referência	Profissionais de saúde		p-valor
Parâmetros Hematológicos		(+)	(-)	
Hematócrito (%)	36 – 54	41.5 ± 3.4	39.3 ± 1.5	0.03
Leucócitos Totais (números)	4,000 – 11,000	8,402 ± 1,494	7,379 ± 1,013	0.03
Neutrófilos (%)	50 – 70	55.58 ± 4.6	51.26 ± 5.7	0.03
Linfócitos (%)	25 – 45	38.3 ± 7.5	31.87 ± 7.6	0.002
Parâmetros Bioquímicos				
Proteína C-reativa (mg/dL)	0 – 0.5	4.7 ± 2.6	2.4 ± 1.4	0.01
Fibrinogênio (mg/dL)	200 – 400	366 ± 77	303 ± 57	0.007

(+) Profissionais de saúde positivos; (-) Profissionais de saúde negativos.

Semelhante à maioria dos parâmetros bioquímicos, a pesquisa de íons não mostrou diferenças significativas entre os grupos, sendo sódio ($140 \pm 2,7$ e $140 \pm 2,3$); potássio ($4,14 \pm 0,4$ e $4,2 \pm 0,4$) e cloreto ($102 \pm 3,0$ e $101 \pm 2,3$) para trabalhadores de saúde positivos e negativos, respectivamente. Em relação aos resultados de produção de citocinas, observamos aumento dos valores de IL-17 no grupo positivo ($p = 0,03$). Apesar de IL-2 e IL-6 estarem aumentadas em relação às demais (IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ) não foram observadas diferenças estatísticas entre elas (Figura 4).

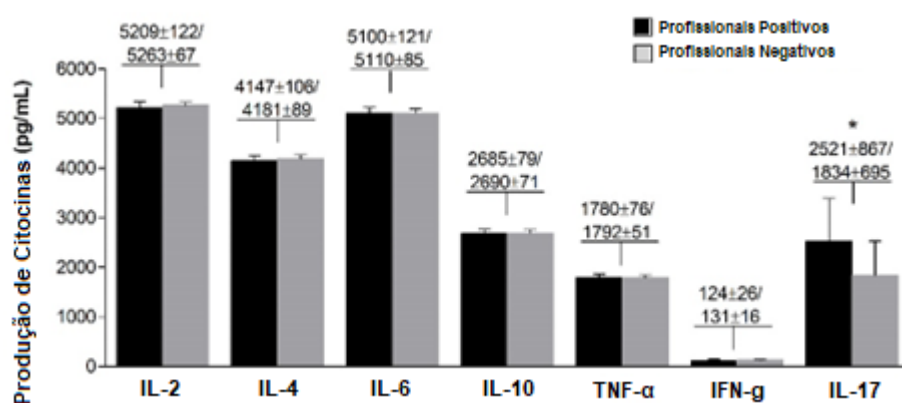


Figura 4- Os níveis de citocinas Th1, Th2 e Th17 medidos no soro do profissional de saúde. As barras verticais representam a média dos 50 voluntários. Valores significativos foram encontrados na citocina IL-17 para profissionais positivos. Os valores são representados como média ± desvio padrão.

Os resultados da imunofenotipagem mostraram que os linfócitos CD56+ estavam elevados no grupo positivo, reforçando as contagens observadas nos parâmetros hematológicos (valores elevados de linfócitos). No entanto, os subconjuntos de linfócitos T CD19+, CD4+ e CD8+ não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 5).

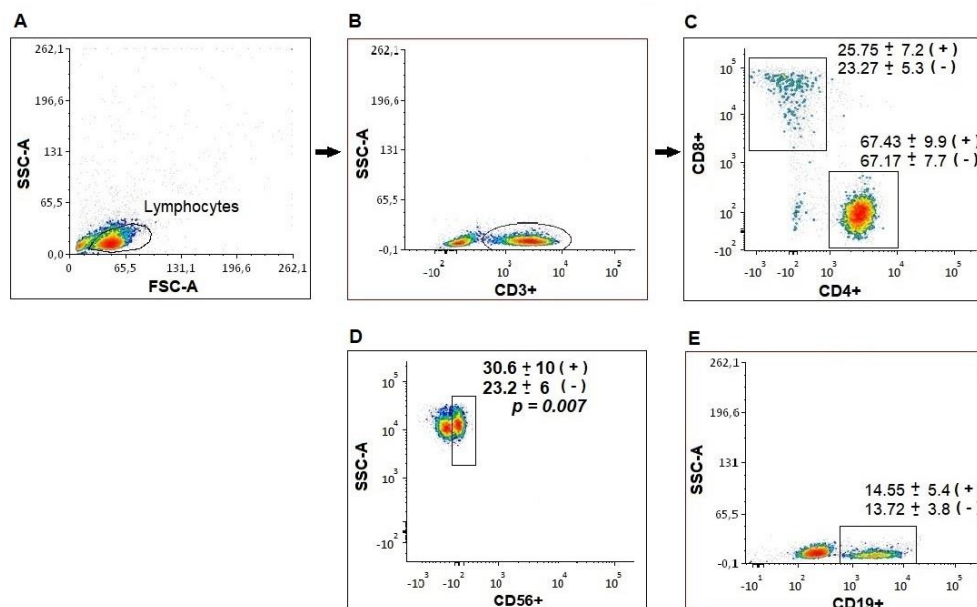


Figura 5- Imunofenotipagem de linfócitos de profissionais de saúde. A média de cada gráfico de pontos foi representada em valores percentuais. A – Dot plot com definição de portão de linfócitos. B – Isolamento da população de linfócitos T CD3+. C – Isolamento da população de linfócitos T CD3+CD4+ e T CD3+CD8+. D e E – Isolamento de Natural killers e população de linfócitos B, respectivamente. Os números representam uma média de 50 voluntários. Os símbolos nos gráficos (+) e (-) estão relacionados aos profissionais de saúde positivos e negativos, respectivamente.

Os resultados das citocinas intracelulares mostraram que os linfócitos T CD56+ produziram IL-10 ($0,4 \pm 0,3$ / $0,03 \pm 0,02$; $p = 0,001$) e IL-17 ($0,1 \pm 0,04$ / $0,03 \pm 0,02$; $p = 0,02$) em valores estatísticos para profissionais de saúde positivos e negativos, respectivamente. Não foram encontradas diferenças nas citocinas liberadas pelos linfócitos T CD4+. O Th2/Th17/Th22 foi a resposta imune observada predominante nos profissionais de saúde positivos (Figura 6). Através do STAT6, STAT3 e FOXO4 pôde-se observar que este perfil de resposta imune é alto em relação ao STAT4 (resposta Th1) e JAK2 (um gene pleiotrópico para as respostas Th1 e Th17).

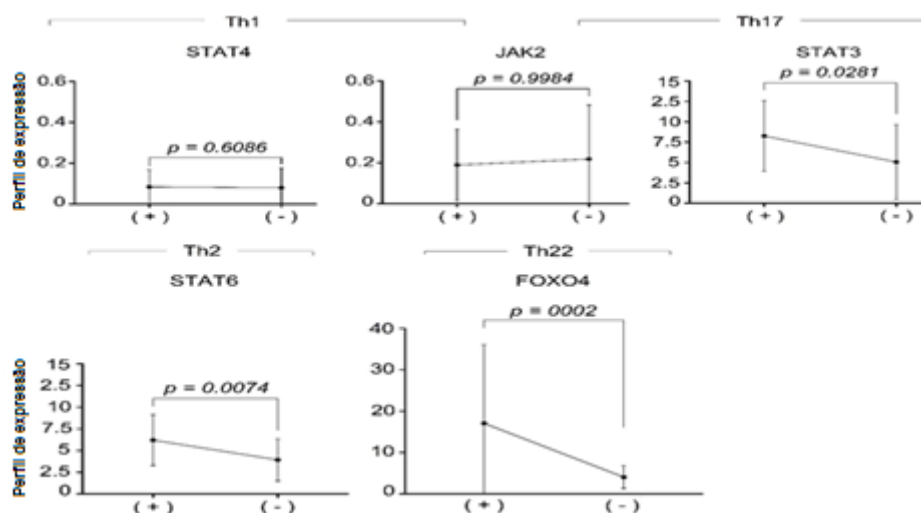


Figura 6- Resultados sobre vias de resposta imune em profissionais de saúde. Os genes associados à resposta Th2/Th17/Th22 (STAT3, STAT6 e FOXO4) foram observados em valores elevados para os profissionais de saúde positivos. Os valores de p estão nos gráficos. Os símbolos nos gráficos (+) e (-) estão relacionados aos profissionais de saúde positivos e negativos, respectivamente.

Os possíveis polimorfismos imunológicos em trabalhadores da saúde foram avaliados para verificar a possibilidade de alterações genéticas na população estudada. As frequências alélicas para cada polimorfismo foram feitas de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg e são mostradas na Tabela 7.

Tabela 7 - Balanço de Hardy-Weinberg para os polimorfismos de IL-6, IL-10, IL-1 β , IL-17 e TNF- α entre profissionais de saúde.

Interleucinas	Profissionais de Saúde (negativos)		Profissionais de Saúde (positivos)	
	X ²	p-valor	X ²	p-valor
IL-6	0.3835	0.5357	0.6625	0.4157
IL-10	0.1592	0.6899	2.7778	0.0956
IL-1β	1.5774	0.2091	0.2681	0.6046
IL-17	0.8400	0.3594	2.4931	0.1143
TNF-α	0.0021	0.9631	0.2870	0.5922

Os genótipos mais comuns encontrados entre os polimorfismos de interleucinas foram GG de IL-6 (64,2%), AA de IL-10 (75%), TC de IL-1 β (57,1%), AA de IL-17 (46,4%), GG de TNF- α (64,2%) em profissionais de saúde positivos. Já os Profissionais de saúde negativos apresentaram **alto polimorfismo** (Ver se houve realmente ou se substitui por alta frequência) em GG IL-6 (72,7%), GA de IL-10 (81,8%), TT de IL-1 β (50%), AA de IL-17 (63,6%) e GG de TNF - α (59%). No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas (Tabela 8).

Tabela 8- Análise das associações entre os polimorfismos de IL-6, IL-10, IL-1 β , IL-17 e TNF- α em profissionais de saúde.

Polimorfismo	PS Positivos	PS Negativos	X²	OR	IC	P
Genotipo IL-6						
GG	18	16		1	ND	ND
GC	7	5	1.0000	0.8036	0.2124-3.0403	0.9883
CC	0	0		-	-	-
GC/CC	-	-		-	-	-
Teste de Tendência Alelo						
G	43	37		1	ND	ND
C	0	0		-	-	-
Genotipo IL-10						
GG	4	3		1	ND	ND
GA	7	11	0.2339	20.952	0.3563-12.3219	0.7063
AA	14	7		0.6667	0.1158-3.8382	10.000
GA/AA	21	18		11.429	0.2253-5.7980	0.8020
Teste de Tendência						

Alelo						
G	15	17		1	ND	ND
A	35	25		0.6303	0.2658-1.4945	0.4059
Genotipo IL-1β						
TT	9	10		1	ND	ND
TC	13	7	0.4525	0.4038	0.0697-2.3391	0.5624
CC	3	4		0.8333	0.1452-4.7810	0.8113
TC/CC	16	11		0.5156	0.0959-2.7731	0.7250
Teste de Tendência						
Alelo						
T	31	27		1	ND	ND
C	19	15		0.9064	0.3870-2.1232	0.9925
Genotipo IL-17						
AA	13	14		1	ND	ND
AG	12	7	1.0000	0.5417	0.1632-1.7975	0.4804
GG	0	0		-	-	-
AG/GG	-	-		-	-	-
Teste de Tendência						
Alelo						
A	38	35		1	ND	ND
G	0	0		-	-	-
Genotipo TNF-α						
GG	18	13		1	ND	ND
GA	6	7	0.7909	16.154	0.4389-5.9456	0.6950
AA	1	1		13.846	-	0.6070
GA/AA	7	8		15.824	0.4579-5.4690	0.6805
Teste de Tendência						
Alelo						
G	42	33		1	ND	ND
A	8	9		14.318	0.4981-4.1150	0.6902

Teste P, G (Williams); OR - Odds Ratio; IC - Intervalo de confiança; ND – Não Determinado, PS – Profissionais da saúde.

6 DISCUSSÃO

Trata-se de um estudo com profissionais de saúde, exposto à pandemia pela COVID-19, realizado no Brasil. Durante 2020, esses trabalhadores com diferentes competências e habilidades ajudaram as unidades públicas e privadas de saúde a tratar e controlar a doença, salvando muitas vidas.

Aqui mostramos que os profissionais de saúde brasileiros são compostos, em sua maioria, por mulheres, com idade acima de 50 anos e com nível de formação técnica, sendo esse perfil também identificado em diferentes países. Tais achados são reforçados pela grande prevalência de profissionais da enfermagem, devido ao grau de dependência de cuidados demandados pelo paciente, quando comparados a outras categorias (Baumann et al., 2018; Lombardi et al., 2020; Pasila et al., 2017; Teixeira et al., 2020).

Estudos relatam que uma longa jornada de trabalho pode comprometer a vigilância dos pacientes, refletindo negativamente sobre a assistência oferecida, aumentando o risco de eventos adversos e contaminação dos trabalhadores (Magno et al., 2020; Pasila et al., 2017). Aqui, pudemos observar que a maioria dos profissionais de saúde trabalha em turnos de 12 horas durante o período diurno. Além disso, uma parcela considerável desses trabalhadores possui duas ou mais vínculos de trabalho, fator associado ao baixo salário em muitas categorias profissionais no Brasil (Andrade et al., 2017; Dall'Ora et al., 2015).

Pesquisas recentes descrevem que as manifestações clínicas do COVID-19 podem variar desde condições assintomáticas, apresentando até sintomas como febre, tosse seca, fadiga, dispneia grave, perda ou comprometimento do olfato e/ou paladar e, em casos atípicos, reações dermatológicas (Niquini et al., 2020; OMS, 2020). Além dessas manifestações, foram relatados distúrbios digestivos em casos menos graves, com diarreia presente na fase inicial da doença, que pode durar de 1 a 14 dias (Guan et al., 2020). Aproximadamente metade dos profissionais de saúde investigados aqui não relataram sintomas semelhantes à gripe como um possível sinal de contaminação. Suárez-García et al., (2020) também mostraram a prevalência de pacientes assintomáticos entre os profissionais de saúde em um hospital de Madri. No entanto, dos que relataram ter sintomas, a diarreia não foi relatada (Huan et al., 2020).

Dois terços dos profissionais de saúde sintomáticos relataram não ter tomado nenhum medicamento para prevenir ou controlar o COVID-19, enquanto outros

trabalhadores utilizaram algumas medidas terapêuticas antimicrobianas e antiparasitárias. Achados científicos demonstraram que não há evidência de benefício no uso de medicamentos para a prevenção ou tratamento específico do COVID-19 e essas drogas podem promover efeitos colaterais. Alguns estudos também mostram que o uso de antimicrobianos e corticosteroides (como terapia, não prevenção) pode ajudar a prevenir pneumonia oportunista e melhorar função pulmonar, evitando o agravamento da condição patológica (Huan et al., 2020; Mao et al., 2020).

A presença tanto do IgM quanto do IgG em trabalhadores positivos expostos ao vírus no hospital é corroborada pelos achados de Ko et al. (2020), onde mostraram que a maioria dos casos leves de COVID-19 produziu anticorpos detectáveis como o IgG⁺ após o período sintomático. No entanto, outros estudos indicaram que a presença de sintomas é necessária para induzir uma resposta humoral imune detectável (tanto para citocinas e imunoglobulinas) quanto sua prevalência sorológica (Lan et al., 2020; Long et al., 2020; Mardano et al., 2020; Wu et al., 2020b). Estudos mundiais com profissionais de saúde têm mostrado alta prevalência de indivíduos assintomáticos, com diminuição dos títulos de IgG (Korth et al., 2020; Zhao et al., 2020b). Os resultados encontrados na pesquisa para profissionais de saúde positivos e negativos foram semelhantes aos estudos. No entanto, os achados encontrados apoiam uma preocupação relacionada a trabalhadores negativos que são expostos diariamente, mas não mostram sinais de infecção. Al-Zoubi et al. (2020) também apresentou resultado semelhante ao investigar 370 profissionais de saúde, a maioria enfermeiros seguidos por médicos e outros funcionários e não encontrou contaminação entre eles.

Os resultados laboratoriais mostraram um importante estado inflamatório para o grupo positivo. O aumento de fibrinogênio, hematócrito, neutrófilos e linfócitos (especialmente células assassinas naturais) mostrou uma possível persistência inflamatória associada à imunossupressão devido à exposição diária ao vírus. Como indicado anteriormente, a maioria dos trabalhadores positivos não apresentava nenhum ou sintomas leves, corroborando com alguns estudos que mostraram que indivíduos assintomáticos apresentam alterações nos exames laboratoriais e de imagem (Lu et al., 2020b). Provavelmente, o aumento de fibrinogênio e neutrófilos em nossos achados está associado a danos nos tecidos pulmonares dos trabalhadores investigados. O aumento dos níveis de fibrinogênio pode ser um fator predisponente para o aumento da hipercoagulação sanguínea e da formação de fibrinas, funcionando como um marcador inflamatório para risco de trombose e como

indicador de inflamação tecidual (Connors e Jerrold, 2020; Iba et al., 2020). Além disso, a presença de neutrófilos em altos valores no sangue e tecido pulmonar devido ao COVID-19 é promovida por sinais inflamatórios reconhecidos da doença (Tay et al., 2020; Wang et al., 2020b).

A genética hospedeira, bem como mudanças no estado imunológico ou ambiente podem promover diferentes doenças. As análises de polimorfismo dos indivíduos deste estudo visavam entender, se condições genéticas, como a regulação ou a desregulamentação das citocinas, poderiam promover uma resposta imune específica (McAleer e Kolls, 2014). Os resultados mostraram que não ocorreu alteração genética nos genes analisados (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17A e TNF- α), e, possivelmente, os achados inflamatórios dos profissionais de saúde estiveram associados à exposição ao vírus.

Quando associados os achados laboratoriais à resposta imunológica (por imunofenotipagem e vias de resposta imune), além de um estado inflamatório (descrito anteriormente), a resposta th2/th17/th22 foi predominante em profissionais de saúde positivos, destacando a produção de citocinas IL-17. Juntos, esses achados revelam o primeiro conjunto de evidências de danos pulmonares em profissionais de saúde devido à sua exposição diária ao vírus. Além disso, a resposta Th2/Th17/Th22 está associada a indivíduos que apresentam asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) levando a um aumento da produção de fibrinogênio e mucinas em tecido pulmonar (Alcorns, Crowe e Kolls, 2010; Jeremy e Jay; Zenewicz, 2018). A citocina IL-17, encontrada em altos valores em profissionais positivos de saúde, deve ser destacada devido aos seus mecanismos imunológicos em doenças respiratórias. Na asma, o IL-17 media o recrutamento de neutrófilos para os pulmões, no COVID-19 promove a persistência viral protegendo células infectadas por vírus da apoptose e pode induzir hiperinflamação (Megna, Napolitano e Fabbrocini, 2020; Paiser, 2013; Sadeghi et al., 2021) .

Assim, nossos achados mostraram predisposição dos profissionais de saúde, expostos ao vírus, para desenvolver reação inflamatória pulmonar devido ao aumento dos nêutrofilos, linfócitos NK, citocinas intracelulares e plasmáticas IL-17, hematócrito e fibrinogênio. Esses marcadores estão associados à defesa imunológica de doenças pulmonares devido à indução da via Th2/Th17/Th22, resposta imune mencionada anteriormente, que está associada à asma, fibrose cística e doenças como a DPOC.

7 CONCLUSÕES

Embora este estudo tenha sido realizado antes do período vacinal, até os dias atuais, a realidade brasileira ainda mostra baixa dosagem de antígenos e anticorpos na população. Além disso, diariamente, muitos trabalhadores usam transportes públicos lotados para se deslocar para seus empregos e estão expostos à infecção por SARS-CoV-2. Da mesma forma, devido à evolução assintomática da doença, a maioria dessas pessoas não suspeita que possa estar infectada pelo vírus e, consequentemente, transmitir para outras pessoas.

Atualmente, apesar da real possibilidade de reinfeção na doença, possuímos alternativas para minimizar a propagação do vírus por meio das vacinas COVID-19. No entanto, a resposta imune Th2/Th17/Th22 apresentada por esses profissionais, dados inéditos, pode levar a uma nova percepção sobre a terapia de prevenção de danos pulmonares nesses indivíduos e alguns estudos devem ser realizados para investigar se a elevada exposição ao antígeno resulta em ativação crônica do sistema imunológico neste grupo-alvo.

Assim, nossos achados destacam a propensão dos profissionais de saúde, expostos ao vírus, para desenvolver reação inflamatória pulmonar devido ao aumento dos nêutrofilos, linfócitos NK, citocinas intracelulares e plasmáticas IL-17, hematócrito e fibrinogênio. Esses marcadores estão associados à defesa imunológica de doenças pulmonares devido à indução da via Th2/Th17/Th22, resposta imune mencionada anteriormente, que está associada à asma, fibrose cística e doenças como a DPOC. Desta forma, se faz necessário a realização de mais estudos com essa temática, para que se possa vislumbrar os perfis imunológicos das populações estudadas, além de poder compreender o estado imunológico após a vacinação, a médio e longo prazo.

REFERÊNCIAS

- Ackermann, M.S.E; Verleden, M; Kuehnel, A; Haverich, T. et al., (2020). **Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19**. *N Engl J Med* 383(2): 120-128.
- Adams, M.J; Carstens, E.B. **Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2012)**. *Archives of virology*, 2012, 157.7: 1411-1422.
- Agca, H; Saglik, I; Ener, B. **Alpha and Beta Coronavirus Infections in a University Hospital**. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 2021, 10-16.
- Alcorn JF, Crowe CR, Kolls JK (2010) TH17 cells in asthma and COPD. **Annu Rev Physiol** 72: 495–516. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135926>
- Al-Zoubi NA, et al (2020) Prevalence of positive COVID-19 among asymptomatic health care workers who care patients infected with the novel coronavirus: A retrospective study. **Annals of Medicine and Surgery**, 57, 14-16. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2020.06.038>
- Alzueta, E; Perrin, P; Baker, F.C; Caffarra, S; Ramos-Usuga, D; Yuksel, D; Arango-Lasprilla, J. C. How the COVID-19 pandemic has changed our lives: A study of psychological correlates across 59 countries. **Journal of clinical psychology**, 2021; 77(3), 556-570.
- Andrade JM, et al (2017) Long working hours in the healthcare system of the Belo Horizonte municipality, Brazil: a population-based cross-sectional survey. **Human resources for health**, 15:1-30. <https://doi.org/10.1186/s12960-017-0203-6>
- Arman A, Yilmaz B, Coker A, Inanc N, Direskeneli H (2006) Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RN) and interleukin-1B gene polymorphisms in Turkish patients with rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology** 24: 643-648.
- Arons MM, et al (2020) Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility. **The New England journal of medicine**, 2020; 382,22: 2081. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2008457>
- Bampoe S, et al (2020) A cross-sectional study of immune seroconversion to SARS-CoV-2 in frontline maternity health professionals. **Anaesthesia**, 75(12), 1614-1619. <https://doi.org/10.1111/anae.15229>
- Baumann A, et al (2018) Policy to practice: Investment in transitioning new graduate nurses to the workplace. **Journal of nursing management**, 26(4), 373-381. <https://doi.org/10.1111/jonm.12540>
- Behrens GM, et al (2020) Strategic anti-SARS-CoV-2 serology testing in a low prevalence setting: the COVID-19 Contact (CoCo) study in healthcare professionals. **Infectious diseases and therapy**, 9(4), 837-849. <https://doi.org/10.1007/s40121-020-00334-1>
- Bermingham, A. et al. **Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012**. *Eurosurveillance*, 2012, 17.40: 20290.
- Blanco-Melo D, et al. **Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19**. *Cell*. 181(5) (2020) 1036-1045.e9. Doi: 10.1016/j.cell.2020.04.026.

Bloomberg. Mapping the Coronavirus Outbreak Across the World. [citado em 26 abri 2022]. Available: <https://www.bloomberg.com/graphics/2022-coronavirus-cases-world-map/>

Borasio, G. D; Gamondi, C; Obrist, M; JOX, R. (2020). COVID-19: decision making and palliative care. **Swiss medical weekly**, 150(1314).

Borroni B, (2004) Intronic CYP46 polymorphism along with ApoE genotype in sporadic Alzheimer disease: from risk factors to disease modulators. **Neurobiology of aging**, 25(6), 747-751. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.08.004>

Brasil (2021). Ministério da Saúde. **Anvisa aprova por unanimidade uso emergencial das vacinas**. <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2021/01/anvisa-aprova-por-unanimidade-uso-emergencial-das-vacinas>. Acessado em 17 de julho de 2021.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico Especial: Doença pelo Coronavírus – COVID-19**. Acesso em: 26 ago 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/covid-19/2022/boletim-epidemiologico-no-118-boletim-coe-coronavirus.pdf/view>.

Brasil. Ministério da Educação. Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH). Acesso em: 10 de agosto de 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/ebserh/pt-br/hospitais-universitarios/regiao-nordeste/hc-ufpe>

Buitrago-Garcia D, et al (2020) Occurrence and transmission potential of asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections: A living systematic review and meta-analysis. **PLoS medicine**, 17(9), e1003346. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003346>

Cabrera M, et al (1995) Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. **The Journal of experimental medicine**, 182(5), 1259-1264. <https://doi.org/10.1084/jem.182.5.1259>

Cagliani, R. et al. **Coding potential and sequence conservation of SARS-CoV-2 and related animal viruses**. Infection, Genetics and Evolution, 2020, 83: 104353.

Cavet J, et al (1999). Recipient Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10 Gene Polymorphisms Associate With Early Mortality and Acute Graft-Versus-Host Disease Severity in HLA-Matched Sibling Bone Marrow Transplants. Blood, **The Journal of the American Society of Hematology**, 94(11), 3941-3946.

Conselho Federal de Medicina. **Pandemia gera estresse e sobrecarga de trabalho, mas reforça confiança dos pacientes na medicina**. Acessado em 20 de agosto de 2021. Disponível em: <https://portal.cfm.org.br/noticias/pandemia-de-covid-19-gera-estresse-e-sobrecarga-de-trabalho-medicos-mas-reforca-confianca-dos-pacientes-na-medicina/>

Chan, J.F.W, et al (2020). A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. **The lancet**, 395(10223), 514-523. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9)

Chen, N. et al. **Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study**. The lancet, 2020, 395.10223: 507-513.

Chew, N; Lee, G; Tan, B; Jing, M; Goh, Y; Ngiam, N; Yeo, L; Ahmad, A; Ahmed Khan, F; Napoleon Shanmugam, G; Sharma, A. K; Komalkumar, R. N; Meenakshi, P. V; Shah, K; Patel, B; Chan, B; Sunny, S; Chandra, B; Ong, J; Paliwal, P.R; Sharma, V.K. A multinational, multicentre study on the psychological outcomes and associated physical symptoms amongst healthcare workers during COVID-19 outbreak. **Brain Behav Immun**. 2020;88:559-565. doi:10.1016/j.bbi.2020.04.049

Chua, R. L; Lukassen, S; Trump, S; Hennig, B.P. et al. (2020). **Cross-talk between the airway epithelium and activated immune cells defines severity in COVID-19**. MedRxiv.

Connors JM, et al (2020) COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, 135(23), 2033-2040. <https://doi.org/10.1182/blood.2020006000>

Conselho Federal de Enfermagem. **Estudo do Conselho Internacional de Enfermagem**. Acessado em 20 de agosto de 2021. Disponível em: http://www.cofen.gov.br/90-dos-conselhos-de-enfermagem-do-mundo-veem-risco-de-aumento-no-abandono-da-profissao_88606.html

Cotrin, P; Moura, W; Gambardela-Tkacz, C.M; Pelloso, F.C; Santos, L. dos; Carvalho, M.D. de B; Pelloso, S.M; Freitas, K.M.S. Healthcare Workers in Brazil during the COVID-19 Pandemic: A Cross-Sectional Online Survey. **INQUIRY: The Journal of Health Care Organization, Provision, and Financing** (2020). <https://doi.org/10.1177/0046958020963711>

Cruz, E. H. M; Maciel, J. M; Clozato, C. L; Serpa, M. S. et al.. Simulation-based evaluation of school reopening strategies during COVID-19: A case study of São Paulo, Brazil. **Epidemiology & Infection**, 149, 2021.

Dall'Ora C, et al (2015) Association of 12 h shifts and nurses' job satisfaction, burnout and intention to leave: findings from a cross-sectional study of 12 European countries. **BMJ open**, 5(9), e008331. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-008331>

De Souza Silva GA, et al (2020) SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 infections in pregnancy and fetal development. **Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction**, 101846. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.101846>

Diao B. et al. **Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19)**. *Frontiers in Immunology*, 11 (2020) 827. Doi: 10.3389/fimmu.2020.00827

Eyerich S, et al (2009) Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. **The Journal of clinical investigation**, 119(12), 3573-3585. <https://doi.org/10.1172/JCI40202>

Falzone, L. et al. **Current and innovative methods for the diagnosis of COVID-19 infection**. *International journal of molecular medicine*, 2021, 47.6: 1-23.

Fenwick, C; Joo, V; Jacquier, P; Noto, A; Banga, R; Perreau, M. et al. **T-cell exhaustion in HIV infection**. *Immunol Rev*. 292 (2019) 149–63. Doi: 10.1111/imr.12823

Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz. **Pesquisa analisa o impacto da pandemia entre profissionais de saúde (2021)**. <https://portal.fiocruz.br/noticia/pesquisa-analisa-o-impacto-da-pandemia-entre-profissionais-de-saude>. Acessado dia 26 de junho de 2021.

Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz. **Monitora COVID (2022)**. <https://bigdata-covid19.icict.fiocruz.br/>. Acessado dia 26 de abril de 2022.

Forouzesh, N; Mishra, N. An Effective MM/GBSA Protocol for Absolute Binding Free Energy Calculations: A Case Study on SARS-CoV-2 Spike Protein and the Human ACE2 Receptor. **Molecules**, 2021, 26.8: 2383.

Fox, S.E; Akmatbekov, A; Harbert, J.L; Li, G.J.Q; Brown, R.S. Pulmonary and cardiac pathology in Covid-19: the first autopsy series from New Orleans. **MedRxiv** 42 (2020) 1123–1125. Doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.049465.

Fu Y, Cheng Y, Wu Y, (2020) Understanding SARS-CoV-2-mediated inflammatory responses: from mechanisms to potential therapeutic tools. **Virologica Sinica**, 35(3), 266-271. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00207-4>

Furukawa NW, Brooks JT, Sobel J, (2020) Evidence supporting transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 while presymptomatic or asymptomatic. **Emerging infectious diseases**, 26(7). <https://doi.org/10.3201/eid2607.201595>

Gao, Y. et al. **Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19**. Journal of medical virology. 92(7) (2020)791-796. Doi: 10.1002/jmv.25770.

Gorbalenya AE, et al (2020) Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses—a statement of the Coronavirus Study Group. **BioRxiv**. <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862>

Gorbalenya, A.E, et al (2020). **Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses—a statement of the Coronavirus Study Group**. BioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862>

Goshua, G, et al. **Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study**. The Lancet Haematology, 2020, 7.8: e575-e582.

Grasselli, G; Pesenti, A; Cecconi, M. Critical care utilization for the COVID-19 outbreak in Lombardy, Italy: early experience and forecast during an emergency response. **Jama**, 2020; 323(16), 1545-1546.

Guan, W.J, et al (2020) Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis. **European Respiratory Journal**, 55(5). <https://doi.org/10.1183/13993003.00547-2020>

Guillon, A; Hiemstra, P.S; Si-Tahar, M. Pulmonary immune responses against SARS-CoV-2 infection: harmful or not? **Intensive Care Med.**, 46(10):1897-1900, 2020.

Gupta, A; et al. **Extrapulmonary manifestations of COVID-19**. Nature medicine, 2020, 26.7: 1017-1032.

Habibzadeh, P; et al. **Molecular diagnostic assays for COVID-19: an overview**. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 2021, 1-20.

Hadjadj, J; et al. **Impaired type I interferon activity and exacerbated inflammatory responses in severe Covid-19 patients**. MedRxiv, 2020. Doi: 10.1126/science.abc6027

Han, R; et al (2020) Early clinical and CT manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) pneumonia. **American Journal of Roentgenology**, 215(2), 338-343.

<https://doi.org/10.2214/AJR.20.22961>

Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. **SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor.** *cell*. 2020 Apr 16;181(2):271-80.

Huang, C; Huang, L; Wang, Y; Li, X; Ren, L; Gu X; Kang, L; Guo, L; Liu, M; et al. **6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study.** *Lancet*. 16;397(10270):220-232, 2021.

HUANG, C; et al. **Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China.** *The lancet*, 2020, 395.10223: 497-506.

Hughes, M.M; Groenewold, M.R; Lessem, S.E; Xu, K; Ussery, E.N; Wiegand, R.E. et al. Update: characteristics of health care personnel with COVID-19—United States, February 12–July 16, 2020. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 69(38), 1364, 2020.

Iba T, (2020) The unique characteristics of COVID-19 coagulopathy. **Critical Care**, 24(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03077-0>

Iqbal, M.R; Chaudhuri, A. COVID-19: results of a national survey of United Kingdom healthcare workers' perceptions of current management strategy - a cross-sectional questionnaire study. **Int J Surg**. 2020;79:156-161. doi:10.1016/j.ijsu.2020.05.042.

Islam, A.B.M.M.K; KHAN, M.A.A.K. **Lung transcriptome of a COVID-19 patient and systems biology predictions suggest impaired surfactant production which may be druggable by surfactant therapy.** (2020) *Scientific reports*, 10(1), 1-16.

Johns Hopkins University (2022). **Attribute the data to the "COVID-19 Data Repository by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University" or "JHU CSSE COVID-19 Data"** for short, and the url: <https://github.com/CSSEGISandData/COVID-19>. Accessed 22 abr 2022

Kaye, A.D; Okeagu, C.N; Pham, A.D; Silva, R.A; Hurley, J.J., et al. Economic Impact of COVID-19 Pandemic on Health Care Facilities and Systems: International Perspectives. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, 2020.

Khailany, R.A; Safdar, M; Ozaslan, M. **Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2.** *Gene reports*, 2020, 19: 100682.

King, A.M.Q, et al. **Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** Elsevier, 2011.

Kishimoto, M., et al. **TMPRSS11D and TMPRSS13 Activate the SARS-CoV-2 Spike Protein.** *Viruses* 2021, 13, 384. 2021.

Ko JH, et al (2020) Neutralizing antibody production in asymptomatic and mild COVID-19 patients, in comparison with pneumonic COVID-19 patients. **Journal of clinical medicine**, 9(7), 2268. <https://doi.org/10.3390/jcm9072268>

Korth J, et al (2020) SARS-CoV-2-specific antibody detection in healthcare workers in Germany with direct contact to COVID-19 patients. **Journal of Clinical Virology**, 128, 104437. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104437>

Laato, S; Islam, A. N; Farooq, A; Dhir, A. Unusual purchasing behavior during the early stages of the COVID-19 pandemic: The stimulus-organism-response approach. **Journal of Retailing and Consumer Services**, 2020; 57, 102224.

Lan L, et al (2020) Positive RT-PCR test results in patients recovered from COVID-19. **Jama**, 323(15), 1502-1503. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2783>

Levi, M; Hunt, B.J. **Thrombosis and coagulopathy in COVID-19: An illustrated review**. Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis, 4.5 (2020) 744-751. Doi: 10.1002/rth2.12400.

Lewkowicz N, et al (2011) Expression of Th1/Th2/Th3/Th17-related genes in recurrent aphthous ulcers. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, 59(5), 399-406. <https://doi.org/10.1007/s00005-011-0134-1>

Li, G, Fan, Y, Lai, Y, et al. **Coronavirus infections and immune responses**. J Med Virol. 2020; 92(4):424-434.

Li, C, et al Asymptomatic and human-to-human transmission of SARS-CoV-2 in a 2-family cluster, Xuzhou, China. (2020a) **Emerging infectious diseases**, 26(7), 1626. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200718>

Li, Q, et al Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus–infected pneumonia. New.(2020b) **England journal of medicine**. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>

Li, Z; Buck, M. **Neuropilin-1 Assists SARS-CoV-2 Infection by Stimulating the Separation of Spike Protein Domains S1 and S2**. bioRxiv, 2021, 2021.01.06.425627.

Liao, M; Liu, Y; Yuan, J; WEN, Y; et al. (2020). **Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19**. Nature medicine, 26(6), 842-844.

Liu, C.Y; Yang, Y.Z; Zhang, X.M et al. The prevalence and influencing factors in anxiety in medical workers fighting COVID19 in China: a cross-sectional survey. **Epidemiol Infect**. 2020;148:e98. doi:10.1017/S0950268820001107.

Livak KJ, et al (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– **ΔΔCT method**. methods, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Lombardi A, et al (2020) Characteristics of 1573 healthcare workers who underwent nasopharyngeal swab testing for SARS-CoV-2 in Milan, Lombardy, Italy. **Clinical microbiology and infection**, 26(10), 1413-e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.06.013>

Long QX, et al (2020) Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. **Nature medicine**, 26(8), 1200-1204. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0965-6>

Lotta, G; Fernandez, M; Corrêa, M.G; Magri, G; Mello, C.A.C; Beck, A.L. **Nota Técnica: A pandemia de COVID-19 e os profissionais de Saúde Pública no Brasil - 2a. fase** [Internet]. São Paulo: FGV; NEB; 2020 [11 dez 2020]. Available: <https://abori.com.br/wp-content/uploads/2020/07/rel05-saude-covid-19-fase2-v4.pdf> » <https://abori.com.br/wp-content/uploads/2020/07/rel05-saude-covid-19-fase2-v4.pdf>

Lu, H et al. **Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle**. Journal of medical virology, (2020) 92,4: 401-402, <https://doi.org/10.1002/jmv.25678>

Lu, H; Stratton, C.W; Tang, Y.W. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in

Wuhan, China: the mystery and the miracle. **Journal of medical virology**, (2020a) 92(4), 401-402. <https://doi.org/10.1002/jmv.25678>

Lu, X; et al SARS-CoV-2 infection in children—Understanding the immune responses and controlling the pandemic. **Pediatric Allergy and Immunology**, (2020b) 31(5), 449-453. <https://doi.org/10.1111/pai.13267>

Magno, L; et al (2020) Challenges and proposals for scaling up COVID-19 testing and diagnosis in Brazil. **Ciencia & saude coletiva**, 25, 3355-3364. <https://doi.org/10.1590/1413-81232020259.17812020>

Maital, S; Barzani, E. (2020). The global economic impact of COVID-19: A summary of research. **Samuel Neaman Institute for National Policy Research**, 2020, 1-12.

Mandić-Rajčević, S; et al (2020) Contact tracing and isolation of asymptomatic spreaders to successfully control the COVID-19 epidemic among healthcare workers in Milan (Italy). **medRxiv**.<https://doi.org/10.1101/2020.05.03.20082818>

Mao, R; et al (2020) Manifestations and prognosis of gastrointestinal and liver involvement in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **The lancet Gastroenterology & hepatology**, 5(7), 667-678. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30126-6](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30126-6)

Mao, Y; Lin, W; Wen, J; Chen, G. **Clinical and pathological characteristics of 2019 novel coronavirus disease (COVID-19): A systematic reviews**. *MedRxiv* (2020) 20025601. Doi: 10.1101/2020.02.20.20025601.

Mardani, R et al (2020) Laboratory parameters in detection of COVID-19 patients with positive RT-PCR; a diagnostic accuracy study. **Archives of academic emergency medicine**, 8(1).

McAleer, J.P; Kolls, J.K. (2014) Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense. **Immunological reviews**, 260(1), 129-144. <https://doi.org/10.1111/imr.12183>

Megna M, et al (2020) May IL-17 have a role in COVID-19 infection? **Medical hypotheses**, 140, 109749. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.mehy.2020.109749>

Melo, C.M.D; Silva, G.A; Melo, A.R; Freitas, A.C. (2020). **COVID-19 pandemic outbreak: the Brazilian reality from the first case to the collapse of health services**. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92(4), <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020200709>

Merad, M; Martin, J.C. **Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages**. *Nature Reviews Immunology*, 2020, 20.6: 355-362.

Mescher, M.F;urtsinger, J.M; Agarwal, P; Casey, K.A; Gerner, M; Hammerbeck, C.D et al. **Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells**. *Immunol Rev*. 211 (2006) 81–92. Doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00382.x

Middleton, E.A et al. **Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Contribute to Immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome**. *Blood*. 136 (10) (2020) 1169–1179. Doi: 10.1182/blood.2020007008.

Moreira, R.A; et al. **Characterization of structural and energetic differences between conformations of the SARS-CoV-2 spike protein**. *Materials*, 2020, 13.23:

5362.

Mousset, C.M, et al (2019) Comprehensive phenotyping of T cells using flow cytometry. **Cytometry Part A**, 95(6), 647-654. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23724>

Mozzini, C; Girelli, D. **The role of Neutrophil Extracellular Traps in Covid-19: Only an hypothesis or a potential new field of research?** *Thrombosis Research* 191 (2020) 26-27. Doi: 10.1016/j.thromres.2020.04.031.

Murdoch, D. R., & French, N. P. (2020). COVID-19: another infectious disease emerging at the animal-human interface. *NZ Med J*, 133(1510), 12-15.

Negro, F. **Is antibody-dependent enhancement playing a role in COVID-19 pathogenesis?** *Swiss Medical Weekly* (2020) 150(1516). Doi: 10.4414/smw.2020.20249.

Ng, C.T Snell, L.M; Brooks, D.G. **Networking at the level of host immunity: immune cell interactions during persistent viral infections.** *Cell Host Microbe*. 13 (2013) 652–64. Doi: 10.1016/j.chom.2013.05.014.

Nguyen, T.M; Zhang, Y; Pandolfi, P.P. (2020) Virus against virus: a potential treatment for 2019-nCov (SARS-CoV-2) and other RNA viruses. **Cell Res** 30, 189–190 (2020).<https://doi.org/10.1038/s41422-020-0290-0>

Nguyen, K. et al. **Exploring the role of glycans in the interaction of SARS-CoV-2 RBD and human receptor ACE2.** *Viruses*, 2021, 13.5: 927.

NHCC - National Health Commission of China. **The guidelines for diagnosis and treatment of novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (the sixth edition draft) issued by the National Health Commission of China.** http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-02/19/content_5480948.htm2020. Accessed February, 2020.

Niquini RP, et al (2020) Description and comparison of demographic characteristics and comorbidities in SARI from COVID-19, SARI from influenza, and the Brazilian general population. **Cadernos de saude publica**, 36, e00149420. <https://doi.org/10.1590/0102-311x00149420>

Organização Pan-Americana de Saúde– OPAS (2020). **COVID-19 has infected some 570,000 health workers and killed 2,500 in the Americas, PAHO Director says.** <https://www.paho.org/en/news/2-9-2020-covid-19-has-infected-some-570000-health-workers-and-killed-2500-americas-paho>. Acessado em 17 de julho de 2021.

Ou, X; Liu, Y; Lei, X; Li, P; Mi, D; Ren, L. et al. **Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV.** *Nature communications*. 11(1) (2020) 1620. Doi: 10.1038/s41467-020-15562-9

Park, S.J. et al (2019) Epigenetic downregulation of STAT6 increases HIF-1 α expression via mTOR/S6K/S6, leading to enhanced hypoxic viability of glioma cells. **Acta neuropathologica communications**, 7(1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0798-z>

Park, S.Y. et al (2019) The JAK2/STAT3/CCND2 Axis promotes colorectal Cancer stem cell persistence and radioresistance. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, 38(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1405-7>

Park, A; Iwasaki, A. **Type I and type III interferons–induction, signaling, evasion,**

and application to combat COVID-19. Cell host & microbe, 2020.

Pasila, K; Elo, S; Kääriäinen, M. (2017) Newly graduated nurses' orientation experiences: A systematic review of qualitative studies. **International Journal of Nursing Studies**, 71, 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2017.02.021>

Peiser, M. (2013) Role of Th17 cells in skin inflammation of allergic contact dermatitis. **Clinical and developmental immunology**, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/261037>

Pereira, J.M; Silva, C; Freitas, D; Salgado, A. Burnout among Portuguese radiographers during the COVID-19 pandemic. Radiography (Lond). 2021 May 18:S1078-8174(21)00054-7. doi: 10.1016/j.radi.2021.05.001. **Epub ahead of print.** PMID: 34053854; PMCID: PMC8130549.

Pessa, V.E; Damasio, L.C.V.C; Luz, L.S; da Silva, P.M.F; Lazzerini, M. COVID-19 among health workers in Brazil: the silent wave. **J Glob Health**. 2020;10(1):010379. doi:10.7189/jogh.10.010379.

Phua, J; Weng, L; Ling, L; Egi, M; Lim, C.M; Divatia, J.V. et al. Intensive care management of coronavirus disease 2019 (COVID-19): challenges and recommendations. **The Lancet Respiratory Medicine**. 2020; 8(5), 506-517.

Polidoro, R.B; Hagan, R.S; De Santis, S.R; Schmidt, N.W. **Overview: Systemic Inflammatory Response Derived From Lung Injury Caused by SARS-CoV-2 Infection Explains Severe Outcomes in COVID-19.** Front Immunol. 2020 Jun 26;11:1626. doi: 10.3389/fimmu.2020.01626. PMID: 32714336; PMCID: PMC7344249.

Porta-Etessam J, (2020) Spectrum of headaches associated with SARS-CoV-2 infection: **Study of healthcare professionals.** Headache: The Journal of Head and Face Pain, 60(8), 1697-1704. <https://doi.org/10.1111/head.13902>

Ranucci, M. et al. **The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome.** Journal of Thrombosis and Haemostasis 18.7 (2020): 1747-1751.

Renast. Boletim CoVida: **pandemia de Covid-19: a saúde dos trabalhadores de saúde no enfrentamento da pandemia da Covid-19** [Internet]. Salvador; 2020 [citado em 9 set 2020]. Disponível em: <http://renastonline.ensp.fiocruz.br/sites/default/files/arquivos/recursos/boletim-covida-5- trabalhadores-da-saude.pdf>

Romano, M. et al. **A structural view of SARS-CoV-2 RNA replication machinery: RNA synthesis, proofreading and final capping.** Cells, 2020, 9.5: 1267.

Ruan, Q; et al. **Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China.** Intensive care medicine. 46(5) (2020) 846-848. Doi: 10.1007/s00134-020-05991-x

Sadeghi, A. et al. Th17 and Treg cells function in SARS-CoV2 patients compared with healthy controls. **Journal of cellular physiology**, 2021; 236(4), 2829-2839. <https://doi.org/10.1002/jcp.30047>

Sambrook, J; Fritsch, E.F; Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory Manual. **Cold Spring Harbor**, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sant'ana, G; Imoto, A. M; Amorim, F. F; Taminato, M. et al. Infection and death in healthcare workers due to COVID-19: a systematic review. **Acta Paul Enferm**, 2020.

Santos, L.A. et al Recurrent COVID-19 including evidence of reinfection and enhanced severity in thirty Brazilian healthcare workers. **The Journal of infection**. 2021.

Silva, G.A.D.S; Silva, S.P.D; Silva, A.R.D; Sousa, G.F.D. et al (2021). **COVID-19: From viral infection to pulmonary fail-ure**. J Clin Images Med Case Rep, 2(2), 1064.

Simmons, G; Zmora, P; Gierer, S; Heurich, A; Pohlmann, S. **Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research**. Antiviral research 100.3 (2013) 605-614. Doi: 10.1016/j.antiviral.2013.09.028

Skendros, P. et al. **Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis**. medRxiv, 130(11) (2020) 6151-6157. Doi: 10.1172/JCI141374.

Sola, I. et al. **Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses**. Annual review of virology, 2015, 2: 265-288.

Su, L. et al (2014) The transcription factor FOXO4 is down-regulated and inhibits tumor proliferation and metastasis in gastric cancer. **BMC cancer**, 14(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-378>

Suárez-García, I. et al (2020) SARS-CoV-2 infection among healthcare workers in a hospital in Madrid, Spain. **Journal of Hospital Infection**, 106(2), 357-363. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.07.020>

Tay, M.Z. et al (2020) The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, 20(6), 363-374. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>

Teixeira, C.F.D.S. et al (2020) The health of healthcare professionals coping with the Covid-19 pandemic. **Ciência & Saúde Coletiva**, 25, 3465-3474. <https://doi.org/10.1590/1413-81232020259.19562020>

Tetro, J.A. **Is COVID-19 receiving ADE from other coronaviruses? Microbes and infection**. 22(2) (2020) 72-73. Doi: 10.1016/j.micinf.2020.02.006.

Theorell, T. COVID-19 and Working Conditions in Health Care. **Psychother Psychosom**. 2020;89(4):193-4.

Unfried, G. et al (2003) A polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and idiopathic recurrent miscarriage. **Human reproduction**, 18(2), 267-270. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg094>

Usui, T. et al (2003) GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12R β 2 chain or T-bet. **Immunity**, 18(3), 415-428. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00057-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00057-8)

Van Dam L.F. et al. **Clinical and computed tomography characteristics of COVID-19 associated acute pulmonary embolism: A different phenotype of thrombotic disease?** Thrombosis Research 193(2020)86-89. Doi: 10.1016/j.thromres.2020.06.010.

Vedovato, T.G et al. Trabalhadores(as) da saúde e a COVID-19: condições de trabalho à deriva? **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional** [online]. 2021, v. 46 [Ago 2021] , e1. <<https://doi.org/10.1590/2317-6369000028520>>. Epub 24 Fev 2021.

ISSN 2317-6369.

Walter, L; Petersen, B. **Diversification of both KIR and NKG 2 natural killer cell receptor genes in macaques—implications for highly complex MHC-dependent regulation of natural killer cells.** *Immunology*, 150(2) (2017) 139-145. Doi: 10.1111/imm.12666

Wang, D. et al (2020a) Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China. **Jama**, 323(11), 1061-1069. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>

Wang, J. et al (2020) Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. **Journal of leukocyte biology**, 108(1), 17-41. <https://doi.org/10.1002/JLB.3COVR0520-272R>

Wang, Y; Grunewald, M; Perlman, S. **Coronaviruses: an updated overview of their replication and pathogenesis.** *Coronaviruses*, 2020b, 1-29.

Watson, J; Whiting, P.F.; Brush, J.E. **Interpreting a COVID-19 test result.** *Bmj*, 2020, 369.

World Health Organization (WHO). **Coronavirus disease (COVID-19) situation reports.** Date last accessed: 18 sep 2021. Available from: <https://who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/>. Accessed 18 sep 2021

Wostyn, P. COVID-19 and chronic fatigue syndrome: Is the worst yet to come? **Medical hypotheses**, v. 146, p. 110469, 2021.

Wu, F. et al (2020) Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. **The lancet** <https://doi.org/10.2139/ssrn.3566211>

Wu, X. et al (2010) Association between polymorphisms in interleukin-17A and interleukin-17F genes and risks of gastric cancer. **International Journal of Cancer**, 127(1), 86-92. <https://doi.org/10.1002/ijc.25027>

Xie, J; Tong, Z; Guan, X; Du, B; Qiu, H; Slutsky, A.S. Critical care crisis and some recommendations during the COVID-19 epidemic in China. **Intensive care medicine**. 2020; 46(5), 837-840.

Xiong, H; Yi, S; Lin, Y. The Psychological Status and Self-Efficacy of Nurses During COVID-19 Outbreak: A Cross-Sectional Survey. **INQUIRY: The Journal of Health Care Organization, Provision, and Financing**. January 2020. doi:10.1177/0046958020957114

Xiong, Y; Liu, Y; Cao, L; Wang, D; Guo, M; Jiang, A. et al. (2020). **Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients.** *Emerging microbes & infections*, 9(1), 761-770.

Yazdanpanah, F; Hamblin, M. R; Rezaei, N. (2020). **The immune system and COVID-19: Friend or foe?** *Life sciences*, 117900.

Zaki, A.M. et al. **Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia.** *New England Journal of Medicine*, 2012, 367.19: 1814-1820.

Zenewicz, L.A. (2018) IL-22: there is a gap in our knowledge. **ImmunoHorizons**. 2

(6): 198–207. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1800006>

Zhang, Y.J; Zeng, G; Pan, H.X; Li, C.G; Kan, B; Hu, Y.L; Mao, H.Y; Xin, Q.Q. et al. **Immunogenicity and safety of a SARS-CoV-2 inactivated vaccine in healthy adults aged 18-59 years: report of the randomized, double-blind, and placebo-controlled phase 2 clinical trial.** medrxiv. 2020 Jan 1

Zhang, M. et al. Biomimetic Human Disease Model of SARS-CoV-2-Induced Lung Injury and Immune Responses on Organ Chip System. **Advanced Science**, v. 8, n. 3, p. 2002928, 2021.

Zhao, M. et al (2018) IL-6/STAT3 pathway induced deficiency of RFX1 contributes to Th17-dependent autoimmune diseases via epigenetic regulation. **Nature communications**, 9(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02890-0>

Zhao XN, et al (2020) Longitudinal single-cell immune profiling revealed distinct innate immune response in asymptomatic COVID-19 patients. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.09.02.276865>

Ziegler, C.G; Allon, S.J; Nyquist, S.K; Mbanjo, I.M; Miao, V.N; Tzouanas, C. et al. (2020). **SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues.** Cell. 181(5) (2020) 1016-1035.e19. Doi: 10.1016/j.cell.2020.04.035.

APÊNDICE A- QUESTIONÁRIO PARA COLETA DE DADOS

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS

Nome: _____ ID pesquisa: _____
 Data de Nascimento: ____/____/____ Gestante: ☐ Sim ☐ Não

DADOS PROFISSIONAIS

Escolaridade: ☐ Nível Médio ☐ Nível Técnico ☐ Nível Superior
 Profissão: _____
 Setor de Trabalho: _____ Turno de Trabalho: ☐ Diurno ☐ Noturno
 Jornada de Trabalho: ☐ Diarista até 6h ☐ Diarista 8h ☐ Plantonista 12h ☐ Plantonista 24h
 Possui outros vínculos de trabalho: ☐ Não ☐ Sim Se sim, quantos: ☐ 01 ☐ 02 ☐ 03 ou mais vínculos

DADOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS

Realizou viagem internacional em 2020: ☐ Não ☐ Sim
 Se realizou viagem internacional, qual o local: _____
 Data da Viagem: ____/____/____ Data do Retorno: ____/____/____
 Durante a atividade profissional, apresentou sintomas para a COVID-19: ☐ Não ☐ Sim
 Quais sintomas: ☐ Febre ☐ Tosse ☐ Dor de Garganta ☐ Dispneia ☐ Sat O₂ ≤ 95% ☐ Diarreia
☐ Vômito ☐ Sinais dermatológicos ☐ Outros: _____
 Fez uso de alguma terapia farmacológica: ☐ Não ☐ Sim
 Se usou medicação, qual(is): ☐ Cloroquina/hidroxicloroquina ☐ Antimicrobiano
☐ Dexametasona ☐ Ivermectina ☐ Nitazoxanida ☐ Outros: _____
 Realizou Exame Diagnóstico/ Triagem: ☐ Não ☐ Sim,
 quais:
☐ RT-PCR - Detectável () Não detectável ()
☐ Teste Rápido - IgM/IgG negativo () IgM/IgG positivo () IgM negativo e IgG positivo ()
☐ IgM positivo e IgG negativo ()
☐ Raio-X - Normal () Infiltrado () Consolidação () Misto () Outros: _____
☐ Tomografia - Normal () Infiltrado () Consolidação () Misto () Outros: _____
☐ Outros exames realizados: _____ Resultado: _____
 Precisou de internação hospitalar: ☐ Não ☐ Sim, enfermaria ☐ Sim, UTI
 Se precisou de internação, Quantos dias: _____ Fez uso de Respirador: ☐ Não ☐ Sim
 Foi afastado das atividade para cumprir isolamento em casa: ☐ Não ☐ Sim, quantos dias: _____
 Possui familiares residindo na mesma casa: ☐ Não ☐ Sim, quantos: _____
 Familiares que residem na mesma casa foram isolados pelo mesmo período de tempo: ☐ Sim ☐ Não
 Se não, motivos: _____
 Fatores de
 Risco/comorbidades:
☐ Gestante ☐ Diabetes Mellitus ☐ Imunodeficiência/Imunosupressão ☐ Asma ☐ Obesidade
☐ Doença Cardiovascular Crônica ☐ Doença Hepática Crônica ☐ Doença Renal Crônica
☐ Doença Neurológica Crônica ☐ Doença Hepatológica Crônica ☐ Pneumopatia Crônica
 Fatores de Risco/comorbidades dos Familiares:
☐ Gestante ☐ Diabetes Mellitus ☐ Imunodeficiência/Imunosupressão ☐ Asma ☐ Obesidade
☐ Doença Cardiovascular Crônica ☐ Doença Hepática Crônica ☐ Doença Renal Crônica
☐ Doença Neurológica Crônica ☐ Doença Hepatológica Crônica ☐ Pneumopatia Crônica

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **Investigação e mapeamento imunológico de pacientes infectados com o vírus SARS-CoV-2 (COVID-19)**, que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) Profa. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo, Av. Prof. Moraes Rego, s/n.º - Cidade Universitária – Recife – PE – CEP 50.670.420, fone: 2126.8866, e-mail: cristianemout@gmail.com.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubricue as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa Investigação e mapeamento imunológico de pacientes infectados com o vírus SARS-CoV-2 (COVID-19), a qual pretende analisar o perfil de resposta de defesa do organismo que o vírus SARS-CoV-2, causador da doença COVID-19, promove. Sua participação é necessária, pois, como portador da doença, o seu sangue será utilizado como controle positivo. Sua participação é voluntária e se dará através da permissão de coleta de até 9 ml de sangue periférico através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou mancha vermelha (hematoma). Caso ocorra qualquer desconforto ou promoção de hematoma local você receberá ajuda da equipe de coleta através de cuidados paliativos. O sangue será utilizado para a realização de identificação dos tipos de células sanguíneas que estão ativadas e das proteínas que ajudam na defesa do organismo, como os objetivos de: (i) verificar produção de citocinas, imunoglobulinas e quimiocinas (substâncias envolvidas no sistema de defesa contra doenças) e (ii) analisar a presença de marcadores de superfície celular (que identifica quais células são e se houve aumento ou diminuição da população de células). Todos os resultados dos marcadores sanguíneos serão comparados, com sua permissão, com o seu diagnóstico clínico constante em prontuário médico obtido junto ao hospital. Eventualmente, caso precisemos, iremos solicitar amostras de Swab suas e/ou nos bancos repositórios para identificação e investigação do tipo viral e confrontar com seus sinais clínicos para estudos de infectividade.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. As amostras sanguíneas coletadas nesta pesquisa serão processadas e ficarão armazenadas em freezer a -20°C, sob a responsabilidade do Profa. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo, no endereço acima informado pelo período de mínimo de 3 anos para investigações futuras. Nesse caso, para a utilização das amostras um novo projeto de pesquisa deverá ser aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do hospital (e, se for o caso, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, a CONEP) e você será contatado novamente para autorizar o novo uso, assinando um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido A retirada do consentimento de guarda das suas amostras biológicas armazenadas em banco deverá ser realizada por escrito e assinada, podendo dar-se a qualquer tempo, sem prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).** O referido comitê está apto para lhe esclarecer a função da pesquisa científica para o avanço da ciência e da confidencialidade de todos os seus dados. Além disso, o CEP/CONEP são corresponsáveis por garantir a proteção dos participantes de pesquisa científica, segundo a resolução Resolução CNS nº 466 de 2012, item VII.1.

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **Investigação e mapeamento imunológico de pacientes infectados com o vírus SARS-CoV-2 (COVID-19)**, como participante da pesquisa. Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar.

(02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____	Nome: _____
Assinatura: _____	Assinatura: _____

APÊNDICE C – ARTIGO ORIGINAL ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

Periódico: Anais da Academia Brasileira de Ciências

Decision Letter (AABC-2022-0502.R1)

From: yralma@pharma.ufrj.br

To: crismout_melo@hotmail.com

CC:

Subject: Annals of the Brazilian Academy of Sciences - Decision on Manuscript ID AABC-2022-0502.R1

Body: 30-Aug-2022

Dear Dr. Melo:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Healthcare workers exposed to COVID-19 patients present an inflammatory status and Th2/Th17/Th22 immune profile: findings from before vaccine application in Brazil." in its current form for publication in the Annals of the Brazilian Academy of Sciences. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Please, do not send any new or corrected version of this paper through the system or via e-mail at this time. We kindly ask you to wait for our editorial office to get in touch with you regarding the production phase.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Annals of the Brazilian Academy of Sciences, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Yralma Cordeiro
yralma@pharma.ufrj.br, yralmacordeiro@gmail.com

Entire Scoresheet:
Reviewer: 1

Recommendation: Accept

Comments:
The authors have addressed properly the remarks raised by the reviewers.

Additional Questions:
Does the manuscript contain new and significant information to justify publication?: Yes

Does the Abstract (Summary) clearly and accurately describe the content of the article?: Yes

Is the problem significant and concisely stated?: Yes

Are the methods described comprehensively?: Yes

Are the interpretations and conclusions justified by the results?: Yes

Is adequate reference made to other work in the field?: Yes

Is the language acceptable?: Yes

Please rate the priority for publishing this article (1 is the highest priority, 10 is the lowest priority): 3

Length of article is: Adequate

Number of tables is: Adequate

Number of figures is: Adequate

Please state any conflict(s) of interest that you have in relation to the review of this paper (state "none" if this is not applicable): None.

Rating:

Interest: 2. Good

Quality: 2. Good

Originality: 3. Average

Overall: 2. Good

Date Sent: 30-Aug-2022

Healthcare workers exposed to COVID-19 patients present an inflammatory status and Th2/Th17/Th22 immune profile: findings from before vaccine application in Brazil.

Rodrigo Cesar Abreu de Aquino ¹ (<https://orcid.org/0000-0002-1883-5001>);
 Bárbara Rafaela da Silva Barros¹ (<https://orcid.org/0000-0003-4697-0937>);
 Guilherme Antonio de Souza Silva¹ (<https://orcid.org/0000-0003-4364-6648>);
 Georon Ferreira de Sousa¹ (<https://orcid.org/0000-0001-8780-202X>);
 Edson Barbosa de Souza² (<https://orcid.org/0000-0002-3716-6907>);
 Dyego Revorêdo de Carvalho Silva² (<https://orcid.org/0000-0002-5293-5911>);
 Arione Vieira do Nascimento² (<https://orcid.org/0000-0002-6547-9708>);
 Igor Wesland Assunção de Sá² (<https://orcid.org/0000-0001-7616-1327>);
 Elker Lene santos de Lima³ (<https://orcid.org/0000-0002-8165-3534>);
 Bárbara de Oliveira Silva³ (<https://orcid.org/0000-0003-4158-5650>);
 Luísa Priscila Oliveira de Lima³ (<https://orcid.org/0000-0002-4119-0491>);
 Amanda Mota Vieira³ (<https://orcid.org/0000-0001-8140-7299>);
 Adauto Gomes Barbosa Neto³ (<https://orcid.org/0000-0002-9545-7905>);
 Bianca de França São Marcos⁴ (<https://orcid.org/0000-0002-8165-3534>);
 Anna Jéssica Duarte Silva⁴ (<https://orcid.org/0000-0002-8341-7877>);
 Talita Helena Araújo de Oliveira⁴ (<https://orcid.org/0000-0001-8170-0989>);
 Bruno Melo Carvalho³ (<https://orcid.org/0000-0002-6792-0288>);
 Maria Tereza Cartaxo Muniz³ (<https://orcid.org/0000-0001-9498-5223>);
 Antonio Carlos de Freitas⁴ (<https://orcid.org/0000-0002-4957-9549>);
 Evônio de Barros Campelo Júnior² (<https://orcid.org/0000-0002-9825-9656>);
 Cristiane Moutinho Lagos de Melo^{1*} (<https://orcid.org/0000-0002-8831-0163>);

1 Laboratory of Immunological and Antitumor Analysis, Department of Antibiotics, and Keizo Asami Laboratory of Immunoparasitology, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Brazil.

2 Clinical Hospital of Federal University of Pernambuco, Brazil.

3 Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco, Brazil.

4 Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy, Department of Genetics, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Brazil.

Keywords: COVID-19; Healthcare workers; Inflammation; SARS-CoV-2

Running title: Inflammatory immune profile of healthcare workers

Manuscript Type: Original Article

*** Corresponding author:**

Melo, CML - Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, P.O. Box: 50740-525, Recife, Brazil; Tel/Fax: +55 (81) 2126-8866; Email: cristiane.moutinho@ufpe.br

ABSTRACT

Healthcare workers present an increased risk of contagion for the SARS-CoV-2 virus due to their labor exposure. Here, we describe the clinical, laboratory, and immunological characteristics of healthcare workers, before vaccine application, exposed to SARS-CoV-2-infected patients. We collected sociodemographic, clinical, and laboratory information from 50 professionals who worked during the COVID-19 pandemic at the Clinical Hospital of the Northwest in Brazil. The results showed that most workers are women, over 50 years old, and worked as nursing technicians. Approximately 56% of workers were positive for a previous infection by RT-PCR and/or anti-SARS-CoV-2-immunoglobulin tests. Increased levels of hematocrit, neutrophils, NK lymphocytes, and fibrinogen, were found in positive healthcare workers, suggesting a light inflammatory status. The immunological findings showed an increase in IL-17 production and a Th2/Th17/Th22 profile followed by high serology for anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG. Those data reveal the importance of studies with healthcare workers to investigate if the continuous exposition to the virus may result in chronic activation of the immune system and/or pulmonary inflammation in this target group.

Keywords: Healthcare workers, Th2/Th17/Th22, COVID-19, inflammation.

1. INTRODUCTION

The coronavirus disease 2019 (COVID-19), which emerged in China, was considered the most serious outbreak of pneumonia in the last 100 years, reaching more than 200 countries around the world (Gorbalenya et al., 2020; Lu et al., 2020; Li et al., 2020a; Melo et al., 2020). The transmissibility of COVID-19 is due to the high viral load in the upper respiratory tract, even among asymptomatic patients, which distinguishes it from other respiratory diseases (Arons et al., 2020; Li et al., 2020b). Virus spread occurs through direct contact with contaminated surfaces, aerosols, and respiratory droplets (Chan et al., 2020). The infected person may not present symptoms (asymptomatic), develops few clinical manifestations such as fever, cough, flu, weakness (mild disease), or progress to pneumonia, dyspnea, hypoxia, lung involvement on imaging tests, respiratory failure, systemic shock, multi-organ failure (severe disease), and to die (Merad and Martin, 2020; Buitrago-Garcia et al., 2020; De Souza Silva et al., 2020; Furukawa et al., 2020).

Worldwide, thousands of healthcare workers have taken leave from professional activities due to COVID-19 infection, which also caused a significant number of deaths. In China, about 29% of healthcare workers were infected with COVID-19 during the first three months of the pandemic (Wang et al., 2020a). Spain and Italy also had 22% and 20% of healthcare workers taking work left, respectively (Suárez-Garcia et al., 2020; Arons et al., 2020). The fundamental role of healthcare workers during the COVID-19 pandemic should be recognized and serve as an example for future generations. However, no study, to date, described the immunobiology of healthcare workers exposed to COVID-19-infected patients and how these professionals physiologically reply to daily contact with SARS-CoV-2. Because of constant SARS-COV-2 exposure, it is possible that health workers might develop unique reactions to infection than non-healthcare workers. Here, we described the clinical, biochemical, and immunological aspects of 50 healthcare workers exposed to the disease (due to their clinical procedures with contaminated patients), during the pandemic outbreak, in a public hospital unit, in a period before vaccination against SARS-CoV-2.

2. Material and Methods

2.1 Characterization of volunteers and collection of blood samples

Volunteers of this study consist of 50 healthcare workers from the Clinical Hospital of the Federal University of Pernambuco in Brazil, who worked throughout the COVID-19 pandemic period. The inclusion criteria were to work with infected patients and/or process biological samples of infected patients during COVID-19 pandemic. The socio-demographic, clinical and epidemiological data of healthcare workers were collected through a questionnaire. Likewise, blood samples to perform laboratorial (hematological, coagulogram, serological, and biochemical) and immunological analyses were collected in different tubes (BD Vacutainer®). All volunteer who participated in this study signed a 'Free and Informed Consent Form'. In addition, all experimental protocols were approved by the Human Ethics Committee from Federal University of Pernambuco (nº 4.206.047/2020; CAAE 30332120.8.3001.5191).

2.2 Laboratorial analysis of blood samples

The blood of all voluntaries was collected on the same day. After the collection and processing of blood from the healthcare workers, blood and serum samples were sent to the laboratory analysis. The blood count was performed in a Yumizen H2500® hematological analyzer, followed by a review of the blood smear slides under an optical microscope. The coagulogram was analyzed in an automatic STA Compact Max® analyzer. The sample serum was used to evaluate the serological and biochemical parameters using the Architect i2000SR® fully automated immune panels and the CMD 800i automatic biochemical analyzer (Wiener lab®), respectively.

2.3 Immunological tests

2.3.1 Immunological analysis from sera samples

The sera collected, according to the 2.1 item, were used for cytokine dosage assays and for the qualitative detection of anti-SARS-CoV-2 immunoglobulins. The Th1/Th2/Th17 human cytokines were measured through of Cytometric Bead Array (CBA) kit (BD Bioscience®) with

all data acquired by FACSVerse platform and processed using the BD FACSuite® software. Exclusively to this assay, we provided seven voluntary samples (which no are healthcare professionals) to compare with our healthcare workers' values. The qualitative detection of IgG and IgM was performed twice, with two months of interval, and using the SARS-CoV-2 Antibody Test Kit by the colloidal gold immunochromatography technique (Lepu Technology®).

2.4 Immunological analysis with blood-isolated cell samples

The isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), previously collected in the 2.1 item, was performed through blood centrifugation (400 x g, 30 min) under a Ficoll separation gradient (1.077 g/mL; GE Healthcare Life Sciences®), cells were washed twice with PBS (400 x g, 10 min) and stained with anti-CD3-FITC, anti-CD4-PercyPCy5, anti-CD8-PE, anti-CD56-PECy7, anti-CD19-FITC (BD Biosciences®). The anti-IL-10-PE and anti-IL-17-PE intracytoplasmic cytokines were also investigated. The acquisition of the cells was made in 10,000 events in a FACSVerse flow cytometer (BD Biosciences®) and data analysis was performed in the BD FACSuite® software.

2.5 Gene expression assay

2.5.1 RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA extraction was performed. PBMC (5×10^6) was homogenized in 1 mL of liquid Trizol (Invitrogen). Purification of isolated total RNA was performed through RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) following the manufacturer's instructions. The RNA's quality was assured by a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific Wilmington, USA) and electrophoresis (1% agarose gel). Purified RNA (1 µg) of adequate quality (an OD260/280 from 1.8 to 2.1 and intact rRNA subunits - 28S and 18S) was used to synthesize cDNA by means of Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase (Thermo Scientific®). For each sample, a negative control RT reaction (without Reverse Transcriptase enzyme) was used.

2.5.2 Primer design and efficiency estimation for qPCR

The primers used to detect STAT4, JAK2, STAT6, STAT3, and FOXO4 genes were designed based on previous studies (Park et al., 2019a; Park et al., 2019b; Su et al., 2014; Usui et al., 2003; Zhao et al., 2018). The reference genes, ACTB and GAPDH, were used for the relative quantification. Those genes were previously validated in PBMC samples (Eyerich et al., 2009; Lewkowicz et al., 2011; Mousset et al., 2019). The ID GenBank for the primers used are STAT4 (NM_001243835.2), JAK2 (NM_001322195.2), STAT6 (NM_001178081.2), STAT3 (NM_001384992.1), FOXO4 (NM_001170931.2), ACTB (NM_001101.5) and GAPDH (NM_001357943.2). The cDNA from positive PBMC samples was used to exemplify a real test condition.

2.5.3 Real-time qPCR

The RT-qPCR reaction (10 μ L) was performed using the Fast SYBR[®] Green Master Mix kit (Applied Biosystems[®]). For reading, the AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies) equipment was used according to the following parameters: 95°C in 20 sec for polymerase activation, 40 cycles in 95°C for 3 sec for denaturation, and 60°C in 30 sec for annealing and extension. Thus, geometrical media of the reference genes (ACTB and GAPDH) was used to calculate the relative expression of all targets (Livak and Schmittgen, 2001).

2.6 Polymorphism Assay

The genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by the phenol–chloroform method for molecular analysis, adapted from Sambrook and Russel (2001). Investigation of polymorphisms -174 G/C IL-6 (rs 1800795), -197 G/A IL-17A (rs1974226), -511 C/T IL-1 β (rs 16944), and -308 G/A TNF- α (rs1800629) was performed by PCR-RFLP. Primer sequence pairs for the amplifications were used as established by Cabrera et al. (1995), Unfried (2001), Arman et al. (2006) and Wu et al. (2010a). For -1082 A/G polymorphism of the IL-10 gene (rs1800896) was made using the PCR-ASA – Allele-Specific method. Primer sequence pairs for the amplifications were used as established by Cavet et al. (1999) and Borroni et al. (2004).

2.7 Statistical analysis

The D'Agostino test was applied to test the normality of the hypothesis and the statistical differences between groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with Unpaired *t* test with Welch's correction confirmation. Results about genes expression it was used Mann-Whitey test. All results were expressed as the mean of the values of the groups $\pm$ standard deviation and analyzed considering the value of $p < 0.05$ as statistically significant. The graphs were processed by GraphPad Prism 9 Software®.

3. RESULTS

The results on the profile of this cohort of healthcare workers showed that 80% were women, 40% were over 51 years old, 56% had a technical level of education and 46% were nursing technicians (see Table I). In addition, 64% worked during the day, 86% with a 12-hour shift, and 62% have two or more jobs in other health services. About 80% of the workers did not have relevant comorbidities (which are risk factors for the worsening of COVID-19).

Table I - Socio-demographic, clinical and epidemiological profile of investigated healthcare workers exposed to SARS-CoV-2-infected patients in the Clinical Hospital.

		N	%
Gender	Women	40	80
	Men	10	20
Age range (years)	20-30 years	2	4
	31-40 years	15	30
	41-50 years	13	26
	Above 51 years	20	40
Schoolarity	Technical level	28	56
	University level	22	44
Occupation	Nursing Technician	23	46
	Nurse	12	24
	Laboratory technician	5	10
	Pharmaceutical	3	6
	Physicians, including residents	3	6
	Physiotherapist	2	4
	Speech Therapist	1	2
	Nutritionist	1	2
Work shift	Day	32	64
	Night	18	36
Hours of work	6h/day	5	10
	8h/day	2	4
	12h/day	43	86

Workplaces	Only 1	19	38
	2 or more	31	62
Risk factors	No comorbidity	40	80
	Cardiovascular disease / hypertension	6	12
	Asthma / Pneumopathy	2	4
	Diabetes Mellitus	1	2
	Obesity	1	2

Bloods of the voluntaries (all of them) were collected on the same day, and they were not symptomatic in this phase. Based on any anti-SARS-CoV-2 positive test, rt-PCR and/or Immunoglobulin, (performed in a period from six months before blood collection) the healthcare workers of this study were divided into two groups, the first group (28 / 56%) was composed of workers who tested positive for infection by SARS-CoV-2. The second group (22 / 44%) was composed of workers who were negative on all tests. Furthermore, about one month before laboratory assays, in the positive healthcare workers group, some people (53.6%) presented symptoms such as diarrhea (24%), sore throat (22%), cough (18%), fever (14%), dyspnea, and others (12%). Few symptoms, similar to flu, were also observed in 23% of negative healthcare workers. Aiming to evaluate the serological response against the SARS-CoV-2 virus, we performed two quick tests (for immunoglobulins anti-SARS-CoV-2 detection). The time interval between two tests was two months. There was an increase in frequency of positive IgG anti-SARS-CoV-2 blood testes overtime (Table II) and a decrease in IgM-positive tests.

Table II: Immunoglobulins anti-SARS-CoV-2 present in serology of the positive healthcare professionals.

1st analysis				2nd analysis		
Immunoglobulin	IgM	IgG	IgM + IgG	IgM	IgG	IgM + IgG
Healthcare workers	28.6%	50%	21.4%	7.2%	71.4%	21.4%

The interval between analysis was two months.

The blood parameters of healthcare workers were evaluated by comparing the results of positive and negative individuals. Individuals with serology positive to the previous infection by SARS-CoV-2 presented a mild but significant increase in the levels of hematocrit, total

leukocytes, neutrophils, and lymphocytes (Table III), although the results were within reference values. Likewise, CRP and fibrinogen were also increased in positive healthcare workers when compared to the negative group (Table III).

Table III: Analysis of blood and biochemical parameters of health professionals.

	Reference values	Healthcare workers		<i>p value</i>
		(+)	(-)	
Hematological parameters				
Hematocrit (%)	36 - 54	41.5 ± 3.4	39.3 ± 1.5	0.03
Total Leucocytes (number)	4,000 – 11,000	8,402 ± 1,494	7,379 ± 1,013	0.03
Neutrophils (%)	50 - 70	55.58 ± 4.6	51.26 ± 5.7	0.03
Lymphocytes (%)	25 - 45	38.3 ± 7.5	31.87 ± 7.6	0.002
Biochemical parameters				
C-reactive Protein (mg/dL)	0 – 0.5	4.7 ± 2.6	2.4 ± 1.4	0.01
Fibrinogen (mg/dL)	200 - 400	366 ± 77	303 ± 57	0.007

(+) positive healthcare workers; (-) negative healthcare workers.

COVID-19 is an expressive immunological disease and inflammatory cytokines, associated with T lymphocytes response can lead to severe disease. We investigated immunological parameters in healthcare workers to evaluate if the immunological response could be changed after the continuous exposition. Regarding the results of cytokine production, we used a negative control (samples from volunteers which no are healthcare workers) to compare values among samples. We observed that TNF- α , IL-6, and IL-17 cytokines produced by negative controls were lower in relation to the healthcare professionals. In this sense, statistical differences were observed to IL-6 (Figure 1). Furthermore, we also could observe an increase in IL-17 values in the positive healthcare workers ($p = 0.04$) in relation to negative healthcare workers (Figure 1).

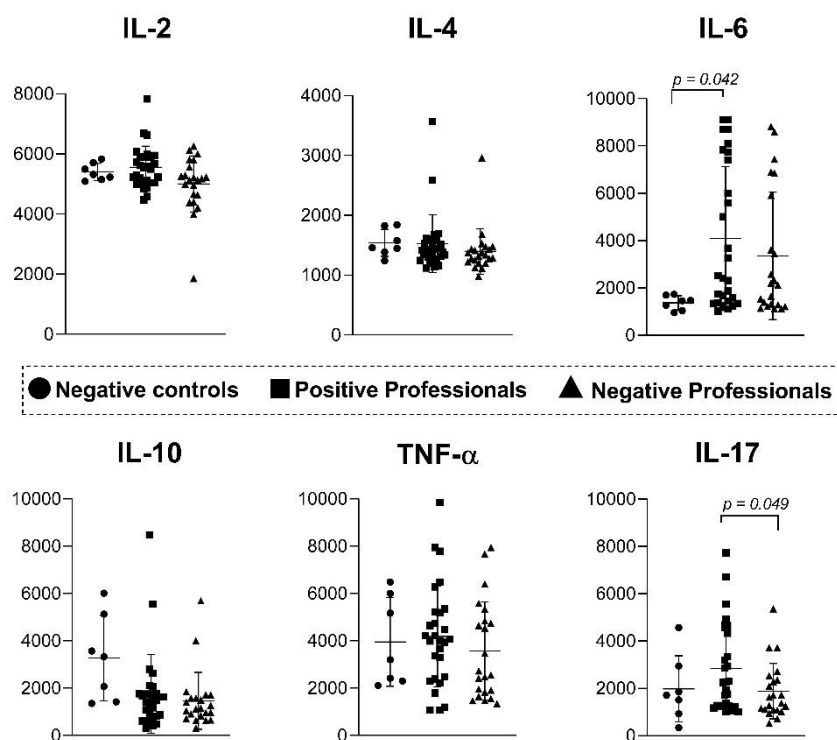


Fig. 1 The levels of Th1, Th2, and Th17 cytokines measured in the healthcare workers and volunteers sera. Vertical bars represent a mean of the 57 voluntaries. Significant values were found in IL-6 and IL-17 cytokine to positive professionals. Values are represented as mean $\pm$ standard deviation.

The immunophenotyping results showed that CD56⁺ T lymphocytes were elevated in the positive group, reinforcing the counts observed in the hematological parameters (high lymphocyte values). However, CD19⁺, CD4⁺, and CD8⁺ lymphocytes subsets did not show statistical differences between groups (Figure 2).

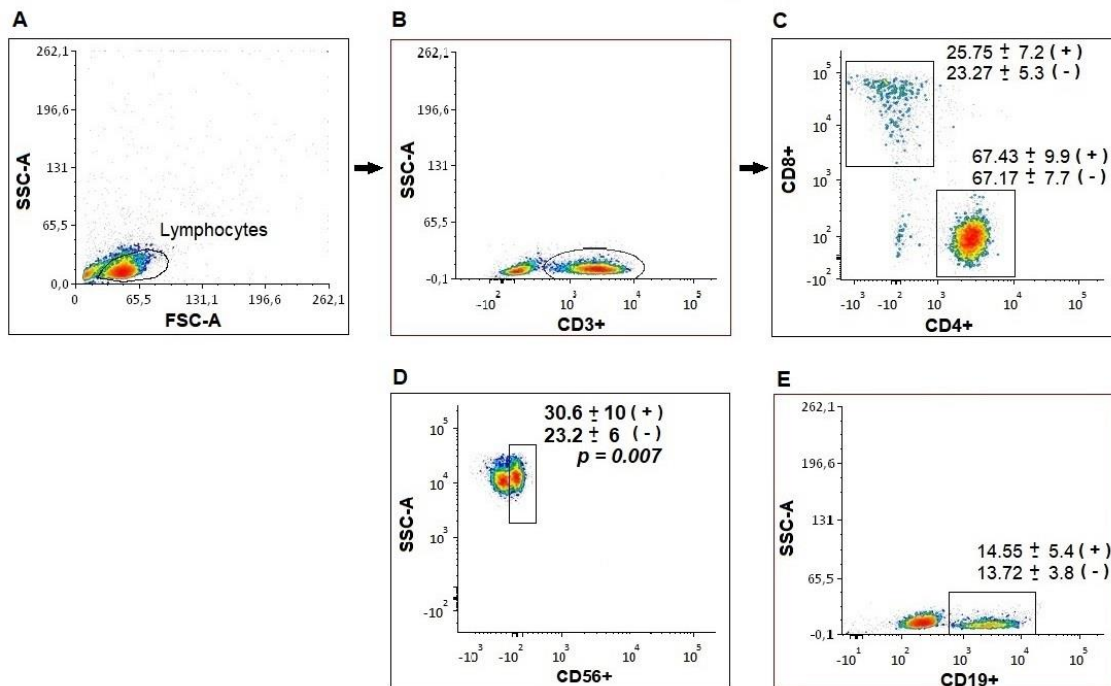


Fig. 2 Immunophenotyping of lymphocytes from healthcare workers. The average of each dot plot was represented in perceptual values. **A** – Dot plot with lymphocytes gate definition. **B** – Isolation of CD3⁺ T lymphocytes population. **C** – Isolation of CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes population. **D** and **E** – Isolation of Natural killers and B lymphocytes population, respectively. The figures represent an average of 50 volunteers. Symbols on graphics (+) and (-) are related to positive and negative healthcare workers, respectively.

Results about intracellular cytokines showed that both CD4⁺ and CD56⁺ lymphocytes produced IL-10 and IL-17 in statistical values in positive healthcare professionals, being more enhanced in CD56⁺ cells (Figure 3).

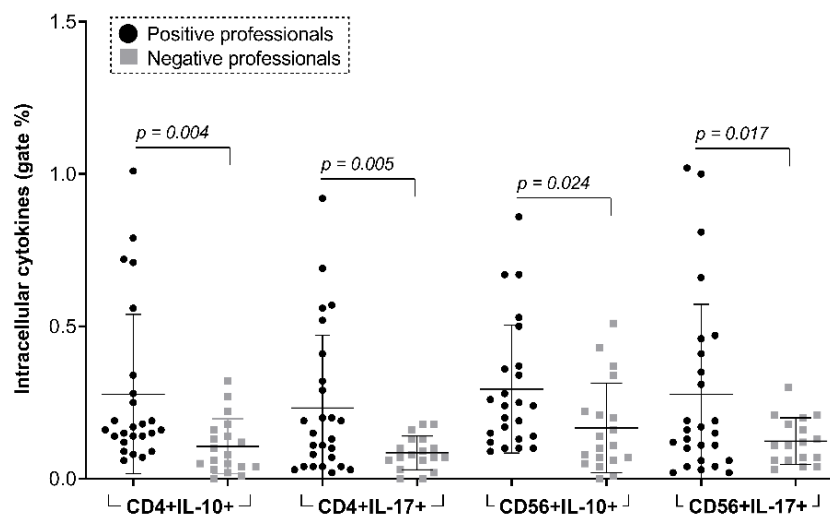


Fig 3 Immunophenotyping of intracellular cytokines from CD4⁺ and CD56⁺ lymphocytes of the healthcare workers. lack scatters means positive healthcare workers and gray scatters are negative healthcare workers. The values represent about 50 volunteers. *P* values are represented in the graph.

The pathways investigation was performed to understand the immune activation in T lymphocytes of virus-exposed and not virus-exposed healthcare workers. The Th2/Th17/Th22 was the most predominant immune response observed by positive healthcare workers (Figure 4). Through STAT6, STAT3, and FOXO4 it could observe that this immune response profile is high in relation to STAT4 (Th1 response) and JAK2 (a pleiotropic gene to both Th1 and Th17 responses).

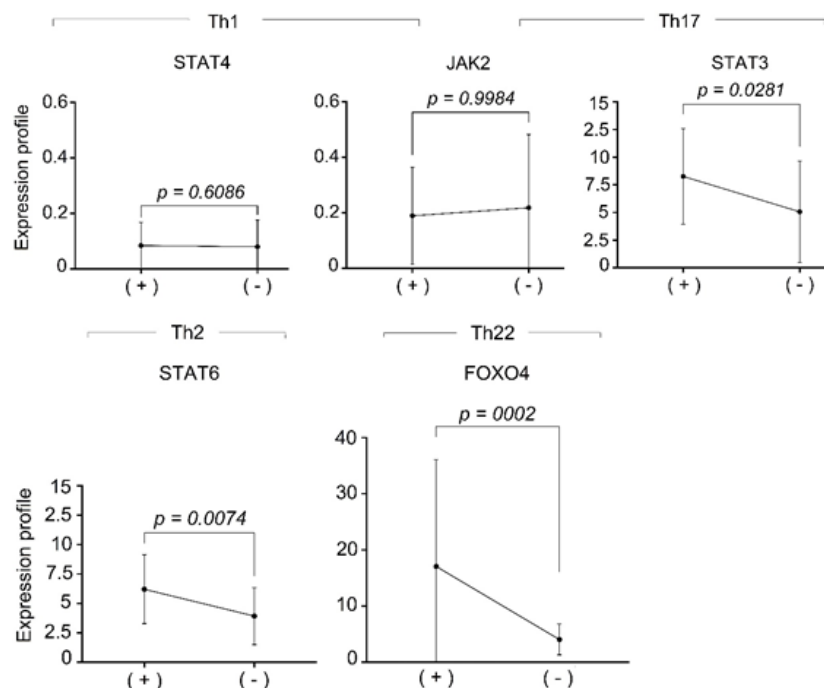


Fig. 4 Results about immune response pathways in 50 healthcare workers. Genes associated with Th2/Th17/Th22 response (STAT3, STAT6, and FOXO4) were observed in high values to positive healthcare workers. Values of p were found through Mann-Whitey test and are on graphics. Symbols on graphics (+) and (-) are related to positive and negative healthcare professionals, respectively.

Since we observed a group of exposed healthcare workers that did not contract SARS-COV-2 infection, we decided to investigate if genetic polymorphisms in immunological genes associated with an inflammatory response to the virus were enhanced in one of the groups. In fact, the possible immune polymorphisms in healthcare workers were evaluated to discard the possibility of the genetic changes in the population of this study. Allelic frequencies for each polymorphism were made in accordance with the Hardy-Weinberg balance and are shown in Table IV.

Table IV - Hardy-Weinberg balance to the IL-6, IL-10, IL-1 β , IL-17 and TNF- α polymorphisms among healthcare workers.

Interleukins	Healthcare workers (negatives)		Healthcare workers (positives)	
	X ²	<i>p</i> -value	X ²	<i>p</i> -value
IL-6	0.3835	0.5357	0.6625	0.4157
IL-10	0.1592	0.6899	2.7778	0.0956
IL-1β	1.5774	0.2091	0.2681	0.6046
IL-17	0.8400	0.3594	2.4931	0.1143
TNF-α	0.0021	0.9631	0.2870	0.5922

The most common genotypes found among interleukins polymorphisms were GG from IL-6 (64.2%), AA from IL-10 (75%), TC from IL-1 β (57.1%), AA from IL-17 (46.4%), GG from TNF- α (64.2%) in positive healthcare professionals. Negative healthcare professionals presented high polymorphism in GG IL-6 (72.7%), GA from IL-10 (81.8%), TT from IL-1 β (50%), AA from IL-17 (63.6%), and GG from TNF- α (59%). However, no statistical differences were observed (Table V).

Table V. Analysis of associations between IL-6, IL-10, IL-1 β , IL-17 and TNF- α polymorphisms in healthcare workers.

[illegible]

AA	13	14		1	ND	ND
AG	12	7	1.0000	0.5417	0.1632-1.7975	0.4804
GG	0	0		-	-	-
AG/GG	-	-		-	-	-
Trend Test						
Allele						
A	38	35		1	ND	ND
G	0	0		-	-	-
Genotype TNF-α						
GG	18	13		1	ND	ND
GA	6	7	0.7909	16.154	0.4389-5.9456	0.6950
AA	1	1		13.846	-	0.6070
GA/AA	7	8		15.824	0.4579-5.4690	0.6805
Trend Test						
Allele						
G	42	33		1	ND	ND
A	8	9		14.318	0.4981-4.1150	0.6902

P, G test (Williams); OR - Odds Ratio; CI - Confidence interval; ND – Not Determined, HW – Healthcare workers.

4. DISCUSSION

This is a study with healthcare workers, exposed to the COVID-19 pandemic, performed in Brazil a period before the start of vaccination against SARS-CoV-2. In 2020, those workers with different actions and abilities helped the public and private health units to treat and control the disease, saving a lot of lives. Similar to our results, other studies with healthcare workers have shown a high number of women in the front line of health services, above 50 years old, and with technical training levels. Such findings are reinforced by the great prevalence of nursing due to the degree of dependence on patient care when compared to other professional categories (Lombardi et al., 2020; Teixeira et al., 2020; Baumann et al., 2020; Pasila and Kääriäinen, 2017).

Studies report that a long working day in the health services can compromise the surveillance of patients, reflecting negatively on the assistance offered, increasing the risk of adverse events and contamination of workers (Magno et al., 2020; Pasila et al., 2017). Here, we could observe that most healthcare workers work 12-hour shifts during the day and have two or more employment relationships. This routine can be associated with low salary payments in many health professional categories in Brazil (Andrade et al., 2017; Dall'Ora et al., 2015). In addition, some surveys show that healthcare workers have reported being afraid of hospital contamination, widespread shortages, and frequent reuse of personal protective

equipment during the COVID-19 pandemic (Tabah et al., 2020; Hoernke et al., 2021).

The clinical manifestations of COVID-19 can vary from asymptomatic conditions to symptoms such as fever, dry cough, fatigue, severe dyspnea, and in atypical cases, dermatological reactions (Niquini, 2020; WHO, 2020). In addition to these manifestations, digestive disorders have been reported in less severe cases, with diarrhea present in the initial phase of the disease, which may last from 1 to 14 days (Guan, 2020; WHO, 2020). Approximately half of the healthcare workers investigated here reported flu-like and other symptoms as a possible sign of contamination. Similar to our findings, some studies have been demonstrating that, when the healthcare workers report any symptoms, the diarrhea stood out (Guan, 2020; Niquini, 2020; WHO, 2020).

Studies have been indicating that the presence of COVID-19 symptoms is needed to induce a detectable immune humoral response (for both cytokines and immunoglobulins) and its serological prevalence (Lan et al., 2020; Long et al., 2020; Mardani et al., 2020; Wu et al., 2020b). Here, the presence of both IgM and IgG in positive healthcare workers exposed to the virus, in the hospital, is corroborated by the findings of Ko et al. (2020). They showed that the majority of mild cases of COVID-19 produced detectable antibodies such as IgG⁺ after the symptomatic period. Rusakaniko et al. (2021) showed that the major exposure to SAR-CoV-2 occurred across the spectrum of COVID-19 patient-facing staff, such as nurses and nursing assistants with the highest seroprevalence. Our findings support a preoccupation related to negative workers who are exposed daily yet do not show signs of infection. Al-Zoubi et al. (2020) also showed similar results when investigating 370 healthcare workers, a majority of whom were nurses followed by physicians and other personnel and did not find contamination among them. In fact, some studies with healthcare workers have shown a high prevalence of asymptomatic individuals, with a progressive decrease of IgG titers and opening an immunological window to reinfection (Al-Zoubi et al., 2020; Korth et al., 2020; Mandić-Rajčević et al., 2020; Zhao et al., 2020).

Laboratory results showed an important inflammatory status to the positive healthcare workers. The increase of fibrinogen, C-reactive Protein, hematocrit, leukocytes, neutrophils,

and lymphocytes (especially Natural Killer cells) showed a possible inflammatory persistence associated with the daily virus exposition. In fact, an increase in fibrinogen levels can be a predisposing factor for increased blood hypercoagulation and fibrin formation, functioning as an inflammatory marker for risk of thrombosis and as an indicator of tissue inflammation (Connors and Jerrold, 2020; Iba et al., 2020). In addition, the presence of neutrophils at high values in blood and lung tissue due to SARS-CoV-2 presence can promote inflammatory damage in target organs (Tay et al., 2020; Wang et al., 2020b).

Host genetics as well as changes in immune status or environment can promote different illnesses. The polymorphism analyses of individuals in this study aimed to understand if genetic conditions, such as upregulation or downregulation of cytokines, could promote a specific immune response (McAleer and Kolls, 2014). Our results showed that occurred no genetic change in the analyzed genes (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17A, and TNF- α), and, possibly, the inflammatory findings of healthcare workers were specifically associated with the virus exposition.

Interestingly, when we associated the laboratory findings with the immunological response (by immunophenotyping and immune pathways), we can observe an inflammatory status in the positive healthcare workers, triggered by high production of IL-2, IL-6, TNF- α , and IL-17 associated to highlighted Th2/Th17/Th22 response.

Our results showed a high prevalence of NKT cells in the blood of positive healthcare workers. Those cells are involved in antiviral responses, helping to control viral load, and boosting the innate and adaptive immune response (Diana and Lehuen, 2009; Vogt and Mattner, 2021). Beyond, activated NKT cells can rapidly secrete high amounts of Th1, Th2, Th10, or Th17 polarizing cytokines and chemokines (Constantinides and Bendelac, 2013; Sag et al., 2014; Cameron and Godfrey, 2018). However, NKT cells aberrant activation can also perpetuate tissue damage (Mattner, 2013) such as observed in COVID-19 patients.

The IL-17 cytokine, found in high values in positive healthcare professionals, also must be highlighted due to its immunological mechanisms in respiratory illness (promoted by allergic reactions or exogenous antigens). In asthma, IL-17 mediates neutrophil recruitment to the

lungs, in COVID-19 promotes viral persistence by protecting virus-infected cells from apoptosis and can induce hyperinflammation (Megna et al., 2020; Peiser, 2013; Sadeghi et al., 2021). In experimental and human models, Th17 cytokine is upregulated in laboratory-confirmed A influenza (H3N2) and Parainfluenza virus, indicating severe disease with respiratory involvement, and associated with modulation of inflammation and clearance of influenza infection (Kudva et al., 2011; Bermejo-Martin et al., 2009; Antalis et al., 2019).

Together, these findings are the first evidence set of possible lung inflammation in healthcare workers due to their daily virus exposition. Furthermore, the Th2/Th17/Th22 response is a known allergic response, associated with individuals who present asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) leading to an increase in fibrinogen and mucins production in pulmonary tissue (Alcorn et al., 2010; Zenewicz, 2018).

5. CONCLUSION

Although this study was performed before the vaccination period, nowadays the Brazilian reality still shows low antigen testing in the population. Moreover, daily a lot of workers use crowded subways and buses to move to their jobs and are exposed to SARS-CoV-2 infection. Likewise, due to the asymptomatic evolution of the disease, the majority of those people do not suspect that may be infected by the virus and, consequently, cause transmission to their patients. Furthermore, recurrent laboratory and immunological investigations, as performed here, can be adopted in healthcare services to help workers (exposed to patients infected with SARS-CoV-2), as prevention therapy in those individuals. Due to the results observed in this study, some investigations should be performed to evaluate if the high exposure to the antigen results in lung tissue inflammation or chronic activation of the immune system in this target group.

Acknowledgments: We thank all healthcare professionals for agreeing to our study and helping us with their experience in hospital care. In addition, to the Clinical Hospital by Federal University of Pernambuco for the technical assistance and laboratory tests performed.

Author contributions

RCAA, BRSB, GASS, and GFS: methodology, writing (original draft), data curation, formal analysis; EBS, DRCS, AVN, ELSL, BOS, LPOL, AMV, AGBN, BFSM, AJDS, THAO, BMC, MTCM: methodology, data curation and formal analysis; IWAS, EBCJ, ACF, and CMLM: project administration, conceptualization, supervision, formal analysis, and writing (review and editing).

REFERENCES

- ALCORN JF, CROWE CR, KOLLS JK. 2010. TH17 cells in asthma and COPD. *Annual Review of Physiology*, 72: 495–516. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135926>
- AL-ZOUBI NA, OBEIDAT BR, AL-GHAZO MA, HAYAJNEH WA, ALOMARI AH, MAZAHREH TS, AL-FAOURI IG, OBEIDAT K, ISSA AB, ALESHAWI A. 2020. Prevalence of positive COVID-19 among asymptomatic health care workers who care patients infected with the novel coronavirus: A retrospective study. *Annals of Medicine and Surgery*, 57, 14-16. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2020.06.038>
- ANDRADE JM, ASSUNÇÃO AA, & ABREU MN. 2017. Long working hours in the healthcare system of the Belo Horizonte municipality, Brazil: a population-based cross-sectional survey. *Human resources for health*, 15:1-30. <https://doi.org/10.1186/s12960-017-0203-6>
- ANTALIS E, SPATHIS A, KOTTARIDI C, KOSSYVAKIS A, PASTELLAS K, TSAKALOS K, MENTIS A, KROUPIS C, TSIODRAS S. 2019. Th17 serum cytokines in relation to laboratory-confirmed respiratory viral infection: A pilot study. *Journal of Medical Virology* 91:963-971 doi: 10.1002/jmv.25406.
- ARMAN A, YILMAZ B, COKER A, INANC N, DİRESKENELİ H. 2006. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RN) and interleukin-1B gene polymorphisms in Turkish patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 24: 643-648.
- ARONS MM, HATFIELD KM, REDDY SC, KIMBALL A, JAMES A, JACOBS JR, TAYLOR J, SPICER K, BARDOSSY AC, OAKLEY LP, et al., Public Health–Seattle and King County and CDC COVID-19 Investigation Team. 2020. Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility. *The New England journal of medicine*, 2020; 382,22: 2081. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2008457>

BAUMANN A, HUNSBERGER M, CREA-ARSENIO M, AKHTAR-DANESH N. 2018. Policy to practice: Investment in transitioning new graduate nurses to the workplace. *Journal of nursing management*, 26(4), 373-381. <https://doi.org/10.1111/jonm.12540>

BERMEJO-MARTIN JF, ORTIZ DE LEJARAZU R, PUMAROLA T, et al. 2019. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Critical Care*, 13(6):R201.

BORRONI B, ARCHETTI S, AGOSTI C, AKKAWI N, BRAMBILLA C, CAIMI L, CALTAGIRONE C, DI LUCA M, PADOVANI A. 2004. Intronic CYP46 polymorphism along with ApoE genotype in sporadic Alzheimer disease: from risk factors to disease modulators. *Neurobiology of aging*, 25(6), 747-751. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.08.004>

BUITRAGO-GARCIA D, EGLI-GANY D, COUNOTTE MJ, HOSSMANN S, IMERI H, IPEKCI AM, SALANTI G, LOW N. 2020. Occurrence and transmission potential of asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS medicine*, 17(9), e1003346. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003346>

CABRERA M, SHAW MA, SHARPLES C, WILLIAMS H, CASTES M, CONVIT J, BLACKWELL JM. 1995. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine*, 182(5), 1259-1264. <https://doi.org/10.1084/jem.182.5.1259>

CAMERON, G., AND GODFREY, D. I. 2018. Differential Surface Phenotype and Context-Dependent Reactivity of Functionally Diverse NKT Cells. *Immunology Cell Biology*. 96:759–771. doi: 10.1111/imcb.12034

CAVET J, MIDDLETON PG, SEGALL M, NOREEN H, DAVIES SM, DICKINSON AM. 1999. Recipient Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10 Gene Polymorphisms Associate With Early Mortality and Acute Graft-Versus-Host Disease Severity in HLA-Matched Sibling Bone Marrow Transplants. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 94(11), 3941-3946.

CHAN JF, YUAN S, KOK KH, TO KK, CHU H, YANG J, XING F, LIU J, YIP CC, POON RW, et al., 2020. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The lancet*, 395(10223), 514-523. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9)

CONNORS JM, LEVY JH. 2020. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 135(23), 2033-2040. <https://doi.org/10.1182/blood.2020006000>

CONSTANTINIDES, M. G., AND BENDELAC, A. 2013. Transcriptional Regulation of the NKT Cell Lineage. *Current Opinion Immunology*, 25:161–167. doi: 10.1016/j.coi.2013.01.003

DALL'ORA C, GRIFFITHS P, BALL J, SIMON M, AIKEN LH. 2015. Association of 12 h shifts and nurses' job satisfaction, burnout and intention to leave: findings from a cross-sectional study of 12 European countries. *BMJ open*, 5(9), e008331. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-008331>

DE SOUZA SILVA GA, DA SILVA SP, DA COSTA MAS, DA SILVA AR, DE VASCONCELOS ALVES RR, ÂNGELO MENDES TENÓRIO FDC, DA SILVA MELO AR, DE FREITAS AC, LAGOS DE MELO CM. 2020. SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 infections in pregnancy and fetal development. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 101846. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.101846>

DIANA J, LEHUEN A. 2009. NKT cells: friend or foe during viral infections? *European Journal of Immunology*. 39:3283-91. doi: 10.1002/eji.200939800.

EYERICH S, EYERICH K, PENNINO D, CARBONE T, NASORRI F, PALLOTTA S, CIANFARANI F, ODORISIO T, TRAILD-HOFFMANN C, BEHRENDT H, et al., 2009. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *The Journal of clinical investigation*, 119(12), 3573-3585. <https://doi.org/10.1172/JCI40202>

FURUKAWA NW, BROOKS JT, SOBEL, J. 2020. Evidence supporting transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 while presymptomatic or asymptomatic. *Emerging infectious diseases*, 26(7). <https://doi.org/10.3201/eid2607.201595>

GORBALENYA AE, et al. 2020. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses—a statement of the Coronavirus Study Group. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862>

GUAN WJ, LIANG WH, ZHAO Y, LIANG HR, CHEN ZS, LI YM, LIU XQ, CHEN RC, TANG

CL, WANG T, et al., 2020. Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis. *European Respiratory Journal*, 55(5).
<https://doi.org/10.1183/13993003.00547-2020>

HOERNKE K, DJELLOULI N, ANDREWS L, LEWIS-JACKSON S, MANBY L, MARTIN S, VANDERSLOTT S, VINDROLA-PADROS C. 2021. Frontline healthcare workers' experiences with personal protective equipment during the COVID-19 pandemic in the UK: a rapid qualitative appraisal. *BMJ open*, 11(1), e046199.

IBA T, LEVY JH, CONNORS JM, WARKENTIN TE, THACHIL J, LEVI M. 2020. The unique characteristics of COVID-19 coagulopathy. *Critical Care*, 24(1), 1-8.
<https://doi.org/10.1186/s13054-020-03077-0>

KO JH, JOO EJ, PARK SJ, BAEK JY, KIM WD, JEE J, KIM CJ, JEONG C, KIM YJ, SHON HJ, et al., 2020. Neutralizing antibody production in asymptomatic and mild COVID-19 patients, in comparison with pneumonic COVID-19 patients. *Journal of clinical medicine*, 9(7), 2268. <https://doi.org/10.3390/jcm9072268>

KORTH J, WILDE B, DOLFF S, ANASTASIOU OE, KRAWCZYK A, JAHN M, CORDES S, ROSS B, ESSER S, LINDEMANN M, et al., 2020. SARS-CoV-2-specific antibody detection in healthcare workers in Germany with direct contact to COVID-19 patients. *Journal of Clinical Virology*, 128, 104437. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104437>

Kudva A, Scheller EV, Robinson KM, et al. Influenza A inhibits Th17-mediated host defense against bacterial pneumonia in mice. *J Immunol*. 2011;186(3):1666-1674.

LAN L, XU D, YE G, XIA C, WANG S, LI Y, XU H. 2020. Positive RT-PCR test results in patients recovered from COVID-19. *Jama*, 323(15), 1502-1503.
<https://doi.org/10.1001/jama.2020.2783>

LEWKOWICZ N, KUR B, KURNATOWSKA A, TCHORZEWSKI H, LEWKOWICZ P. 2011. Expression of Th1/Th2/Th3/Th17-related genes in recurrent aphthous ulcers. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 59(5), 399-406. <https://doi.org/10.1007/s00005-011-0134-1>

LI Q, GUAN X, WU P, WANG X, ZHOU L, TONG Y, REN R, LEUNG KSM, LAU EHY, WONG JY, et al., 2020a. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel

coronavirus–infected pneumonia. *New England journal of medicine*.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>

LI Q, GUAN X, WU P, WANG X, ZHOU L, TONG Y, REN R, LEUNG KSM, LAU EHY, WONG JY, et al. 2020b. Asymptomatic and human-to-human transmission of SARS-CoV-2 in a 2-family cluster, Xuzhou, China. *Emerging infectious diseases*, 26(7), 1626.

<https://doi.org/10.3201/eid2607.200718>

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.

<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

LOMBARDI A, CONSONNI D, CARUGNO M, BOZZI G, MANGIONI D, MUSCATELLO A, CASTELLI V, PALOMBA E, CANTÙ AP, CERIOTTI F, et al. 2020. Characteristics of 1573 healthcare workers who underwent nasopharyngeal swab testing for SARS-CoV-2 in Milan, Lombardy, Italy. *Clinical microbiology and infection*, 26(10), 1413-e9.

<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.06.013>

LONG QX, TANG XJ, SHI QL, LI Q, DENG HJ, YUAN J, HU JL, XU W, ZHANG Y, LV FJ, et al. 2020. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nature medicine*, 26(8), 1200-1204.

<https://doi.org/10.1038/s41591-020-0965-6>

LU H, STRATTON CW, TANG YW. 2020a. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: the mystery and the miracle. *Journal of medical virology*, 92(4), 401-402.

<https://doi.org/10.1002/jmv.25678>

MAGNO L, ROSSI TA, MENDONÇA-LIMA FW, SANTOS CCD, CAMPOS GB, MARQUES LM, PEREIRA M, PRADO NMBL, DOURADO I. 2020. Challenges and proposals for scaling up COVID-19 testing and diagnosis in Brazil. *Ciencia & saude coletiva*, 25, 3355-3364.

<https://doi.org/10.1590/1413-81232020259.17812020>

MANDIĆ-RAJČEVIĆ S, MASCI F, CRESPI E, FRANCHETTI S, LONGO A, BOLLINA I, BOSELLI L. 2020. Contact tracing and isolation of asymptomatic spreaders to successfully control the COVID-19 epidemic among healthcare workers in Milan (Italy). *medRxiv*.

<https://doi.org/10.1101/2020.05.03.20082818>

MARDANI R, AHMADI VASMEHJANI A, ZALI F, GHOLAMI A, MOUSAVI NASAB SD,

KAGHAZIAN H, KAVIANI M, AHMADI N. 2020. Laboratory parameters in detection of COVID-19 patients with positive RT-PCR; a diagnostic accuracy study. *Archives of academic emergency medicine*, 8(1).

MATTNER, J. 2013. Natural killer T (NKT) Cells in Autoimmune Hepatitis. *Current Opinion in Immunology*, 25:697–703. doi: 10.1016/j.coi.2013.09.008

MCALEER JP, KOLLS JK. 2014. Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense. *Immunological reviews*, 260(1), 129-144. <https://doi.org/10.1111/imr.12183>

MEGNA M, NAPOLITANO M, FABBROCINI G. 2020. May IL-17 have a role in COVID-19 infection? *Medical hypotheses*, 140, 109749.
<https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.mehy.2020.109749>

MELO CML, SILVA GAS, MELO ARS, FREITAS AC. 2020. COVID-19 pandemic outbreak: the Brazilian reality from the first case to the collapse of health services. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92(4). <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020200709>

MERAD, M, MARTIN, JC. 2020. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 20(6), 355-362.
<https://doi.org/10.1038/s41577-020-0331-4>

MOUSSET CM, HOBO W, WOESTENENK R, PREIJERS F, DOLSTRA H, & VAN DER WAART AB. 2019. Comprehensive phenotyping of T cells using flow cytometry. *Cytometry Part A*, 95(6), 647-654. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23724>

NIQUINI RP, LANA RM, PACHECO AG, CRUZ OG, COELHO FC, CARVALHO LM, VILLELA DAM, GOMES MFDC, BASTOS LS. 2020. Description and comparison of demographic characteristics and comorbidities in SARI from COVID-19, SARI from influenza, and the Brazilian general population. *Cadernos de saude publica*, 36, e00149420.
<https://doi.org/10.1590/0102-311x00149420>

PEISER M. 2013. Role of Th17 cells in skin inflammation of allergic contact dermatitis. *Clinical and developmental immunology*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/261037>

PARK SY, LEE CJ, CHOI JH, KIM JH, KIM JW, KIM JY, NAM JS. 2019a. The JAK2/STAT3/CCND2 Axis promotes colorectal Cancer stem cell persistence and

radioresistance. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 1-18.
<https://doi.org/10.1186/s13046-019-1405-7>

PARK SJ, KIM H, KIM SH, JOE EH, JOU I. 2019b. Epigenetic downregulation of STAT6 increases HIF-1 α expression via mTOR/S6K/S6, leading to enhanced hypoxic viability of glioma cells. *Acta neuropathologica communications*, 7(1), 1-19.
<https://doi.org/10.1186/s40478-019-0798-z>

PASILA K, ELO S, KÄÄRIÄINEN M. 2017. Newly graduated nurses' orientation experiences: A systematic review of qualitative studies. *International Journal of Nursing Studies*, 71, 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2017.02.021>

RUSAKANIKO S, SIBANDA EN, MDULUZA T, TAGWIREYI P, DHLAMINI Z, NDHLOVU CE, CHANDIWANA P, CHIWAMBUTSA S, LIM RM, SCOTT F, et al., 2021. SARS-CoV-2 Serological testing in frontline health workers in Zimbabwe. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(3), e0009254.

SADEGHI A, TAHMASEBI S, MAHMOOD A, KUZNETSOVA M, VALIZADEH H, TAGHIZADIEH A, NAZEMIYEH M, AGHEBATI-MALEKI L, JADIDI-NIARAGH F, ABBASPOUR-AGHDAM S, 2021. Th17 and Treg cells function in SARS-CoV2 patients compared with healthy controls. *Journal of cellular physiology*, 236:2829-2839.
<https://doi.org/10.1002/jcp.30047>

SAG D, KRAUSE P, HEDRICK CC, KRONENBERG M, WINGENDER G. 2014. IL-10-producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset. *Journal of Clinical Investigation*, 124:3725-40. doi: 10.1172/JCI72308.

SU L, LIU X, CHAI N, LV L, WANG R, LI X, NIE Y, SHI Y, FAN D. 2014. The transcription factor FOXO4 is downregulated and inhibits tumor proliferation and metastasis in gastric cancer. *BMC cancer*, 14(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-378>

SUÁREZ-GARCÍA I, MARTÍNEZ DE ARAMAYONA LÓPEZ MJ, SÁEZ VICENTE A, LOBO ABASCAL P. 2020. SARS-CoV-2 infection among healthcare workers in a hospital in Madrid, Spain. *Journal of Hospital Infection*, 106(2), 357-363.
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.07.020>

TABAH A, RAMANAN M, LAUPLAND KB, BUETTI N, CORTEGIANI A, MELLINGHOFF J,

CONWAY MORRIS A, CAMPOROTA L, ZAPPELLA N, ELHADI M, et al., 2020. Personal protective equipment and intensive care unit healthcare worker safety in the COVID-19 era (PPE-SAFE): an international survey. *Journal of critical care*, 59, 70-75.

TAY MZ, POH CM, RÉNIA L, MACARY PA, NG LFP. 2020. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation, and intervention. *Nature Reviews Immunology*, 20(6), 363-374. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>

TEIXEIRA CFS, SOARES CM, SOUZA EA, LISBOA ES, PINTO ICM, ANDRADE LR, ESPIRIDIDÃO MA. 2020. The health of healthcare professionals coping with the Covid-19 pandemic. *Ciência & Saúde Coletiva*, 25, 3465-3474. <https://doi.org/10.1590/1413-81232020259.19562020>

UNFRIED G, BÖCSKÖR S, ENDLER G, NAGELE F, HUBER JC, TEMPFER CB. 2003. A polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and idiopathic recurrent miscarriage. *Human reproduction*, 18(2), 267-270. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg094>

USUI T, NISHIKOMORI R, KITANI A, STROBER W. 2003. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12R β 2 chain or T-bet. *Immunity*, 18(3), 415-428. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00057-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00057-8)

VOGT S, MATTNER J. 2021. NKT Cells Contribute to the Control of Microbial Infections. *Frontiers in Cell Infection and Microbiology*, 14:718350. doi: 10.3389/fcimb.2021.718350.

WANG D, HU B, HU C, ZHU F, LIU X, ZHANG J, WANG B, XIANG H, CHENG Z, XIONG Y. 2020a. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China. *Jama*, 323(11), 1061-1069. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>

WANG J, JIANG M, CHEN X, MONTANER LJ. 2020. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *Journal of leukocyte biology*, 108(1), 17-41. <https://doi.org/10.1002/JLB.3COVR0520-272R>

World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) situation reports. Date last accessed: 08 sep 2020. Available from: <https://who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/>. Accessed 08 May 2021

- WU X, ZENG Z, CHEN B, YU J, XUE L, HAO Y, CHEN M, SUNG JJ, HU P. 2010. Association between polymorphisms in interleukin-17A and interleukin-17F genes and risks of gastric cancer. *International Journal of Cancer*, 127(1), 86-92. <https://doi.org/10.1002/ijc.25027>
- WU F, WANG A, LIU M, WANG Q, CHEN J, XIA S, et al., 2020. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3566211>
- ZENEWICZ, LA. 2018. IL-22: there is a gap in our knowledge. *ImmunoHorizons*. 2 (6): 198–207. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1800006>
- ZHAO M, TAN Y, PENG Q, HUANG C, GUO Y, LIANG G, ZHU B, HUANG Y, LIU A, WANG Z. 2018. IL-6/STAT3 pathway induced deficiency of RFX1 contributes to Th17-dependent autoimmune diseases via epigenetic regulation. *Nature communications*, 9(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02890-0>
- ZHAO XN, YOU Y, WANG GL, GAO HX, CUI XM, DUAN LJ. 2020. Longitudinal single-cell immune profiling revealed distinct innate immune response in asymptomatic COVID-19 patients. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.09.02.276865>

APÊNDICE D– ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO



An Acad Bras Cienc (2022) 94(3): e20211590 DOI 10.1590/0001-376520220211590
 Anais da Academia Brasileira de Ciências | Annals of the Brazilian Academy of Sciences
 Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690
 www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

HEALTH SCIENCES

Memory elicitation, T-cell response and antibody production: an independent study of an inactivated entire virus vaccine (Coronavac)

GUILHERME ANTONIO DE SOUZA-SILVA, RODRIGO CESAR A. DE AQUINO, GEORON F. DE SOUSA, BÁRBARA RAFAELA S. BARROS, MARÍLLIA RAPHAELLA C.F. DE LIMA, LEONARDO C.O. CRUZ, BIANCA F. SÃO MARCOS, ANNA JÉSSICA D. SILVA, APARECIDA VIRGÍNIA S. TALES, MADI V. DINIZ, MÔNICA MARIA C. LIMA, IGOR W.A. DE SÁ, FÁBIO A.C. RODRIGUES, EDSON B. DE SOUZA, ARIONE V. DO NASCIMENTO, AMANDA M. VIEIRA, BRUNO M. DE CARVALHO, EVÔNIO B. CAMPELO JÚNIOR, ANTONIO C. DE FREITAS, CRISTIANE M.L. DE MELO

Abstract: Health professionals working to mitigate the COVID-19 pandemic are one of the main risk groups for the disease, being prioritized for vaccination. Considering this, the aim of this study was to analyze the immune response of these professionals immunized with Coronavac in the first and second doses. Blood samples were collected after the first and second doses of the vaccine (Coronavac) and used to investigate hematological and biochemical parameters, analysis of immunoglobulin production, cytokines, and gene expression profile, as well as the identification of subsets of immune cells. Post-first dose immunological phenotypic memory (CD27⁺) profiles (T CD4⁺, TCD8⁺ and CD19⁺) showed a significant increase, as did Monocyte APCs (CD80⁺HLA-DR⁺) in relation to the second dose. The cytokines IL-2, IL-6 and IFN- γ showed increased values in relation to the other analyzed cytokines. The Th2/Th17 profile in the second dose was characterized by gene expression analysis. The production of IgM and IgG after vaccination showed statistically significant values in the comparison between doses. Coronavac showed activation of APCs monocytes, memory response of T and B lymphocytes, with immunoglobulins production. This set of responses is characterized by the Th2/Th17 immunological profile.

Key words: Coronavac, health professionals, immunological memory, immunoglobulin production, COVID-19, SARS-CoV-2.

INTRODUCTION

Coronavirus 2019 disease (COVID-19), which emerged in China, is currently considered the most serious outbreak of pneumonia in the last 100 years, affecting more than 200 countries around the world (Li et al. 2020a, Lu et al. 2020, Melo et al. 2020). According to the Johns Hopkins University Center for Systems Science and Engineering (CSSE) COVID-19 Panel, the disease

had generated an estimated 195,767,462 cases and 4,183,074 deaths worldwide (on July 28, 2021), and 19,749,073 cases and 551,835 deaths from Brazil (JHU, 2021).

The transmissibility of COVID-19 is due to the high viral load in the upper respiratory tract, even in asymptomatic patients, which differentiates it from other respiratory diseases (Arons et al. 2020, Li et al. 2020b). Virus propagation occurs through direct contact with contaminated surfaces,

APARECIDA VIRGÍNIA S. TALES⁴

<https://orcid.org/0000-0002-4541-4437>

MADI V. DINIZ⁴

<https://orcid.org/0000-0002-5673-2687>

MÔNICA MARIA C. LIMA⁴

<https://orcid.org/0000-0002-2890-1107>

IGOR WA. DE SÁ⁴

<https://orcid.org/0000-0001-7010-1327>

FÁBIO AUGUSTO C. RODRIGUES⁴

<https://orcid.org/0000-0001-5622-0008>

EDSON B. DE SOUZA⁴

<https://orcid.org/0000-0002-3796-6907>

ARIONE V. DO NASCIMENTO⁴

<https://orcid.org/0000-0002-0547-9708>

AMANDA M. VIEIRA⁴

<https://orcid.org/0000-0001-8140-7299>

BRUNO M. DE CARVALHO⁴

<https://orcid.org/0000-0002-6792-0288>

EVÔNIO B. CAMPELO JÚNIOR^{4*}

<https://orcid.org/0000-0002-9825-9056>

ANTONIO CARLOS DE FREITAS^{4}**

<https://orcid.org/0000-0002-4957-9549>

CRISTIANE M.L. DE MELO^{1,2*}

<https://orcid.org/0000-0002-6831-0163>

¹Federal University of Pernambuco, Laboratory of Immunological and Antitumor Analysis, Department of Antibiotics, Bioscience Center, Av. Prof. Artur de Sá, s/n, Cidade Universitária, 50740-525 Recife, PE, Brazil

²Federal University of Pernambuco, Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Avenida Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

³Federal University of Pernambuco, Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy, Department of Genetics, Bioscience Center, Avenida Reitor Joaquim Amazonas, s/n, Cidade Universitária, 50740-570, Recife, PE, Brazil

⁴Federal University of Pernambuco, Clinical Hospital,

Avenida Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

⁵University of Pernambuco, Institute of Biological Sciences, Rua Amóbio Marquês, 310, Santo Amaro, 50100-130 Recife, PE, Brazil

*equally responsible for this study

**senior investigators of this study

Correspondence to: **Cristiane Moutinho Lagos de Melo**

E-mail: cristiane.moutinho@ufpe.br

Author contributions

Guilherme Antonio de Souza-Silva, Rodrigo Cesar Abreu de Aquino, Georon Ferreira de Sousa and Bárbara Rafaela da Silva Barros contributed to methodology, data acquisition, interpretation and discussion. Marília Raphaela Cabral Fonseca de Lima, Leonardo Carvalho de Oliveira Cruz, Bianca de França São Marcos, Anna Jéssica Duarte Silva contributed to data acquisition. Aparecida Virgínia Soares Tales, Madi Veiga Diniz, Mônica Maria Cavalcante Lima, Igor Wesland Assunção de Sá, Fábio Augusto da Cunha Rodrigues, Edson Barbosa de Souza, Arione Vieira do Nascimento contributed to laboratorial and clinical findings. Amanda Mota Vieira and Bruno Melo de Carvalho contributed to methodology and cytometry data acquisition. Evônio de Barros Campelo Júnior, Antonio Carlos de Freitas and Cristiane Moutinho Lagos de Melo contributed to project administration, discussion of findings and critical review of the manuscript. All authors gave their final approval and agreed with all aspects of the work.



APÊNDICE E– ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO COMO CO-AUTOR

www.jcimcr.org

ISSN 2766-7820

Review Article

Open Access, Volume 2

COVID-19: From viral infection to pulmonary failure

Guilherme Antonio de Souza Silva¹; Suellen Pedrosa da Silva²; Abdênego Rodrigues da Silva²; Georon Ferreira de Sousa¹; Bárbara Rafaela da Silva Barros¹; Rodrigo Cesar Abreu de Aquino³; Igor Wesland Assunção de Sá³; Fábio Augusto da Cunha Rodrigues²; Evônio de Barros Campelo Júnior³; Antonio Carlos de Freitas⁴; Cristiane Moutinho Lagos de Melo^{1*}

¹Laboratory of Immunological and Antitumor Analysis, Department of Antibiotics, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Brazil.

²Laboratory of Protein Biochemistry, Department of Biochemistry, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Brazil.

³Clinical Hospital, Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Brazil.

⁴Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy, Department of Genetics, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Brazil.

*Corresponding Author: Cristiane Moutinho

Lagos de Melo

Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, 50740-525, Recife, Brazil.

Tel/Fax: +55-81-2126-8866;

Email: crismout_melo@hotmail.com

Abstract

SARS-CoV-2 is a virus which promoted a worldwide pandemic outbreak in 2020. The virus is highly infectious and is able to contaminate a lot of people in a short time period. The disease promoted by the virus, named COVID-19, can cause different symptoms such as fever, cough, muscle pain, headache, prostration, diarrhea, neurological complications, dermic manifestations, pulmonary impairment, dyspnea, coagulopathies, organ failure, and death. Here, we show how the infection occurs and the major characteristics observed in the lungs of patients with COVID-19. In addition, we explored the immunological activation in this environment by the virus and some treatments used in the severe phase of the disease.

Keywords: COVID-19; Pulmonary impairment; SARS-CoV-2; Virus; Pandemic.

Received: Mar 15, 2021

Accepted: Apr 20, 2021

Published: Apr 23, 2021

Archived: www.jcimcr.org

Copyright: © Melo CMLD (2021).

Introduction

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), cause of the outbreak of severe pneumonia, called COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) [1], is present in more than 200 countries [2-4]. According to a notification from the COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University, by March 27, 2021, there were a total of 126,280,989 cases and 2,769,934 deaths worldwide [5].

The SARS-CoV-2 is believed to be able to disseminate through contaminated objects, respiratory droplets, and aerosols,

where the virus can be suspended in the air for up to three hours [6,7]. The symptoms are commonly recognized as fever, dry cough, tachypnea, shortness of breath, sore throat, sneezing, nasal congestion, and other symptoms, including severe inflammatory responses with the evolution of cytokine storm, pneumonia, and sepsis [8,9].

Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is the most common complication in patients with COVID-19, with Acute Lung Injury (ALI) being the most serious form of viral infection [10]. Due to the clinical importance associated with the estab-

APÊNDICE F – CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO COMO CO-AUTOR

Livro: Wellington Pinheiro dos Santos, Juliana Carneiro Gomes, Máira Araújo de Santana, Valter Augusto de Freitas Barbosa , " Intelligent Diagnosis of Lung Cancer and Respiratory Diseases ", Bentham Science Publishers (2022). <https://doi.org/10.2174/97898150505091220101>

Capítulo: COVID-19: Clinical, Immunological, and Image Findings from Infection to Post-COVID Syndrome

Page: 76-98 (23).

Intelligent Systems in Radiology

Intelligent Diagnosis of Lung Cancer and Respiratory Diseases

Edited by

Wellington Pinheiro dos Santos

*Federal University of Pernambuco,
Brazil*

Juliana Carneiro Gomes

*Polytechnique School of The University of Pernambuco,
Brazil*

Máira Araújo de Santana

*Polytechnique School of The University of Pernambuco,
Brazil*

&

Valter Augusto de Freitas Barbosa

*Federal Rural University of Pernambuco,
Brazil*

CHAPTER 4

COVID-19: Clinical, Immunological, and Image Findings from Infection to Post-COVID Syndrome

Georon Ferreira de Sousa¹, Guilherme Antonio de Souza Silva¹, Bárbara Rafaela da Silva Barros¹, **Rodrigo Cesar Abreu de Aquino¹**, Marília Raphaella Cabral Fonseca de Lima¹, Leonardo Carvalho de Oliveira Cruz¹, Elifrances Galdino de Oliveira, Igor Wesland Assunção de Sá, Fábio Augusto da Cunha Rodrigues, Francisco Hélio Oliveira, Antonio Carlos de Freitas, Evônio de Barros Campelo Júnior and Cristiane Moutinho Lagos de Melo^{1,*}

¹ Laboratory of Immunological and Antitumor Analysis, Department of Antibiotics, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Brazil

² Laboratory of Neuroendocrinology and Metabolism, Department of Physiology and Pharmacology, Center for Biosciences, Federal University of Pernambuco, Brazil

³ Clinics Hospital of Federal University of Pernambuco, Brazil

⁴ Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy, Department of Genetics, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Brazil

Abstract: The SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) is a virus responsible for the COVID-19 pandemic outbreak. The virus has high infectious power and easy ability to spread geographically, due to the fact that the infection is asymptomatic in some cases. However, 25% of patients infected by SARS-CoV-2 can progress to the severity of the disease and develop acute respiratory distress syndrome (ARDS). The symptoms are commonly recognized as fever, dry cough, tachypnea, shortness of breath, sore throat, sneezing, nasal congestion, and other symptoms, including severe inflammatory responses with the evolution of cytokine storm, pneumonia, and sepsis. Here, we show the COVID-19 since infection in the host cell to Post-COVID-19 syndrome, relating the occurrence of virus variants, laboratory and immunological aspects, the major clinical manifestations and image findings, and all aspects associated with pulmonary damage promoted by the virus.

Keywords: COVID-19, Post-COVID Syndrome, Pulmonary disease, SARS-CoV-2.

* Corresponding author **Cristiane Moutinho L. Melo**: Laboratório de Análises Imunológicas e Antitumorais, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil; E-mail: cristiane.moutinho@ufpe.br

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

**CENTRO INTEGRADO DE
SAÚDE AMAURY DE
MEDEIROS - CISAM/UPE.**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação e mapeamento imunológico de pacientes infectados com o vírus SARS-CoV 2 (COVID-19)

Pesquisador: Cristiane Moutinho Lagos de Melo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30332120.8.3001.5191

Instituição Proponente: Universidade de Pernambuco

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.208.047

Apresentação do Projeto:

Trata-se de resposta da CONEP de Emenda ao projeto original para a inclusão de mais um local para coleta de dados, solicitando a inserção do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco como Instituição Coparticipante da Pesquisa. No referido Hospital serão realizadas as coletas sanguíneas dos pacientes acometidos pela COVID-19.

As informações contidas nos campos Apresentação do Projeto, Objetivo da Pesquisa e Avaliação dos Riscos e Benefícios foram retiradas do arquivo Pareceres, a partir das informações inseridas pelo Pesquisador Responsável do estudo na Plataforma Brasil em 31/07/2020.

RESUMO

Até o momento, os achados e investigações imunológicas a respeito da COVID-19 ainda são muito preliminares para tirar conclusões necessárias para o desenvolvimento de medicamentos e possíveis métodos de tratamento contra o SARS-CoV 2. Dos achados relacionados com a doença, estudos demonstraram um aumento no total de neutrófilos (38%), reduzindo o total de linfócitos (35%), um aumento da IL-6 sérica (52%) e um aumento da proteína c - reativa (84%), dos 99 pacientes analisados (Zhou et al., 2020). Esses resultados são ratificados por Tan et al. (2020) e Huang et al. (2020), onde foi possível observar que os pacientes que necessitaram de terapia intensiva devido a doença, apresentaram o aumento de citocinas como IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, IP-10, MCP-1, MIP -1A e TNFα. Alguns estudos identificaram um quadro de leucopenia associada a

Endereço: Rua Visconde de Mamanguape, s/nº 1º andar

Bairro: Encruzilhada **CEP:** 52.090-010

UF: PE **Município:** RECIFE

Telefone: (81)3182-7738 **Fax:** (81)3182-7738 **E-mail:** cep.cisam@upe.br

CENTRO INTEGRADO DE SAÚDE AMAURY DE MEDEIROS - CISAM/UPE.



Continuação do Parecer: 4.256.047

alguns pacientes infectados com SARS-CoV 2 (Li et al., 2020). Nesse sentido, este estudo se propõe a fazer um mapeamento imunológico em pacientes infectados, a fim de contribuir com a comunidade científica, que busca incessantemente por alternativas de possíveis marcadores imunológicos para o diagnóstico e tratamento da doença, que possam contribuir para a sobrevivência dos

infectados mesmo nos casos mais graves, além no desenvolvimento de vacinas para a imunização da população mundial, visto que a pandemia está tomando proporções preocupantes, na saúde e refletindo consequentemente na economia dos países atingidos pela doença. Além disso, visamos contribuir com mais informações a respeito do perfil imunológico da COVID-19, que será essencial para o desenvolvimento de ações como esta, que podem ser uma ferramenta eficaz e de fácil aplicabilidade nos Sistemas de Saúde do Brasil e do mundo.

HIPÓTESE

Fatores imunológicos são ferramentas de diagnóstico tanto para identificação da severidade da doença quanto para mapeamento de vigilância sanitária.

METODOLOGIA

Local do estudo e considerações éticas A pesquisa será realizada pela equipe do Laboratório de Análises Imunológicas e Antitumorais do Departamento de Antibióticos da UFPE em parceria com a demanda de ações do Laboratório Central do Estado de Pernambuco (LACEN-PE). A parceria faz parte dos esforços entre governo estadual, UFPE e IAM-FIOCRUZ, na busca pelo diagnóstico confirmatório dos casos em Pernambuco. Uma parte da genotipagem viral será realizada no Laboratório de Estudos Moleculares e Terapias Experimentais, do Departamento de Genética, UFPE e a parte imunológica será realizada por nossa equipe. É provável a utilização do NB3 tanto do Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami – LIKA (o qual precisará passar por adequações), quanto do próprio LACEN, mas essas informações ainda não foram confirmadas. A logística de processamento das amostras ainda não está definida, mas em processo de planejamento junto à Secretaria Estadual de Saúde, o qual está prevista para o mês de abril. No entanto, a aprovação desse projeto se faz urgente devido à chamada do governo para o atendimento imediato dos casos no estado de Pernambuco.

4.2 Pacientes e análise amostral A população analisada será composta por pacientes que apresentarem sintomas da doença, e que forem recebidos e diagnosticados pelas equipes de diagnóstico associados ao Sistema Único de Saúde do Estado de Pernambuco. A quantidade de amostras será admitida por conveniência, conforme surjam pacientes infectados durante todo o período da pandemia. O diagnóstico da COVID-19 será realizado com base na avaliação clínica e

Endereço: Rua Visconde de Mamanguape, s/nº 1º andar
Bairro: Encruzilhada **CEP:** 52.030-010
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)3182-7738 **Fax:** (81)3182-7738 **E-mail:** cisp.cisam@upe.br

**CENTRO INTEGRADO DE
SAÚDE AMAURY DE
MEDEIROS - CISAM/UPE.**



Continuação do Parecer: 4.256.047

nos resultados laboratoriais de identificação do genótipo viral e a análise imunológica será feita com a utilização do soro e das células presentes no sangue coletado dos pacientes infectados. 4.3 Critérios de inclusão e exclusão Serão incluídos nesse estudo todos os pacientes positivos para COVID-19. Os grupos de pacientes imunodeprimidos ou em tratamento de doenças que promovem baixa resposta imunológica, deverão ser tratados como um segundo grupo à parte.

4.4 Dosagem das Citocinas, Quimiocinas e Imunoglobulinas Os soros coletados segundo item 4.2, passarão por ensaio de dosagem de citocinas, quimiocinas e imunoglobulinas. A avaliação será realizada utilizando o kit de citocinas humanas Th1/Th2/Th17 (Becton Dickinson Biosciences) para a detecção simultânea das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- e IFN-; o kit de quimiocinas humanas (Becton Dickinson Biosciences) para a detecção simultânea das quimiocinas CCL5, CCL2, CXCL8, CXCL9 e CXCL10 e o kit de imunoglobulinas humanas (Becton Dickinson Biosciences) para a detecção simultânea das imunoglobulinas IgG, IgG2, IgG3, IgG4, IgM e IgA. A medição das proteínas imunológicas será baseada na tecnologia de Cytometric Bead Array (CBA), todos os dados serão adquiridos na plataforma FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences) e processados através do software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Biosciences). 4.5 Contagem e ativação de linfócitos As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) das amostras coletadas segundo item 4.2, passarão por ensaio de contagem e ativação de linfócitos. A avaliação será realizada através de imunofenotipagem para a detecção de linfócitos CD4, CD8, NK, CD14, FoxP3 e CD19 e avaliação das moléculas co-estimulatórias CD25, CD28, CD80, CD86 e CTLA-4.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Serão incluídos nesse estudo todos os pacientes positivos para COVID-19. Os grupos de pacientes imunodeprimidos ou em tratamento de doenças que promovem baixa resposta imunológica, deverão ser tratados como um segundo grupo à parte.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Serão excluídos do estudo pacientes negativos para COVID-19, mesmo que apresente outras síndromes respiratórias.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO

Investigar o perfil imunológico de pacientes diagnosticados com COVID-19, pelo Sistema Único de Saúde de Pernambuco.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Endereço: Rua Visconde de Mamanguape, s/nº 1º andar
Bairro: Encruzilhada **CEP:** 52.090-010
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)3162-7738 **Fax:** (81)3162-7738 **E-mail:** cep.cisam@upe.br

**CENTRO INTEGRADO DE
SAÚDE AMAURY DE
MEDEIROS - CISAM/UPE.**



Continuação do Parecer: 4.206.047

- Traçar um perfil populacional dos pacientes envolvidos no estudo;
- Investigar o perfil de células (imunofenotipagem) e proteínas imunológicas (citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e imunoglobulinas) produzidas no decorrer da manifestação da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Ocorrerá coleta de até 9 ml de sangue periférico através de um tubo adaptado a uma agulha, estéril e descartável. Esse procedimento é praticamente isento de risco, pois todo material utilizado é descartável, porém, poderá causar dor ou mancha vermelha (hematoma). Caso ocorra qualquer desconforto ou promoção de hematoma local o sujeito da pesquisa receberá ajuda da equipe de coleta através de cuidados paliativos.

BENEFÍCIOS

O estudo poderá fornecer outras ferramentas de diagnóstico e também servirá de subsídio para a fabricação de imunobiológicos no tratamento e prevenção da doença. Além disso, a identificação de anticorpos de fase recente e tardia da doença servirão de meios estatísticos para a Vigilância sanitária compreender a fase da doença no estado de Pernambuco.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de Emenda:

Emenda 01:

Inserção do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco como Instituição Coparticipante da Pesquisa. No referido Hospital serão realizadas as coletas sanguíneas dos pacientes acometidos pela COVID-19.

INCLUSÃO DE CENTROS:

- Universidade de Pernambuco

Tereza Carlaxo

LISTA ATUALIZADA DE CENTROS:

- Hospital das Clínicas de Pernambuco

Evônio de Barros Campelo Júnior;

- Universidade de Pernambuco

Tereza Carlaxo.

Endereço: Rua Visconde de Mamanguape, s/nº 1º andar
Bairro: Encruzilhada **CEP:** 52.090-010
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)3182-7738 **Fax:** (81)3182-7738 **E-mail:** cep.cisam@upe.br

**CENTRO INTEGRADO DE
SAÚDE AMAURY DE
MEDEIROS - CISAM/UPE.**



Continuação do Parecer: 4.206.047

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Descreveram:

A carta de anuência da instituição foi anexada à documentação exigida.

Recomendações:

Não foram identificados óbices éticos nesta emenda.

Recomento anexar pareceres parcial e final a plataforma brasil

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, mediante observar protocolo completo e adequado e lero parecer da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, que manifestou-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa, considero solicitação de pesquisadores APROVADA.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, mediante observar protocolo completo e adequado e ler o parecer da CONEP, que manifestou-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa, considero solicitação de pesquisadores APROVADA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	justificativa_de_emenda.pdf	28/07/2020 12:01:38	Cristiane Moulinho Lagos de Melo	Aceite
Outros	Carta_anuencia_HC.pdf	24/07/2020 13:09:20	Cristiane Moulinho Lagos de Melo	Aceite
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_COVID19_Cristiane_Moulinho_ Evonio_HC.pdf	24/07/2020 13:07:37	Cristiane Moulinho Lagos de Melo	Aceite
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_final_limpo.pdf	25/04/2020 20:01:16	Cristiane Moulinho Lagos de Melo	Aceite
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_final.pdf	25/04/2020 20:01:07	Cristiane Moulinho Lagos de Melo	Aceite
Outros	CARTA_RESPOSTA.docx	25/04/2020	Cristiane Moulinho	Aceite

Endereço: Rua Visconde de Mamanguape, s/nº 1º andar
 Bairro: Encruzilhada CEP: 52.090-010
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)3182-7738 Fax: (81)3182-7738 E-mail: cep.cisam@upe.br

**CENTRO INTEGRADO DE
SAÚDE AMAURY DE
MEDEIROS - CISAM/UPE.**



Continuação do Parecer: 4.286.047

Outros	CARTA_RESPOSTA.docx	19:59:59	Lagos de Melo	Aceite
Outros	carta_de_anuencia.pdf	29/03/2020 17:26:42	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceite
Outros	Projeto_COVID19_termo_confidencialidade.pdf	29/03/2020 17:26:17	Cristiane Moutinho Lagos de Melo	Aceite

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 11 de Agosto de 2020

**Assinado por:
Sandra Trindade Low
(Coordenador(a))**

Endereço: Rua Visconde de Mamanguape, s/nº 1º andar
Bairro: Encruzilhada **CEP:** 52.090-010
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)3182-7738 **Fax:** (81)3182-7738 **E-mail:** cep.cisam@upe.br