

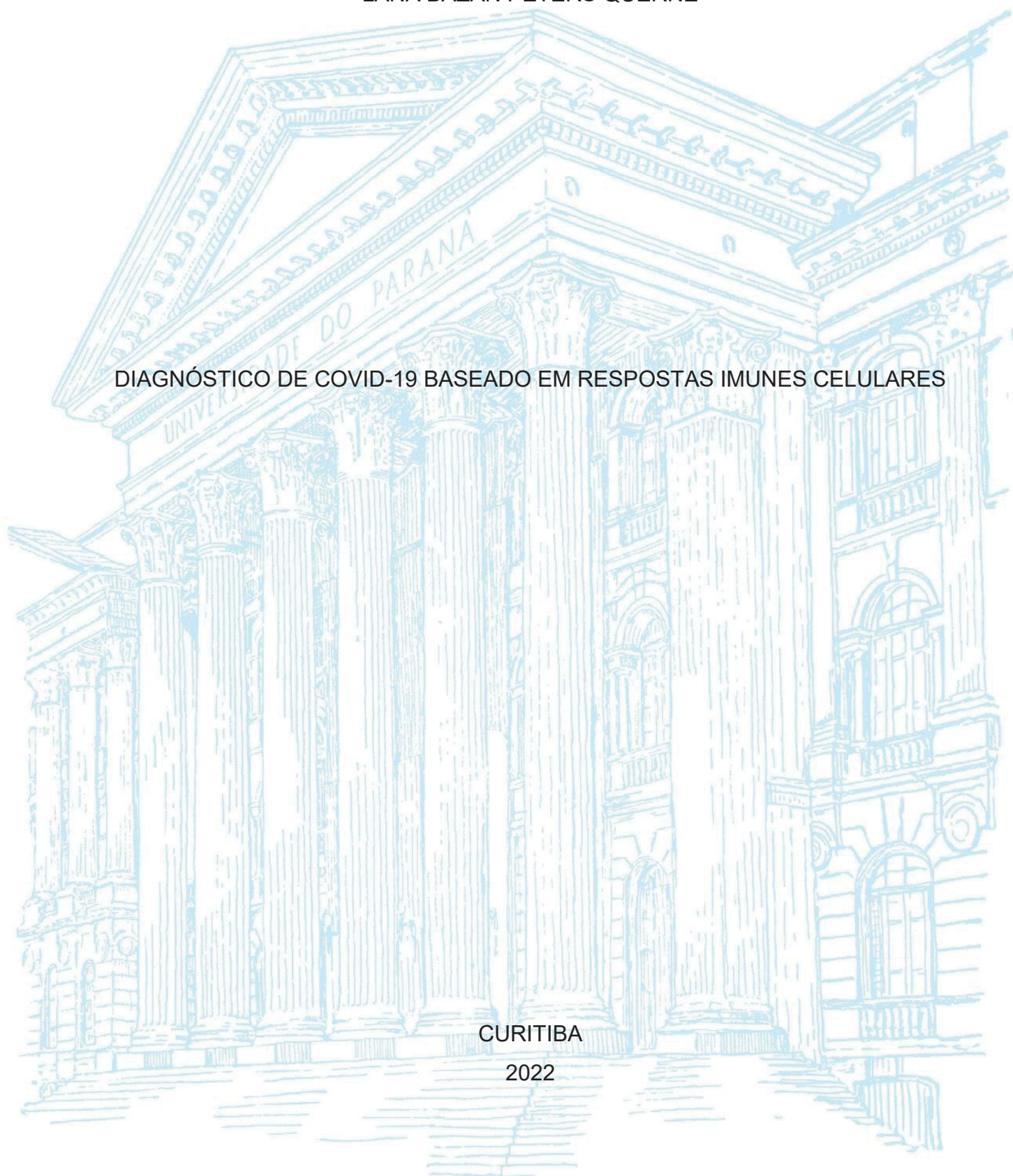
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LANA BAZAN PETERS QUERNE

DIAGNÓSTICO DE COVID-19 BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES

CURITIBA

2022



LANA BAZAN PETERS QUERNE

DIAGNÓSTICO DE COVID-19 BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Área de Contracção em Saúde Humana e Animal, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Vanete Thomaz Soccol
Coorientador: Prof. Dr. Breno Castello Branco
Beirão

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Querne, Lana Bazan Peters

Diagnóstico de COVID-19 baseado em respostas imunes celulares /
Lana Bazan Peters Querne . – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia.

Orientadora: Profª Dra Vanete Thomaz Soccol.

Coorientador: Prof. Dr. Breno Castello Branco Beirão.

1. SARS-CoV-2. 2. Coronavírus bovino (BcoV). 3. Biossensores. I.
Soccol, Vanete Thomaz. II. Beirão, Breno Castello Branco. III.
Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. IV. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **LANA BAZAN PETERS QUERNE** intitulada: **Diagnóstico de COVID-19 por respostas imunes celulares**, sob orientação da Profa. Dra. VANETE THOMAZ SOCCOL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 12 de Dezembro de 2022.

Assinatura Eletrônica
19/12/2022 12:14:18.0
VANETE THOMAZ SOCCOL
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
19/12/2022 12:13:07.0
LIA SUMIE NAKAO
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA)

Assinatura Eletrônica
21/12/2022 14:24:48.0
LEA CHAPAVALANDRI
Avaliador Externo (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA
AGROPECUÁRIA)

Assinatura Eletrônica
19/12/2022 12:09:01.0
BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO
Coordenador(a)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ana Maria e Sebastião, por tudo que sacrificaram para que eu pudesse ter acesso a educação de qualidade desde o início e estar aqui hoje. Também agradeço por sempre me incentivarem a ser quem eu sou e me ajudarem a seguir meus sonhos;

Ao meu irmão Mateus, por ter sido minha referência de vida e me induzido a trilhar os caminhos que hoje sigo;

À minha gata, Nega, por ser minha companheira por 11 anos e ser meu suporte quando tudo parece ser difícil;

À minha amiga Naomi Ueno, que ao longo de mais de 16 anos está ao meu lado, me dando forças e esperanças nos momentos difíceis e celebrando os bons momentos em minha companhia, apesar da distância;

Aos meus colegas de graduação e de pós-graduação, Ariane Mello e Leonardo Herrmann, pelas ajudas nas minhas dúvidas, artigos e vida. Os almoços sempre eram melhores com vocês;

À Dr^a Fernanda Zettel, minha colega de bancada desde o início do mestrado, por ser como uma mentora quando eu precisava e não sabia por onde seguir e pelos bons momentos que passamos juntas falando bobagem e trocando figurinhas e memes no Instagram;

Aos colegas do laboratório de Imunologia Comparada, Neurobiologia e Patologia Redox, por toda a companhia e apoio ao longo desses dois anos;

Ao pessoal da empresa Imunova Ltda, por auxiliarem em meus experimentos;

Ao Dr. Silvio Zanata e à Dr^a Lia Nakao, pelos conselhos dados que me permitiram avançar no meu projeto mesmo quando nada parecia dar certo;

À minha orientadora, Dr^a Vanete Thomaz Soccol pelos conselhos dados.

Ao meu orientador, professor Dr. Breno Castello Branco Beirão, por me guiar nesses dois anos de trabalho;

À CAPES pela bolsa e financiamento concedidos e CNPq pelo financiamento.

「悲しい日はお腹いっぱい食べればいい
たまにヘコんだら昼まで寝てればいい」

*“You said you have a dream... That dream... Make it
come true! Make your wonderful dream a reality, and
it will become your truth! If anyone can, it's you!”*

Natural Harmonia Gropius

RESUMO

O coronavírus nomeado *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) foi descoberto em Wuhan, China em dezembro de 2019. Esse é o agente etiológico da *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19), caracterizada por um surto de pneumonia incomum. Os kits comercialmente disponíveis de imunodiagnósticos são voltados à detecção de anticorpos antivirais. Contudo, sabe-se que a resposta humoral à COVID-19 tem duração insatisfatória, dificultando a predição de uma infecção secundária ou infecção pós-vacinal, por exemplo. Assim, as técnicas de mensuração de respostas imunes celulares têm sido aperfeiçoadas para uso em ambiente *point-of-care*. O presente projeto teve o objetivo de determinar a viabilidade técnica para diferentes métodos de análise de respostas celulares, com o propósito de se obter um teste celular rápido para imunodiagnóstico. O presente documento foi dividido em quatro capítulos. O capítulo 1 trata de uma revisão bibliográfica sobre os temas COVID-19 e sistema imune, para maior compreensão do trabalho. No capítulo 2 é mostrado uma investigação *in silico* da relação entre o coronavírus bovino (BCoV) e a atual pandemia de SARS-CoV-2. O Brasil foi utilizado como modelo para a análise do impacto das populações bovinas na prevalência de COVID-19 em pessoas. Além disso, foi determinado o reconhecimento de HLA e a reatividade de linfócitos humanos a epítopos de BCoV usando recursos de bioinformática. O capítulo 3 teve por objetivo analisar documentos publicados na última década utilizando respostas imunes celulares no diagnóstico de doenças, possibilitando relatar os avanços na área e quais as principais técnicas atualmente utilizadas. Já no capítulo 4 considerou-se a produção de espécies reativas de oxigênio na diferenciação de linfócitos T, analisando a utilização de eletrodos de carbono para o diagnóstico de COVID-19 por meio das respostas imunes celulares.

Palavras-chave: Diagnóstico. Biossensores. SARS-CoV-2. Coronavírus bovino (BCoV). Reatividade cruzada. Epítipo. *In silico*.

ABSTRACT

The coronavirus named Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was discovered in Wuhan, China in December 2019. It is the etiological agent of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), characterized by an outbreak of unusual pneumonia. Commercially available immunodiagnostic kits are aimed at detecting antiviral antibodies. However, it is known that the humoral response to COVID-19 has an unsatisfactory duration, making it difficult to predict a secondary infection or post-vaccine infection, for example. Thus, techniques for measuring cellular immune responses have been improved for use in a point-of-care environment. This project aimed to determine the technical feasibility of different methods of analyzing cellular responses, with the aim of obtaining a rapid cellular test for immunodiagnosis. This document is divided into four chapters. Chapter 1 deals with a bibliographical review on the themes of COVID-19 and the immune system, for a better understanding of the work. Chapter 2 presents an *in silico* investigation of the relationship between bovine coronavirus (BCoV) and the current SARS-CoV-2 pandemic. Brazil was used as a model for analyzing the impact of bovine populations on the prevalence of COVID-19 in people. In addition, HLA recognition and reactivity of human lymphocytes to BCoV epitopes were determined using bioinformatics resources. Chapter 3 aimed to analyze documents published in the last decade using cellular immune responses in the diagnosis of diseases, making it possible to report advances in the area and which are the main techniques currently used. In Chapter 4, the production of reactive oxygen species in the differentiation of T lymphocytes was considered, analyzing the use of carbon electrodes for the diagnosis of COVID-19 through cellular immune responses.

Keywords: Diagnosis. Biosensors. SARS-CoV-2. Bovine coronavirus (BCoV). Cross-reactivity. Epitope. *In silico*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FILOGENIA DE CORONAVÍRUS.....	20
FIGURA 2 – ESTRUTURA DE UM CORONAVÍRUS.....	21
FIGURA 3 – ESTRUTURA DO GENOMA DO SARS-CoV, MERS-CoV E SARS-CoV-2.....	23
FIGURA 4 – LINHA DO TEMPO MUNDIAL DO SURTO DE COVID-19.....	24
FIGURA 5 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA COVID-19.....	24
FIGURA 6 – PREVALÊNCIA DE COVID-19 NO MUNDO.....	26
FIGURA 7 – ATUALIZAÇÃO DIÁRIA DE (A) CASOS E (B) ÓBITOS DE COVID-19 NO MUNDO.....	27
FIGURA 8 – NÚMEROS DIÁRIOS DE CASOS DE COVID-19 POR CONTINENTE.....	27
FIGURA 9 – NÚMEROS DIÁRIOS DE ÓBITOS DE COVID-19 POR CONTINENTE.....	28
FIGURA 10 – ATUALIZAÇÃO DIÁRIA DE (A) CASOS E (B) ÓBITOS DE COVID-19 NO BRASIL.....	29
FIGURA 11 – MAPA DO TOTAL DE DOSES DE VACINA PARA COVID-19 ADMINISTRADAS PARA CADA 100 PESSOAS.....	33
FIGURA 12 – TOTAL DE DOSES DE VACINA PARA COVID-19 ADMINISTRADAS PARA CADA 100 PESSOAS POR PAÍSES.....	33
FIGURA 13 – DOSES TOTAIS DE VACINAS CONTRA COVID-19 APLICADAS NO BRASIL.....	34
FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO DE (a) TCAR DO PULMÃO E (b) RM DO CÉREBRO EM CASOS GRAVES DE COVID-19.....	36
FIGURA 15 – MÉTODO DE (a) RT-PCR E (b) RT-LAMP PARA DETECÇÃO DE SARS-CoV-2.....	38
FIGURA 16 – TESTE RÁPIDO SOROLÓGICO.....	39
FIGURA 17 – CÉLULAS DOS SISTEMAS IMUNES INATO E ADAPTATIVO.....	41
FIGURA 18 – FUNÇÕES DAS CÉLULAS T EFETORAS.....	43
FIGURA 19 – REGULAÇÃO REDOX DE CÉLULAS T.....	45
FIGURA 20 – ROS NA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T.....	46
FIGURA 21 – VIAS DE ENTRADA DO SARS-CoV-2 NA CÉLULA-ALVO.....	48

FIGURA 22 – PERFIL DE CÉLULAS T DURANTE INFECÇÃO POR SARS-CoV-2.....	49
FIGURA 23 – COMPOSIÇÃO DE UM <i>SCREEN-PRINTED ELECTRODE</i>	52
FIGURA 24 – REPRESENTAÇÃO DE UM VOLTAMOGRAMA.....	53
FIGURA 25 – <i>SCRIPT</i> EM PYTHON PARA FORMAR PEPTÍDEOS USADOS NO PRESENTE TRABALHO.....	56
FIGURA 26 – REGRESSÃO LINEAR ENTRE A DENSIDADE DE BOVINOS E A INCLINAÇÃO DO AUMENTO CUMULATIVO DE CASOS DE COVID-19 NO ESTADO BRASILEIRO DO MATO GROSSO DO SUL.....	58
FIGURA 27 – CORRELAÇÃO ENTRE A DENSIDADE DE POPULAÇÕES DE GADO E A PREVALÊNCIA DE COVID-19 EM TODO O BRASIL.....	59
FIGURA 28 – (A) ARTIGOS E (B) PATENTES ADQUIRIDOS DO WEB OF SCIENCE E DERWENT.....	73
FIGURA 29 – PUBLICAÇÕES DE (A) ARTIGOS E (B) PATENTES PELO MUNDO NO TEMA DE DIAGNÓSTICOS USANDO IMUNIDADE CELULAR.....	74
FIGURA 30 – PUBLICAÇÕES NO TEMA DE DIAGNÓSTICOS USANDO IMUNIDADE CELULAR ENTRE 2011 E 2021.....	75
FIGURA 31 – PRINCIPAIS DOENÇAS DIAGNOSTICADAS NOS (A) ARTIGOS E (B) PATENTES DA PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.....	77
FIGURA 32 – PRINCIPAIS TÉCNICAS APLICADAS NOS DIAGNÓSTICOS NOS (A) ARTIGOS E (B) PATENTES DA PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.....	78
FIGURA 33 – PRINCIPAIS ALVOS DETECTADOS NOS DIAGNÓSTICOS DOS (A) ARTIGOS E (B) PATENTES DA PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.....	79
FIGURA 34 – DISTRIBUIÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO.....	103
FIGURA 35 – SOBREPOSIÇÃO DOS RESULTADOS DA ANÁLISE POR FTIR PARA CÉLULAS (A) CONTROLE NEGATIVO E EM (B) CÉLULAS INDUZIDAS DOS GRÁFICOS EM FTIR.....	112
FIGURA 36 – GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO COM CONCAVALINA A.....	112
FIGURA 37 – CURVA PADRÃO DE NITRITO.....	113
FIGURA 38 – GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO COM CONCAVALINA A.....	114

FIGURA 39 – VOLTAMETRIA CÍCLICA DE CÉLULAS JURKAT CONTROLES E INDUZIDAS EM ELETRODOS APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO COM CONCANAAVALINA A.....	114
FIGURA 40 – PADRÃO DE LEITURA DA TÉCNICA DE VOLTAMETRIA CÍCLICA PARA DEPOSIÇÃO DE GQD.....	115

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PRINCIPAIS PAÍSES COM CASOS E ÓBITOS DE COVID-19.....	28
TABELA 2 – NÚMERO DE CASOS E ÓBITOS NO BRASIL POR REGIÃO.....	30
TABELA 3 – NÚMERO DE CASOS E ÓBITOS NO BRASIL POR ESTADO E DISTRITO FEDERAL.....	30
TABELA 4 – RECOMENDAÇÕES PARA O TRATAMENTO DE COVID-19 COM ANTIVIRAIS.....	35
TABELA 5 – FUNÇÕES DA IMUNIDADE INATA.....	40
TABELA 6 – DESENVOLVIMENTO HISTÓRICO DE ELETRODOS E BIOSSENSORES.....	51
TABELA 7 – SEQUÊNCIAS PROTEÔMICAS DE CORONAVÍRUS BOVINO E SARS-COV-2 HUMANO OBTIDAS DO NCBI.....	56
TABELA 8 – PEPTÍDEOS DE PROTEÍNAS SPIKE, MEMBRANA E NUCLEOCAPSÍDEO DE BCOV QUE PROVAVELMENTE INDUZIRIAM RESPOSTAS DE CÉLULAS T E B HUMANAS E QUE MOSTRARAM PELO MENOS 80% DE SEMELHANÇA COM SARS-COV-2.....	61
TABELA 9 – PEPTÍDEOS DA POLIPROTEÍNA REPLICASE (ORF1AB) QUE PROVAVELMENTE INDUZIRIAM RESPOSTAS DE CÉLULAS T E B HUMANAS E QUE MOSTRARAM PELO MENOS 80% DE SEMELHANÇA COM SARS-COV-2.....	62
TABELA 10 – RESULTADO DA BUSCA DE ARTIGOS SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.....	80
TABELA 11 – RESULTADO DA BUSCA DE PATENTES SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.....	94
TABELA 12 – FUNÇÕES DE CITOCINAS EM CÉLULAS T.....	100
TABELA 13 – PARÂMETROS DO PROGRAMA PSTRACE 5 PARA AS LEITURAS EM ELETRODOS IMPRESSOS DE CARBONO.....	110

LISTA DE ABREVIACÕES

ABS - Acrilonitrila-butadieno-estireno
ACE2 - Enzima conversora da angiotensina 2
ADHP - Vermelho amplex ou 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina
APC - Células Apresentadoras de Antígenos
BCoV - Coronavírus bovino
BCR - Receptor de antígeno de células B
CD - Conglomerados de diferenciação
CFSE - *5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester*
CIII - Complexo mitocondrial III
CLIA - Imunoensaio por Quimioluminescência
ConA - Concanavalina A
CoV - Coronavírus
COVID-19 - Coronavirus Disease 2019
DC - Células Dendríticas
DCFH-DA - Diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína
E - Envelope
ECLIA - Imunoensaio por Eletroquimioluminescência
ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática
ELISpot - Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima em pontos
FACS - Separador de células por fluorescência ativada
FP - Peptídeo de fusão
FTIR - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
GQD - *Quantum dot* de grafeno
GSH - Glutathione
HCoV-229E – Coronavírus Humano 229E
HCoV-HKU1 - Coronavírus Humano HKU1
HCoV-NL63 – Coronavírus Humano NL63
HCoV-OC43 - Coronavírus Humano OC43
HE - Hemaglutina esterase
HLA - Antígeno Leucocitário Humano
IBV - *Infectious Bronchitis Virus*
IFN - Interferon

IL - Interleucina
LFIA - Imunoensaios de fluxo lateral
LOX - Lipoxigenase
M - Membrana
MERS-CoV - Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
MS - Ministério da Saúde
N - Nucleocapsídeo
NIH - *National Institutes of Health*
NK - *Natural Killers*
NPS - Non-Structural Proteins
OMS - Organização Mundial de Saúde
ORF - *Open Reading Frame*
ORF1ab - Poliproteína replicase
PA - Poliamida
PBMC - *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
PBS - Tampão fosfato salino
Pen/Strep - Penicilina/Streptomicina
PLA - Ácido poli-lático
PLL - Poli L-Lisina
POC - Point-of-care
PRRs - Receptores de reconhecimento de patógenos
 R_0 - Número de reprodução
RM - Ressonância Magnética
RNS - Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
RT-LAMP - Amplificação isotérmica mediada por loop com transcriptase reversa
RT-qPCR - *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*
S - *Spike*
SARS-CoV - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV-2 - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
SD - Desvio Padrão
SFB - Soro Fetal Bovino
SPE - Eletrodos serigrafados ou screen-printed electrodes

TCAR - Tomografia Computadorizada de Alta Resolução

TCR - Receptor de antígeno de célula T

TGF- β - Fator de transformação de crescimento β

T_H - Célula T Auxiliar

TLR - Receptores do tipo Toll

TMPRSS2 - Serinoprotease transmembrana II humana

T_{reg} - Célula T Reguladora

TRX - Tioredoxina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	18
 CAPÍTULO 1 – COVID-19 E O SISTEMA IMUNE: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
1 COVID-19.....	20
1.1 CORONAVÍRUS.....	20
1.2 SARS-COV-2 E COVID-19.....	23
1.3 PREVALÊNCIA DA COVID-19 NO MUNDO.....	25
1.4 PREVENÇÃO E TRATAMENTO.....	32
2 PROCEDIMENTOS PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19.....	35
3 SISTEMA IMUNE.....	39
3.1 RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA.....	39
3.2 RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR.....	42
3.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E DE NITROGÊNIO (RNS).....	44
3.4 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS DA COVID-19.....	47
4 BIOSSENSORES.....	50
 CAPÍTULO 2 - ANÁLISE IN SILICO DAS CORRELAÇÕES ENTRE BCoV E SARS-CoV-2.....	54
1 INTRODUÇÃO.....	54
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
2.1 EPIDEMIOLOGIA DO COVID-19 E ASSOCIAÇÃO COM FATORES DE RISCO.....	55
2.2 CONFIGURAÇÃO DE PEPTÍDEOS PARA AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA.....	56
2.3 PREVISÃO DA REATIVIDADE DAS CÉLULAS T.....	57
2.4 PREVISÃO DA REATIVIDADE DAS CÉLULAS B.....	57
2.5 SEMELHANÇA DE PEPTÍDEOS BCoV EM RELAÇÃO ÀS PROTEÍNAS SARS-CoV-2.....	57
3 RESULTADOS.....	58
3.1 EPIDEMIOLOGIA DO COVID-19 E ASSOCIAÇÃO COM FATORES DE RISCO.....	58
3.2 CONFIGURAÇÃO DE PEPTÍDEOS PARA AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA.....	60
3.3 PREVISÃO DA REATIVIDADE DAS CÉLULAS T.....	60

3.4 PREVISÃO DA REATIVIDADE DAS CÉLULAS B.....	60
3.5 SEMELHANÇA DE PEPTÍDEOS BCoV EM RELAÇÃO ÀS PROTEÍNAS SARS-CoV-2.....	60
4 DISCUSSÃO.....	68
5 CONCLUSÕES.....	70

CAPÍTULO 3 – DETECÇÃO DE RESPOSTAS IMUNES CELULARES PARA DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS: REVISÃO DOS ÚLTIMOS 10 ANOS DE DESENVOLVIMENTO.....

1 INTRODUÇÃO.....	71
2 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.....	72
3 RESULTADOS.....	72
3.1 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	72
3.2 DIAGNÓSTICOS POR ELISA E ELISPOT.....	99
3.3 DIAGNÓSTICOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	102
4 PERSPECTIVAS.....	103
5 CONCLUSÕES.....	105

CAPÍTULO 4 - DIAGNÓSTICO DE COVID-19 BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.....

1 INTRODUÇÃO.....	107
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	108
2.1 OBTENÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS.....	108
2.2 ANÁLISE DE LINFÓCITOS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	108
2.3 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR DICLOROFLUORESCEÍNA-DIACETATO.....	108
2.4 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO POR GRIESS.....	109
2.5 LEITURA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM ELETRODOS DE CARBONO.....	110
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	111
3 RESULTADOS.....	111
3.1 ANÁLISE DE LINFÓCITOS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	111

3.2 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR DICLOROFLUORESCEÍNA.....	112
3.3 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO POR GRIESS.....	113
3.4 LEITURA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO ELETRODOS DE CARBONO.....	114
4 DISCUSSÃO.....	116
5 CONCLUSÕES.....	118
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	119
PERSPECTIVAS.....	119
REFERÊNCIAS.....	120
APÊNDICE.....	139

INTRODUÇÃO GERAL

Descoberto em dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, China, o coronavírus nomeado *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) é o agente etiológico da *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19), doença caracterizada por um surto de pneumonia incomum. Quanto ao imunodiagnóstico da mesma, os kits comercialmente disponíveis são voltados à detecção de anticorpos antivirais. Entretanto, estudos demonstram que a resposta humoral contra a COVID-19 tem duração insatisfatória, dificultando, por exemplo, a predição de uma infecção secundária ou infecção pós-vacinal (GEURTSVANKESSEL et al., 2022). Considerando esses casos, uma alternativa aos métodos de diagnóstico com foco na detecção de anticorpos específicos são as técnicas baseadas em respostas imunes celulares. A imunidade celular é uma maneira eficaz e eficiente de diagnosticar doenças, uma vez que possui uma resposta mais duradoura que a apresentada pela imunidade humoral (MURPHY, 2014). Sendo assim, as técnicas de mensuração de respostas imunes celulares têm sido aperfeiçoadas para uso em ambiente *point-of-care*, ou seja, a realização dos testes de diagnósticos em ambientes fora de laboratórios clínicos. O presente projeto teve o objetivo geral de determinar a viabilidade técnica para diferentes métodos de análise de respostas celulares, com o propósito de se obter um teste celular rápido para imunodiagnóstico.

A presente dissertação foi dividida em quatro capítulos, com objetivos específicos para cada um. O capítulo 1 se trata de uma revisão bibliográfica sobre os temas COVID-19 e sistema imune, finalizando com a utilização de biossensores eletroquímicos, servindo como base teórica para maior compreensão dos capítulos seguintes. O capítulo 2 é mostrado uma investigação *in silico* da relação entre o coronavírus bovino (BCoV) e a atual pandemia de SARS-CoV-2. No projeto, o Brasil foi utilizado como modelo para a análise do impacto das populações bovinas na prevalência de COVID-19 em pessoas. Além disso, foi determinado o reconhecimento de HLA e a reatividade de linfócitos humanos a epítomos de BCoV usando recursos de bioinformática. Já no capítulo 3 teve por objetivo analisar documentos publicados na última década (2011-2021) que utilizem respostas imunes celulares no diagnóstico de doenças, de forma que seja possível relatar os avanços na área e quais as principais técnicas utilizadas atualmente. Por fim, no capítulo 4 considerou-se a produção de espécies reativas de oxigênio no processo

de diferenciação de linfócitos T, analisando a utilização de eletrodos de carbono para o diagnóstico de COVID-19 por meio das respostas imunes celulares.

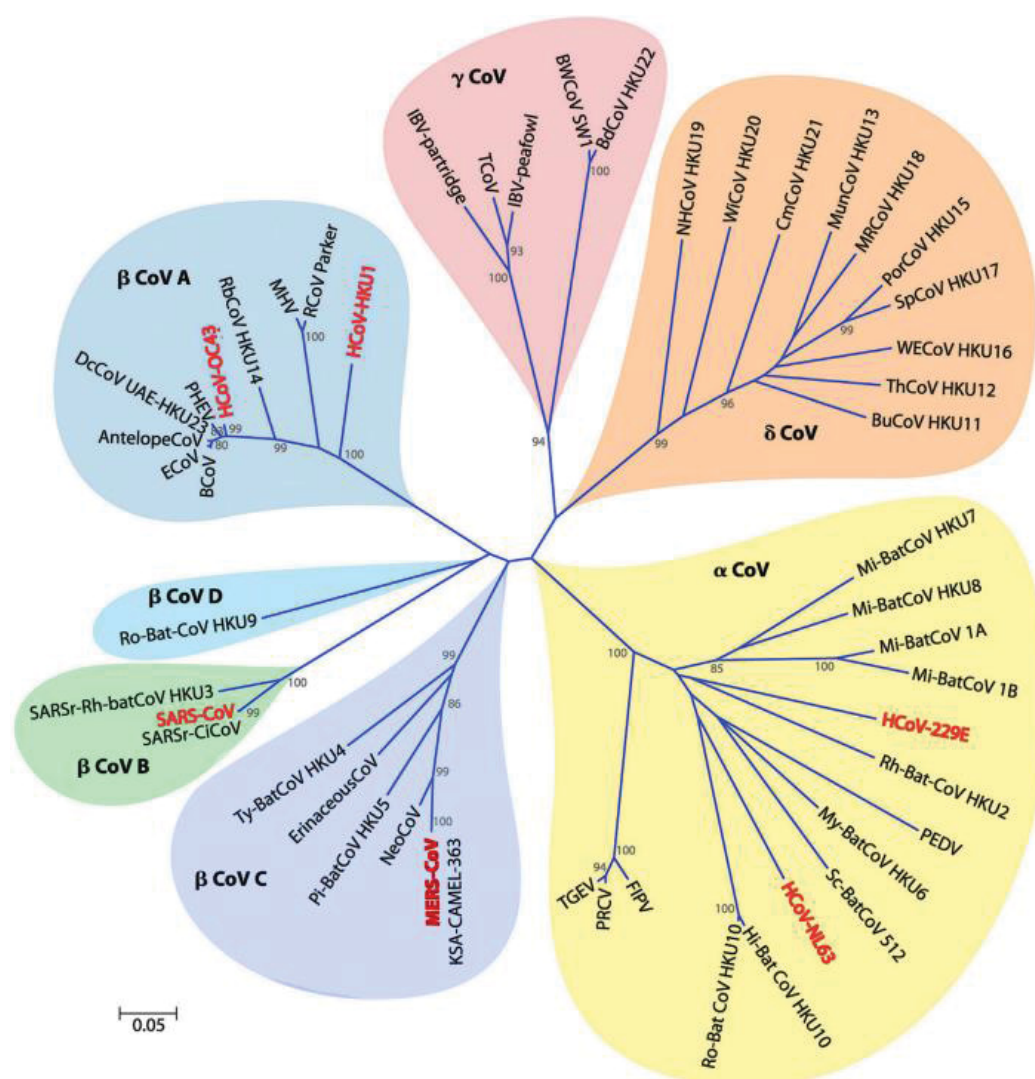
CAPÍTULO 1 – COVID-19 E O SISTEMA IMUNE: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 COVID-19

1.1 CORONAVÍRUS

Coronavírus (CoVs) são vírus compostos por RNA fita simples classificados na ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, consistindo de duas subfamílias: (1) *Coronavirinae* e (2) *Torovirinae* (SAIF et al., 2019). Dentro da primeira subfamília citada há quatro gêneros que a compõem: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* (WU et al., 2020).

FIGURA 1 – FILOGENIA DE CORONAVÍRUS.



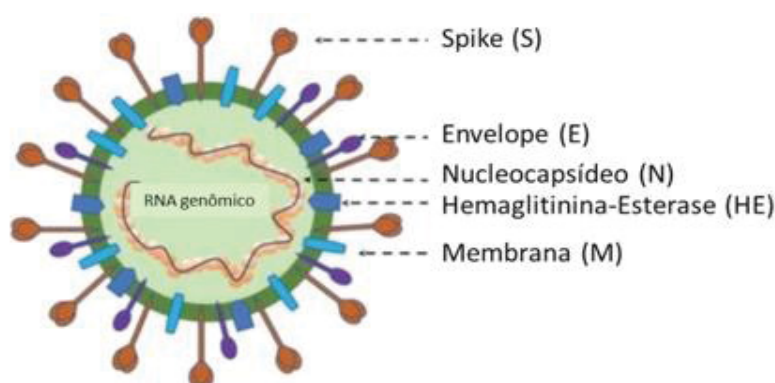
FONTE: BURRELL; HOWARD; MURPHY (2016).

LEGENDA: Árvore filogenética de 50 coronavírus construída usando sequências parciais de nucleotídeos de RNA polimerase dependente de RNA. Em vermelho encontram-se marcados os coronavírus capazes de causar doenças em humanos. Pode-se perceber que entre os β CoV há a

divisão em quatro grupos diferentes, os β CoV A, B, C e D. Exemplos notáveis no grupo A incluem os HCoV-HKU1, HCoV-OC43 e o coronavírus bovino (BCoV), quanto nos grupos B e C se encontram o SARS-CoV e MERS-CoV, respectivamente. Dentro do gênero *Betacoronavirus* há o subgênero *Sabercovirus*, que engloba o SARS-CoV e o SARS-CoV-2, sendo esses dois vírus os mais semelhantes entre si.

Os vírus dessa família possuem o formato redondo, envelopados e cobertos por projeções superficiais espaçadas claviformes. De tamanho médio, os coronavírus podem medir entre 100-150 nm de diâmetro, sendo que as projeções apresentam em média 20 nm de comprimento, representadas por agregados da proteína *spike* (S). Em sua superfície, os beta-coronavírus podem conter uma proteína de envelope mais curta, intitulada hemaglutinina esterase (HE), além da própria proteína envelope (E) (PEIRIS, 2016).

FIGURA 2 – ESTRUTURA DE UM CORONAVÍRUS.



FONTE: MENEZES; LIMA; MARTINELLO (2020).

Esses vírus são capazes de infectar diversos animais, como humanos, outros mamíferos e aves, causando doenças respiratórias, gastrointestinais e neurológicas. Como exemplos de coronavírus prejudiciais para mamíferos há o beta-coronavírus BCoV (coronavírus bovino), responsável por perdas na pecuária, e o delta-coronavírus IBV (*Infectious bronchitis virus*, em inglês), o qual infecta aves. Atualmente são conhecidas sete espécies diferentes aptas a causarem doenças em humanos (YAN; CHANG; WANG, 2020), sendo eles:

- Alfa-coronavírus:

- (1) HCoV-NL63: *Human Coronavirus* NL63 ou Coronavírus Humano NL63. Encontrado majoritariamente em crianças, idosos e pacientes imunocomprometidos, esse vírus foi descrito pela primeira vez em 2004. Ele é

responsável por causar infecções leves a moderadas do trato respiratório superior e inferior e bronquiolite (ABDUL-RASOOL; FIELDING, 2010);

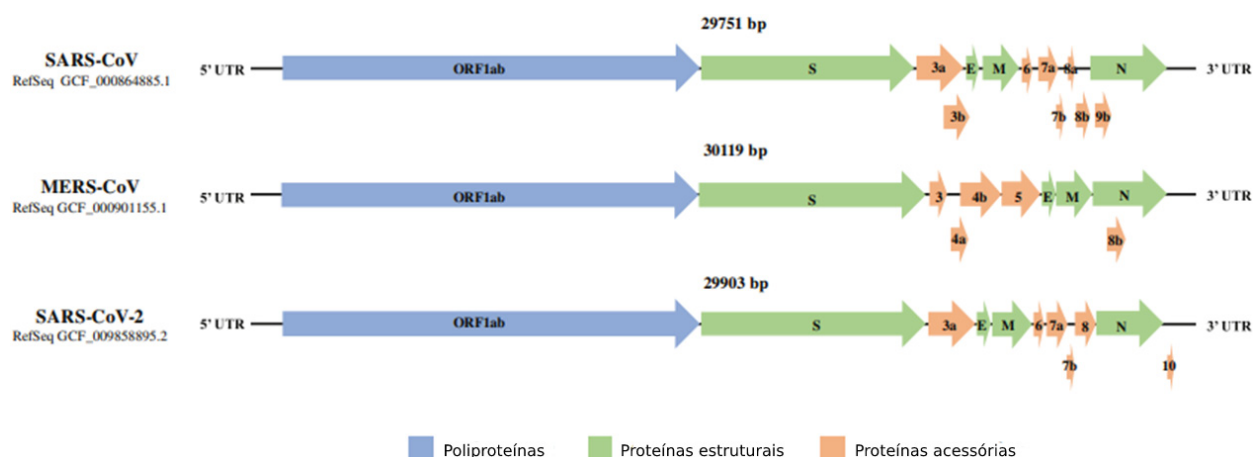
- (2) HCoV-229E: *Human Coronavirus 229H* ou Coronavírus Humano 229E. Descrito em 1966, foi o primeiro entre todos os coronavírus caracterizados. Este vírus é responsável por causar resfriados em humanos (NISHIOKA, 2020);

- Beta-coronavírus:

- (3) HCoV-OC43: *Human Coronavirus OC43* ou Coronavírus Humano OC43. Isolado em 1967, assim como HCoV-229E foi descrito como responsável por causar resfriados leves em humanos (NISHIOKA, 2020);
- (4) HCoV-HKU1: *Human Coronavirus HKU1* ou Coronavírus Humano HKU1. Identificado em 2005, em Hong Kong. Em humanos esse vírus é causador de resfriado moderado, com desconforto respiratório agudo e pneumonia (LIM, 2016);
- (5) MERS-CoV: *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* ou Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS). Descoberto em 2012 em países do Oriente Médio, o MERS-CoV chegou aos humanos por camelos infectados, sendo responsável por causar MERS e resultando em mais de 800 mortes em 27 países diferentes (OMS, 2022);
- (6) SARS-CoV: *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* ou Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS). Surgido na China, em 2002, esse vírus foi responsável por causar a epidemia de SARS, a qual causou mais de 700 mortes em 29 países (NISHIOKA, 2020);
- (7) SARS-CoV-2: *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* ou Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2. Descoberto em 2019, na China, o SARS-CoV-2 é responsável pela pandemia de COVID-19 (*coronavirus disease 2019*, em inglês) (WALLS et al., 2020).

Sendo o maior genoma viral de RNA conhecido, o genoma dos coronavírus apresenta tamanho variando de 25,4 a 31,8 kb, fita simples, sentido positivo, adenilado e capeado (YAN; CHANG; WANG, 2020). Os beta-coronavírus codificam no genoma 4 proteínas estruturais, envelope (E), membrana (M), nucleocapsídeo (N) e *spike* (S), além das *non-structural proteins* (NSP) e de 7 a 14 *open reading frame* (ORF) (YAO et al., 2020; HASOKSUZ, KILIÇ, SARAÇ, 2020; BURREL, HOWARD, MURPHY, 2016).

FIGURA 3 – ESTRUTURA DO GENOMA DO SARS-CoV, MERS-CoV E SARS-CoV-2.



FONTE: ADAPTADO DE YAN; CHANG; WANG (2020).

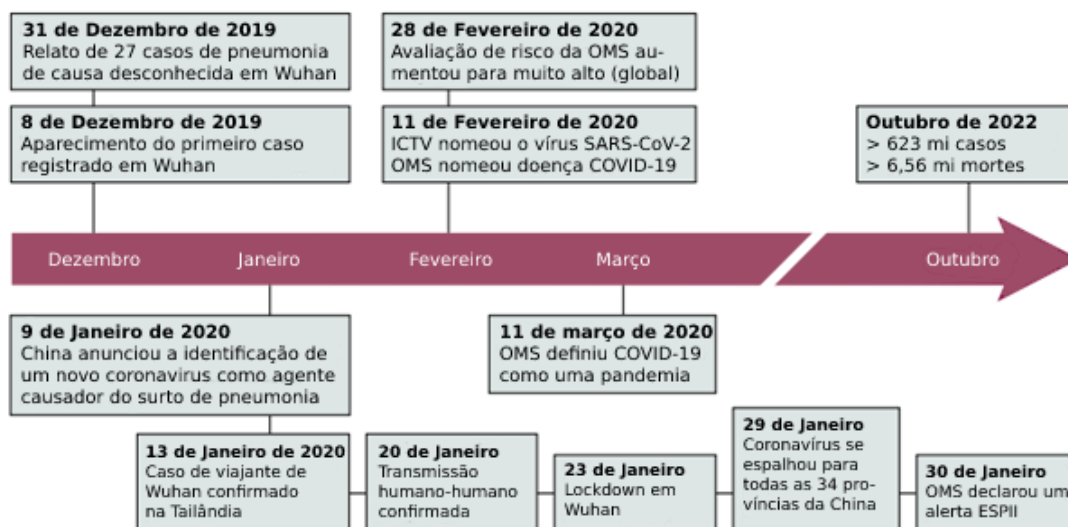
1.2 SARS-CoV-2 E COVID-19

Em dezembro de 2019, um novo coronavírus chamado *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) foi descoberto em Wuhan, na província de Hubei na China (WALLS et al., 2020). Esse vírus é responsável por causar a *coronavirus disease 2019* (COVID-19), caracterizada por um surto de pneumonia incomum. A principal forma de transmissão do SARS-CoV-2 ocorre por aerossóis e gotículas liberados por espirros e tosses de pessoas contaminadas (SALIAN et al., 2021).

Apesar de possuir taxa de mortalidade relativamente baixa se comparada com outras doenças virais, de apenas 3,1%, o número de reprodução (R_0) é estimado próximo de 5.9 pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention* ou CDC, em inglês). Esse valor é definido como o número médio de infecções secundárias que uma pessoa infectada pode produzir, determinando, assim, o potencial de transmissão de doenças infecciosas (SALIAN et al., 2021).

Devido a alta taxa de transmissão e o aumento de casos em todos os continentes, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou uma pandemia do novo coronavírus no dia 11 de Março de 2020 (OMS, 2020). Mais dados temporais do surto de COVID-19 estão representados na FIGURA 4.

FIGURA 4 – LINHA DO TEMPO MUNDIAL DO SURTO DE COVID-19.



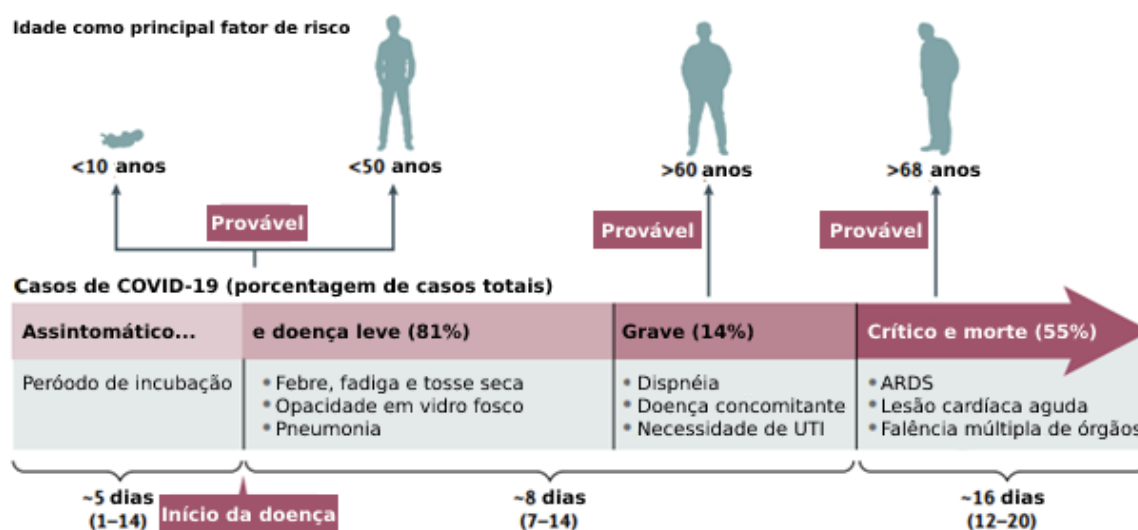
FONTE: ADAPTADO DE HU et al. (2021).

Após o período de incubação aproximado de 4 a 14 dias, a maioria dos indivíduos infectados começam a manifestar sintomas da doença. Os sintomas mais comuns e leves apresentados em pessoas infectadas assemelham-se aos de uma pneumonia viral, como tosse (46-82%), febre (77-98%) e desconforto ao respirar (CHEN; LI, 2020). Também são observados alguns sintomas menos comuns, como diarreia, náusea, vômito, cefaleia, corrimento nasal, perda de paladar (disgeusia) e olfato (anosmia), dado a capacidade do vírus de afetar diversos órgãos, não apenas o pulmão (HU et al., 2021).

Em indivíduos pertencentes aos grupos de risco é mais comum o desenvolvimento de casos graves da COVID-19, com dispneia e infiltração pulmonar bilateral, elevando os casos de internações e mortes nesta população (HU et al., 2021). Fazem parte dos grupos de risco os pacientes idosos e pacientes com comorbidades, como diabetes, obesidade, tabagismo, hipertensão, doença cardiovascular, doença pulmonar crônica (ex. asma e bronquite) e indivíduos imunossuprimidos (SALIAN et al., 2021).

Aproximadamente 30% das pessoas que testam positivo para COVID-19 são assintomáticos. Entretanto, dentro dessa população a taxa de contágio do vírus ainda pode acontecer, sendo necessário altos níveis de testagem e detecções de indivíduos contaminados.

FIGURA 5 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA COVID-19.



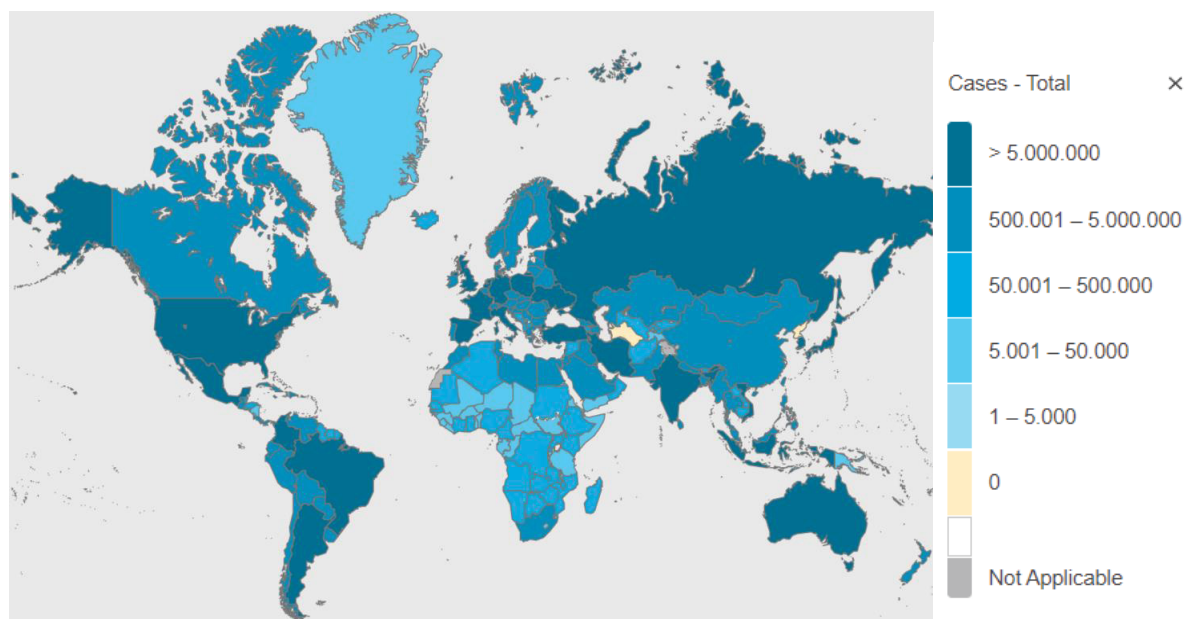
FONTE: ADAPTADO DE HU et al. (2021).

1.3 PREVALÊNCIA DA COVID-19 NO MUNDO

Desde 2020 a COVID-19 vem sendo um grande problema de saúde pública, ainda com milhares de novos casos diários. Até o dia 27 de Maio de 2022, a COVID-19 já é responsável por 524.878.064 de casos e 6.283.119 de mortes ao redor do mundo, de acordo com dados atualizados diariamente pela OMS (OMS, 2022). Na FIGURA 13 é possível observar a distribuição de casos de COVID-19 pelo mundo.

Ao longo da pandemia, a média mundial do número de casos da doença é de 6.729,2/100.000 habitantes e a relação sobre o número de óbitos é de 80,6/100.000 habitantes. Observando apenas os dados do primeiro ano de pandemia, os números mundiais foram de 1.062,9/100.000 habitantes e 24,7/100.000 habitantes para casos e óbitos, respectivamente. Já em 2021, houve um aumento de 2,5 vezes a média do número de casos do ano anterior, sendo de 2.617,5/100.000 habitantes. Para a média do número de óbitos no mesmo ano, também foi observado aumento, nesse caso de 1,8 vezes, sendo de 45,1/100.000 habitantes (OMS, 2022). Apesar de 2021 ter sido o ano do início da vacinação mundial, o aumento tanto do número de casos quanto de óbitos mundialmente se deve a alguns fatores diferentes, entre eles: Início tardio da vacinação em alguns países, demora para completar o ciclo vacinal, segunda onda de contaminação mais forte e surgimento de novas cepas de SARS-CoV-2, como a variante Delta (B.1.617.2) (OMS, 2022).

FIGURA 6 – PREVALÊNCIA DE COVID-19 NO MUNDO.

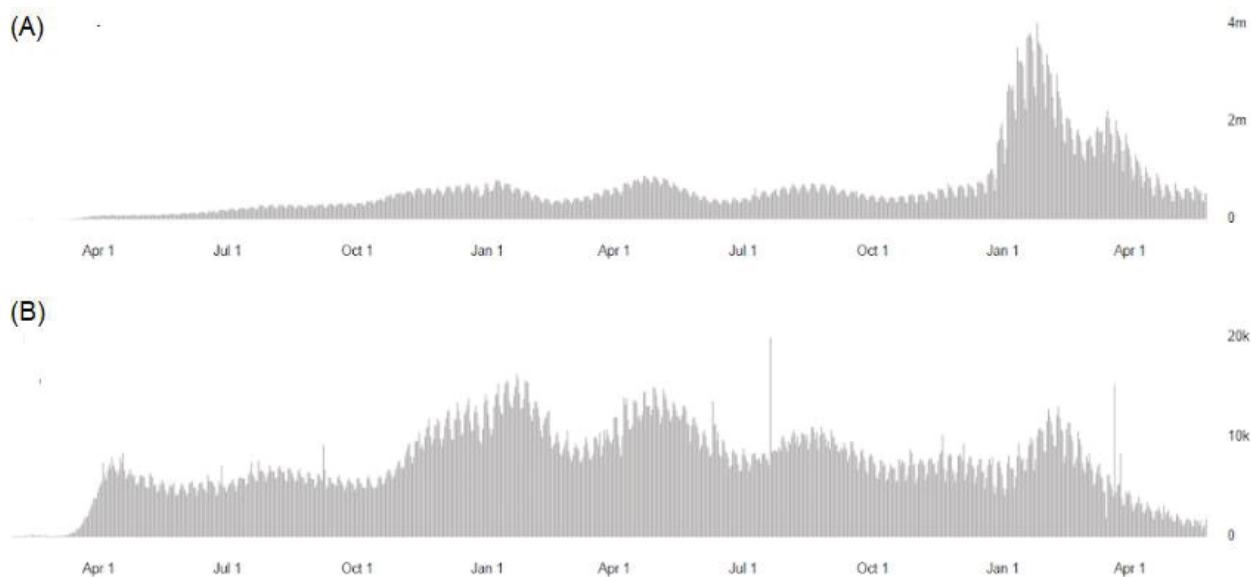


FONTE: OMS (2022).

Considerando os dados anuais de 2022 até o mês de Maio, houve um aumento de 2,9 e 1,2 vezes em relação a 2020 e 2021, respectivamente, para a média no número de casos de COVID-19, sendo de 3.048,7/100.000 habitantes. O número de mortes, no entanto, decaiu 2,3 e 4,2 vezes se comparado com os anos de 2020 e 2021, respectivamente, sendo de 10,7/100.000 habitantes (OMS, 2022). O aumento do número de casos se deve pelo afrouxamento de algumas medidas de segurança, como uso de máscara e capacidade máxima reduzida, retorno de diversas atividades presenciais e principalmente pelo surgimento da variante Ômicron do SARS-CoV-2 (B.1.1.529) e suas diferentes cepas (BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5) (OMS, 2022). Atualmente, a variante B.1.1.529 é conhecida por ser a mais transmissível da COVID-19 (INSTITUTO BUTANTAN, 2022). A FIGURA 7 apresenta a atualização diária do número de casos e óbitos de COVID-19 no mundo.

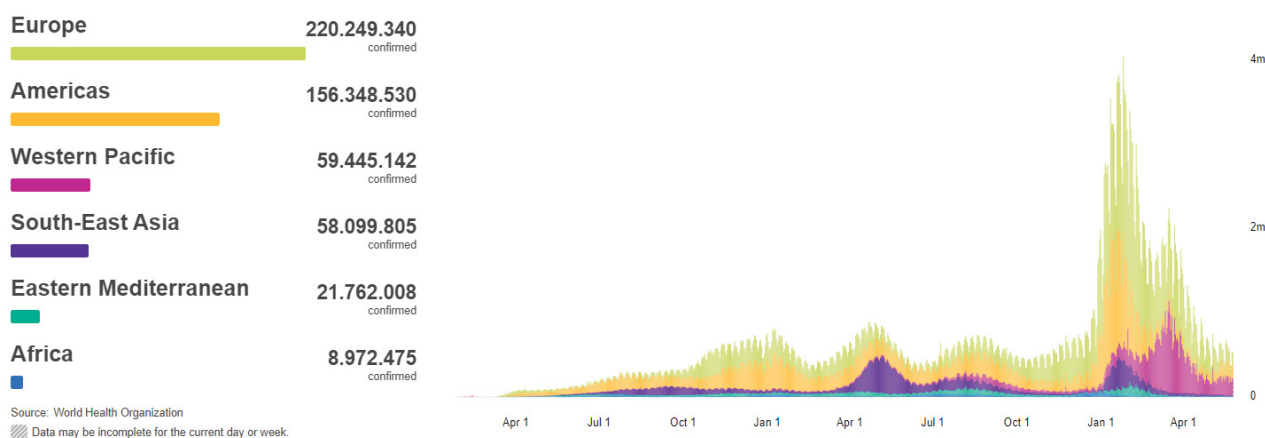
Cada variante nova do vírus foi responsável por diferentes ondas de contágio em regiões diferentes. Devido principalmente por causa da Ômicron, atualmente a Europa é o continente com maior número de casos confirmados de COVID-19, representando 42,0% do total mundial. Em seguida, há as Américas com 29,8% dos casos confirmados, acompanhado do Pacífico Ocidental e Sudeste da Ásia com 11,3% e 11,1% dos casos totais, respectivamente. O Mediterrâneo Oriental concentrou 4,1% e por último há a África com 1,7% do total (OMS, 2022).

FIGURA 7 – ATUALIZAÇÃO DIÁRIA DE (A) CASOS E (B) ÓBITOS DE COVID-19 NO MUNDO.



FONTE: OMS (2022).

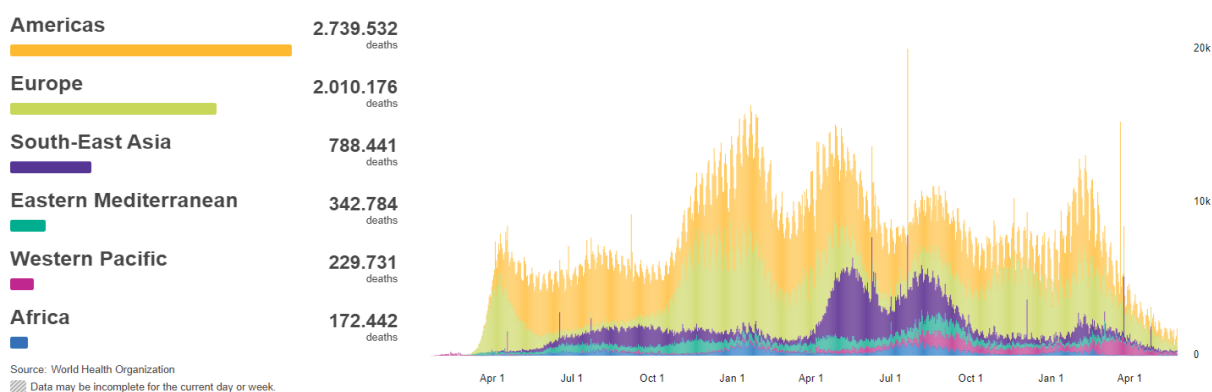
FIGURA 8 – NÚMEROS DIÁRIOS DE CASOS DE COVID-19 POR CONTINENTE.



FONTE: OMS (2022).

O cenário se altera quando se trata da porcentagem do número de óbitos nas regiões diferentes. Em primeiro lugar está as Américas com 43,6% dos óbitos globais, seguida da Europa com 32% do total de óbitos. O Sudeste da Ásia representa 12,5% e o Mediterrâneo Oriental 5,5% dos casos de óbitos. As regiões com as menores porcentagens são o Pacífico Ocidental e a África, com 3,7% e 2,7% dos óbitos totais no mundo, respectivamente (OMS, 2022).

FIGURA 9 – NÚMEROS DIÁRIOS DE ÓBITOS DE COVID-19 POR CONTINENTE.



FONTE: OMS, 2022.

Na TABELA 1 está indicado os dez principais países responsáveis pelos maiores números de casos e óbitos no mundo. Não há relação direta entre todos os países nas duas listas, representando que apesar de alguns países terem uma grande quantidade de casos elevada, esse número não se converteu proporcionalmente em óbitos, como é o caso da Alemanha, República da Coreia e Turquia.

TABELA 1 – PRINCIPAIS PAÍSES COM CASOS E ÓBITOS DE COVID-19.

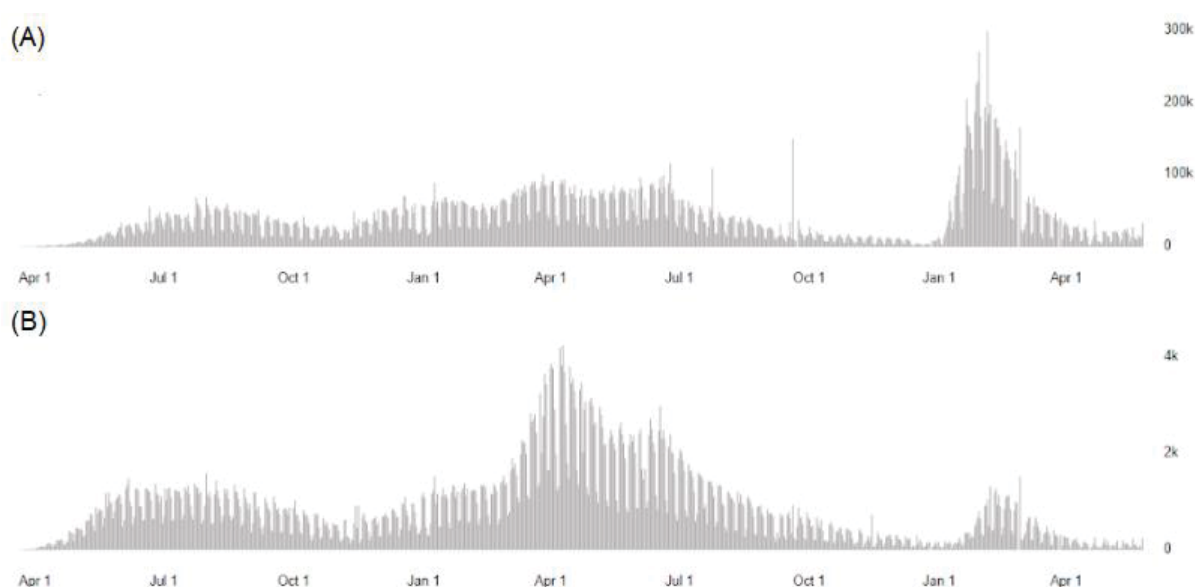
Número de casos		Número de óbitos	
País	Casos confirmados	País	Óbitos confirmados
Estados Unidos	82.853.070	Estados Unidos	996.108
Índia	43.147.530	Brasil	666.037
Brasil	30.846.602	Índia	524.539
França	28.561.540	Federação Russa	378.784
Alemanha	26.199.643	México	324.768
Reino Unido	22.272.992	Peru	213.134
Federação Russa	18.315.292	Reino Unido	178.397
República da Coreia	18.053.287	Itália	166.358
Itália	17.333.299	Indonésia	156.565
Turquia	15.068.094	França	144.809

FONTE: ADAPTADO DE OMS (2022).

Entretanto, os Estados Unidos se encontram em primeiro lugar tanto para o número de casos quanto para o número de óbitos. Esse país sozinho é responsável por 15,8% dos casos globais e por 15,9% dos números de óbitos globais (OMS, 2022).

O Brasil ocupa, atualmente, a terceira posição de casos totais confirmados e o segundo lugar em relação ao número de óbitos confirmados, representando 5,9% e 10,6% do total, respectivamente. Diferentemente dos Estados Unidos, o qual teve as porcentagens de casos e óbitos iguais, os óbitos brasileiros são quase o dobro dos casos confirmados em porcentagem mundial.

FIGURA 10 – ATUALIZAÇÃO DIÁRIA DE (A) CASOS E (B) ÓBITOS DE COVID-19 NO BRASIL.



FONTE: OMS (2022).

A incidência de COVID-19 no Brasil desde o início da pandemia é de 14.678,6/100.000 habitantes, enquanto o coeficiente de mortalidade da doença é de 316,9/100.000 habitantes. Os valores referentes às cinco regiões brasileiras, tanto para os casos confirmados quanto para os óbitos confirmados, estão indicados na TABELA 2 abaixo.

TABELA 2 – NÚMERO DE CASOS E ÓBITOS NO BRASIL POR REGIÃO.

Região	População	Casos acumulados	Casos acumulados 100mi	Óbitos acumulados	Óbitos acumulados 100mi
Centro-Oeste	16297074	3325436	20405	63487	390
Nordeste	57071654	6268986	10984	129008	226
Norte	18430980	2507151	13603	50185	272
Sudeste	88371433	12103839	13697	318769	361
Sul	29975984	6641190	22155	104588	349
Totais	210147125	30846602	14679	666037	317

FONTE: ADAPTADO DE MS (2022).

Observando cada estado individualmente, tem-se que, em números brutos, o estado de São Paulo apresentou o maior número de casos confirmados de COVID-19, superando 5,4 milhões de casos, o que representa 11.936/100.000 habitantes. Entretanto, o estado que mais tem casos acumulados por 100.000 habitantes é o estado do Espírito Santo, com um valor de 26.161/100.000 habitantes, o que equivale a aproximadamente 1 milhão de casos confirmados.

Novamente o estado de São Paulo acumulou o maior número de óbitos totais do Brasil, com quase 170 mil mortes por COVID-19. O coeficiente de mortalidade da doença nesse estado é de 368/100.000 habitantes. O estado que apresenta o maior número de casos confirmados por 100.000 habitantes é o estado do Rio de Janeiro, com mais de 73 mil óbitos e coeficiente de mortalidade equivalente a 427/100.000 habitantes (MS, 2022). Os dados para os números de casos e óbitos, totais e para cada 100.000 habitantes, para todos os estados brasileiros mais o Distrito Federal encontram-se na TABELA 3 abaixo.

TABELA 3 – NÚMERO DE CASOS E ÓBITOS NO BRASIL POR ESTADO E DISTRITO FEDERAL.
(continua)

UF	População	Casos acumulados	Casos acumulados 100mi	Óbitos acumulados	Óbitos acumulados 100mi
AC	881935	124974	14170	2002	227
AL	3337357	298871	8955	6936	208
AM	4144597	582734	14060	14173	342

TABELA 3 – NÚMERO DE CASOS E ÓBITOS NO BRASIL POR ESTADO E DISTRITO FEDERAL.
(conclusão)

UF	População	Casos acumulados	Casos acumulados 100mi	Óbitos acumulados	Óbitos acumulados 100mi
AP	845731	160418	18968	2133	252
BA	14873064	1547372	10404	29922	201
CE	9132078	1246002	13644	27051	296
DF	3015268	703602	23335	11690	388
ES	4018650	1051335	26161	14405	358
GO	7018354	1357565	19343	26604	379
MA	7075181	437344	6181	10888	154
MG	21168791	3394187	16034	61520	291
MS	2778986	532610	19166	10565	380
MT	3484466	731659	20998	14628	420
PA	8602865	773846	8995	18354	213
PB	4018127	604539	15045	10220	254
PE	9557071	934383	9777	21700	227
PI	3273227	368074	11245	7745	237
PR	11433957	2502334	21885	43284	379
RJ	17264943	2177585	12613	73791	427
RN	3506853	504990	14400	8199	234
RO	1777225	403680	22714	7214	406
RR	605761	155679	25700	2152	355
RS	11377239	2408431	21169	39472	347
SC	7164788	1730425	24152	21832	305
SE	2298696	327411	14243	6347	276
SP	45919049	5480732	11936	169053	368
TO	1572866	305820	19443	4157	264
Totais	210147125	30846602	14679	666037	317

FONTE: ADAPTADO DE MS (2022).

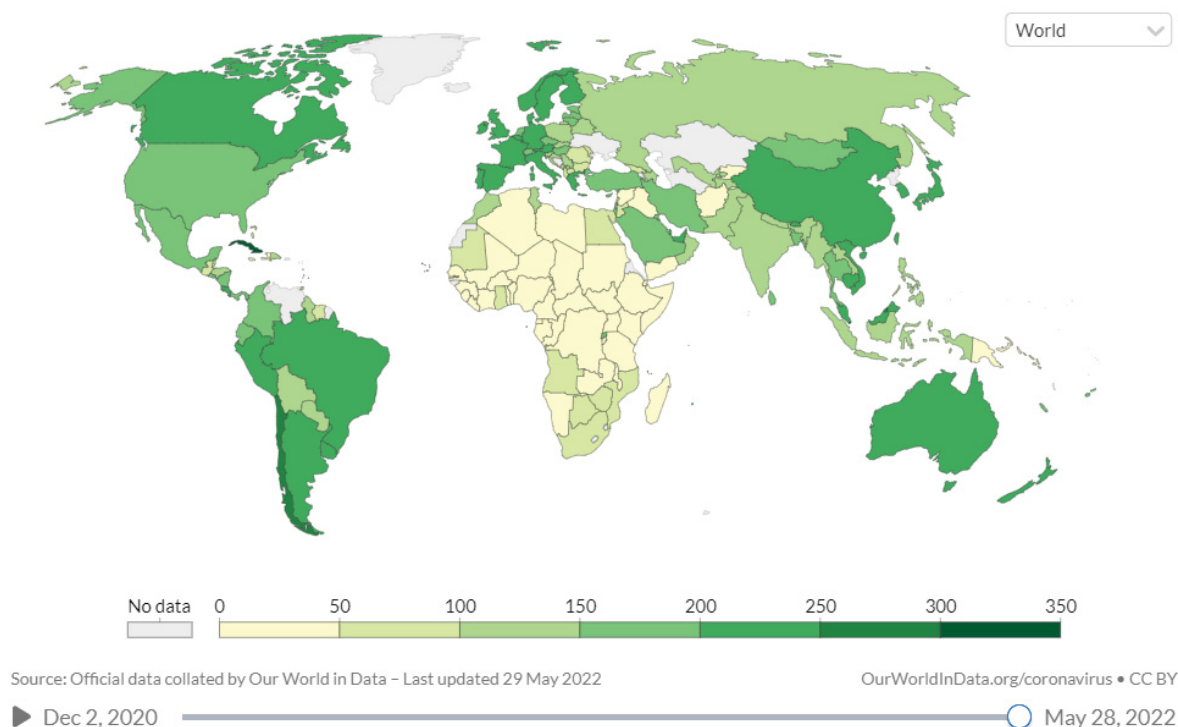
1.4 PREVENÇÃO E TRATAMENTO

A prevenção da COVID-19 é feita seguindo as medidas de segurança contra a doença e com a vacinação completa. As medidas de segurança contra a COVID-19 são um conjunto de ações não farmacológicas para prevenção e segurança da pandemia (MS, 2021). As medidas apontadas pelo Ministério da Saúde contam com o distanciamento social, higienização das mãos, etiqueta respiratória, uso de máscara em ambientes fechados, aglomerados ou em serviços de saúde, limpeza e desinfecção de ambientes, além da quarentena de casos confirmados e suspeitos de COVID-19. As etiquetas respiratórias incluem (1) cobrir o nariz e a boca com lenço de papel ou com o antebraço ao tossir ou espirrar, (2) evitar contato nos olhos, nariz e boca com as mãos não higienizadas, (3) manter distanciamento de pelo menos 1 metro de indivíduos que estejam tossindo ou espirrando, (4) evitar contatos físicos, como abraços, beijos e apertos de mão, (5) higienizar com frequência objetos de uso contínuo e evitar compartilhar objetos de uso pessoal e (6) evitar aglomerações e manter os ambientes com boa ventilação (MS, 2021).

O programa de vacinação contra COVID-19 iniciou-se mundialmente em Dezembro de 2020, com a autorização pela OMS para uso de emergência da vacina Pfizer/BioNTech Comirnaty. Outras vacinas aprovadas para uso de emergência pela própria OMS incluem a SII/Covishield e AstraZeneca/AZD1222, desenvolvidas pela AstraZeneca/Oxford, a Janssen/Ad26.COV 2.S, desenvolvida pela Johnson & Johnson, a Sinopharm COVID-19, produzida pelo Beijing Bio-Institute of Biological Products Co Ltd e a vacina Moderna COVID-19 (mRNA 1273). Outras vacinas foram comprovadas como seguras e eficazes, nesse caso sendo necessário a autorização do uso das mesmas pelas agências reguladoras nacionais (OMS, 2021).

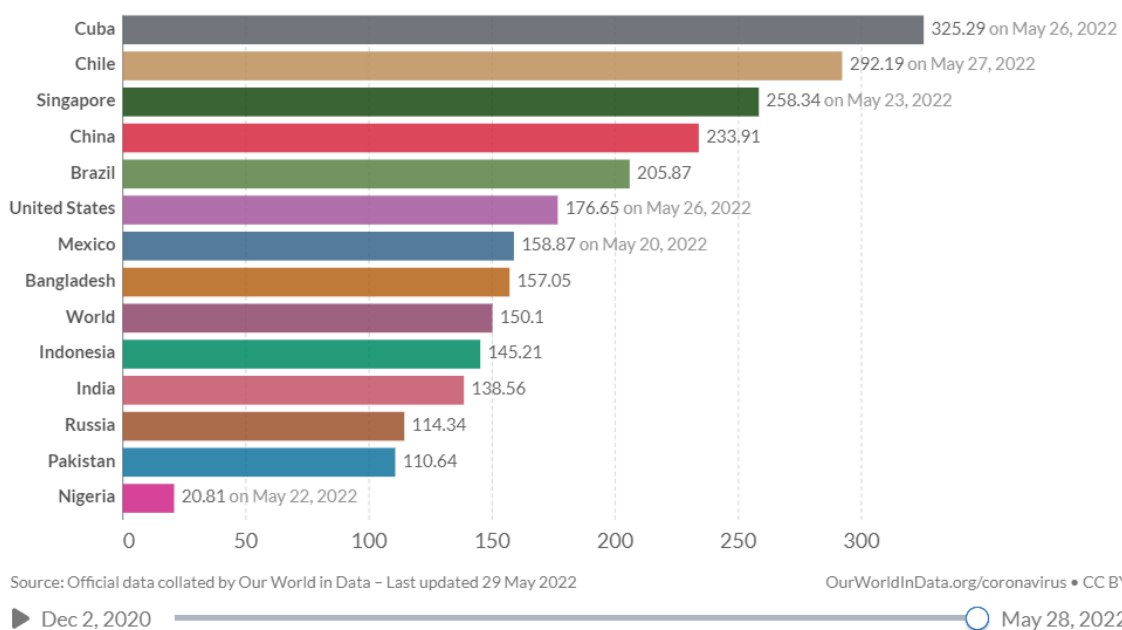
A FIGURA 11 abaixo apresenta um panorama mundial da vacinação contra COVID-19 até o dia 29 de Maio de 2022, enquanto na FIGURA 12 é informado os principais países com maiores valores de doses aplicadas para cada 100 habitantes, até a mesma data da figura anterior.

FIGURA 11 – MAPA DO TOTAL DE DOSES DE VACINA PARA COVID-19 ADMINISTRADAS PARA CADA 100 PESSOAS.



FONTE: MATHIEU et al. (2022).

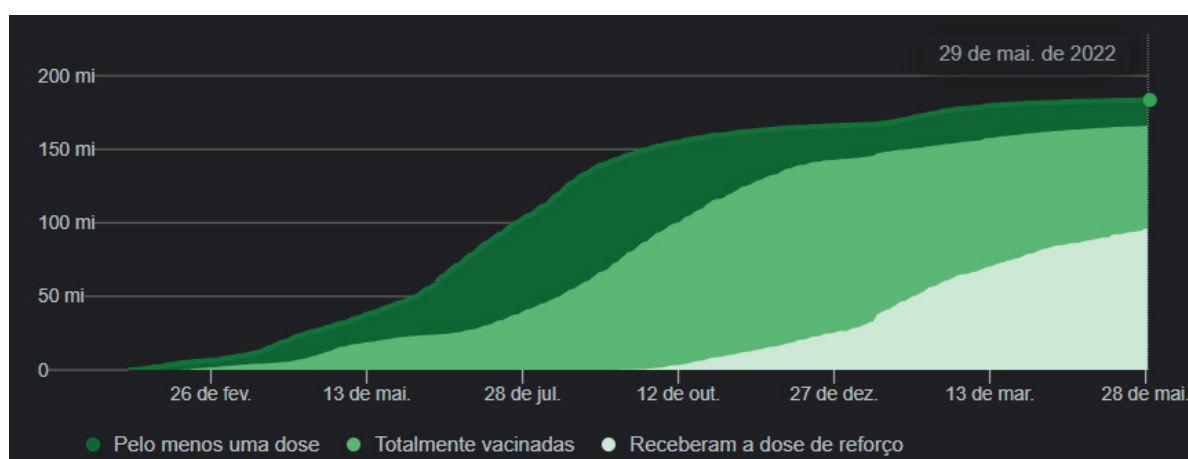
FIGURA 12 – TOTAL DE DOSES DE VACINA PARA COVID-19 ADMINISTRADAS PARA CADA 100 PESSOAS POR PAÍSES.



FONTE: MATHIEU et al. (2022).

O Brasil é o quinto país com maior número de doses de vacina para COVID aplicadas para cada 100 habitantes. Aqui a vacinação se iniciou no dia 17 de Janeiro de 2021 e segue o Plano Nacional de Operacionalização da Vacinação contra a COVID-19 apresentado pelo Ministério da Saúde. Ainda segundo o Ministério da Saúde, já foram aplicadas 399 milhões de doses, de forma que 91,5% dos brasileiros estejam pelo menos com a 1ª dose e 85,8% completamente vacinados (MS, 2022). As vacinas aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso no Brasil são as CoronaVac (Instituto Butantan/Sinovac), a Pfizer/BioNTech Comirnaty, Janssen/Ad26.COV 2.S (Johnson & Johnson), SII/Covishield (Oxford/AstraZeneca) e a Gam-COVID-Vac, também conhecida como Sputnik V (ANVISA, 2022).

FIGURA 13 – DOSES TOTAIS DE VACINAS CONTRA COVID-19 APLICADAS NO BRASIL.



FONTE: MATHIEU et al. (2022).

Atualmente há apenas um medicamento aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de COVID-19, o antiviral Remdesivir. Entretanto, apenas um antiviral pode não ser o adequado para o tratamento devido a possibilidade de surgimento de novas cepas resistentes ao medicamento por mutações (SUPURAN, 2021).

Por essa razão, há a necessidade de complementar o tratamento com novas opções antivirais e anticorpos monoclonais anti-SARS-CoV-2. O *National Institutes of Health* (NIH) por meio do *COVID-19 Treatment Guidelines Panel* apresenta diversas opções de tratamentos, seja para pacientes hospitalizados ou não, baseados em estudos clínicos realizados com diferentes opções de medicamentos

utilizados no tratamento da doença (NIH, 2022). A TABELA 4 resume a informação referente aos antivirais recomendados ou contraindicados para o tratamento de COVID-19.

TABELA 4 – RECOMENDAÇÕES PARA O TRATAMENTO DE COVID-19 COM ANTIVIRAIS.

Recomendado para pacientes não hospitalizados	
Tratamento indicado	Tratamento APENAS se o indicado não está disponível ou não é apropriado
Ritonavir-boosted nirmatrelvir (Paxlovid)	Bebtelovimab
Remdesivir	Molnupiravir
Recomendado para pacientes hospitalizados	
Remdesivir com imunomoduladores, como dexametasona, corticosteróides, baricitinib, IV tocilizumab ou IV sarilumab	
Drogas antivirais não recomendadas	
Não recomendados, exceto em ensaios clínicos	Não recomendado em nenhum caso para tratamento de COVID-19
Interferons para pacientes não hospitalizados	Cloroquina ou Hidroxicloroquina para qualquer paciente
Interferon alfa ou lambda para pacientes hospitalizados	Azitromicina para qualquer paciente
Ivermectina	Lopinavir/ritonavir para qualquer paciente
Nitazoxanide	Interferon beta sistêmico para pacientes hospitalizados

FONTE: ADAPTADO DE NIH (2022).

2 PROCEDIMENTOS PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19

A importância do diagnóstico rápido e eficiente é essencial para prevenir a propagação do vírus por pessoas em fase assintomática ou assintomáticos, que possuem a capacidade de transmitir a doença para diversos indivíduos, incluindo grupos mais vulneráveis. Dessa forma, a detecção em massa de COVID-19 com alta sensibilidade e especificidade é um ponto importante para conter o avanço da pandemia de COVID-19, quando devidamente associado com quarentena dos casos confirmados (KEVADIYA et al., 2021).

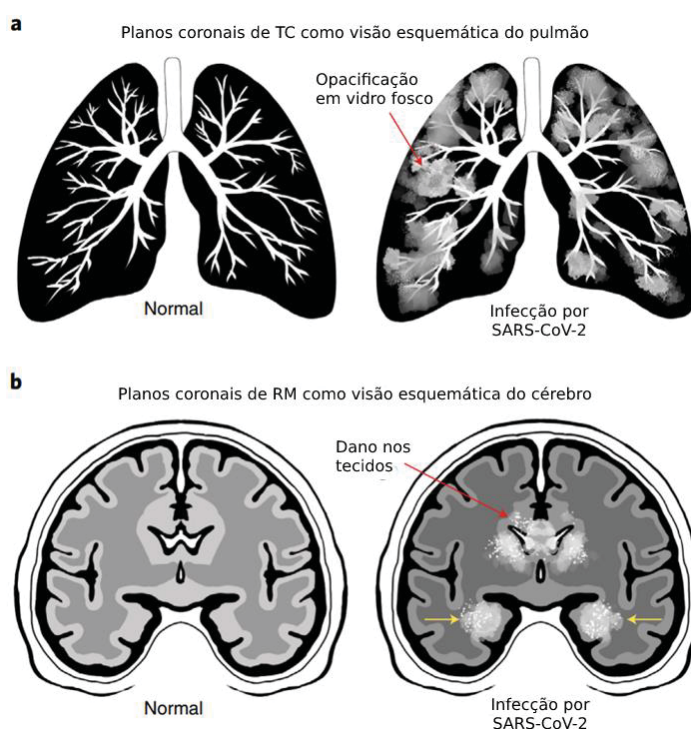
De acordo com o Ministério da Saúde, as formas de diagnóstico da COVID-19 utilizadas no Brasil são por (1) diagnóstico clínico, (2) diagnóstico laboratorial,

envolvendo biologia molecular, sorologia e testes rápidos e (3) diagnóstico por imagem (MS, 2021).

No caso do diagnóstico clínico, ele é realizado por meio de uma investigação clínico-epidemiológica, anamnese e adequado exame físico do indivíduo. Devem ser considerados os sintomas característicos da doença e também se houve contato próximo com casos confirmados para COVID-19 nos últimos 14 dias. Como as características clínicas da doença se assemelham a outros vírus respiratórios, como é o caso da influenza, rinovírus, adenovírus, etc., não há especificidade para a COVID-19, sendo necessário outros exames para confirmar o diagnóstico (MS, 2021).

O diagnóstico de imagem é executado por tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) do pulmão, podendo ser confirmado também com a complementação de ressonância magnética (RM) do cérebro. As alterações tomográficas observadas no caso da COVID-19 são opacidade em vidro fosco periférico e bilateral, opacidade em vidro fosco multifocal de morfologia arredondada e sinal de halo reverso, característico de pneumonia (MS, 2021; KEVADIYA et al., 2021).

FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO DE (a) TCAR DO PULMÃO E (b) RM DO CÉREBRO EM CASOS GRAVES DE COVID-19.



FONTE: ADAPTADO DE KEVADIYA et al. (2021).

O diagnóstico laboratorial que envolve biologia molecular se dá por duas técnicas: a *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* em tempo real (RT-qPCR) e a amplificação isotérmica mediada por loop com transcriptase reversa (*Reverse Transcriptase Loop-mediated isothermal Amplification* ou RT-LAMP, em inglês). Ambas as técnicas são responsáveis por identificar o material genético do SARS-CoV-2.

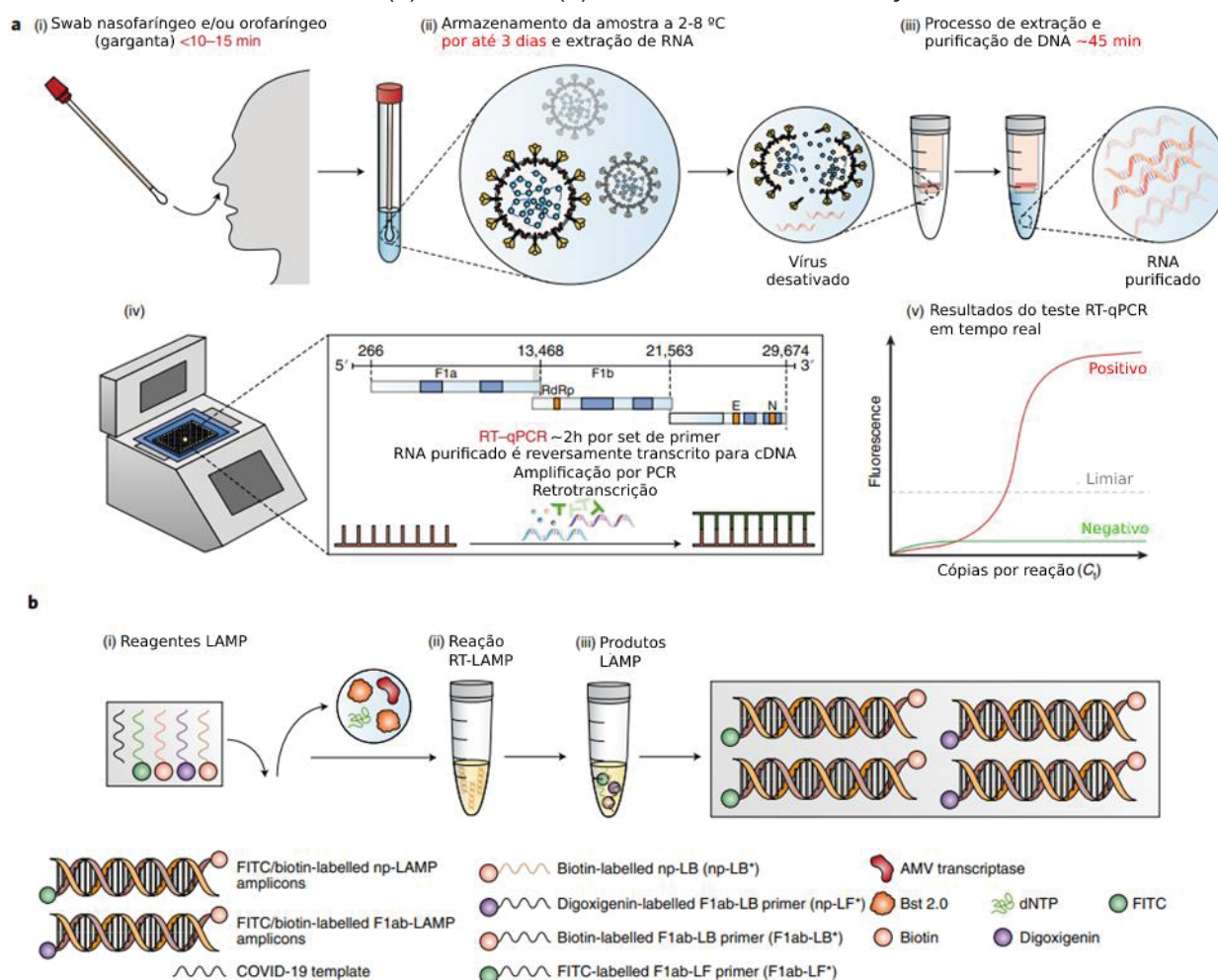
A RT-qPCR é considerada o padrão ouro para COVID-19 e se baseia em converter o RNA viral em DNA complementar (cDNA), o qual é amplificado pela Taq DNA polimerase e, assim, quantificado. Alguns pontos negativos da técnica, se comparado com métodos que não são baseados em biologia molecular, envolvem a possibilidade de falso negativo a depender da evolução do vírus, armazenamento das amostras, purificação do ácido nucleico com baixa qualidade, alto custo e demora na realização do procedimento (KEVADIYA et al., 2021). Entretanto, os casos de falsos negativos por erros operacionais e pela baixa carga viral não são limitações da técnica em si, que apresentaria o resultado esperado caso o diagnóstico fosse realizado dentro das condições padrões para a RT-qPCR.

A técnica RT-LAMP utiliza como método de detecção medidas colorimétricas, níveis de turbidez ou de fluorescência. Esse teste utiliza uma estrutura de lab-on-a-chip com tiras integradas em uma plataforma microfluídica, onde fluoresceína é concedida ao conjunto de primers utilizados, de forma que o produto da reação RT seja marcado (KEVADIYA et al., 2021).

Já o diagnóstico laboratorial por sorologia é baseado na detecção de anticorpos contra o SARS-CoV-2, como o IgM, identificável na primeira semana e com pico após duas semanas, IgA, detectáveis entre os dias 4 e 10 da infecção, e IgG, com início da detecção mais tardio, mas perdurando até 48 dias em média, podendo, assim, ser diagnosticados casos em que a doença esteja ativa ou tenha ocorrido a infecção no passado (KEVADIYA et al., 2021).

Os métodos aplicados nesse caso são Imunoensaio por Quimioluminescência (CLIA), Imunoensaio por Eletroquimioluminescência (ECLIA) e principalmente o Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* ou ELISA, em inglês) (MS, 2021).

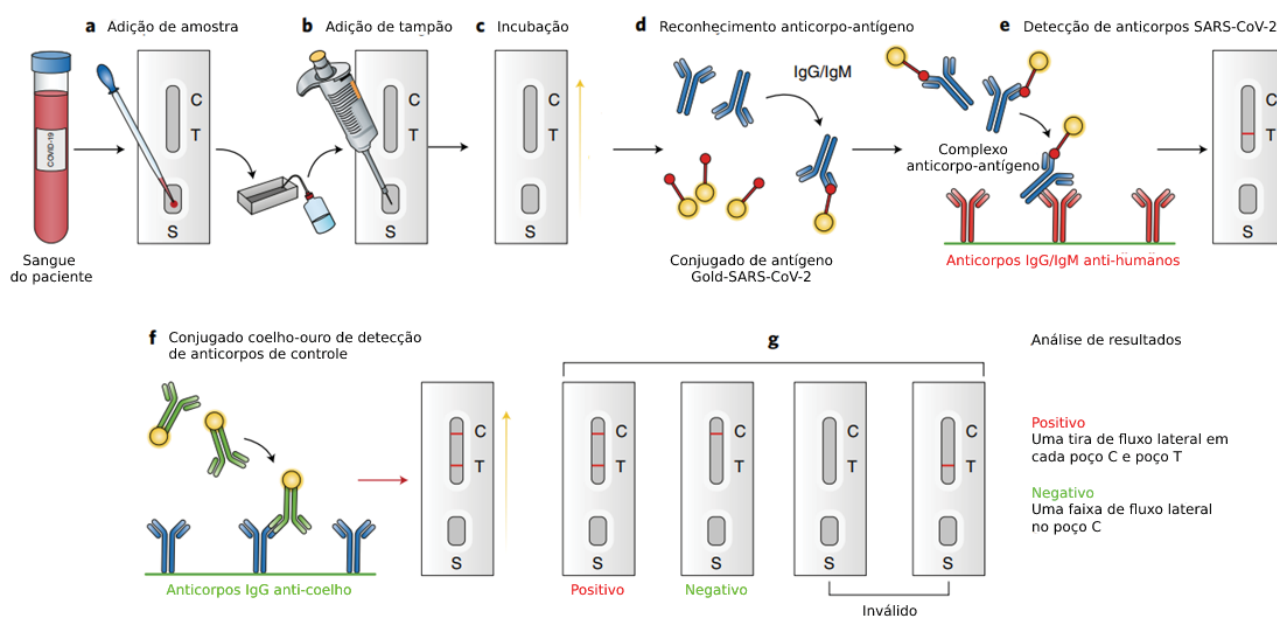
FIGURA 15 – MÉTODO DE (a) RT-PCR E (b) RT-LAMP PARA DETECÇÃO DE SARS-CoV-2.



FONTE: ADAPTADO DE KEVADIYA et al. (2021).

Por último há a utilização de testes rápidos como forma de diagnóstico laboratorial da COVID-19. Esses testes se encontram disponíveis de duas formas, sendo (1) de antígeno, detectando proteínas do SARS-CoV-2 em amostras naso/orofaringe coletadas durante a fase aguda da doença, e (2) de anticorpo, detectando os anticorpos anteriormente citados, utilizando como amostra sangue total, soro ou plasma do paciente contaminado (MS, 2021). A metodologia dos testes rápidos é por imunocromatografia (FIGURA 16) e oferece alta sensibilidade e especificidade (97% e 98%, respectivamente) a baixo custo e resultados fornecidos dentro de 15 minutos.

FIGURA 16 – TESTE RÁPIDO SOROLÓGICO.



FONTE: ADAPTADO DE KEVADIYA et al. (2021).

3 SISTEMA IMUNE

A imunologia é definida como sendo o estudo das defesas do organismo contra infecções. A forma como o organismo se defende dos agentes infecciosos e suas infecções é mediada por células e moléculas que constituem o sistema imune. São quatro as principais funções que o sistema imune confere para proteger o indivíduo contra o patógeno: (1) reconhecimento imune, (2) funções imunes efetoras, (3) regulação imune e (4) memória imune (MURPHY, 2014).

A resposta imunológica que o sistema imune realiza é dividida em dois grupos: resposta imune inata, envolvendo barreiras físicas e químicas (ex.: pele e sistema complemento), além de células (ex.: macrófagos, células dendríticas, etc.), e resposta imune adaptativa, que conta com células T e B, juntamente com os seus produtos. Há também a divisão da resposta imunológica em humoral e celular, quando é mediada por anticorpos e por células, respectivamente (TERRA et al., 2012).

3.1 RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do indivíduo e é caracterizada por ser mais ágil, de forma que esteja sempre disponível de imediato para combater uma ampla variedade de patógenos. Entretanto, a imunidade inata

não é específica para nenhum patógeno e também não produz uma imunidade duradoura (MURPHY, 2014).

A partir do momento em que os patógenos cruzam as barreiras físicas e químicas, o sistema complemento é responsável por reconhecer e destruir de imediato os agentes estranhos ao corpo, sendo que a imunidade inata disponibiliza células fagocitárias, como macrófagos e neutrófilos, células dendríticas (DC) e células *natural killers* (NK) para eliminar os patógenos por meio da produção de substâncias químicas tóxicas, como moléculas antimicrobianas assim como óxido nítrico (NO), juntamente de enzimas de degradação (MURPHY, 2014; TERRA et al., 2012).

As células dendríticas são a ligação entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa, uma vez que são especializadas em fazer a apresentação dos antígenos para as células da imunidade adaptativa, sendo também chamadas de células apresentadoras de antígenos (APC). Ao invés de realizar a eliminação dos patógenos, as DC se maturam em células que irão ativar células T por apresentar os antígenos em sua superfície, fornecendo também outros sinais importantes para a ativação de células T (MURPHY, 2014).

TABELA 5 – FUNÇÕES DA IMUNIDADE INATA.

Principais funções do sistema imune inato
Impedir a entrada de agentes estranhos pelas barreiras físicas e químicas
Prevenir a disseminação da infecção por meio de mediadores humorais
Remover não próprios via fagocitose ou meios citotóxicos
Ativar o sistema imune adaptativo através de citocinas de sinalização e apresentação de antígenos

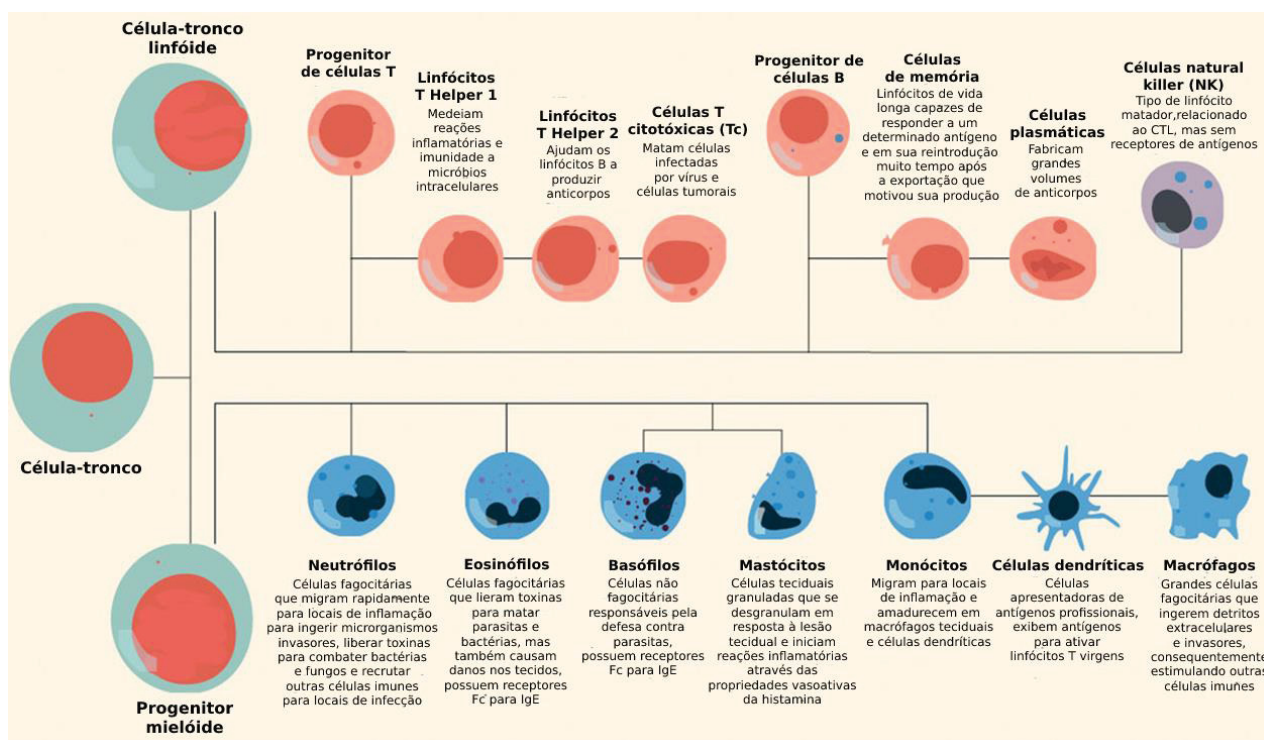
FONTE: ADAPTADO DE GLEICHMANN; STEWARD (2020).

A resposta imune adaptativa produz imunidade específica, com a produção de anticorpos e células específicas contra um agente infeccioso em particular ou produtos do mesmo. Ao contrário da imunidade inata, a adaptativa é caracterizada pela resposta imunológica tardia, levando dias para se sintetizar. Dessa forma, o organismo consegue desenvolver memória imune, conferindo imunidade protetora contra reinfecções causadas pelo mesmo patógeno (MURPHY, 2014; TERRA et al., 2012).

A imunidade adaptativa inclui principalmente a atuação de leucócitos conhecidos como linfócitos, envolvendo as células T (CD4⁺ e CD8⁺), com produção de citocinas, e células B, as quais produzem anticorpos. Essas células são capazes de reconhecer e agir contra determinados antígenos devido à presença de receptores de antígenos especializados na superfície desses linfócitos, permitindo com que as células se liguem aos antígenos (MURPHY, 2014).

Quando o antígeno se encontra com um receptor de antígeno de célula T (T-cell receptor ou TCR, em inglês), os linfócitos T se proliferam e se diferenciam em efectoras. São três variações de células T efectoras, com funções diferentes: (1) As células T citotóxicas (CD8⁺) são responsáveis por matar as células infectadas com patógenos intracelulares; (2) as células T auxiliares (CD4⁺) efetuam sinais que influenciam a atividade de outras células, como células B e células fagocitárias, melhorando a produção de anticorpos e tornando-as mais eficientes para eliminar os patógenos, respectivamente; e (3) as células T reguladoras (CD4⁺) regulam as atividades dos linfócitos, inibindo as respostas imunes das células T (MURPHY, 2014).

FIGURA 17 – CÉLULAS DOS SISTEMAS IMUNES INATO E ADAPTATIVO.



FONTE: ADAPTADO DE GLEICHMANN; STEWARD (2020).

As células T amadurecem em um órgão linfóide central chamado de timo, localizado no tórax superior. As células maduras circularam pelos órgãos linfóides periféricos, abrangendo os linfonodos, tecidos linfóides de mucosa, como intestino, trato respiratório e urogenital, etc., e baço, onde ficarão até o início da resposta imune adaptativa. As células ativadas se proliferam produzindo progênes para o mesmo antígeno, processo conhecido como expansão clonal (MURPHY, 2014).

3.2 RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR

A resposta imune adaptativa é dividida em duas: a resposta imune humoral e a resposta imune celular/mediada por células. A resposta imune humoral é mediada por anticorpos e controlada pelas células B ativadas. Ou seja, quando há eliminação de um patógeno por moléculas liberadas pelo sistema imune a resposta imunológica é humoral (TERRA et al., 2012).

A ativação de células B ocorre com a ligação do antígeno ao receptor de células T (BCR), transmitindo sinais intracelulares para indicar a ligação. Além disso, o BCR envia o antígeno para o meio intracelular, gerando peptídeos do patógeno que são devolvidos para a superfície da célula B associados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex* ou MHC, em inglês) de classe II. As células T auxiliares específicas para o antígeno são capazes de reconhecer os complexos de peptídeos ligados aos MHC de classe II. Dessa forma, essas células liberam citocinas que promovem a proliferação de células B, diferenciando-se em células secretoras de anticorpos, as células plasmáticas, e em células B de memória (MURPHY, 2014).

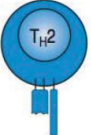
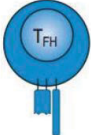
São três as principais funções dos anticorpos: neutralização, opsonização e ativação do complemento. Na neutralização os anticorpos se ligam ao patógeno para impedir a entrada dos mesmos nas células. A opsonização é caracterizada pelo revestimento da superfície de um agente infeccioso, promovendo a fagocitose. Por último há a ativação do complemento, que ocorre quando os anticorpos ativam proteínas do sistema do completo pela via clássica, aumentando a opsonização e lise de alguns patógenos (MURPHY, 2014; DORNELL, 2021).

A resposta imune celular ou resposta imune mediada por células é aquela onde a eliminação do patógeno é mediada principalmente por células T. Esse tipo de resposta atua contra patógenos intracelulares, tanto quando o agente infeccioso é fagocitado e escapa para o interior da célula ao burlar os mecanismos, quanto na

infecção de um patógeno ao penetrar uma célula-alvo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

As células T CD8⁺ virgens reconhecem peptídeos apresentados pelo MHC de classe I, diferenciando-se em células T CD8⁺ citotóxicas, as quais atuam contra patógenos intracelulares, especialmente em células infectadas por vírus, liberando substâncias que causam a fagocitose da célula infectada (DJAUD; PARHAM, 2020). É comum que as células necessitem do auxílio de células T CD4⁺ auxiliares para se tornarem efetoras (MURPHY, 2014).

FIGURA 18 – FUNÇÕES DAS CÉLULAS T EFETORAS.

	Células T CD8 citotóxicas	Células CD4 T _H 1	Células CD4 T _H 2	Células CD4 T _H 17	Células T _{FH}	Células T CD4 reguladoras (vários tipos)
Tipos de células T efetoras						
Principais funções na resposta imune adaptativa	Mata células infectadas por vírus	Ativa macrófagos infectados Fornece auxílio às células B para a produção de anticorpos	Fornece auxílio às células B para a produção de anticorpos, sobretudo com a mudança para IgE	Intensifica a resposta de neutrófilos Promove a integridade da barreira (pele, intestino)	Auxilia as células B Realiza a troca de isotipo Produz anticorpos	Inibe as respostas das células T
Patógenos-alvo	Vírus (p. ex., da gripe, da raiva e da varicela) Algumas bactérias intracelulares	Microrganismos que persistem nas vesículas macrófágicas (p. ex., micobactéria, <i>Listeria</i> , <i>Leishmania donovani</i> e <i>Pneumocystis carinii</i>) Bactérias extracelulares	Parasitas helmintos	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Fungos (<i>Candida albicans</i>)	Todos os tipos	

FONTES: MURPHY (2014).

As células T CD4⁺ virgens se diferenciam após o reconhecimento de peptídeos específicos apresentados por MHC de classe II, havendo subpopulações de células efetoras com funções imunes distintas. As células T CD4⁺ auxiliares são identificadas nas classes funcionais T_H1, T_H2, T_H17 e T_{FH} (célula T auxiliar folicular), auxiliando diferentes células do sistema imune. As características destas classes se encontram na FIGURA 18. A segunda função efetora que a célula pode adquirir é a de célula T CD4⁺ reguladora (T_{reg}), podendo inibir as respostas das células T. Elas podem ser conhecidas como células T_{reg} naturais quando realizam sua função no próprio timo ou células T_{reg} induzidas quando células T CD4⁺ virgens são ativadas na presença de fator de transformação de crescimento β (TGF-β) e na ausência de IL-6, além de outras citocinas (MURPHY, 2014; ALVES, 2021).

A principal consequência da imunidade adaptativa é a construção de uma imunidade protetora contra as reinfecções, por meio da memória imune. Essa imunidade duradoura é estabelecida por anticorpos pré-formados, células T efectoras e a geração de novas populações de linfócitos. As novas populações adquirem a capacidade de atender imediatamente novas infecções pela transferência da atividade de células B e T instruídas para linfócitos virgens. Sabe-se também que as células T CD4⁺ são essenciais para regular as células T CD8⁺ de memória (MURPHY, 2014).

3.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E DE NITROGÊNIO (RNS)

Durante as funções do metabolismo e da via aeróbica há um processo fundamental para o organismo chamado de reações redox, compostas por oxidações e reduções. A oxidação é uma reação química onde há a perda de elétrons de uma substância ou um aumento no estado de oxidação da mesma. Já a redução é quando há o ganho de elétrons de uma substância ou diminuição no estado de oxidação (REDOX, 2012). Essas reações quando são aplicadas para os conceitos de química orgânica há também a transferência de elétrons, que fica visível e representada pelas moléculas envolvidas na transferência. No caso, a oxidação orgânica ocorre quando há ganho de oxigênio ou perda de hidrogênio, enquanto a redução orgânica é o ganho de hidrogênio e perda de oxigênio (NISHINAGA, 2015).

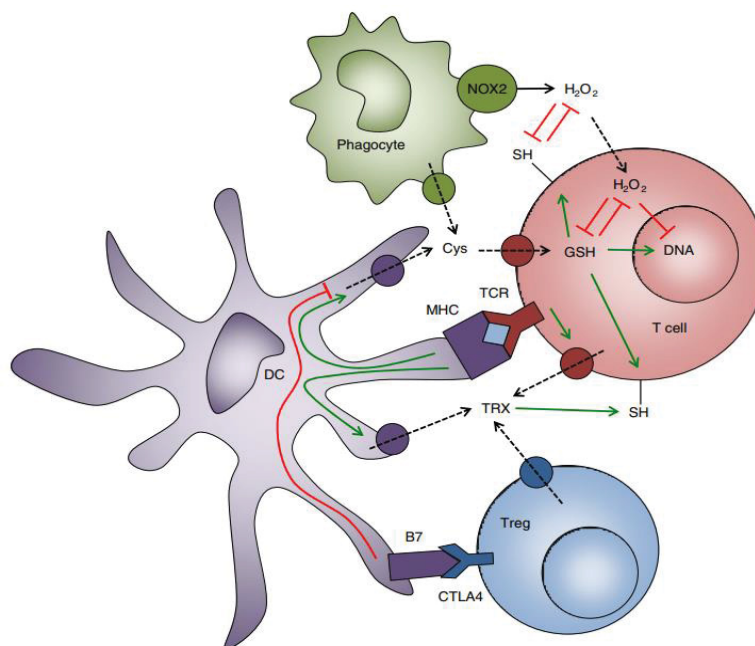
As reações de oxidação no organismo formam radicais livres, os quais apresentam um ou mais elétrons desemparelhados nos átomos de nitrogênio ou de oxigênio. Quando o elétron está centrado em um átomo de oxigênio, é chamado de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* ou ROS, em inglês), que há como exemplos radicais superóxido (O₂^{•-}) e hidroxila (HO[•]) e derivado não radical peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Quando as espécies são derivadas de nitrogênio, elas são nomeadas de espécies reativas de nitrogênio (*reactive nitrogen species* ou RNS, em inglês), tendo como exemplos o óxido nítrico (NO[•]), o dióxido de nitrogênio (NO₂[•]) e o intermediário peroxinitrito (ONOO⁻) (CALAS-BLANCHARD; CATANANTE; NOGUER, 2014; VASCONCELOS et al., 2007).

Por se tratar de uma função essencial no metabolismo em condições normais fisiológicas, ocorre o balanço entre geração e eliminação de ROS/RNS nas células, importantes para a sinalização celular, regulação de citocinas inflamatórias e fatores

de crescimento (SUHAIL et al., 2020). Caso os níveis dessas espécies estejam inferiores ao normal, elas podem ser sinalizadores para promover a sobrevivência e proliferação celular, enquanto o aumento na concentração delas pode induzir a morte celular por causar dano às macromoléculas celulares, como proteínas, lipídios e DNA. O desequilíbrio nos níveis de moléculas oxidantes e antioxidantes, é chamado de estresse oxidativo (SILVA; CERCHIARO; HONÓRIO, 2011).

Células T ativadas e citocinas secretadas se encontram próximas de fagócitos ativados, os quais produzem H_2O_2 via NOX-2. O H_2O_2 pode oxidar os tióis (SH) presentes na superfície das células T ou, intracelularmente, oxidar a glutatona (GSH) ou interferir na síntese de DNA. O estresse oxidativo em células T pode causar hipo ou hiperresponsividade das mesmas, o que pode acarretar no desenvolvimento de diversas enfermidades (BELIKOV; SCHRAVEN; SIMEONI, 2015).

FIGURA 19 – REGULAÇÃO REDOX DE CÉLULAS T.

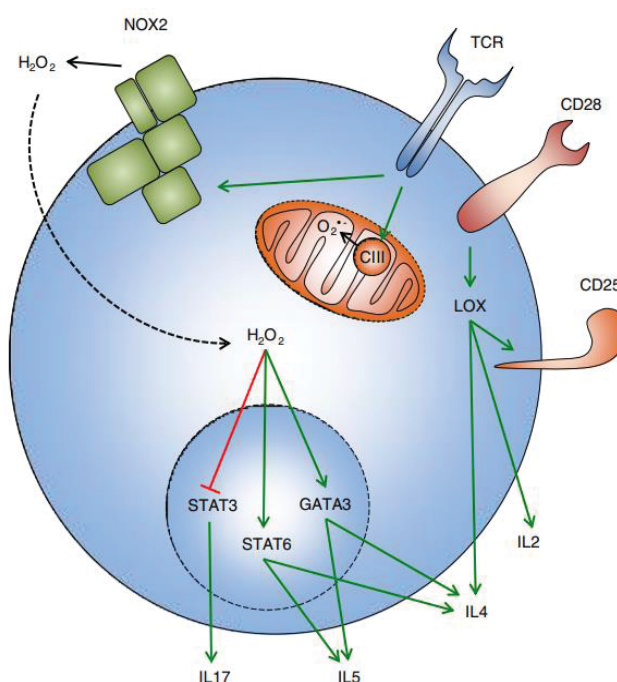


FONTE: BELIKOV; SCHRAVEN; SIMEONI (2015).

LEGENDA: Fagócitos ativados e células dendríticas (DC) secretam cisteína (Cys) para o espaço extracelular, onde é absorvida pelas células T e, então, convertida em GSH. A GSH é um antioxidante responsável por neutralizar efeitos supressores de ROS liberadas pelos fagócitos ativados e DC, mantendo os tióis de superfície reduzidos, neutralizando o H_2O_2 intracelular e permitindo a síntese de DNA. Além disso, a interação TCR-peptídeo-MHC provoca secreção de tioredoxina (TRX) pelas células T, T_{reg} e DCs. Essa substância também é responsável por conservar os tióis de superfície no estado reduzido.

Há também estudos sobre a participação de ROS durante a ativação de células T humanas, as quais produzem as espécies após estimulação com diferentes agentes. Um fator a ser levado em consideração é a possibilidade das ROS detectadas serem produzidas por contaminantes durante a preparação das células T, como células fagocíticas (BELIKOV; SCHRAVEN; SIMEONI, 2015).

FIGURA 20 – ROS NA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS T.



FONTE: BELIKOV; SCHRAVEN; SIMEONI (2015).

LEGENDA: A estimulação de TCR ou CD28 acarreta a produção de ROS por 5-lipoxigenase, NOX-2 e mitocôndrias em células T. A ativação da via da lipoxigenase (LOX) ocorre durante a ligação do CD28, alavancando a expressão de CD25, IL-2 e IL-4. Já o TCR tem duas participações em relação às ROS, a primeira aumentando a produção de $O_2^{\cdot -}$ pelo complexo mitocondrial III (CIII) e a segunda pela ativação de NOX-2. Como descrito anteriormente, a NOX-2 é responsável pela produção de H_2O_2 que, uma vez dentro da célula, ativa GATA-3 e STAT-3, além de inibir STAT-6. A diferenciação da célula T é dependente desses fatores, uma vez que GATA-6 e STAT-6 direcionam para o fenótipo T_H2 e produção de IL-4 e IL-5, enquanto a STAT-3 para T_H17 com produção de IL-17 (BELIKOV; SCHRAVEN; SIMEONI, 2015).

É possível monitorar a produção intracelular de ROS/RNS em células vivas principalmente com a utilização de sondas fluorescentes. Os métodos mais comuns para monitoramento das ROS são utilizando as sondas vermelho amplex (10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazina ou ADHP) e o diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (ENOMOTO; MATHARU; REVZIN, 2013; CHEN et al., 2012). A sonda

DCFH-DA é desacetilada após atravessar a membrana celular, tornando-se acessíveis para reagir com oxidantes. Após ser oxidada, há a geração de diclorofluoresceína fluorescente, a qual pode ser quantificada nos comprimentos de onda de excitação de 485 nm e de emissão em 530 nm (WU; YOTNDA, 2011).

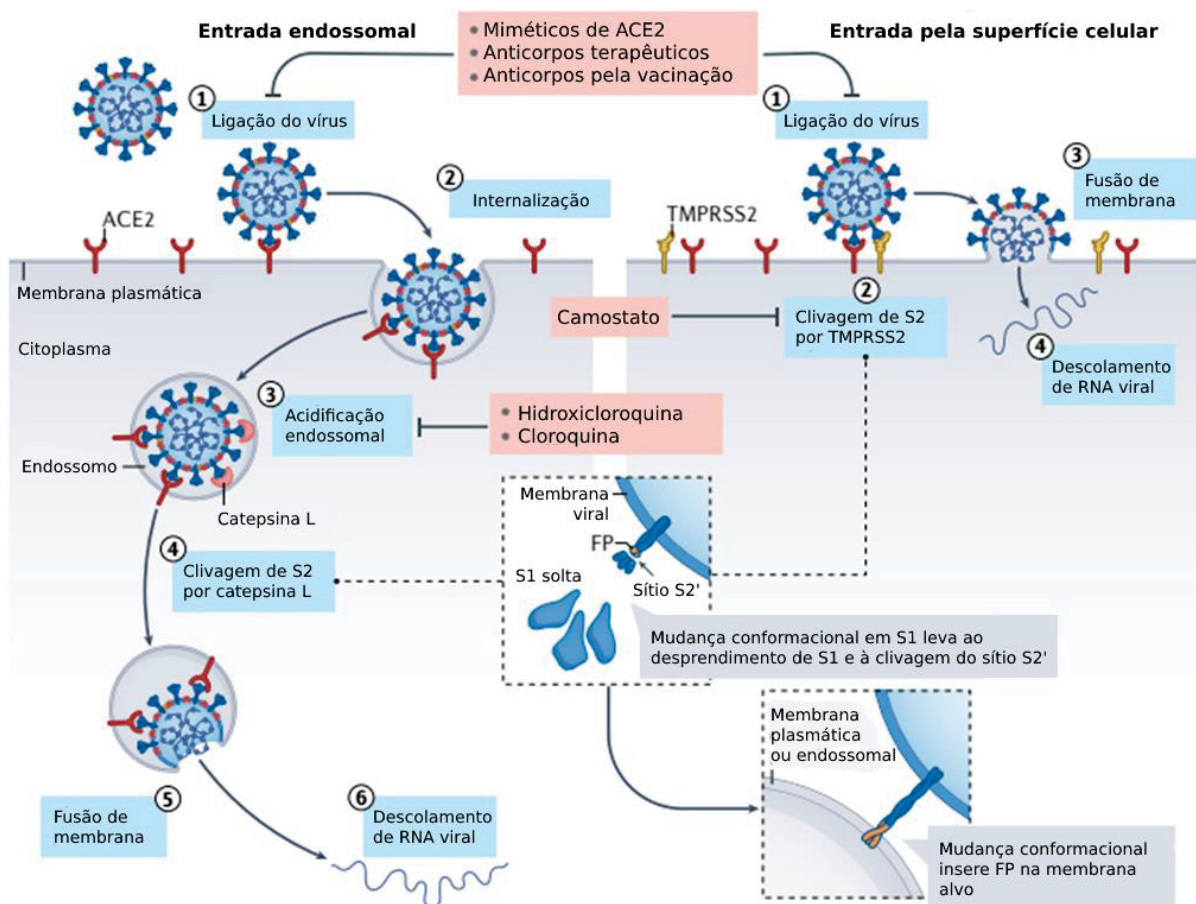
Já o controle das RNS acontece especialmente pela medição de espécies de óxido nítrico com a utilização de sondas fluorescentes, como diaminofluoresceínas, ou o agente Griess, que reage com o óxido nítrico, formando um complexo que pode ser mensurado no comprimento de onda de 548 nm (CALAS-BLANCHARD; CATANANTE; NOGUER, 2014). Entretanto, o Griess detecta apenas o nitrito nas amostras, não outras formas de RNS, além de ser uma sonda pouco sensível.

3.4 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS DA COVID-19

O SARS-CoV-2 infecta o organismo via naso-oral e interage com as células pulmonares que expressam o receptor da enzima conversora da angiotensina 2 (*angiotensin-converting enzyme 2* ou ACE2, em inglês), como as células alveolares tipo 2 (SHAH et al., 2020). Após o vírus se ligar ao receptor ACE2 pela proteína S, ele consegue adentrar as células pulmonares por duas vias distintas: (1) na ausência de serinoprotease transmembrana II humana (TMPRSS2) e (2) na presença de TMPRSS2.

No caso da célula-alvo não expressar TMPRSS2 suficiente ou se o vírus ligado ao ACE2 não encontra a proteína, o complexo vírus-ACE2 será internalizado na célula via endocitose mediada por clatrina nos endolisossomos. O local S2', interno à subunidade S2 da proteína S, é clivado por catepsina L, a qual só tem atividade em ambiente ácido. Já em situações em que a célula-alvo expressa TMPRSS2, a proteína é responsável por realizar a clivagem no local S2' da proteína S, a qual ocorre na superfície da célula sem prévia internalização do complexo vírus-ACE2 (JACKSON et al., 2022).

FIGURA 21 – VIAS DE ENTRADA DO SARS-CoV-2 NA CÉLULA-ALVO.



FONTE: ADAPTADO DE JACKSON et al. (2022).

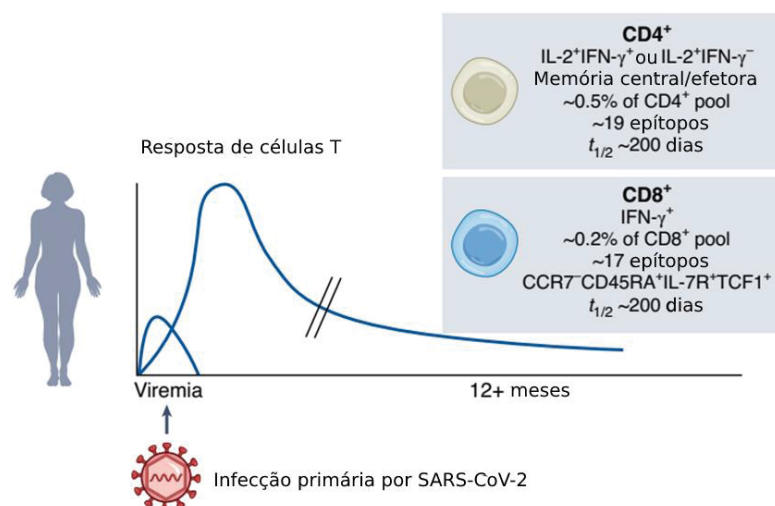
Independente da via de entrada do SARS-CoV-2 na célula, quando ocorre a clivagem do sítio S2' há mudanças conformacionais na subunidade S2 que além de exporem o peptídeo de fusão (FP) também impulsionam o mesmo para dentro da membrana do alvo, acontecendo a fusão entre as membranas viral e celular. A fusão de membranas é realizada com a formação de um poro de fusão pelo qual é liberado o RNA viral no citoplasma da célula-alvo (JACKSON et al., 2022).

Os primeiros a identificarem o vírus no organismo são os receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs), sobretudo os receptores do tipo Toll (*toll-like receptors* ou TLR, em inglês) 3, 7 e 8, elevando a produção de interferon. A resposta imune inata, em especial a mediada por interferons do tipo I, interfere e pode influenciar na resposta imune adaptativa e no quadro clínico da doença, sendo que quadros clínicos graves são caracterizados pela inflamação precoce, com altos níveis de IFN- α , TNF e IFN- γ 21, juntamente de resposta imune adaptativa tardia e excessiva (MOSS, 2022).

No decorrer da infecção pelo SARS-CoV-2, as células T reconhecem os antígenos do vírus que são apresentados pelo MHC de classe I, também chamado de HLA em humanos (Antígeno Leucocitário Humano ou *Human Leukocyte Antigen*, em inglês), que promove a atividade citotóxica de células T CD8⁺ e a liberação de citocinas. De forma similar, também é possível que o MHC de classe II apresente peptídeos do vírus para células T CD4⁺ (SHAH et al., 2020).

A resposta imune celular com controle eficaz da COVID-19 e em casos leves da doença é caracterizada pelo desenvolvimento precoce de resposta por células T CD8⁺ citotóxicas, associado ao alto nível de expressão de moléculas efetoras por essas células, e células T CD4⁺ tipo 1, com pico em aproximadamente 14 dias após a aparição dos sintomas. Já quando há a ativação em excesso de células T e um perfil de células T CD4⁺ tipo 2, o quadro clínico da doença é frequentemente grave (MOSS, 2022). Em casos assintomáticos de COVID-19, as respostas das células T vírus-específicas são definidas pela produção de citocinas inflamatórias e IL-10 em equilíbrio, enquanto a infecção sintomática há produção polarizada dos mediadores inflamatórios (SHAH et al., 2020).

FIGURA 22 – PERFIL DE CÉLULAS T DURANTE INFECÇÃO POR SARS-CoV-2.



FONTE: ADAPTADO DE MOSS (2022).

LEGENDA: Durante os 12 primeiros meses após a eliminação da infecção primária de SARS-CoV-2 (viremia) por células T CD4⁺ e CD8⁺, há a manutenção das respostas de células T de memória. Essas populações representam aproximadamente 0,5% e 0,2% do repertório de células T CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente, visando 19 e 17 epítopos cada.

Nos casos de reinfecção por SARS-CoV-2, as células T CD4⁺ de memória, com a produção de citocinas, estimulam células B e outras células do sistema imune, apresentando mais marcadores de memória central, como CD45RA⁻, CD62L⁻ e CCR7⁺. Já as células T CD8⁺ citotóxicas de memória são responsáveis pela destruição das células infectadas com o vírus, sendo que esse grupo celular tem marcadores de memória efetora, como CD45RA⁺, CD62L⁻ e CCR7⁻ (SHAH et al., 2020).

4 BIOSSENSORES

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry* ou IUPAC, em inglês), sensores químicos são definidos como instrumento que respondem de maneira seletiva a espécies ou compostos químicos contidos em uma amostra, de tal forma que o sinal originado do sistema é proporcional à concentração (HULANICKI; GLAB; INGMAN, 1991).

Os sensores são constituídos por um receptor, o qual transforma a informação química em energia, e um transdutor, responsável por medir a energia do receptor por meio de um sinal analítico. A depender da origem do sinal, os receptores podem ser baseados em princípios físicos (sem reação química), químicos (com reação química) e bioquímicos (processo bioquímico). Neste último caso de receptor os sensores são classificados como biossensores (HULANICKI; GLAB; INGMAN, 1991).

Biossensores são definidos como dispositivos encarregados de converter uma resposta biológica em um sinal elétrico, onde os receptores são elementos biológicos, como células, enzimas, anticorpos, etc. Dessa forma, é possível realizar o monitoramento de doenças, detecção de drogas, patógenos e marcadores, como a detecção de hormônios, toxinas, metais pesados, etc. (METKAR, GIRIGOSWAMI, 2019).

Como características de biossensores há a seletividade para detectar o analito específico em uma amostra; reprodutibilidade; estabilidade para não ser suscetível a mudanças no ambiente; sensibilidade, ou seja, capacidade de detectar analitos com baixíssimas concentrações, como limite de detecção na faixa de ng/mL; e linearidade, atribuído à precisão da resposta medida, havendo mudança do sinal

captado quando se altera a concentração do analito (METKAR, GIRIGOSWAMI, 2019).

Um modelo eletroquímico que pode ser utilizado como um biossensor são os eletrodos serigrafados (*screen-printed electrodes* ou SPE, em inglês). Esses eletrodos são constituídos pela deposição de camada por camada de tinta sobre a base sólida, sendo comumente utilizadas as tintas de prata, ouro e carbono, na configuração de três eletrodos impressos: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e contra eletrodo. A prata impressa no eletrodo funciona como uma trilha condutora no eletrodo de referência, enquanto o ouro ou carbono compõem o eletrodo de trabalho e contra eletrodo (TALEAT; KHOSHROO; MAZLOUM-ARDAKANI, 2014). A prevalência da utilização de carbono na construção dos eletrodos é devido ao baixo custo e por ser quimicamente inerte, entretanto é necessário a adição de polímeros no eletrodo de trabalho para que haja a imobilização de amostras biológicas.

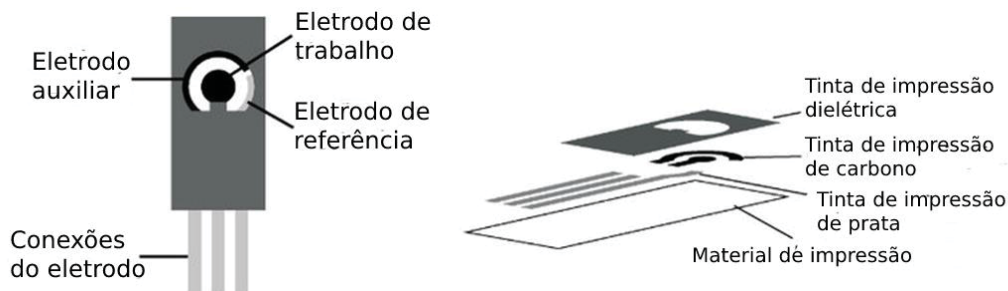
TABELA 6 – DESENVOLVIMENTO HISTÓRICO DE ELETRODOS E BIOSSENSORES.

Década	Evento
	Descoberta do transistor de efeito de campo sensível a íons (ISFET)
1970	Detecção de CO₂ e O₂ por biossensor de fibra óptica Primeiro biossensor comercial para detecção de glicose Primeiro imunossensor baseado em micróbios Biossensor de fibra óptica para detecção de glicose Imunossensor de ressonância plasmônica de superfície (SPR)
1980	Primeiro biossensor mediado por amperometria Desenvolvimento de ultramicroeletrodos Desenvolvimento de eletrodo revestido de polímero Biossensor baseado em SPR
1990	Biossensor de sangue portátil Desenvolvimento de <i>screen-printed electrode</i> (SPE)

FONTE: ADAPTADO DE METKAR, GIRIGOSWAMI (2019); WANG (1994).

Os materiais mais empregados nesses casos são o ácido poli-lático (PLA), poli L-lisina (PLL), poliamida (PA) e acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS) (MARTINS et al., 2021; GUVEN; LOZANO-SANCHEZ; GUVEN, 2013).

FIGURA 23 – COMPOSIÇÃO DE UM *SCREEN-PRINTED ELECTRODE*.

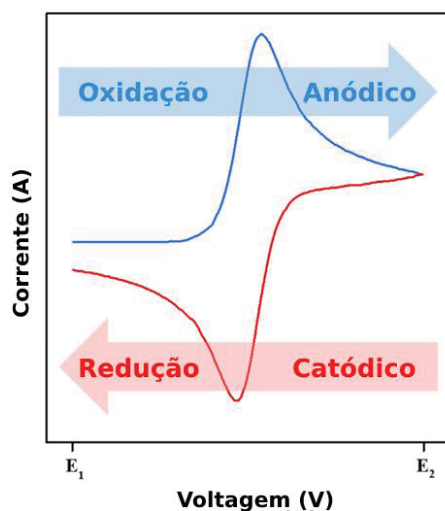


FONTE: ADAPTADO DE KAVCIC; KARLOVITS; ZULE (2020).

Dessa forma, os SPE de ouro ou de carbono, este último quando combinado com outros polímeros, podem ser aplicados como biossensores eletroquímicos, com exemplos de sensores enzimáticos, imunológicos ou de genes. Podendo ser integrados em dispositivos eletrônicos, os SPE oferecem uma alternativa rápida, de alta sensibilidade, com facilidade de operação e portátil no diagnóstico de doenças (POHANKA, 2020).

O diagnóstico realizado pelos SPE ocorre por meio da medição de compostos ativos redox presentes na amostra biológica, utilizando técnicas de voltametria, como a voltametria de onda quadrada e a voltametria cíclica (POHANKA, 2020). A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica responsável pelo estudo de reações iniciadas por transferência de elétrons, como a redução e oxidação. Os resultados são transferidos para um gráfico, conhecido como voltamograma, contendo no eixo x o potencial aplicado enquanto no eixo y há a corrente resultante para aquele potencial. A varredura positiva do potencial gera o traço anódico, formando o pico de oxidação, seguido de uma alteração na direção da varredura, percorrendo o potencial negativamente com o traço catódico, gerando o pico de redução (ELGRISHI et al., 2018).

FIGURA 24 – REPRESENTAÇÃO DE UM VOLTAMOGRAMA.



FONTE: ADAPTADO DE KIM et al. (2020).

Sendo assim, uma alternativa para os diagnósticos tradicionais de COVID-19, descritos no tópico 2 (página 34) deste documento, é a utilização de biossensores SPE na detecção de ROS produzidas durante a ativação e diferenciação de células T específicas para a doença. Os biossensores são alternativas para a falta de sensibilidade e ocorrência de falsos negativos nos testes por antígeno e por anticorpos. Já o diagnóstico baseado em respostas imunes celulares torna-se relevante por ser mais duradoura que a resposta imune humoral, além de abranger pacientes que não tenham desenvolvido anticorpos contra o SARS-CoV-2. Como publicado na pesquisa de GEURTSVANKESSEL et al. (2022), indivíduos vacinados para COVID-19 que apresentavam falta de anticorpos neutralizantes ainda mantinham células T CD4⁺ e CD8⁺, potencialmente auxiliando na prevenção ou limitando casos graves da doença.

CAPÍTULO 2 – ANÁLISE *IN SILICO* DAS CORRELAÇÕES ENTRE BCoV E SARS-CoV-2

1 INTRODUÇÃO

Coronavírus (CoVs) são vírus compostos por RNA fita simples pertencentes à família *Coronaviridae*, capazes de infectar diversos animais causando doenças respiratórias, gastrointestinais e neurológicas. Os quatro gêneros que compõem essa família são: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* and *Deltacoronavirus* (WU et al., 2020). Entre os beta-coronavírus estão o SARS-CoV-2 e o coronavírus bovinos (BCoV), sendo o último responsável por perdas na pecuária causando diarreia em bezerros neonatos e infecções respiratórias em bezerros e gado confinado (VLASOVA; SAIF, 2021; TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2008). Ambos codificam no genoma 4 proteínas estruturais, envelope (E), membrana (M), nucleocapsídeo (N) e spike (S), além das *non-structural proteins* (NSP) e *open reading frame* (ORF) (YAO et al., 2020; HASOKSUZ; KILIÇ; SARAÇ, 2020).

A reatividade cruzada entre cepas de coronavírus é capaz de induzir uma memória imunológica que ajuda a reduzir a gravidade e propagação de doenças. Essa imunidade pré-existente pelo contato com outros coronavírus, como o BCoV, pode fornecer proteção ou aumentar susceptibilidade contra o SARS-CoV-2 sem que seja necessário exposição prévia (LEE et al., 2020). No entanto, trabalhos anteriores que previam a imunidade cruzada se concentraram em coronavírus de diferentes gêneros (THE PHARMALETTER, 2021).

Aqui, é realizada uma análise *in silico* das correlações entre os coronavírus bovino e humano. A correlação espacial entre bovinos e COVID-19 foi avaliada usando dados do Brasil. O país possui áreas grandes e bem definidas com alta densidade de gado. As análises dentro do estado permitem a comparação controlada dos fatores de risco da COVID-19, pois as políticas públicas mais importantes que alteram os riscos da COVID-19 são distribuídas igualmente em nível estadual. Além disso, realizamos uma avaliação imunológica da probabilidade de que a exposição ao BCoV possa induzir respostas imunes protetoras em humanos contra o SARS-CoV-2. Procuramos peptídeos originados das proteínas BCoV M, N, S e ORF que potencialmente poderiam induzir respostas de células T e B em pessoas e que apresentam alta identidade com SARS-CoV-2.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO COVID-19 E ASSOCIAÇÃO COM FATORES DE RISCO

A epidemiologia do COVID-19 foi avaliada a partir de dados disponíveis publicamente (JUSTEN, 2021). Para as análises intra-estaduais, foi utilizada a inclinação de aumento de casos/100.000 pessoas para cada município do estado brasileiro de Mato Grosso do Sul (MS) (entre janeiro de 2020 e setembro de 2021) (ISLAM et al., 2021). A inclinação dos casos de COVID-19 foi comparada com o número de bovinos/100.000 habitantes para cada município do estado (IBGE, 2021).

Como controle, a distância de cada município até a grande cidade da sub-região do estado foi comparada com a inclinação dos casos de COVID-19 (SALDANHA et al., 2015). A eficiência geral dos gastos públicos (não correlacionada diretamente com a COVID-19) também foi usada como controle em uma análise de correlação com a prevalência da COVID-19. Foram utilizados dados da literatura sobre investimento público. O rigor dos gastos foi pontuado de 1 a 4, sendo quatro o uso público de recursos de melhor qualidade (DORSA et al., 2020). A correlação dos dados com a prevalência de COVID-19 foi avaliada com o teste de corrida em uma correlação linear.

Dados de todo o país do Brasil foram avaliados usando QGIS 3.24.1 Tisler. Os dados da COVID-19 de todos os municípios brasileiros e o mapa das estradas brasileiras foram obtidos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (PORTAL, 2022). A localização e densidade da população de gado foi de um conjunto de dados publicado anteriormente, não havendo distinção entre gado de corte e leiteiro (GILBERT et al, 2018).

As taxas de prevalência de COVID-19, densidade de estradas e populações de gado foram comparadas pela intensidade de pixel das respectivas camadas rasterizadas usando '*Point Sampling Tool Plugin*' para QGIS (versão 0.5.3, por Borys Jurgiel). Uma grade de pontos foi colocada sobre os mapas de interesse para análise usando o plugin. A malha foi posicionada para cobrir todo o território brasileiro ao sul do Equador, onde estão localizadas as regiões pecuárias. A prevalência de COVID-19 foi corrigida em relação à densidade de estradas na respectiva região. Para isso, cada ponto COVID-19 da grade de análise foi dividido pela soma dos 9 pontos de 'intensidade' da estrada mais próxima. GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., EUA) foi usado para gráficos e para análise estatística.

2.2 CONFIGURAÇÃO DE PEPTÍDEOS PARA AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA

As sequências proteômicas do coronavírus bovino foram obtidas do banco de dados do NCBI e focadas em quatro proteínas (TABELA 7): proteína spike (S), proteína de membrana (M), proteína do nucleocapsídeo (N) e poliproteína replicase (Orf1ab).

TABELA 7 – SEQUÊNCIAS PROTEÔMICAS DE CORONAVÍRUS BOVINO E SARS-COV-2 HUMANO OBTIDAS DO NCBI.

	Coronavírus bovino	SARS-CoV-2
Proteína <i>spike</i>	NP_150077.1	YP_009724390.1
Proteína de membrana	NP_150082.1	YP_009724393.1
Proteína do nucleocapsídeo	NP_150084.1	QQD86936.1
Orf1ab	NP_150073.3	BCT04066.1

Orf1ab = poliproteína replicase.

FONTE: A AUTORA (2022).

Todas as sequências de proteínas foram organizadas em peptídeos de 15 meros que se sobrepuseram por 10 aminoácidos, usando um programa desenvolvido em python versão 3.10 (RECHE, 2020).

FIGURA 25 – SCRIPT EM PYTHON PARA FORMAR PEPTÍDEOS USADOS NO PRESENTE TRABALHO.

```

1  sequencia = ""
2      COLE SUA SEQUENCIA AQUI,
3      PODE CONTER QUEBRAS DE LINHA
4  """
5
6  sequencia = sequencia.replace('\n', '').strip()
7  tamanho = 15
8  volta = 5
9
10 index = 0
11 tamanho_total = len(sequencia)
12
13 while index < tamanho_total:
14     print(sequencia[index: index + tamanho])
15     index = index + (tamanho - volta)

```

FONTE: A AUTORA (2022).

NOTA: Observa-se na figura um código construído em python versão 3.10, onde uma estrutura de repetição 'while' gera peptídeos de 15 aminoácidos com sobreposição de 10 aminoácidos devido a

variável 'volta' que, ao imprimir um peptídeo, voltará 5 aminoácidos para então adicionar os 15 aminoácidos do próximo peptídeo. Ou seja, a sobreposição dos peptídeos são pelos 5 primeiros aminoácidos, comum ao peptídeo anterior, e os 5 últimos aminoácidos, comum ao peptídeo seguinte. O código é genérico e pode ser utilizado para gerar peptídeos de qualquer proteína, bastando inserir a sequência completa dentro da variável 'sequencia', sendo que a mesma em seguida retira as quebras de linhas da proteína, transformando em um texto contínuo que pode ser utilizado pela repetição em seguida. É possível também alterar o tamanho e sobreposição dos peptídeos apenas alterando os valores presente nas variáveis 'tamanho' e 'volta'.

2.3 PREVISÃO DA REATIVIDADE DAS CÉLULAS T

A reatividade das células T de peptídeos de coronavírus bovino foi avaliada pela previsão de sua ligação a moléculas de antígeno leucocitário humano classe I (*Human Leucocyte Antigen class I* ou HLA I em inglês) usando a ferramenta de previsão de ligação *TepiToll* (<http://tools.iedb.org/tepitool/>) enquanto a previsão de ligação a moléculas de antígeno leucocitário humano classe II (*Human Leucocyte Antigen class II* ou HLA II em inglês) foi realizada usando a ferramenta de previsão de ligação *IEDB MHC II* (<http://tools.iedb.org/mhcii/>). A ligação peptídica foi prevista para o painel de 27 alelos A e B mais frequentes e todas as moléculas HLA classe II, respectivamente. Um ponto de corte de 20% no *percentile rank* foi escolhido como um limite de predição universal (PAUL et al., 2015).

2.4 PREVISÃO DA REATIVIDADE DAS CÉLULAS B

A reatividade das células B de peptídeos de coronavírus bovino foi avaliada usando o *IEDB Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* (<http://tools.iedb.org/bcell/>). Os resíduos com pontuações acima do limiar (0,5) e com 5 aminoácidos ou mais foram previstos como parte de um epítipo (GASTEIGER et al., 2005; JESPERSEN et al., 2017).

2.5 SEMELHANÇA DE PEPTÍDEOS BCoV EM RELAÇÃO ÀS PROTEÍNAS SARS-COV-2

Todos os peptídeos BCoV que estavam acima dos limites nas análises de células T e B foram avaliados quanto à sua semelhança com as proteínas correspondentes do SARS-CoV-2 (TABELA 7) usando o *Multiple Sequence Alignment* (Clustal Omega, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Sequências

com uma identidade maior ou igual a 80% foram selecionadas como correspondências de peptídeos (RECHE, 2020).

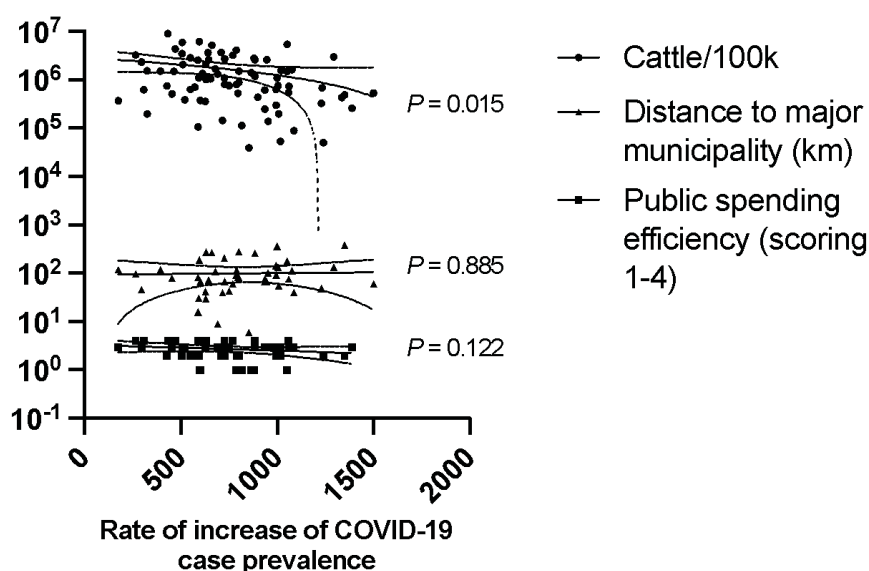
3. RESULTADOS

3.1 EPIDEMIOLOGIA DO COVID-19 E ASSOCIAÇÃO COM FATORES DE RISCO

Analizamos a correlação da prevalência de COVID-19 com a densidade de bovinos no estado brasileiro de MS. Isso foi realizado como uma investigação inicial de uma possível associação epidemiológica entre a exposição humana ao coronavírus bovino (BCoV) e a propagação pandêmica alterada.

A densidade de gado (gado/100.000 pessoas) correlacionou-se negativamente com a inclinação do aumento de casos de COVID-19 na EM. Em contrapartida, os fatores de confusão nesta análise epidemiológica não mostraram associação com a inclinação dos casos de COVID-19 no estado (os fatores avaliados foram distância de cada município ao principal polo regional e qualidade do gasto público) (FIGURA 26).

FIGURA 26 – REGRESSÃO LINEAR ENTRE A DENSIDADE DE BOVINOS E A INCLINAÇÃO DO AUMENTO CUMULATIVO DE CASOS DE COVID-19 NO ESTADO BRASILEIRO DO MATO GROSSO DO SUL.



FONTE: A AUTORA (2022).

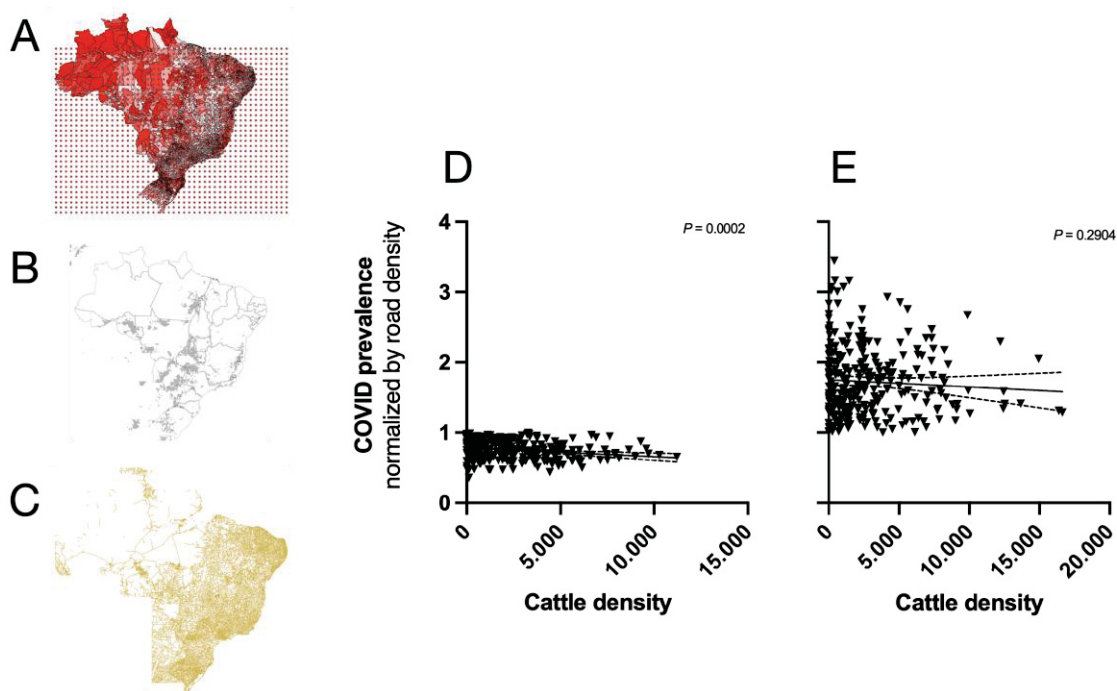
NOTA: Foram utilizados dados entre 20/jan/21 e set/21. A densidade de gado foi calculada como o número de gado/100.000 habitantes no município. A distância do município à cidade-polo principal foi utilizada para controlar a menor conectividade de pessoas das áreas de pecuária. A eficiência dos gastos públicos foi usada para controlar possíveis respostas mais lentas à pandemia de COVID-19

dos municípios pecuaristas. Análise por teste de corrida em uma regressão linear. Os valores P são mostrados para cada regressão. As linhas pontilhadas ao redor da tendência de regressão linear indicam o IC de 99%.

Em uma segunda análise de prova de conceito, determinamos a correlação entre a) prevalência de COVID-19 em todo o Brasil; b) a densidade de populações de gado nas respectivas áreas. Como controle, o tráfego humano foi determinado pela avaliação da densidade de estradas na área.

Os municípios brasileiros foram classificados como a) com menos casos de COVID-19 do que o esperado para a infraestrutura viária do entorno ou, b) com mais casos de COVID-19 do que o esperado para a infraestrutura viária do entorno. No último grupo de alto risco, a densidade bovina correlacionou-se negativamente com a prevalência de COVID-19 (FIGURA 27).

FIGURA 27 – CORRELAÇÃO ENTRE A DENSIDADE DE POPULAÇÕES DE GADO E A PREVALÊNCIA DE COVID-19 EM TODO O BRASIL.



FONTE: A AUTORA (2022).

NOTA: A densidade de gado foi negativamente associada à prevalência de COVID-19 no Brasil. A prevalência de COVID-19 (A, em vermelho) e a densidade do gado (B, tons de cinza) foram avaliadas usando um sistema de informações geográficas. A densidade de estradas (C) também foi avaliada como um controle para a relevância do movimento humano na prevalência de COVID-19. Embora não mostrada, a grade aplicada em (A) também estava em (B) e (C) para as respectivas medidas. O efeito da densidade de gado foi avaliado separadamente em áreas com baixo (D) e alto risco (E) (como esperado da densidade de estradas). O valor P indica afastamento da linearidade para as linhas de correlação. A linha tracejada indica 95% CI.

3.2 CONFIGURAÇÃO DE PEPTÍDEOS PARA AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA

Um total de 136, 23, 45 e 709 peptídeos 15-mer que se sobrepuseram por 10 aminoácidos foram obtidos para as proteínas S, M, N e ORF1ab, respectivamente.

3.3 PREVISÃO DA REATIVIDADE DAS CÉLULAS T

Os resultados adquiridos pela ferramenta de predição de ligação ao MHC I do IEDB TepiToll, 81 peptídeos da proteína S, 18 peptídeos da proteína M, 25 peptídeos da proteína N e 452 peptídeos da proteína ORF1ab tiveram uma classificação percentual igual ou inferior a 20%.

A partir dos resultados obtidos pela ferramenta de predição de ligação do IEDB MHC II, 106 peptídeos da proteína S, 20 peptídeos da proteína M, 24 peptídeos da proteína N e 566 peptídeos da proteína ORF1ab estavam acima do limite de seleção.

3.4 PREVISÃO DA REATIVIDADE DAS CÉLULAS B

A partir dos resultados obtidos pelo IEDB Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0, 70 peptídeos da proteína S, 9 peptídeos da proteína M, 38 peptídeos da proteína N e 386 peptídeos da proteína ORF1ab tiveram pontuações acima do limiar.

3.5 SEMELHANÇA DE PEPTÍDEOS BCOV EM RELAÇÃO ÀS PROTEÍNAS SARS-COV-2

Entre os peptídeos que mostraram bons resultados para interações de células T ou B humanas putativas, apenas 2 peptídeos da proteína S, 1 peptídeo da proteína M e 2 peptídeos da proteína N mostraram pelo menos 80% de similaridade com SARS-CoV-2 (TABELA 8). Nenhuma sequência peptídica dessas três proteínas foi encontrada acima dos valores de corte para ambas as células T e células B.

Em relação à proteína ORF1ab, 109 peptídeos estavam acima do limite para epítomos de células T ou B potenciais. Neste caso, 15 peptídeos foram encontrados acima do corte para células T e células B (TABELA 9).

TABELA 8 – PEPTÍDEOS DE PROTEÍNAS SPIKE, MEMBRANA E NUCLEOCAPSÍDEO DE BCoV QUE PROVAVELMENTE INDUZIRIAM RESPOSTAS DE CÉLULAS T E B HUMANAS E QUE MOSTRARAM PELO MENOS 80% DE SEMELHANÇA COM SARS-COV-2.

Peptídeo	Alelo MHC II	Similaridade (%)	Alelo MHC I	Peptídeo 14mer em MHC I	Similaridade do 14mer (%)	Área no linfócito B	Similaridade da área (%)
Proteína N							
PRWYFYLTGTGPHAK	HLA-DRB5*01:01,	86,7	HLA-A*03:01,	RWYFYLTGTGPHAK	85,7		
	HLA-DRB1*04:05,		HLA-A*31:01,				
	HLA-DRB1*11:01,		HLA-A*30:01,				
	HLA-DRB1*04:01,		HLA-A*11:01,				
	HLA-DRB1*01:01,		HLA-A*30:02,				
	HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01, HLA-DRB1*09:01		HLA-A*33:01,				
VLPQGYIEGGRSA		-	HLA-A*24:02,	-	-	YIEGS	80
			HLA-A*23:01,				
Proteína M							
TGSWWSFNPETNNLM	-	-	-	-	-	SFNPETN	100
Proteína S							
LEAQAQIDRLINGRL	-	-	-	-	-	QIDRLI	100
VDVTNGLGTYVLDRL	-	-	-	-	-	LGTYT	80

FONTE: A AUTORA (2022).

TABELA 9 – PEPTÍDEOS DA POLIPROTEÍNA REPLICASE (ORF1AB) QUE PROVAVELMENTE INDUZIRIAM RESPOSTAS DE CÉLULAS T E B HUMANAS E QUE MOSTRARAM PELO MENOS 80% DE SEMELHANÇA COM SARS-COV-2.

(continua)						
Peptídeo	Alelo MHC II	Similaridade de (%)	Alelo MHC I	Peptídeo 14mer em MHC I	Similaridade do 14 mer (%)	Área no linfócito B
	HLA-DRB3*01:01, HLA-DRB1*03:01, HLA-		HLA-A*68:01, HLA-A*33:01, HLA-A*31:01, HLA-A*03:01, HLA-A*11:01, HLA-B*35:01			
HYVYIGDPAQLPA PR	DQA1*05:01/DQB1*03:01, HLA-DRB1*13:02, HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*04:05, HLA-DRB1*04:01	100		YVYIGDPAQLPAPR	100	GDPAQL
						100
YASAKNRARTVA GV	HLA-DRB1*11:01, HLA-DRB5*01:01, HLA-DRB1*13:02, HLA- DQA1*01:02/DQB1*06:02, HLA- DQA1*05:01/DQB1*03:01	100	HLA-A*02:03	AISAKNRARTVAGV	100	AKNRARTV
						100
DVYLPYDPSPRIL GA	HLA-DRB3*01:01	93,3	HLA-A*24:02, HLA-A*23:01	VYLPYDPSPRILGA	100	YDPSPR
						100

TABELA 9 – PEPTÍDEOS DA POLIPROTEÍNA REPLICASE (ORF1AB) QUE PROVAVELMENTE INDUZIRIAM RESPOSTAS DE CÉLULAS T E B HUMANAS E QUE MOSTRARAM PELO MENOS 80% DE SEMELHANÇA COM SARS-COV-2.

(continuação)						
Peptídeo	Alélo MHC II	Similaridade e (%)	Alélo MHC I	Peptídeo 14mer em MHC I	Similaridade do 14 mer (%)	Área no linfócito B
IERFVSLAIDAYPLV	HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01, HLA-DRB3*01:01, HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB4*01:01, HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*13:02, HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01, HLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*15:01, HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01, HLA-DRB1*12:01, HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02, HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01, HLA-DRB1*04:05, HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*09:01	93,3	HLA-B*40:01	IERFVSLAIDAY PL	100	
			HLA-A*68:02, HLA-B*51:01	ERFVSLAIDAYP LV	92,9	SLAIDA
			HLA-B*07:02, HLA-B*35:01, HLA-B*53:01, HLA-B*57:01, HLA-B*58:01, HLA-B*15:01, HLA-A*24:02, HLA-A*23:01, HLA-A*32:01	KPGGTSSGDAT TAF	92,9	TSSGDATT
	HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01, HLA-DRB3*01:01	93,3				
KPGGTSSGDATTAF						

TABELA 9 – PEPTÍDEOS DA POLIPROTEÍNA REPLICASE (ORF1AB) QUE PROVAVELMENTE INDUZIRIAM RESPOSTAS DE CÉLULAS T E B HUMANAS E QUE MOSTRARAM PELO MENOS 80% DE SEMELHANÇA COM SARS-COV-2.

(continuação)						
Peptídeo	Alelo MHC II	Similaridade (%)	Alelo MHC I	Peptídeo 14mer em MHC I	Similaridade do 14 mer (%)	Área no linfócito B
LYYQNNVFMSESKW	HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01, HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01, HLA-DRB1*04:01	93,3	HLA-A*23:01,	YYQNNVFMSESKW	92,9	VFMSE
			HLA-A*24:02,			
			HLA-B*57:01,			
			HLA-B*53:01,			
			HLA-B*58:01,			
			HLA-B*44:02,			
			HLA-B*44:03			
			HLA-A*24:02,			
			HLA-A*23:01,			
			HLA-B*15:01,			
TQLCQYLNTTTLA	HLA-DRB1*04:05, HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*15:01	93,3	HLA-A*32:01,	KYTQLCQYLNTTTL	92,9	CQYLNT
			HLA-B*40:01,			
			HLA-A*02:06,			
			HLA-A*02:03,			
			HLA-B*07:02,			
			HLA-A*02:01,			
			HLA-A*30:01			
			HLA-A*01:01,	YTQLCQYLNTTTLA	92,9	
			HLA-A*24:02			
						100

TABELA 9 – PEPTÍDEOS DA POLIPROTEÍNA REPLICASE (ORF1AB) QUE PROVAVELMENTE INDUZIRIAM RESPOSTAS DE CÉLULAS T E B HUMANAS E QUE MOSTRARAM PELO MENOS 80% DE SEMELHANÇA COM SARS-COV-2.

(continuação)						
Peptídeo	Alelo MHC II	Similaridade (%)	Alelo MHC I	Peptídeo 14mer em MHC I	Similaridade do 14 mer (%)	Área no linfócito B
KFQTVKPGNFNQDFY	HLA-DRB5*01:01, HLA-DRB1*07:01	86,7	HLA-A*23:01,	KFQTVKPGNFNQDF	85,7	VKPGNFNQ
			HLA-A*24:02			
			HLA-A*01:01,			
			HLA-A*30:02,	FQTVKPGNFNQDFY	92,9	
			HLA-B*15:01,			
SVINARIRAKHYVYI	HLA-DRB1*13:02, HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB1*11:01, HLA-DRB1*12:01, HLA-DRB5*01:01	86,7	HLA-A*26:01			IRAKH
			HLA-A*30:02,			
			HLA-A*26:01,			
			HLA-B*15:01,			
			HLA-A*01:01,			
			HLA-A*11:01,			
			HLA-B*35:01,			
			HLA-A*32:01,	SVINARIRAKHYVY	85,7	
			HLA-A*03:01,			
			HLA-A*68:01,			
VGILTLDNQDLNGKW	HLA-DRB3*01:01, HLA-DRB4*01:01, HLA-DRB1*04:05, HLA-DRB1*03:01	86,7	HLA-B*57:01,			LDNQDLN
			HLA-B*58:01,	GILTLDNQDLNGKW	85,7	
			HLA-A*32:01,			
			HLA-B*53:01			

100

80

TABELA 9 – PEPTÍDEOS DA POLIPROTEÍNA REPLICASE (ORF1AB) QUE PROVAVELMENTE INDUZIRIAM RESPOSTAS DE CÉLULAS T E B HUMANAS E QUE MOSTRARAM PELO MENOS 80% DE SEMELHANÇA COM SARS-COV-2.

(continuação)														
Peptídeo	Alelo MHC II	Similaridade (%)	Alelo MHC I	Peptídeo 14mer em MHC I	Similaridade do 14 mer (%)	Área no linfócito B	Similaridade da área (%)							
GSLYYNKHAFHTKPF	HLA-DRB5*01:01	86,7	HLA-B*15:01,	SLYVNKHAFHTKPF	85,7	VNKHAFH	100							
			HLA-B*08:01,											
			HLA-A*23:01,											
			HLA-A*32:01,											
			HLA-A*24:02											
			HLA-A*01:01,											
			HLA-A*24:02,											
			HLA-A*30:02,											
			HLA-A*23:01,											
			HLA-A*26:01,											
WYDFVENPDIINVYK	HLA-DRB3*01:01	80	HLA-B*35:01,	WYDFVENPDIINVY	85,7	VENPDII	85,7							
			HLA-B*53:01,											
			HLA-A*33:01											
			HLA-A*68:01,											
			HLA-A*33:01,											
			HLA-A*01:01,											
			HLA-A*11:01,											
			HLA-B*53:01											
			DMAKFPLKLAGTAVI					HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*09:01, HLA-DRB1*08:02, HLA-DRB1*13:02, HLA-DRB1*11:01, HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*15:01	80	HLA-B*08:01	DMAKFPLKLAGTAV	85,7	PLKLAG	83,3

83,3

TABELA 9 – PEPTÍDEOS DA POLIPROTEÍNA REPLICASE (ORF1AB) QUE PROVAVELMENTE INDUZIRIAM RESPOSTAS DE CÉLULAS T E B HUMANAS E QUE MOSTRARAM PELO MENOS 80% DE SEMELHANÇA COM SARS-COV-2.

(conclusão)							
Peptídeo	Alelo MHC II	Similaridade (%)	Alelo MHC I	Peptídeo 14mer em MHC I	Similaridade do 14 mer (%)	Área no linfócito B	Similaridade da área (%)
LIISDMYDPITKNIG	HLA-DRB3*01:01, HLA-DRB1*03:01	80	HLA-A*24:02, HLA-A*23:01	LIISDMYDPITKNI	85,7	DMYDPIT	85,7
MIRDKLALGGSAIK	HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01, HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*09:01, HLA-DRB1*07:01, HLA-DRB1*13:02, HLA-DRB1*04:01						
		80	HLA-A*03:01	IRDKLALGGSAIK	85,7	KLALGGS	100

FONTE: A AUTORA (2022).

4 DISCUSSÃO

Os coronavírus bovinos (BCoV) são membros do gênero *Betacoronavirus* juntamente com o SARS-CoV-2, denotando suas semelhanças. Além disso, dentro do *Betacoronavirus*, o BCoV está entre os mais semelhantes ao SARS-CoV-2 (ZHOU et al., 2021; TILOCCA et al., 2020). De fato, o gado pode ser infectado experimentalmente com SARS-CoV-2 (ULRICH et al., 2020) e os coronavírus bovinos já se espalharam para humanos antes - as cepas atuais de BCoV podem ser cultivadas em células de adenocarcinoma retal humano, demonstrando que a infecção entre espécies ainda é um risco, se não um evento comum já (VLASOVA; SAIF, 2021; RUSSOW; BRUSSOW, 2021; STIPP, 2007). Outros trabalhos já discutiram os impactos imunológicos que os coronavírus de animais domésticos podem ter em humanos. No Brasil, o uso do *Deltacoronavirus* da Bronquite Infecciosa Aviária está sendo testado clinicamente para vacinação contra COVID-19, por exemplo (THE PHARMALETTER, 2021; TILOCCA et al., 2020). No entanto, tais considerações ainda não haviam sido direcionadas ao BCoV.

A hipótese levantada aqui é que a exposição ao BCoV influenciou as respostas imunes humanas ao COVID-19. Se fosse esse o caso, seria de esperar que a epidemiologia da pandemia tivesse sido alterada pela exposição humana ao gado, uma vez que o BCoV ocorre de forma natural e ampla em rebanhos bovinos (ROSSI et al., 2017). Nesse cenário, a exposição ao BCoV seria um entre outros fatores de interação na disseminação do COVID-19, como taxas de renda e níveis de vulnerabilidade social (CESTARI et al., 2021). Os resultados do estado do MS e a análise mais ampla do Brasil apoiaram a hipótese de que a exposição humana ao gado teve impacto na epidemiologia da COVID-19.

O estado brasileiro de MS foi escolhido como um estudo de caso prova de conceito, por ser um grande produtor de carne bovina sem megacidades, o que pode “distorcer” o status epidemiológico local devido à sua grande influência nas estatísticas e suas conexões mundiais (DESAI, 2020; REN et al., 2020). Para o Brasil, as condições de infraestrutura, escolaridade, renda e produção animal dentro do estado são mais homogêneas do que nas comparações interestaduais (KRAWCZYK; VIEIRA, 2006; LEBIODA; CABRAL; TEZZA, 2019). Os dados da COVID-19 do MS puderam ser comparados com a eficiência geral dos gastos públicos – um fator importante na disseminação e controle da pandemia no Brasil (SZYLOVEC et al., 2021) – e para a distância dos grandes centros das cidades.

Prevê-se que os municípios com mais gado fiquem mais afastados dos pólos regionais, uma vez que são necessárias grandes áreas de terra para a agricultura. Portanto, qualquer associação entre os casos de COVID-19 com a densidade de bovinos poderia estar associada à menor conectividade do município, que é uma das principais causas da proliferação espacial da doença (JO; HONG; SUNG, 2021). Esses dados estavam disponíveis gratuitamente e, portanto, foram utilizados para a análise do estado do MS.

Os dados do COVID-19 brasileiro em todo o país demonstraram um padrão interessante em que municípios menos impactados foram mais “beneficiados” da exposição ao gado. A prevalência de COVID-19 foi corrigida para densidade de estradas, criando um índice de cidades que tiveram prevalência de COVID-19 maior ou menor do que o esperado teoricamente com base na densidade de estradas (uma inferência de movimentos populacionais, que alteram muito a propagação de doenças infecciosas). Taxas de COVID-19 “inferiores do que o esperado” podem indicar uma infinidade de fatores, como melhores sistemas de saúde ou leis de controle de COVID-19 mais rígidas. Nesse caso, os resultados indicariam que a exposição ao BCoV beneficiou apenas populações humanas com baixo risco de COVID-19. A alta exposição ao SARS-CoV-2 pode ter superado quaisquer benefícios conferidos pelo contato anterior com o BCoV. A densidade rodoviária regional também pode não ter normalizado adequadamente a prevalência de COVID-19, pois é um controle muito limitado (HU et al., 2021). No entanto, é interessante observar que o conjunto de dados mostrou melhorias nas taxas de COVID-19 com alto poder estatístico.

Deve-se ressaltar que não foi objetivo deste estudo confirmar a associação de BCoV com COVID-19 usando dados epidemiológicos. Nossa análise é extremamente restrita para este propósito. No entanto, esses resultados são uma indicação do papel da exposição humana ao gado no que diz respeito ao desenvolvimento da pandemia.

Avançamos nossa avaliação da conexão entre BCoV e COVID-19 usando uma abordagem totalmente diferente. Nós avaliamos in silico se epítomos de BCoV podem ser reconhecidos por linfócitos B e T humanos. Aqui, relatamos vários epítomos que provavelmente serão importantes na resposta ao COVID-19 e que são compartilhados com o BCoV. Essa análise é valiosa para entender o impacto que a exposição ao coronavírus bovino pode ter na COVID-19. É possível que a

epidemiologia do COVID-19 tenha sido moldada pela exposição humana ao BCoV, assim como a varíola foi naturalmente reduzida pela exposição à varíola bovina (RIEDEL, 2005), e este artigo oferece evidências de proteção cruzada viral a partir da análise de epítomos comuns.

5 CONCLUSÕES

O SARS-CoV-2 e o BCoV compartilham vários epítomos comuns, que podem conferir imunidade cruzada. A relevância dessa conexão para o desenvolvimento da pandemia é ainda desconhecida e deve ser comprovada com ensaios controlados de respostas humanas ao vírus bovino. No entanto, nossos resultados para a correlação entre a prevalência de COVID-19 e a densidade do gado são uma indicação do papel da exposição humana ao gado no que diz respeito ao desenvolvimento da pandemia. Um resultado importante dessa análise é que, se as vacinas veterinárias forem consideradas para uso humano contra o COVID-19, como está sendo testada no Brasil, o BCoV é um provável candidato.

CAPÍTULO 3 – DETECÇÃO DE RESPOSTAS IMUNES CELULARES PARA DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS: REVISÃO DOS ÚLTIMOS 10 ANOS DE DESENVOLVIMENTO

1 INTRODUÇÃO

Quando se fala em doenças emergentes ou negligenciadas, há a necessidade de desenvolver e aprimorar técnicas e medicamentos aplicados ao diagnóstico, tratamento e prevenção delas. Sem sombra de dúvidas a identificação correta e precoce de uma doença possibilita a utilização do melhor tratamento disponível.

Majoritariamente os métodos de diagnósticos usam a resposta imune humoral de forma indireta como auxiliar para indicar o agente causal da doença. Nos dias atuais muito são usados os testes sorológicos que detectam a presença de anticorpos no paciente, e a biologia molecular, como a técnica de RT-PCR, para identificar a presença de ácidos nucleicos do patógeno, pela amplificação de seu material genético. Essas técnicas possuem desvantagens para diagnosticar doenças, como por exemplo, resultados falsos negativos que podem ocorrer devido à baixa quantidade de material genético do patógeno ou pela ausência de anticorpos mesmo havendo contato com o antígeno (MORALES-NARVÁEZ; DINCER, 2020). Uma alternativa aos métodos tradicionais de diagnóstico são as técnicas baseadas em respostas imunes celulares, que incluem as células T, as citocinas produzidas e marcadores celulares para estas células. A imunidade celular é uma maneira eficaz e eficiente de diagnosticar doenças, sendo uma resposta mais duradoura que a apresentada pela imunidade humoral, além de contornar algumas limitações referentes aos métodos tradicionais de diagnóstico (MURPHY, 2014). Adicionalmente, alguns patógenos causam importantes respostas celulares, podendo apresentar, no entanto, respostas de anticorpos inconsistentes (GEURTSVANKESSEL et al. 2022). Segundo os autores da pesquisa, foi constatado que indivíduos vacinados para COVID-19, mas que apresentavam falta de anticorpos neutralizantes, ainda mantinham a imunidade contra a doença por células T CD4⁺ e CD8⁺, potencialmente auxiliando na prevenção ou limitando casos graves da doença.

Sendo assim, o presente capítulo tem por objetivo analisar documentos publicados nos últimos 10 anos e que usaram respostas imunes celulares no diagnóstico de doenças. Essa revisão possibilitará relatar os avanços na área e

organizar em um só documento quais são as principais técnicas atualmente utilizadas.

2 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

Parte do conhecimento científico reside em artigos e resenhas publicados em diversos periódicos. Para compilar esses documentos, foram desenvolvidos bancos de dados e plataformas de busca. Este capítulo tem como objetivo mostrar os resultados de uma pesquisa bibliográfica na área de diagnósticos baseados em respostas imunes celulares dos últimos 10 anos (de 2011 a novembro de 2021).

A base de dados Web of Science/ISI Web of Knowledge e Derwent Innovations Index foram escolhidas para realizar esta pesquisa, pois possui acesso gratuito a documentos de mais de 50 países com títulos e resumos em inglês e possibilita uma análise rápida dos dados. A primeira base de dados forneceu o resultado de artigos, capítulos de livros, estudos de casos e outras publicações, enquanto a segunda base de dados resultou em dados de patentes publicadas.

Os termos de busca utilizados nestas bases de dados seguiu a associação das palavras "*cell-mediated*" AND *immun** AND (*diagnost** OR *biosensor** OR "*point-of-care*") no tópico do documento para refinar os resultados. Essa estratégia foi escolhida por se entender que os resultados obtidos eram adequados para análise posterior. Não houve restrição para o idioma dos documentos na realização das buscas, entretanto todos os resultados apresentavam pelo menos o resumo do texto em inglês.

Para a análise dos dados fornecidos nos documentos foram selecionados o país e ano do estudo, doença ou patógeno diagnosticado, método utilizado no diagnóstico e qual molécula ou célula pertencente à resposta imune celular era identificada pela técnica. Os dados extraídos dos artigos e patentes foram utilizados para o desenvolvimento de uma tabela de resultados.

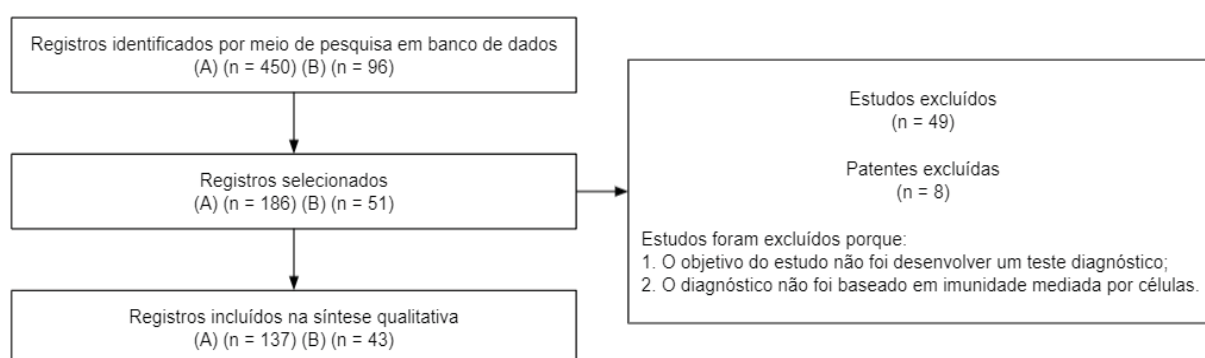
3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A busca realizada gerou 450 resultados na Coleção Principal do Web of Science/ISI Web of Knowledge e para o Derwent Innovations Index, 96. Foi estabelecido um banco de dados em Excel para a análise dos documentos. Os artigos da primeira busca tiveram seus títulos e resumos lidos para seleção primária.

Dos 450 documentos, 186 foram mantidos. As patentes da segunda busca tiveram seus títulos, resumos e reivindicações lidos como primeiro critério de seleção. Das 96 patentes, 51 foram mantidas. Como critério de exclusão secundário, todos os documentos de ambas as buscas foram lidos na íntegra. Para a primeira busca, 137 documentos foram selecionados para as análises definitivas, enquanto para a segunda busca foram 43 patentes. A exclusão de documentos foi feita de forma a manter apenas aqueles que realmente estavam ligados ao tema.

FIGURA 28 – (A) ARTIGOS E (B) PATENTES ADQUIRIDOS DO WEB OF SCIENCE E DERWENT.



FONTE: A AUTORA (2022).

Os resultados obtidos melhoraram a construção gráfica do país de origem, a evolução do número de documentos por ano e uma análise das técnicas mais aplicadas.

As origens dos documentos obtidos são diversas. No caso dos 137 artigos publicados, 20 (14,6%) publicações foram realizadas nos Estados Unidos, 14 na África do Sul (10,2%) e 10 (7,3%) na Alemanha e também na Espanha. No total há 36 países publicando sobre o tema, incluindo aqueles em desenvolvimento. Ou seja, a pesquisa não está concentrada apenas em potências econômicas. Já das 43 patentes, 17 (39,5%) foram depositadas nos Estados Unidos, seguido da Austrália e China com 6 (13,9%) e 5 (11,6%), respectivamente. As demais patentes foram depositadas majoritariamente em países europeus, com poucas publicações em outros países desenvolvidos e em desenvolvimento, demonstrando que no caso de patentes há predominância em países detentores de tecnologias, diferenciando dos artigos com publicações em países mais variados.

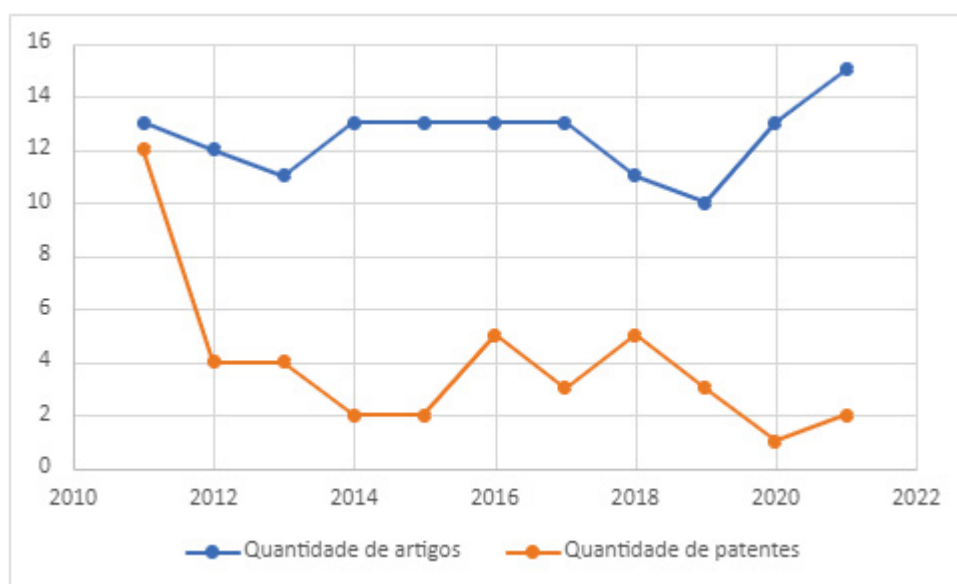
FIGURA 29 – PUBLICAÇÕES DE (A) ARTIGOS E (B) PATENTES PELO MUNDO NO TEMA DE DIAGNÓSTICOS USANDO IMUNIDADE CELULAR.



FONTE: A AUTORA (2022).

Ao longo dos anos, o número de documentos publicados se manteve constante, tendo pico de publicações em 2021, uma indicação da busca por novas técnicas e revisões de protocolos já bem estabelecidos devido à pandemia de COVID-19. As patentes tiveram uma grande variação de publicações nos últimos 10 anos. No entanto, as inovações nesta área referem-se a novos métodos de diagnósticos ou a novas moléculas utilizadas em técnicas já estabelecidas.

FIGURA 30 – PUBLICAÇÕES NO TEMA DE DIAGNÓSTICOS USANDO IMUNIDADE CELULAR ENTRE 2011 E 2021.



FONTE: A AUTORA (2022).

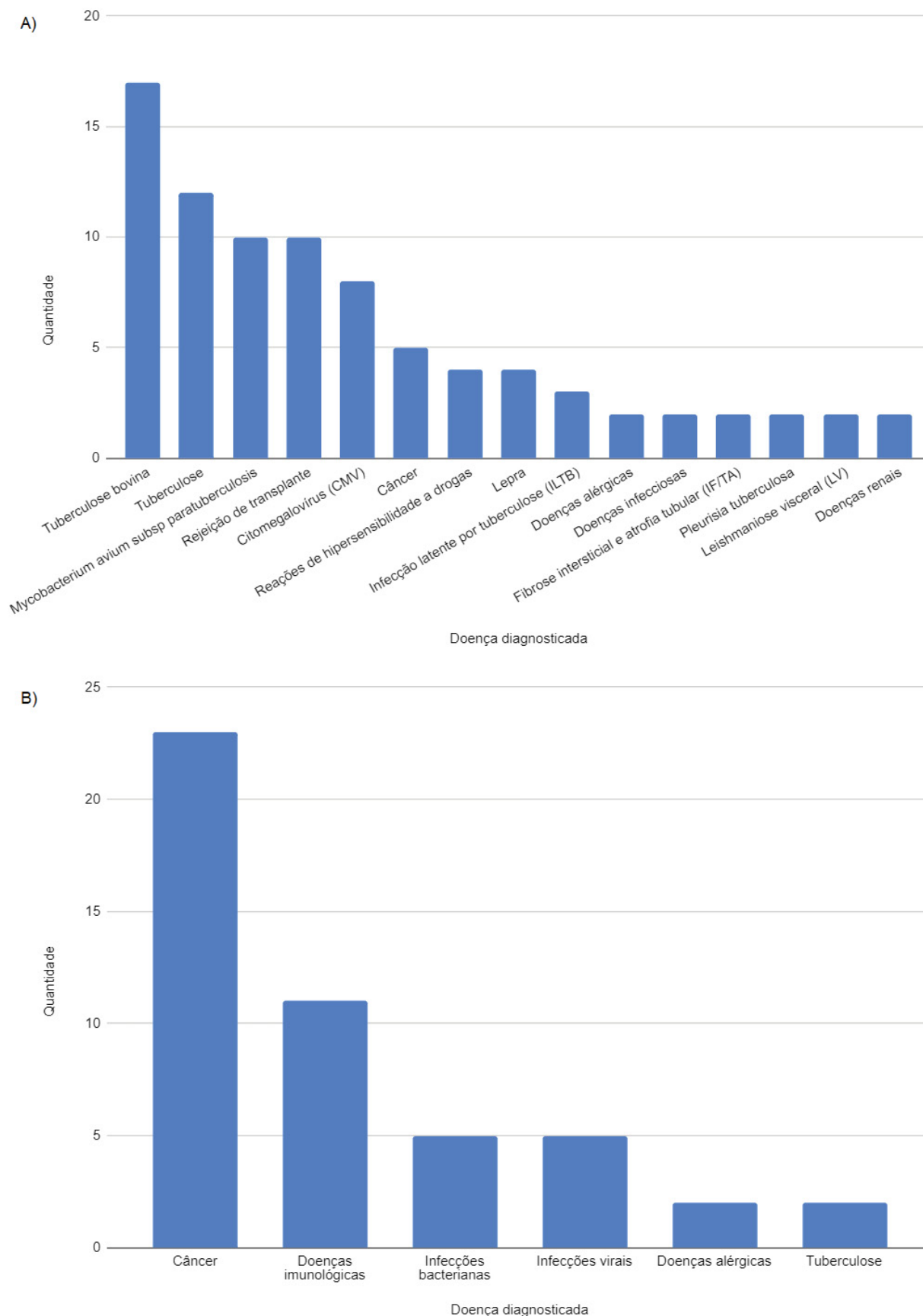
A análise completa dos dados obtidos pela pesquisa está representada na TABELA 10 para os artigos e na TABELA 11 para as patentes analisadas. Além disso, os dados principais quanto às doenças pesquisadas, métodos utilizados e alvos na detecção dos diagnósticos foram resumidos nos gráficos (FIGURA 31 a 33) a seguir. Para todos os gráficos, os resultados mencionados apenas uma vez foram omitidos das imagens.

Enquanto os artigos publicados focam no diagnóstico de doenças causadas por bactérias do gênero *Mycobacterium*, principalmente a tuberculose bovina e tuberculose humana, as patentes desenvolvem novas substâncias que possam ser utilizadas no diagnóstico de diversos tipos de câncer (FIGURA 31). Foram encontradas também 52 e sete doenças que apareceram apenas uma vez nos resultados dos artigos e patentes, respectivamente. Já para a técnica utilizada, os artigos utilizam principalmente o ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* ou ELISA, em inglês) e o ensaio de imunoabsorção ligado à enzima em pontos (*Enzyme-Linked Immune Absorbent Spot* ou ELISpot, em inglês), seguida da citometria de fluxo. As patentes, por sua vez, focam no desenvolvimento de novos peptídeos que possam causar imunorresponsividade mediada por células T, ou seja, não é descrito qual a técnica que seria utilizada para

a detecção dessa imunorresponsividade. Além disso, as técnicas ELISA e citometria são, respectivamente, a segunda e terceira técnicas mais usadas nas patentes aqui analisadas (FIGURA 32). Além disso, nos artigos houve 12 tecnologias citadas apenas uma vez, além de quatro documentos que não especificaram o método utilizado, enquanto as patentes tiveram 15 métodos com única citação. Por fim, o principal alvo detectado nas técnicas apresentadas pelos artigos são as citocinas, seguidas de outros biomarcadores de superfície celular e da detecção da proliferação de linfócitos. Como comentado anteriormente, a maioria das patentes focaram no desenvolvimento de novos epítopos que possam ser utilizados para causar resposta imune celular e, assim, ao invés de comentarem sobre o alvo detectado, as patentes trouxeram o desenvolvimento de fragmentos de ligação ao antígeno de interesse e até mesmo anticorpos. Na terceira e quarta posição para os alvos apresentados em patentes estão as citocinas e biomarcadores de superfície específicos para a resposta imune celular (FIGURA 33). A pesquisa também encontrou 11 e quatro alvos utilizados na detecção que foram citados apenas uma vez nos artigos e patentes analisadas, respectivamente.

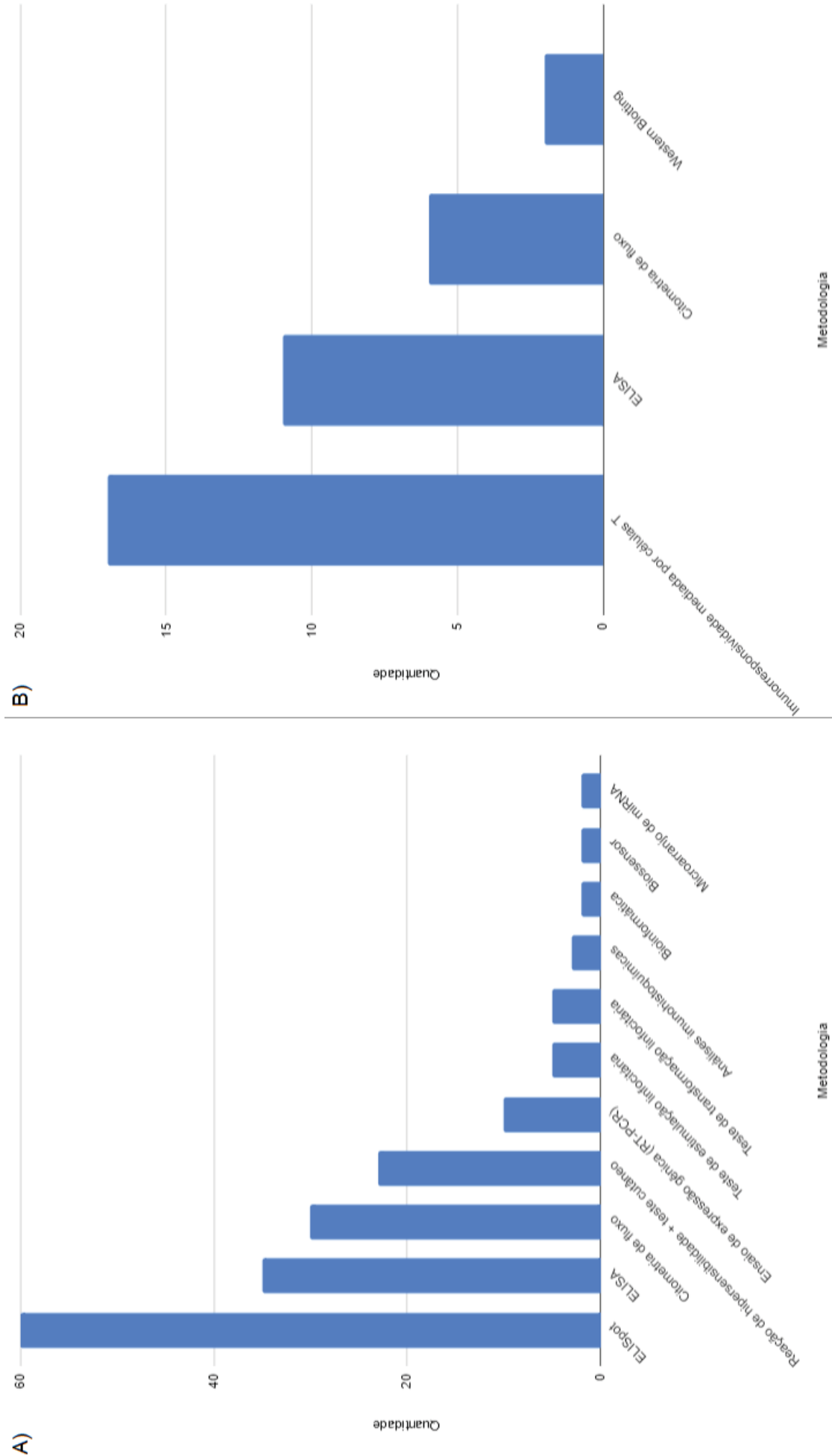
Diversos documentos utilizaram mais de uma técnica para diagnóstico da doença por resposta imune celular, sendo também comum o número de artigos e patentes que confirmaram a doença pelo uso de outros métodos, como os baseados em resposta imune humoral e em biologia molecular. Apenas alguns documentos utilizaram o diagnóstico celular sozinho como resultado final.

FIGURA 31 – PRINCIPAIS DOENÇAS DIAGNOSTICADAS NOS (A) ARTIGOS E (B) PATENTES DA PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.



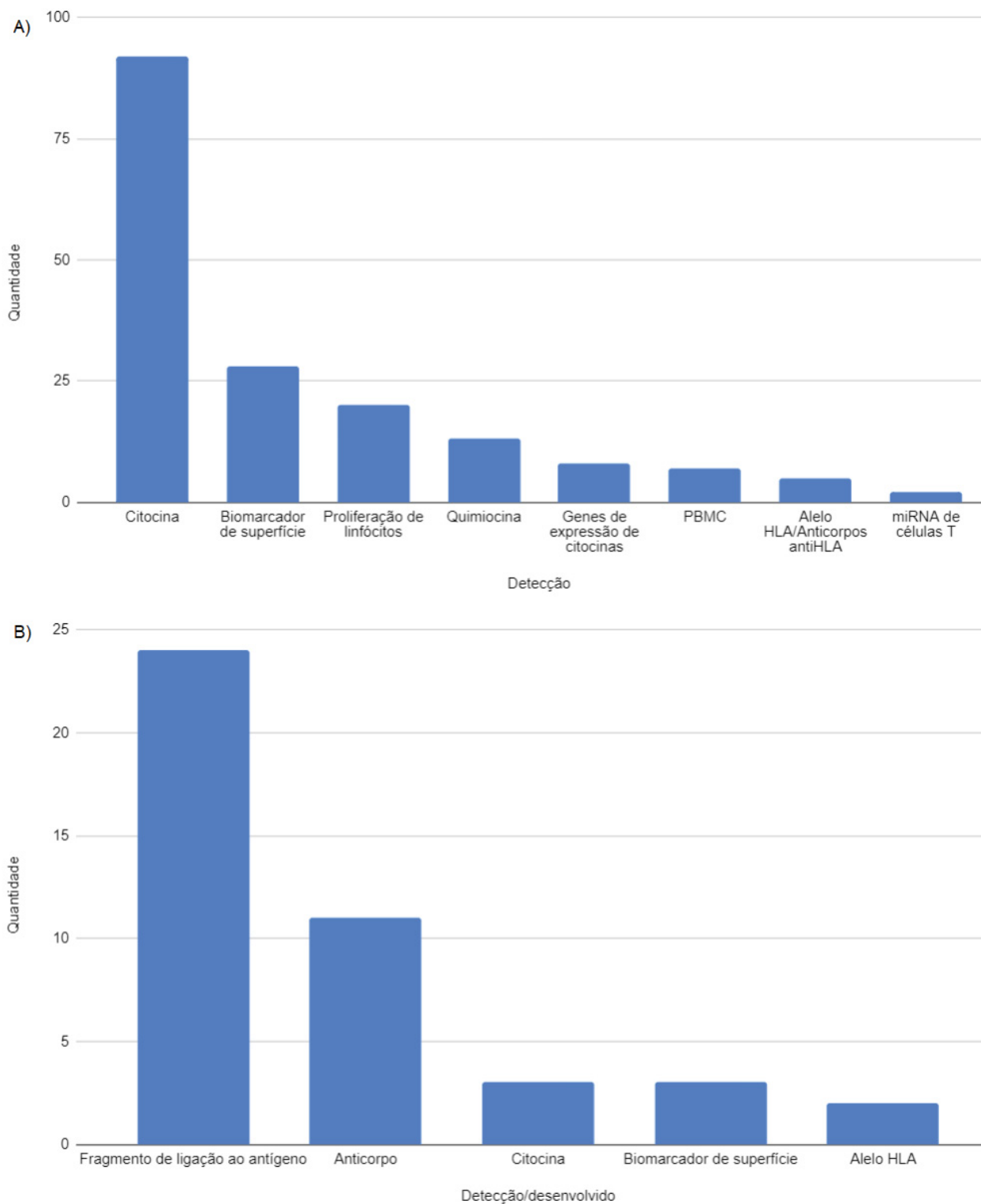
FONTE: A AUTORA (2022).

FIGURA 32 – PRINCIPAIS TÉCNICAS APLICADAS NOS DIAGNÓSTICOS NOS (A) ARTIGOS E (B) PATENTES DA PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.



FONTE: A AUTORA (2022).

FIGURA 33 – PRINCIPAIS ALVOS DETECTADOS NOS DIAGNÓSTICOS DOS (A) ARTIGOS E (B) PATENTES DA PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.



FONTE: A AUTORA (2022).

LEGENDA: PBMC é a sigla para células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, em inglês).

TABELA 10 – RESULTADO DA BUSCA DE ARTIGOS SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

(continua)

Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo
PHILLIPS et al.	2019	Estados Unidos	Alergia a medicamentos	Teste de adesivo, teste intradérmico retardado (IDT)	Célula T
TAKEDA et al.	2017	Japão	Alergia a metais	Citometria de fluxo	Célula T CD3+, Célula T CD4+, Célula T CD8+
KIMURA et al.	2012	Japão	Alergia intestinal ao leite de vaca (ICMA)	Teste de estimulação linfocitária	Hipersensibilidade mediada por células às proteínas CM
CANNELLA et al.	2012	Estados Unidos	Brucelose bovina	Ensaio de IFN- γ	IFN- γ
PEREZ-SANCHO et al.	2014	Espanha	Brucelose ovina	Ensaio de IFN- γ	IFN- γ
SUWANNASAE N et al.	2011	Tailândia	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Ensaio de IFN- γ (ELISA)	IFN- γ
TOMIC et al.	2014	Sérvia	Câncer	Citometria de fluxo, ensaio de citocinas (ELISA)	PBMC, Citocinas (IL-12p70, IL-10, IL-23, IFN γ , IL-4, IL-17)
KARABULUT et al.	2016	Turquia	Câncer colorretal	Ensaio de Citocinas (ELISA)	IL-17
ZHU et al.	2020	China	Câncer de intestino	Citometria de fluxo	HIP1R
SCHIEGNITZ et al.	2018	Alemanha	Carcinoma de células escamosas oral	Ensaio de Citocinas (ELISA, Imunoensaio de Eletroquimioluminescência (Elecys®))	Citocinas (IL-6, IL-8, sIL-2R, TNF- α e MICB)
RUAN et al.	2019	China	Carcinoma de células renais	Não especificado	Biomarcador (TGFB1, TIMP1 e VIM)
GRAHAM; SMYRK; ZHANG	2012	Estados Unidos	Cirrose Biliar Primária	Ensaio imuno-histoquímico	Células de Langerhans CD1a-positivas

TABELA 10 – RESULTADO DA BUSCA DE ARTIGOS SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

(continuação)

Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo
KIM et al.	2015	Coreia do Sul	Citomegalovírus (CMV)	Ensaio de IFN-γ (ELISpot específico para CMV)	IFN-γ
TORRE-CISNEROS et al.	2016	Espanha	CMV	QuantIFERON-CMV	IFN-γ
JUNG et al.	2017	Coreia do Sul	CMV	Ensaio ELISpot de células T específico para CMV (T-track CMV)	IFN-γ
DEBORSKA-MATERKOWSKA et al.	2018	Polónia	CMV	Ensaio de IFN-γ (ELISA (QuantIFERON-CMV (QF-CMV)))	IFN-γ
BANAS et al.	2018	Alemanha	CMV	Ensaio ELISpot IFN-γ (T-Track® CMV)	CMV-CMI
BANAS et al.	2018	Alemanha	CMV	Ensaio ELISpot IFN-γ (T-Track® CMV)	CMV-CMI
ROGERS et al.	2020	Estados Unidos	CMV	Citometria de fluxo (Painel de Imunidade de Células T CMV (CMV-TCIP), Coloração Intracelular de Citocinas (ICS))	Células T CD4+ e CD8+ específicas para CMV, Citocina (IFN-γ)
MANUEL; AVERY	2021	Suíça	CMV	ELISpot (T-Track-CMV e T-SPOT.CMV), ELISA (Quantiferon-CMV)	IFN-γ
KANDARIANI et al.	2017	Estados Unidos	Citotoxicidade	Citometria de fluxo	Célula NK
PAVIA; WORMSER	2020	Estados Unidos	COVID-19	Reação de hipersensibilidade após um teste cutâneo	Citocina
NEWMAN et al.	2012	Estados Unidos	Degeneração Macular Relacionada à Idade	Bioinformática	Assinaturas gênicas associadas a doenças e redes de associação de proteínas funcionalmente enriquecidas

TABELA 10 – RESULTADO DA BUSCA DE ARTIGOS SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

(continuação)

Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo
LOMBARDO et al.	2014	Itália	Dermatite papular	DTH + Teste cutâneo de Leishmaniana (LST)	Citocinas
TANG et al.	2021	China	Diabetes melito tipo 1	Ensaio de IFN- γ (ELISpot)	IFN- γ
NIGAM et al.	2018	Índia	Disfunção do aloenxerto renal	Estimativa quantitativa de anticorpos específicos do doador por teste de antígeno único	Anticorpos IgG anti-HLA específicos
MIKOS et al.	2014	Polônia	Doença Autoimune da Tireóide	Ensaio de Citocinas (ELISA)	Citocina (IL-1 beta, TNF-alfa, IL-6)
ONTIVEROS et al.	2014	Austrália	Doença celíaca	Ensaio de IFN- γ (ELISpot)	IFN- γ
AVUMEGAH et al.	2020	Austrália	Doença de <i>Mycobacterium ulcerans</i>	Citometria de fluxo, ensaio de citocinas (ELISA)	Célula T CD4+, IFN- γ , IL-5
LABAN et al.	2019	Países Baixos	Doença Inflamatória Orbital	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	PET-CT com rituximabe marcado com zircônio-89 (PET/CT com Zr-89-rituximabe)
FRIEDMANN et al.	2021	Alemanha	Doença Pulmonar Intersticial	Citometria de Fluxo, Ensaio de Citocinas (Ensaio de Tecnologia de Esferas Multiplex, ELISA)	Células T (CD3, CD4, CD8a, CD25, CD27, CD28, CD45, CD45RA, CCR6, CXCR3, CXCR5, PD-1, FoxP3, CTLA-4) e população de células B (CD19, CD21, CD27 e CD38), Citocinas (IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e CXCL10 (IP10), APRIL, BAFF, CXCL9, CXCL13, CXCL14)
ECKL-DORNA et al.	2015	Áustria	Doenças alérgicas	Ensaio baseado em diluição CFSE	Célula T, célula B

TABELA 10 – RESULTADO DA BUSCA DE ARTIGOS SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

(continuação)

Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo
SANDOR	2015	Hungria	Doenças alérgicas	Proliferação celular induzida por alérgenos, medições de liberação de citocinas	Célula T, Citocina
RUDOLPH; SCHOON; SCHONIGER	2017	Alemanha	Doenças endometriais	Ensaio imuno-histoquímico	Marcadores de macrófagos (CD172a, CD14, CD172a, CD206)
BACHER et al.	2013	Alemanha	Doenças imunomediadas	Citometria de fluxo	Célula T CD4+, Célula T CD154+
PETCHAKU P et al.	2021	Singapura	Doenças infecciosas	Citometria de Fluxo (Citometria de Impedância Microfluídica)	Linfócitos (CD69+, CD137+)
DE WAAL et al.	2021	África do Sul	Doenças infecciosas em elefante africano (<i>Loxodonta africana</i>)	Ensaio de Expressão Gênica de Citocinas (GEAs)	Biomarcadores de citocinas específicos de elefante (YWHAZ, CXCL9, CXCL10, IFN-γ, IL-4, IL-12, ACTB, B2M, GAPDH, TNF, IL-10, TGF-β)
OH et al.	2016	Estados Unidos	Doenças mediadas por células T	Plataforma microfluídica que integra matrizes de nanorod de ouro conjugado com anticorpo (AuNR)	Citocinas (IL-2, IFN-γ, TNF-α, IL-10)
HAUMONTE et al.	2014	França	Doenças Vasculares da Gravidez	Ensaio de IFN-γ (ELISA)	IFN-γ
DUTTA; RHODES; WOOD	2015	Estados Unidos	Ebola	ELISpot, ICS	IFN-γ
CRAVENS et al.	2013	Estados Unidos	Esclerose múltipla	Polarização de células T, Citometria de Fluxo, Ensaio de Citocinas (ELISA), GEA	Célula T, citocinas (IFN-γ, IL-17), gene de expressão de citocinas
SCIAN et al.	2011	Estados Unidos	Fibrose intersticial e atrofia tubular (IF/TA)	Análise de Microarray de Expressão Gênica	Biomarcadores de IF/TA

TABELA 10 – RESULTADO DA BUSCA DE ARTIGOS SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

(continuação)

Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo
MATZ et al.	2016	Alemanha	IF/TA	GEA (RT-PCR), Quantificação da expressão de proteínas (ELISA).	Expressão de Citocinas (RANTES, granulinsina, granzima-B, IL-8, IP-10, Mic-A, IFN- γ)
BURROWS; MOSS; KHANNA	2011	Austrália	Herpes vírus	Múltiplos de peptídeos MHC, ensaios de citocinas intracelulares, ensaios ELISpot e QuantiFERON-CMV	Múltiplos de peptídeos de MHC, citocinas
HALLAB	2017	Alemanha	Hipersensibilidade ao metal	Reação de hipersensibilidade (DTH) + um teste cutâneo, teste de transformação linfocitária (LTT), citometria de fluxo (teste de ativação de linfócitos (LAT)), ensaio de IFN- γ (ELISpot)	Célula T
MOEHNLE et al.	2018	Alemanha	Imunossupressão séptica	Microensaio de miRNA	miRNA de células T (miR-143, miR-150)
GARCIA-ELORRIAGA et al.	2013	México	Infecção Latente da Tuberculose (LTB)	IGRA (QuantiFERON mediado por células (QFT-CMI))	IFN- γ
MAMISHI et al.	2014	Irã	LTB	IGRA, Teste Tuberculínico (TST)	IFN- γ ,
DODDAM; PEDDIREDDY; AHMED	2017	Índia	LTB	Citometria de fluxo, ensaio de citocinas (ELISA)	Biomarcadores de PBMC, Citocina (TNF- α , IL-8, IL-1 β , IFN- γ , IL-12)
SCHOFFELEN et al.	2014	Países Baixos	Infecção por <i>Coxiella burnetii</i>	Ensaio de IFN- γ (ELISpot)	IFN- γ
STEPANOVA et al.	2012	República Checa	Infecção por <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i> , <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	Ensaio de IFN- γ	IFN- γ

TABELA 10 – RESULTADO DA BUSCA DE ARTIGOS SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

					(continuação)	
Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo	
CLARKE et al.	2017	África do Sul	Infecção por <i>Mycobacterium suricattae</i>	Ensaio de IFN-γ (ELISA), Ensaio de Liberação de IP-10 (IPRA)	IFN-γ, IP-10	
SANTOSH; RENUKANANDA; ABHILASH	2016	Índia	Infecções otorrinolaringológicas crônicas	Ensaio Enzimático	Adenosina Desaminase (ADA)	
OKTEM-OKULLU et al.	2015	Turquia	Infecções por <i>Helicobacter pylori</i>	GEA (qRT-PCR)	Genes de Expressão de Citocinas (IFN-γ (Th1), IL-17 (Th17) e FOXP3 (Treg))	
RANTSI et al.	2018	Finlândia	Infertilidade por Fator Tubal	Proliferação de linfócitos in vitro	Linfócitos	
HO et al.	2016	Canadá	Inflamação do aloenxerto renal	Ensaio de Quimiocinas (ELISA)	Quimiocina (CXCL10)	
LIN et al.	2013	Reino Unido	Inflamação peritoneal	Citometria de fluxo	Célula T γδ	
EJAZI et al.	2020	Índia	Leishmaniose visceral (LV)	Ensaio de citocinas (kit BD OptEIA ELISA)	Citocinas (IFN-γ, IL-12, IL-10 e TGF-β)	
ALEKA et al.	2020	Etiópia	LV	Citometria de Fluxo (ensaio CBA)	Citocinas, Quimiocinas (IFN-γ, TNF-α, IP-10, IL-2, IL-10, MIG e MCP-1)	
LAHIRI et al.	2011	Estados Unidos	Lepra	Ensaio de IFN-γ	IFN-γ	
SAMPAIO et al.	2011	Brasil	Lepra	Ensaio de Sangue Total (WBA), Ensaio de IFN-γ (ELISA)	IFN-γ	
GELUK; DUTHIE; SPENCER	2011	Países Baixos	Lepra	IGRA	IFN-γ	

TABELA 10 – RESULTADO DA BUSCA DE ARTIGOS SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

(continuação)

Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo
FREITAS et al.	2015	Estados Unidos	Lepra	Ensaio de IFN- γ	IFN- γ
ZHANG et al.	2020	China	Linfohistiocitose Hemofagocítica Primária	Citometria de fluxo (ensaio imunológicos rápidos (ensaio de citotoxicidade NK, ensaio de degranulação de células NK, ensaio de expressão de proteína intracelular))	Citotoxicidade NK, células NK CD3-CD56+, expressão de NK- Δ CD107a, Perforina, SAP e XIAP em células NK
CADER et al.	2018	Estados Unidos	Linfomas de Hodgkin Clássicos	Citometria de Massa de Tempo de Voo (CyTOF)	Célula T
CHUANG; TAN	2019	Taiwan	Lúpus Eritematoso Sistêmico	Não especificado	Biomarcador (DUSP22)
ZHOU et al.	2017	Estados Unidos	Malária	Ensaio single-cell Barcode (SCBC)	Célula T CD8+
ATANACKOVI C et al.	2011	Hamburgo	Mieloma múltiplo	GEA (RT-PCR)	Molécula de superfície CD229
MIKKELSEN et al.	2011	Dinamarca	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	DTH + teste cutâneo, ensaio de IFN- γ	Citocinas (IFN- γ)
MIKKELSEN et al.	2011	Dinamarca	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Ensaio de IFN- γ	IFN- γ
RAWTHER et al.	2012	Índia	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Teste Johnin intradérmico único	Espessura da pele
WYNNE et al.	2012	Austrália	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Ensaio de IFN- γ (BOVIGAM)	IFN- γ
JUNGERSEN; MIKKELSEN; GRELL	2012	Dinamarca	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Ensaio de IFN- γ	IFN- γ

TABELA 10 – RESULTADO DA BUSCA DE ARTIGOS SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

(continuação)

Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo
PLAIN et al.	2012	Austrália	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Ensaio de IFN- γ (ELISA) usando potenciação de IL-7 e IL-12	IFN- γ
MIKKELSEN et al.	2012	Dinamarca	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	ELISA	IFN- γ
HUGHES et al.	2013	Reino Unido	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Ensaio de IFN- γ	IFN- γ
GURUNG et al.	2014	Austrália	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Ensaio de IFN- γ (ELISA), citometria de fluxo (CFSE)	IFN- γ , PBMC
DERNIVOIX et al.	2017	Bélgica	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	IGRA	IFN- γ
FIORANI et al.	2020	Argentina	<i>Neospora caninum</i>	DTH + teste cutâneo	Células T de memória antígeno específicas
GOVINDARAJ et al.	2016	Índia	<i>Periplaneta americana</i>	Ensaio de Proliferação de PBMC (MTT)	Proliferação de linfócitos
CHUNG et al.	2017	Coreia do Sul	Pleurisia tuberculosa	Imunoensaios enzimáticos (ELISA)	Citocina (IFN- γ), Quimiocina (CXCL9, CXCL11)
KOHMO et al.	2012	Japão	Pleurisia tuberculosa	Imunoensaios enzimáticos (ELISA (Kit Quantikine ELISA))	Citocina (IFN- γ), Quimiocina (CXCL12)
BARNES et al.	2021	Austrália	Pneumonite de hipersensibilidade	Não especificado	Células imunes do lavado broncoalveolar (macrófagos alveolares, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos)
DIEDERICH et al.	2018	Alemanha	Polineuropatia Desmielinizante Inflamatória Crônica	Ensaio de IFN- γ (ELISpot)	IFN- γ

TABELA 10 – RESULTADO DA BUSCA DE ARTIGOS SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

					(continuação)	
Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo	
COPAESCU et al.	2021	Canadá	Reações Adversas a Medicamentos Antibióticos Imunomediados	DTH + teste cutâneo, ensaio de IFN- γ (ELISpot)	IFN- γ	
ROMANO et al.	2017	Itália	Reações cutâneas não imediatas a beta-lactâmicos	LTT, ELISpot	Célula T, Citocina, Biomarcador	
COPAESCU et al.	2021	Austrália	Reações de Hipersensibilidade a Medicamentos	LTT, Ensaio de Liberação de Citocinas (ELISpot)	Célula T, Citocina (IFN- γ)	
ROMANO et al.	2011	Itália	Reações de Hipersensibilidade a Medicamentos	DTH + teste cutâneo, LTT, citometria de fluxo (teste de ativação de linfócitos (LAT)), ensaio de IFN- γ (ELISpot)	Citocina (IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-8, IL-12, IL-17), Biomarcador (CD69), célula T	
PICHLER; SCHNYDER	2013	Itália	Reações de Hipersensibilidade a Medicamentos	Determinação de alelos HLA, LTT, ensaio de IFN- γ (ELISpot), marcadores celulares e ensaios de liberação de citocinas (RT-PCR, citometria de fluxo, ELISA), teste de estimulação de alérgenos celulares (CAST-ELISA®), célula T Ensaio de Priming (TCPA), Citometria de Fluxo (Teste de Sensibilização da Pele Mielóide U937 (MUSST) e MUSST Modificado (mMUSST), Teste de Ativação de Linha de Célula Humana (h-CLAT)), Ensaio de Ativação de THP-1	Alelo HLA, proliferação de linfócitos, citocinas (IL-5, IL-8, IL-10, IFN- γ), gene de expressão de citocina, leucotrienos, célula T CD4+, célula T CD8+, biomarcador (CD2, CD11a, CD28, CD40, CD54, CD58, CD80, CD86), THP-1	
ANTUNEZ et al.	2011	França	Reações dos meios de contraste	Proliferação celular, ensaio de citocinas	Célula T, célula dendrítica, citocinas (IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-1b e TNF- α)	
BUTLER et al.	2013	Estados Unidos	Rejeição de transplante	Sensores Biomagnéticos	Nanopartículas marcadas com anticorpos anti-CD3 direcionadas para células T	

TABELA 10 – RESULTADO DA BUSCA DE ARTIGOS SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

					(continuação)	
Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo	
WOLFRAM et al.	2015	Áustria	Rejeição de transplante	Teste cutâneo, GEA	Infiltração linfocítica, expressão gênica de citocina/quimocina (Ifng, Il1a, Il1b, Il2, Il4, Il5, Il6, Il10, Il12a, Il12b, Il17a, Il18, Ccl2, Ccl7, Cxcl1, Tnf, Csf2)	
RABANT et al.	2015	França	Rejeição de transplante	Ensaio de quimiocinas (ELISA (IP10 Quantikine ELISA))	Quimiocina (CXCL9, CXCL10)	
CHRISTIANS; KLAWITTER; KLAWITTER	2016	Estados Unidos	Rejeição de transplante	Proteômica de diagnóstico, metabolômica e ensaios multi-analitos direcionados	Painel de citocinas, quimiocinas e receptores imunológicos (IL-6, IL-2R, CCL-2, CCL-5, CCL-8, CXCL-9 e CXCL-10)	
AGUADO-DOMINGUEZ et al.	2019	Espanha	Rejeição de transplante	Tecnologia de sistema assistido por computador (newCAST™) da Visiopharm®	Célula T CD4+, macrófago M1	
NEMES et al.	2019	Hungria	Rejeição de transplante	Citometria de fluxo multicolorida, ensaio Luminex Single Antigen Bead	Subconjuntos de células T, anticorpos anti-HLA específicos do doador	
MARGETA et al.	2020	Croácia	Rejeição de transplante	Ensaio de Monitor QuantiFERON	IFN-γ	
GUO et al.	2020	China	Rejeição de transplante	Imunoensaio de Esferas Multiplex, Matriz de Esferas Citométricas (CBA), Citometria de Fluxo	Citocina (IL-21), célula T CD4+, célula B CD19+	
MILLAN et al.	2021	Espanha	Rejeição de transplante	Imunoensaios enzimáticos (ELISA)	Biomarcador (CXCL-10)	
BRUNET; MILLAN	2021	Espanha	Rejeição de transplante	Ensaios de citocinas/quimiocinas, microarray de miRNA	MiRNA de células T, Biomarcador (IL-2, IFN-γ, GM-CSF, CXCL-9, CXCL-10)	

TABELA 10 – RESULTADO DA BUSCA DE ARTIGOS SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

(continuação)

Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo
LEE et al.	2019	Coreia do Sul	Rejeição mediada por anticorpos ativos agudos ou crônicos	Análises imunohistoquímicas	C4d glomerular
DEY et al.	2019	Austrália	Revisão	Ensaio de Proliferação Celular (CSFE), Ensaio de Secreção Celular (ELISpot), Citometria de Fluxo (ICS), Biossensor, GEA	Célula T, Citocinas, Expressão de Biomarcadores de Superfície (por exemplo, CD4+, CD8+ etc.)
PICONE et al.	2019	França	Rubéola	Ensaio de IFN-γ	IFN-γ
KONSTANTINOU et al.	2014	Grécia	Síndrome de enterocolite induzida por proteína alimentar	Citometria de fluxo (CFSE), Ensaio de TGF-β	PBMC, TGF-β
CURRIU et al.	2013	Espanha	Síndrome de Fadiga Crônica	Citometria de fluxo	Célula T CD4+, Célula T CD8+, Célula B, Célula NK
MAHMOUDI et al.	2017	Irã	<i>Toxoplasma gondii</i>	IGRA/ELISA	IFN-γ
FAZELI et al.	2021	Irã	Tromboangeíte obliterante ou doença de Buerger	Vários	Biomarcadores
DOSANJH et al.	2011	Reino Unido	Tuberculose	Ensaio de IFN-γ (ELISpot), Teste Tuberculínico (TST)	IFN-γ
BORGSTROM et al.	2011	Suécia	Tuberculose	Citometria de fluxo	ESAT-6 e CFP-10
PARSONS et al.	2012	África do Sul	Tuberculose	GEA, teste QFN-G-IT	Expressão do gene IFN-γ, IFN-γ
ABUBAKAR et al.	2013	Reino Unido	Tuberculose	Ensaio de IFN-γ	IFN-γ

TABELA 10 – RESULTADO DA BUSCA DE ARTIGOS SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

(continuação)

Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo
ANGKAWANIS H et al.	2013	Países Baixos	Tuberculose	Ensaio de IFN- γ	IFN- γ
PEREZ-PORCUNA et al.	2014	Espanha	Tuberculose	TST, teste QFN-G-IT	IFN- γ
RITACCO; KANTOR	2015	Argentina	Tuberculose	TST, IGRA	IFN- γ
LUO et al.	2015	China	Tuberculose	ELISpot (T-SPOT.TB), TST	célula T, IFN- γ
AGARWAL et al.	2016	Estados Unidos	Tuberculose	IGRA (TSPOT.TB)	IFN- γ
ARRIETA-VILLEGAS et al.	2020	Espanha	Tuberculose	Teste de Tuberculina Intradérmico Único (SIT), Teste de Tuberculina Comparativo Cervical Único (SICCT), IGRA	IFN- γ
COPPOLA et al.	2020	Países Baixos	Tuberculose	TST, teste QFN-G-IT, citometria de fluxo (Múltipla Matriz de Citocinas)	Citocinas (IL-13, IL-22, IL-17A, IFN- γ , IP-10 (CXCL10), IL-10, GM-CSF e TNF- α)
COPAESCU et al.	2021	África do Sul	Tuberculose	Ensaio com base colorimétrica, citometria de fluxo, ensaio de IFN- γ (ELISpot)	Lactato desidrogenase (LDH), 7-aminoactinomicina (7-AAD), IFN- γ
BEZOS et al.	2014	Espanha	Tuberculose bovina	Ensaio de IFN- γ (BOVIGAM®)	IFN- γ
PALMER et al.	2020	Estados Unidos	Tuberculose bovina	TST, IGRA (Bovigam® (Thermo Fisher Scientific, Prionics AG, Schlieren-Zurich, Suíça), ID Screen® Ruminant IFN- γ (ID Vet Innovative Diagnostics, Grabels, França), Kit BIO-RAD Interferon Bovino Gamma ELISA (BIO-RAD, Hercules Califórnia)), ELISA, ELISpot	IFN- γ , Biomarcador (IL-1 β , IL-2, CXCL9, MIG, CXCL10, IP-10, TNF- α , NO, IL-17, IL-22)

TABELA 10 – RESULTADO DA BUSCA DE ARTIGOS SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

(continuação)

Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo
BOGGIATTO; KANJIPE; PALMER	2021	Estados Unidos	Tuberculose bovina	Citometria de fluxo	Célula T, Citocina (IFN- γ), Biomarcador
CASAL et al.	2014	Espanha	Tuberculose bovina	Teste tuberculínico intradérmico (SIT e SICCT), ensaio de IFN- γ (Bovigam)	IFN- γ
GOOSEN et al.	2015	África do Sul	Tuberculose bovina	Ensaio IFN- γ (Bovigam PC-EC, Bovigam PC-HP, QuantiFERON TB-Gold modificado (mQFT))	Biomarcadores (IFN- γ , IP-10)
EIRIN et al.	2015	Argentina	Tuberculose bovina	TST, IGRA	IFN- γ
PIRSON et al.	2015	Reino Unido	Tuberculose bovina	Ensaio de IFN- γ (BOVIGAM®), citometria de fluxo	IFN- γ , PBMC bovino
PARSONS et al.	2016	África do Sul	Tuberculose bovina	Ensaio de IFN- γ (ELISA (Bovigam®)), IL-10 ELISA	IFN- γ , IL-10
GERACE et al.	2016	Itália	Tuberculose bovina	Ensaio de IFN- γ (ELISA (Bovigam®))	IFN- γ , Interleucina
GOOSEN et al.	2016	África do Sul	Tuberculose bovina	QFT-G-IN, IP-10 ELISA	IFN- γ , IP-10
VAN DER HEIJDEN et al.	2016	África do Sul	Tuberculose bovina	SICCT, IGRA	IFN- γ
PARSONS et al.	2017	África do Sul	Tuberculose bovina	Ensaio IFN- γ (IGRA Específico para Rinocerontes, Ensaio QFT-G-IT	IFN- γ
BERNITZ et al.	2018	África do Sul	Tuberculose bovina	SCITT, IGRA (Bovigam® IGRA, Qiagen Cattletype IGRA (coorte B))	IFN- γ
ROOS et al.	2018	África do Sul	Tuberculose bovina	Teste QFN-G-IT	IFN- γ , Biomarcador (IP-10)

TABELA 10 – RESULTADO DA BUSCA DE ARTIGOS SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

					(conclusão)
Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo
ROOS et al.	2019	África do Sul	Tuberculose bovina	Ensaio de Expressão Gênica (GEA), teste QFN-G-IT	Expressão do gene IFN- γ , IFN- γ
SMITH et al.	2021	África do Sul	Tuberculose bovina	MILLIPLEX (R) Ensaio Multiplex de Citocinas/Quimioquinas Bovinas	Biomarcador (IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, MIP-1 α , IL-36 RA, IP-10, MCP-1, MIP-1 β , TNF- α , VEGF-A)
SMITH et al.	2021	África do Sul	Tuberculose bovina	IGRA	Citocina (IFN- γ)
HAN et al.	2013	China	Vírus da bronquite infecciosa (IBV)	Não especificado	Epítipo de célula B

FONTE: A AUTORA (2022).

TABELA 11 – RESULTADO DA BUSCA DE PATENTES SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

(continua)

Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo
GUO et al.	2015	Estados Unidos	Alergia, autoimunidade, inflamação ou sepse	ELISA, ensaio de proliferação celular	VSIg8
DECKERT et al.	2011	Estados Unidos	Câncer	Metade detectável	Anticorpo ou fragmento
KOCHETKOV A et al.	2011	Austrália	Câncer	Determinar ou estimar a quantidade do heteromultímero CXCR4-CCR7 ou uma célula que expressa o heteromultímero CXCR4-CCR7 na amostra	Heteromultímero CXCR4-CCR7
HAMMOND et al.	2011	Estados Unidos	Câncer	Citometria de fluxo, análise FMAT™	Anticorpo huCA
SUCIU-FOCA et al.	2012	Estados Unidos	Câncer	Anticorpo monoclonal isolado ou uma porção de ligação a ILT3 do mesmo de acordo com a reivindicação 1 ou outro anticorpo monoclonal ou policlonal anti-ILT3, um anticorpo anti-ILT3Fc ou uma porção do mesmo que se liga seletivamente a ILT3 ou combinações de anticorpos	Ligante de ILTL3 ou ILT3
COJOCARU et al.	2013	Israel	Câncer	Imunoresponsividade mediada por células T	Anticorpos para moléculas LSR
MAHR et al.	2017	Estados Unidos	Câncer	Eluição, proteômica LC/MS/MS	Moléculas de MHC
POIRIER; MARY	2017	Austrália	Câncer	Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos (ADCC), Citotoxicidade Dependente de Complemento (CDC)	Receptor de IL-7
SILACCI et al.	2018	Estados Unidos	Câncer	Imagens médicas	Peptídeo que se liga ao receptor 3 do fator de crescimento de fibroblastos
ECKELMAN et al.	2019	Estados Unidos	Câncer	Imunoresponsividade mediada por células T	Polipeptídeo multiespecífico

TABELA 11 – RESULTADO DA BUSCA DE PATENTES SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

(continuação)

Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo
QIAN et al.	2021	China	Câncer	Imunorresponsividade mediada por células T	CLDN18.2
ZHANG; HUBER	2011	Austrália	Câncer mediado por Her3	Técnicas de imunodeteção (coloração imunohistológica, western blotting, dot blotting, precipitação, aglutinação, ensaios ELISA, imunohistoquímica, hibridização in situ, citometria de fluxo ou técnica de radioimunoensaio (RIA))	Anti-Her3
NALLANI et al.	2019	Singapura	Câncer, doença autoimune ou infecciosa	Imunorresponsividade mediada por células T CD8+	Polimerossomo
TOELLNER; BICKNELL	2015	Estados Unidos	Câncer, doenças imunológicas	Imunorresponsividade mediada por células T	Alvo de autoantígeno
BELNOUE; DEROUAZI	2016	Suíça	Câncer, doenças imunológicas e rejeição de transplantes	Imunorresponsividade mediada por células T	Agonista peptídico de TLR
HANSEN	2016	Estados Unidos	Câncer, doenças inflamatórias	Imunorresponsividade mediada por células T	Anticorpo ou fragmento
MOLLOY et al.	2017	Estados Unidos	Câncer, doenças inflamatórias e imunológicas, alergias	Imunorresponsividade mediada por células T	Anticorpo ou fragmento
NALLANI et al.	2019	Singapura	Câncer, infecções	Imunorresponsividade mediada por células T	Polimerossomo
ZHANG	2018	China	Câncer, mieloma e linfoma	ELISA	Anticorpos anti-ligante de morte I (PD-L1) programados
LI; LIU	2018	China	Câncer; Doença relacionada a CD19	Contatar a amostra com os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos aqui fornecidos; Determinando a presença ou quantidade de CD19 na amostra	Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno

TABELA 11 – RESULTADO DA BUSCA DE PATENTES SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

(continuação)

Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo
LIANG	2014	Estados Unidos	Câncer; leucemia; esclerose múltipla, neuroblastoma e glioblastoma; doenças autoimunes mediadas por células T e B; doenças inflamatórias; infecções; doenças hiperproliferativas; AIDS; degenerativas, doenças cardiovasculares e rejeição de transplantes.	Kit produzido	Nanopartícula
FIORETOS; LANDBERG; SANDEN	2021	Suécia	Distúrbios hematológicos neoplásicos	Citometria de fluxo	SLAMF6
FORSBERG et al.	2020	Suécia	Doença associada à proteína acessória do receptor de interleucina-1	ELISA	Anticorpo anti-IL1RAP
MOTAMED et al.	2011	Estados Unidos	Doença neoplásica, proliferativa ou inflamatória	Imunoresponsividade mediada por células T	Proteína SPARC humana
LI; MEI	2018	China	Doença relacionada a CD3	Determinar a presença ou quantidade de CD3epsilon na amostra	Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno
LIU et al.	2016	China	Doença relacionada ao receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina	ELISA, Citometria de Fluxo	Anticorpo anti-CD3
NORENBERG ; LARSON	2012	Estados Unidos	Doenças inflamatórias e imunológicas	Sonda de imagem	Complexos de 5-(4-bromo-benzil)-3-(3,5-dicloro-fenil)-5-metil-imidazolidina-2,4-diona-radiometal
KOLLIPARA	2011	Índia	HIV	Detectar formação do complexo entre a sequência polipeptídica da proteína de fusão TBLIT1, TBL1T2 e/ou TBL1T3 e célula B	Glicoproteína

TABELA 11 – RESULTADO DA BUSCA DE PATENTES SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

(continuação)

Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo
SORENSEN et al.	2013	Noruega	Infecções virais	ELISA	Peptídeo monomérico
MCELHANEY et al.	2013	Canadá	Infecções virais	Quantificação de biomarcadores	Biomarcador granzima B (bGrzB)
GOLCALVES et al.	2018	França	Leishmaniose	Imunoresponsividade mediada por células T	Epítopo, proteína
SPITS et al.	2016	Países Baixos	Leucemia	Imunoresponsividade mediada por células T	Peptídeo (CD)-43
DECKERT et al.	2011	Estados Unidos	Linfomas de células B e linfoma não Hodgkin	ELISA	Moléculas de ligação a CD37
BARDROFF et al.	2014	Estados Unidos	Sarcoidose, uveíte, diabetes tipo 1 e aterosclerose	ELISA	Proteína de ligação a IL-18
KUZNETSOVA; MARTYNOVA; PROKHORENKO V	2011	Rússia	Sífilis latente	Quantificação da fagocitose aguda mediada por células	Linfócitos CD19, HLA-DR
MALLEY; LU; ZHANG	2012	Canadá	<i>Streptococcus pneumonia</i>	Imunoresponsividade mediada por células T	Polissacarídeo
DECKERT; TAVARES; PARK	2011	Estados Unidos	Trombocitopenia autoimune, esclerose múltipla, psoríase, miastenia gravis, vasculite, diabetes mellitus, doença de Crohn e colite ulcerativa	Western blot, ELISA, citometria de fluxo	Anticorpos anti-CD20
JONES; VORDERMEIER	2011	Reino Unido	Tuberculose	Teste cutâneo	Polipeptídeo

TABELA 11 – RESULTADO DA BUSCA DE PATENTES SOBRE DIAGNÓSTICO BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES.

(conclusão)					
Autor	Ano	País	Doença diagnosticada	Método	Alvo
BOYLE	2016	Estados Unidos	Tuberculose	Imunorresponsividade mediada por células T CD4+ e CD8+	Peptídeo (ESAT-6 e CFP-10)
TRIEU et al.	2011	Canadá	Tumor retal, tumor anal	ELISA	Anticorpos de ligação SPARC
BOYLE et al.	2011	Austrália	Várias infecções	Imunorresponsividade mediada por células T CD4+ e CD8+/Citocina (IFN- γ , IL, TGF β , G-CSF e GM-CSF)	Peptídeo
BOYLE; MANKTELOW	2012	Austrália	Várias infecções	Imunorresponsividade mediada por células T	Receptor Toll-like (TLR)
BOYLE	2013	Austrália	Várias infecções	Imunorresponsividade mediada por células T CD4+ e CD8+	Peptídeo

FONTE: A AUTORA (2022).

3.2 DIAGNÓSTICOS POR ELISA E ELISPOT

Citocinas são glicoproteínas com cerca de 25 kDa liberadas por diversos tipos celulares dos organismos, responsáveis por mediar e regular as respostas imunológicas, induzindo ligações a receptores específicos (TERRA et al., 2012). A atuação das citocinas pode ser definida como autócrina, quando atua na mesma célula que a liberou, parácrina, afetando células adjacentes a que liberou, ou endócrina, quando as citocinas são estáveis e capazes de afetar células distantes, o que depende de sua meia-vida e capacidade de entrar na circulação sanguínea (MURPHY, 2014).

Outro grupo de citocinas são as quimiocinas, as quais fazem parte de uma família de citocinas quimioatraentes que são liberadas nas fases iniciais da infecção. Essas proteínas são responsáveis por induzir a quimiotaxia, ou seja, movimento celular em direção à fonte de quimiocina. Sua principal função no sistema imune é atuar como quimioatraentes para leucócitos, de forma que células imunes se desloquem para o local onde ocorreu a infecção. Elas também podem auxiliar no desenvolvimento, migração e guiar linfócitos da imunidade adaptativa (MURPHY, 2014). As origens e funções das principais citocinas presentes durante a resposta imune celular estão representadas na TABELA 12.

As citocinas e quimiocinas podem ser detectadas por meio das técnicas de ELISA e sua modificação ELISpot, sendo esta utilizada como padrão-ouro mediando a resposta imune de células T específicas em ensaios clínicos (MURPHY, 2014; JoVE, 2022). Em ambos os casos se pesquisa anticorpos específicos para a citocina de interesse em analisar. Na técnica de ELISpot as amostras de células T são adicionadas a uma placa na presença do anticorpo específico, de forma que caso a célula secrete a citocina de interesse, a mesma será capturada pelos anticorpos (MURPHY, 2014).

Na pesquisa realizada o diagnóstico de doenças mediado por imunidade celular realizado pelas técnicas ELISA e ELISpot representam 62% dos artigos e 21% das patentes analisadas, sendo que as patentes em sua grande maioria não descrevem a técnica utilizada no diagnóstico, tendo maior foco no desenvolvimento de novos antígenos/anticorpos específicos para serem aplicados em métodos já conhecidos.

TABELA 12 – FUNÇÕES DE CITOCINAS EM CÉLULAS T.

Citocina	Fonte de célula T	Efeitos em				Outras células teciduais
		Células B	Células T	Macrófagos	Células hematopoiéticas	
Interleucina-2 (IL-2)	Virgens, Th1, algumas CD8+	Estimula o crescimento e a síntese da cadeia J	Crescimento	-	Estimula crescimento de células NK	-
Interferon-γ (IFN-γ)	Th1, CTL	Diferenciação: síntese de IgG2a (camundongo)	Inibe o crescimento de células Th2	Ativação, ↑ MHC de classes I e II	Ativa células NK	Antiviral ↑ MHC de classes I e II
Linfotóxina-a (LT-a, TNF-b)	Th1, algumas CTL	Inibe	Mata	Ativa, induz produção de NO	Ativa neutrófilos	Mata fibroblastos e células tumorais
Interleucina-4 (IL-4)	Th2	Ativação, crescimento IgG1, IgE ↑ MHC de classe II indução	Crescimento, sobrevivência	Inibe ativação de macrófagos	↑ Crescimento de mastócitos	-
Interleucina-5 (IL-5)	Th2	Camundongo: diferenciação, síntese de IgA	-	-	↑ Crescimento e diferenciação de eosinófilos	-
Interleucina-10 (IL-10)	Th2 (algumas Th1 humanas), Treg	↑ MHC de classe II	Inibe Th1	Inibe a liberação de citocinas	Coestimula crescimento de mastócitos	-
Interleucina-3 (IL-3)	Th1, Th2, alguns CTL	-	-	-	Fatos de crescimento para células progenitoras hematopoiéticas (multi-CSF)	-
Fator de necrose tumoral-α (TNF-α)	Th1, algumas Th2, alguns CTL	-	-	Ativa, induz produção de NO	-	Ativa o endotélio microvascular
Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF)	Th1, algumas Th2, alguns CTL	Diferenciação	Inibe crescimento?	Ativação, diferenciação em células dendríticas	↑ Produção de granulócitos e macrófagos (mielopoiese) e células dendríticas	-

(continua)

TABELA 12 – FUNÇÕES DE CITOCINAS EM CÉLULAS T.

(conclusão)					
Citocina	Fonte de célula T	Efeitos em			
		Células B	Células T	Macrófagos	Células hematopoieticas
Fator de transformação do crescimento-b (TGF-b)	Células T CD4+ (Treg)	Inibe crescimento, fator de troca para IgA	Inibe crescimento, promove sobrevivência	Inibe ativação	Ativa neutrófilos
	Células T CD4+ (Th17), macrófagos	-	-	-	Estimula a secreção de quimiocinas por fibroblastos e células epiteliais

FONTE: ADAPTADO DE MURPHY (2014).

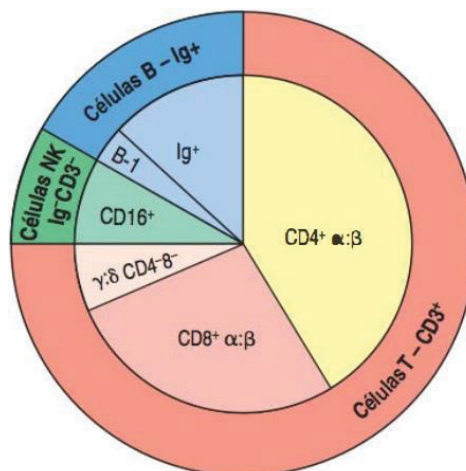
A principal aplicação desses métodos se encontra na detecção de IFN- γ em doenças causadas por bactérias do gênero *Mycobacterium*, como a tuberculose humana, tuberculose bovina e paratuberculose. Como exemplo destes casos, os autores Goosen et al. (2015) e Casal et al. (2014), entre outros listados na TABELA 1, trazem o kit BOVIGAM™ TB (Applied Biosystems, Foster City, CA) no diagnóstico de tuberculose bovina, detectando a produção de IFN- γ a partir de amostras de sangue incubadas com o antígeno *overnight*. Já Jung et al. (2017) e Deborska-Materkowska et al. (2018) trouxeram a utilização dos kit comerciais T-Track® CMV e QuantiFERON-CMV (QIAGEN, Germantown, MD, EUA), baseados nas técnicas de ELISpot e ELISA respectivamente, no diagnóstico de doenças causadas pelo herpes vírus, citomegalovírus, detectando a presença de IFN- γ nas amostras de sangue dos pacientes.

3.3 DIAGNÓSTICOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

Outro método amplamente utilizado para diagnóstico mediado por imunidade celular é a citometria de fluxo com separador de células por fluorescência ativada (*fluorescence-activated cell sorter* ou FACS, em inglês). Essa técnica se baseia na identificação de linfócitos, pela diferença na expressão de proteínas encontradas na superfície celular, que são detectadas por anticorpos monoclonais específicos contra as mesmas. Essas proteínas também são chamadas de antígenos CD (conglomerados de diferenciação ou *cluster of differentiation*, em inglês) e são responsáveis pelo reconhecimento dos antígenos específicos (MURPHY, 2014).

As células marcadas passam por um feixe de luz laser, de forma que cada tipo celular dispersa a luz de maneira diferente e o corante ligado à célula fluorescerá. A luz dispersada é, então, detectada por tubos fotomultiplicadores sensíveis, responsáveis por fornecer dados referentes ao tamanho e granulosidade celular. Já a fluorescência emitida indica a ligação dos anticorpos marcados e também a expressão das proteínas de superfície celular (MURPHY, 2014). A FIGURA 34 representa de forma resumida as proteínas principais na superfície de alguns tipos celulares.

FIGURA 34 – DISTRIBUIÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO.



FONTE: MURPHY (2014).

Dos resultados obtidos na pesquisa, 19% dos artigos e 9,3% das patentes selecionadas aplicavam a citometria de fluxo no diagnóstico mediado por respostas imunes celulares de diversas doenças, sendo a segunda técnica mais utilizada. Rogers et al. (2020) realizaram o diagnóstico de pacientes contaminados com citomegalovírus marcando as células com anticorpos CD4⁺ e CD8⁺ específicas para CMV. Já os autores Konstantinou et al. (2014), utilizando o marcador 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE), detectaram a proliferação de PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*, em inglês) em pacientes com síndrome de enterocolite induzida por proteína alimentar (*food protein-induced enterocolitis syndrome* ou FPIES, em inglês).

4 PERSPECTIVAS

A pesquisa bibliográfica realizada no presente documento apresentou um número relativamente reduzido de métodos usados para realizar o diagnóstico de doenças, alergias e microorganismos patogênicos tanto para humanos quanto para animais. Este pode representar um reflexo da prioridade em realizar diagnósticos usando biologia molecular e em imunidade humoral. Entretanto, a resposta imune celular é uma maneira muito eficiente e eficaz para detectar uma doença, contornando algumas limitações das outras técnicas, como baixa quantidade do patógeno ou de seu material genético, além dos casos onde não há produção de anticorpos apesar do contato com o antígeno.

Novas tecnologias já utilizadas no diagnóstico baseado em respostas imunes humorais com potencial para serem também desenvolvidas em imunidade celular são os biossensores e o *point-of-care*. Os biossensores são capazes de converter uma resposta biológica em um sinal elétrico. Esses dispositivos são caracterizados pela seletividade; estabilidade quanto a mudanças no ambiente; reprodutibilidade; alta sensibilidade, detectando analitos com baixíssimas concentrações, na faixa de ng/mL; e linearidade (METKAR, GIRIGOSWAMI, 2019).

Dey et al. (2019) em seu trabalho focado em diagnóstico por imunidade celular apresentaram diferentes modelos de biossensores, sendo eles: imunossensores de microarranjo e imunossensores de microfluídica. O primeiro modelo de biossensores é caracterizado pela detecção de moléculas em baixas concentrações presentes em amostras biológicas complexas, podendo apresentar como pontos negativos a adsorção não específica e difusão lenta de moléculas na matriz. Já o segundo modelo citado permite a redução do volume necessário de amostra, uma vez que apresenta canais micrométricos, além de ser possível realizar em um único chip diversas análises simultaneamente. A aplicação dos biossensores se encontra na detecção em diferentes tempos de moléculas secretadas por células T, sendo alguns dos exemplos citados pelos autores a detecção de citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2 e de célula T antígeno específicas em imunossensores de microarranjo, enquanto os imunossensores de microfluídica detectam em sua maioria a expressão de proteínas CD em células T, utilizando baixas concentrações de analito e não sendo necessário processamento prévio das células.

Os biossensores também podem ser enquadrados como um diagnóstico *point-of-care* (POC). A testagem POC é caracterizada pelo diagnóstico rápido e precoce, uma vez que envolve a proximidade com os pacientes devido à sua portabilidade. Dessa forma, o monitoramento de doenças infecciosas ou com alta mortalidade em fase inicial permite realizar o tratamento adequado para as mesmas, permitindo também a modificação do tratamento de acordo com o avanço da doença. Os modelos de POC incluem tiras reagentes (*dipsticks*, em inglês), imunoensaios de fluxo lateral (*lateral flow immunoassays* ou LFIA, em inglês) e microfluídica, já descrita neste documento, sendo os dois últimos modelos os mais aplicados para diagnósticos de doenças. O princípio de funcionamento do LFIA envolve o carregamento de anticorpo marcado em tiras de nitrocelulose, polímero, etc. que irão interagir com a amostra. As vantagens do método incluem a facilidade

de operação, não exigindo mão de obra especializada, além de serem rápidos e terem longa vida útil (KUMAR et al., 2021). No entanto, não foram encontradas utilizações do LFIA com diagnóstico baseado em respostas imunes celulares na presente pesquisa. Apesar das vantagens operacionais e na leitura do resultado do diagnóstico, o desenvolvimento de modelos que utilizam o LFIA é muito complexo, sendo necessário considerar diversos parâmetros até chegar no produto final.

As duas técnicas, discutidas neste tópico, apresentam vantagens em relação aos atuais métodos atualmente aplicados em diagnóstico baseado em respostas imunes celulares, descritos anteriormente. As principais diferenças incluem tempo de resposta rápido, permitindo análises sem necessidade de prévia proliferação dos linfócitos, havendo casos de obtenção de resultados em tempo real; baixo custo de preparo; não necessidade de mão de obra altamente especializada; e a criação de dispositivos portáteis de fácil aplicação (MORALES-NARVÁEZ; DINCER, 2020).

5 CONCLUSÕES

Os diagnósticos baseados em respostas imunes celulares são uma alternativa aos métodos tradicionais de diagnóstico, por se tratar de uma resposta mais duradoura que a da imune humoral, além de abranger pacientes que não tenham adquirido anticorpos contra o patógeno, evitando a falta de sensibilidade e ocorrência de falsos negativos.

Tem-se que, na última década, mais da metade dos artigos publicados utilizavam as técnicas de ELISA e ELISpot, enquanto quase 20% das publicações realizavam o diagnóstico de diversas doenças com um citômetro de fluxo por FACS. O cenário para as patentes submetidas no mesmo período se difere, tendo como principal método utilizado o desenvolvimento de epítomos que possam, posteriormente, ser aplicadas para ativar as células do sistema imune, detectando a presença da doença por imunorresponsividade de células T. Além disso, os principais alvos para o diagnóstico de doenças baseados em respostas imunes celulares são as citocinas e quimiocinas, seguida dos biomarcadores de superfície celular. As patentes ainda trazem fragmentos de anticorpos ou de antígenos como moléculas desenvolvidas para corroborar no diagnóstico das mais diversas doenças.

Entretanto, as técnicas que são amplamente aplicadas no diagnóstico por imunidade celular apresentam algumas desvantagens, como elevado tempo de resposta e necessidade de mão de obra altamente especializada. Uma alternativa

para essas limitações se encontram no *point-of-care* e biossensores, como os imunossensores de microarranjo e microfluídica, capazes de reduzir os custos de produção e entregar o resultado do diagnóstico em tempo real. Ainda assim, há espaço para ampliar a aplicação dessas tecnologias em uma maior variedade de patógenos e doenças, além de melhorar a acessibilidade aos mesmos.

CAPÍTULO 4 – DIAGNÓSTICO DE COVID-19 BASEADO EM RESPOSTAS IMUNES CELULARES

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia que cresce ao longo dos anos para realizar o diagnóstico das mais diversas doenças é o *point-of-care* (POC) que, devido sua portabilidade, permite realizar diagnósticos rápidos e precisos em mais pacientes, mesmo aqueles que teriam dificuldade de acesso a um hospital. Dentro do POC há o desenvolvimento de biossensores, dispositivos capazes de converter uma resposta biológica em um sinal elétrico, apresentando alta sensibilidade, seletividade, estabilidade para mudanças no ambiente e reprodutibilidade (METKAR, GIRIGOSWAMI, 2019).

Uma abordagem que pode ser utilizada ao realizar o diagnóstico é a resposta imune celular, onde a eliminação do patógeno é mediada principalmente por linfócitos T. Essas células, ao entrar em contato com um determinado patógeno, irão se proliferar em linfócitos T antígenos específicos. Esse processo de proliferação é capaz de produzir espécies reativas de oxigênio, como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e derivado não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2), substâncias que apresentam elétrons desemparelhados, formados quando há ganho de oxigênio ou perda de hidrogênio em uma reação orgânica (NISHINAGA, 2015). Por serem moléculas com capacidade de oxidação e redução, podem, potencialmente, serem detectadas por biossensores.

Quanto à COVID-19, os principais meios de diagnosticar a doença são pelo uso de biologia molecular para detectar a presença do vírus no paciente, como a técnica de RT-PCR, e a detecção de anticorpos contra a doença, principalmente o IgG e IgM. Considerando os pontos negativos desses métodos de diagnóstico, que incluem os casos de falsos negativos, basear-se em respostas imunes celulares é uma alternativa que permite uma detecção mais precisa dos casos de COVID-19. A utilização de biossensores imunoeletroquímicos corrobora, ainda, com o diagnóstico rápido e POC, atingindo a população fora de laboratórios clínicos. Sendo assim, a detecção rápida e precisa de casos de COVID-19 podem reduzir o número de internações e mortes pela doença, uma vez que permitem medidas rápidas de contenção da doença. Desta forma, o objetivo do presente projeto é testar um

modelo de detecção de ROS produzidas por linfócitos T no processo de proliferação e diferenciação em eletrodos impressos de carbono.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS

As células Jurkat, fornecidas pelo laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas/FIOCRUZ Paraná, foram cultivadas em meio RPMI 1640 com 10% SFB, 1% pen/strep e HEPES [1X], incubadas em estufa a 37°C com 5% de atmosfera de CO₂. A troca de meio foi realizada três vezes por semana até as células atingirem alta confluência (80%).

2.2 ANÁLISE DE LINFÓCITOS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

As células Jurkat foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ células/poço em placa de 96 poços (RPMI 1640, 10% SFB, 1% pen/strep, HEPES [1X]) nos grupos experimentais controle negativo, que não é induzido a proliferação, e induzido, que a proliferação dos linfócitos é induzida por concanavalina A (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) na concentração de 0,0025 µg/µL. As células são mantidas em estufa a 37°C com 5% de atmosfera de CO₂ por cinco dias. Após o tempo de incubação as células são centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos e o pellet ressuspendido em 20 µL de RPMI 1640 sem suplementação.

Como branco das células foi realizada uma leitura apenas do meio RPMI 1640 sem suplementação. Amostras de 5 µL foram colocadas em cima do cristal e lidas no espectro de 650-4000 cm⁻¹. A superfície do cristal é limpa com etanol entre as leituras. Cada grupo foi escaneado sob as mesmas condições e para a análise de dados foram utilizadas duplicatas celulares.

2.3 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR DICLOROFLUORESCEÍNA-DIACETATO

As células Jurkat foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ células/poço em placa de 96 poços (RPMI 1640, 10% SFB, 1% pen/strep, HEPES [1X]). O ensaio de detecção de espécies reativas de oxigênio foi realizado com quatro grupos experimentais: Jurkat não marcadas, Jurkat marcadas com 2,7-diclorohidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, Missouri, Estados

Unidos), Jurkat marcadas com DCFH-DA e estimuladas com concanavalina A a 0,0025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e Jurkat marcadas com DCFH-DA e incubadas com H_2O_2 a 0,03%, que foi utilizado como controle positivo do ensaio.

A marcação com DCFH-DA seguiu o protocolo descrito por Chen et al (2010). As células são lavadas uma vez com PBS [1X] para remoção de vestígios do meio original, centrifugando a 2000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. As células são, então, marcadas com 1 μM de DCFH-DA em PBS [1X] e incubadas em estufa a 37°C com 5% de atmosfera de CO_2 por 30 minutos, protegidas da luz. As células são centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos e lavadas mais duas vezes com PBS [1X] aquecido, para remoção do excesso de DCFH-DA. Meio fresco RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB foi adicionado nas células marcadas. Uma duplicata de Jurkat marcada foi estimulada para a proliferação celular e produção de espécies reativas de oxigênio com a adição de concanavalina A, enquanto o controle positivo foi adicionado de H_2O_2 , ambos com concentrações previamente descritas. A placa com os quatro grupos experimentais foi incubada em estufa a 37°C com 5% de atmosfera de CO_2 por cinco dias, protegidas da luz.

No quinto dia, a fluorescência dos poços foi monitorada pelo Tecan i-control M-200, nos comprimentos de onda de excitação em 485 nm e emissão em 530 nm. Cada amostra foi analisada por triplicata.

2.4 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO POR GRIESS

Os grupos experimentais, célula e condições de cultivo são iguais ao realizado no tópico 2.2 (página 107). Após cinco dias de incubação as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos e o pellet ressuspensionado em 80 μL de PBS [1X] para não haver interferência do fenol vermelho presente no meio RPMI 1640 na coloração do Griess.

A detecção de espécies reativas de nitrogênio foi realizada por meio do *Griess Reagent Kit for Nitrite Determination* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Para construir a curva padrão de nitritos foram preparadas soluções de NaNO_2 com concentrações de 1, 10, 25, 50, 75 e 100 μM diluindo a solução estoque de NaNO_2 200 μM em água deionizada.

A absorbância dos poços foi monitorada pelo equipamento Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), no comprimento de onda de 548 nm.

2.5 LEITURA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM ELETRODOS DE CARBONO

O cultivo das células Jurkat, assim como os grupos experimentais definidos, são os mesmos realizados no tópico 2.2 (página 107). O ensaio de leitura de espécies reativas de oxigênio utilizou eletrodos impressos de carbono comerciais da empresa Zimmer & Peacock A/S (Horten, Noruega). Os eletrodos são inseridos no potenciostato ANABOX ZP2000003 (Zimmer & Peacock A/S, Horten, Noruega) e lidos no programa PSTrace 5 (PalmSens, Houten, Países Baixos).

Inicialmente, nos eletrodos foi realizada a eletrodeposição de *quantum dot* de grafeno (*graphene quantum dot* ou GQD, em inglês), obtido em parceria pelo laboratório Labsense do Prof. Luiz Humberto Marcolino e Prof. Marcio Bergamini no departamento de química da UFPR, já modificado para funcionalizar eletrodos, adicionando-se 45 µL de uma solução contendo GQD sobre os eletrodos de trabalho, referência e contra eletrodo. A eletrodeposição foi realizada por voltametria cíclica, variando a voltagem de 0V a -1,3V por 3 ciclos de varredura. Essa eletrodeposição de GQD teve por finalidade funcionalizar a superfície do eletrodo com grupamentos de ácido carboxílico, o que permite a posterior imobilização de PLL e células no mesmo.

Após a lavagem da superfície dos eletrodos com água deionizada, os mesmos foram adicionados de 3 µL de PLL apenas no eletrodo de trabalho. Realizou-se após secagem da solução nova lavagem da superfície para remoção do excesso de PLL que não imobilizou no eletrodo. A partir dessa etapa as leituras utilizaram os seguintes parâmetros:

TABELA 13 – PARÂMETROS DO PROGRAMA PSTRACE 5 PARA AS LEITURAS EM ELETRODOS IMPRESSOS DE CARBONO.

Parâmetro	Valor
<i>T equilibration</i>	30 s
<i>E begin</i>	-0,5 V
<i>E vertex 1</i>	0,8 V
<i>E vertex 2</i>	-0,5 V
<i>E step</i>	0,01 V
<i>Scan rate</i>	0,05 V/s
<i>Number of scans</i>	1

FONTE: A AUTORA (2022).

Com os eletrodos completamente secos, foi adicionado 45 μL da solução de leitura, descrita no apêndice (página 135), na superfície dos eletrodos de carbono imobilizados com PLL, realizando-se a leitura por voltametria cíclica. Após uma nova lavagem com água destilada, foi depositado na superfície do eletrodo de trabalho 5 μL de células, incubado por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, uma última lavagem com água deionizada foi realizada para remoção do excesso de célula que não ficou imobilizada. Os eletrodos foram novamente lidos após a adição de 45 μL da solução de leitura na superfície dos mesmos.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

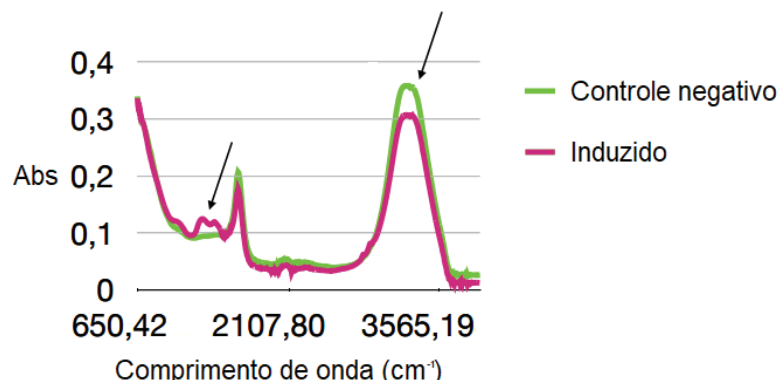
Os resultados são expressos como médio $\pm$ desvio padrão da média (SD). Para o ensaio descrito em 2.3 (página 107), os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de múltipla comparação de Bonferroni. Valores de P menores que 0,05 ($P < 0,05$) são considerados como indicativo de significância. Já para os outros experimentos realizados, os dados foram avaliados pelo teste t de *student* não paramétrico (Mann-Whitney) Os cálculos realizados utilizaram o software estatístico GraphPad Prism versão 6.00 (San Diego Califórnia, Estados Unidos).

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DE LINFÓCITOS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

A intensidade detectada das células Jurkat não induzidas (controle negativo) e induzidas com concanavalina A (ConA) após cinco dias de cultivo por FTIR está indicada na FIGURA 35. A sobreposição de ambos os gráficos permite observar em quais comprimentos de onda há diferenciação dos picos gerados entre o grupo de controle negativo e as células induzidas com concanavalina A. Como representado na FIGURA 35, foram observadas duas distinções entre os grupos, sendo elas o surgimento de novo pico em 1600 cm^{-1} e a redução de pico em 3500 cm^{-1} .

FIGURA 35 – SOBREPOSIÇÃO DOS RESULTADOS DA ANÁLISE POR FTIR PARA CÉLULAS (A) CONTROLE NEGATIVO E EM (B) CÉLULAS INDUZIDAS DOS GRÁFICOS EM FTIR.

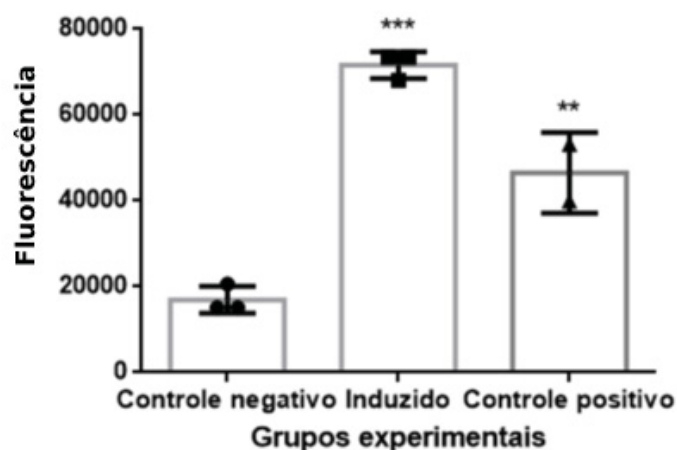


FONTE: A AUTORA (2022).

NOTA: A indução foi realizada com ConA por cinco dias em células Jurkat na concentração de $0,1 \times 10^6$ células/poço em placa de 96 poços, incubadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB, 1% pen/strep, HEPES [1X] a 37°C com 5% de atmosfera de CO₂. Células não induzidas foram mantidas nas mesmas condições de cultivo, sem a adição de ConA. As setas indicam o surgimento de um novo pico em 1600 cm⁻¹ e a redução de pico em 3500 cm⁻¹ após a proliferação das células.

3.2 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO POR DICLOROFLUORESCÊINA

FIGURA 36 – GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO COM CONCAVALINA A.



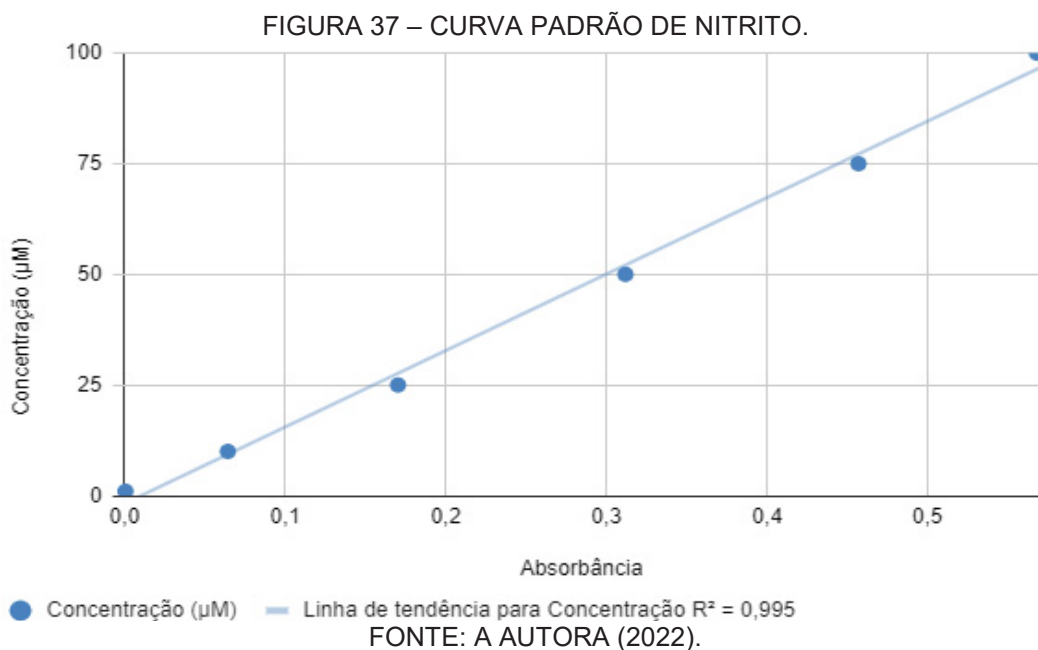
FONTE: A AUTORA (2022).

NOTA: A indução foi realizada com ConA por cinco dias em células Jurkat na concentração de $0,1 \times 10^6$ células/poço em placa de 96 poços, marcadas com DCFH-DA e incubadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB, 1% pen/strep, HEPES [1X] a 37°C com 5% de atmosfera de CO₂. Células não induzidas foram mantidas nas mesmas condições de cultivo, sem a adição de ConA, enquanto as células utilizadas no controle positivo foram incubadas com H₂O₂ a 0,03%. Análise estatística por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de múltipla comparação de Bonferroni. Valores de P menores que 0,05 ($P < 0,05$) são considerados como indicativo de significância e estão representados por asteriscos sobre as barras, comparando os grupos em questão com o controle negativo. O gráfico apresenta médias $\pm$ SD.

A fluorescência detectada das células Jurkat após cinco dias de cultivo e marcação com DCFH-DA, após correção dos valores branco (células Jurkat não induzidas e não marcadas), está indicada na FIGURA 36. O controle negativo representa as células Jurkat marcadas com DCFH-DA e não induzidas, enquanto o controle positivo conta com as células Jurkat marcadas com DCFH-DA e adicionadas de H_2O_2 .

3.3 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO POR GRIESS

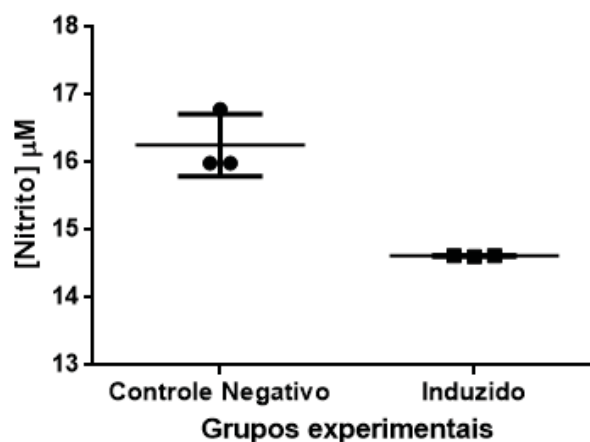
Os resultados obtidos em fluorescência na leitura realizada após cinco dias de experimento foram convertidos em concentração de nitrito por meio de curva padrão de nitrito.



NOTA: A figura apresenta a curva padrão de nitrito obtida para a técnica de Griess. Para a construção da mesma foram preparadas soluções de $NaNO_2$ com concentrações de 1, 10, 25, 50, 75 e 100 µM diluindo a solução estoque de $NaNO_2$ 200 µM em água deionizada.

O gráfico na FIGURA 38 indica que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

FIGURA 38 – GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO COM CONCAVALINA A.



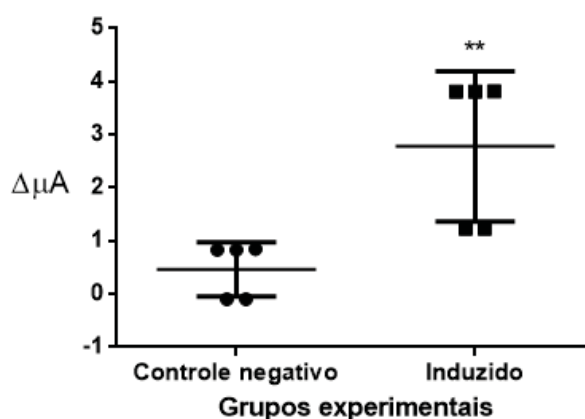
FONTE: A AUTORA (2022).

NOTA: A indução foi realizada com ConA por cinco dias em células Jurkat na concentração de $0,1 \times 10^6$ células/poço em placa de 96 poços, incubadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB, 1% pen/strep, HEPES [1X] a 37°C com 5% de atmosfera de CO_2 . Células não induzidas foram mantidas nas mesmas condições de cultivo, sem a adição de ConA. Análise estatística pelo teste t de *student* não paramétrico (Mann-Whitney). O gráfico apresenta médias $\pm$ SD.

3.4 LEITURA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO ELETRODOS DE CARBONO

A deposição de GQD na superfície dos eletrodos é confirmada com a redução do pico a partir da segunda varredura, como representado na FIGURA 40. Os eletrodos que apresentaram correta deposição de GQD em sua superfície seguiram para as próximas etapas.

FIGURA 39 – VOLTAMETRIA CÍCLICA DE CÉLULAS JURKAT CONTROLES E INDUZIDAS EM ELETRODOS APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO COM CONCAVALINA A.



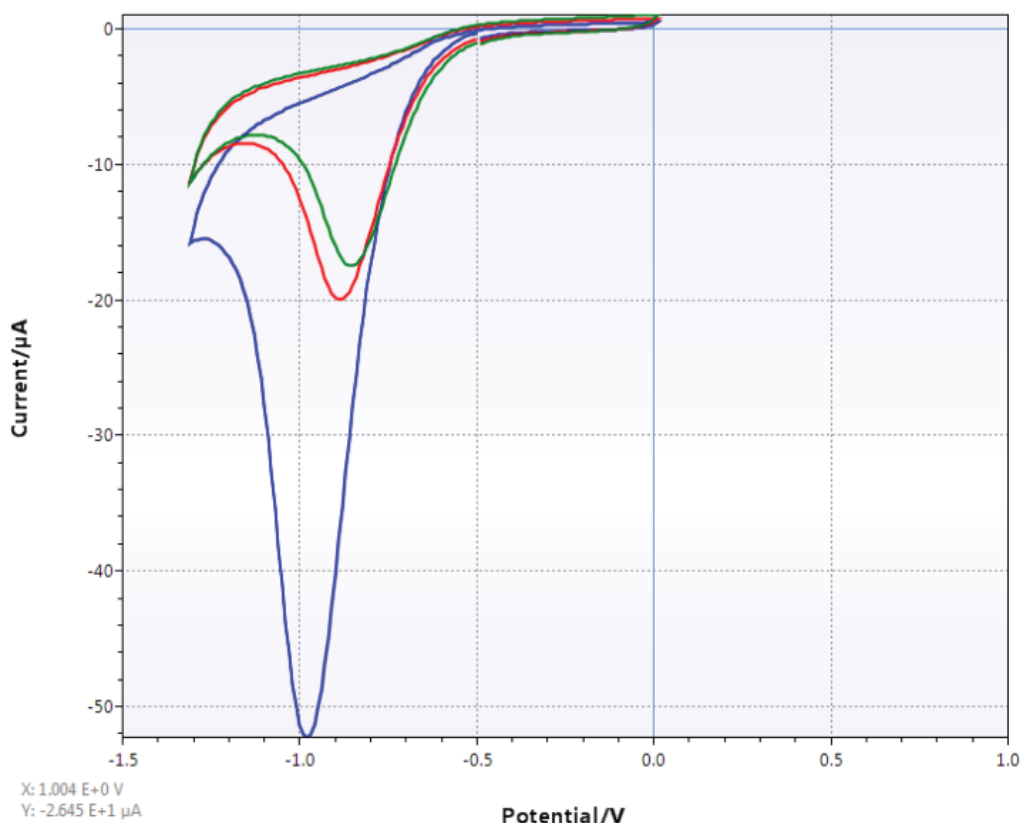
FONTE: A AUTORA (2022).

NOTA: A indução foi realizada com ConA por cinco dias em células Jurkat na concentração de $0,1 \times 10^6$ células/poço em placa de 96 poços, incubadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB, 1% pen/strep, HEPES [1X] a 37°C com 5% de atmosfera de CO_2 . Células não induzidas foram mantidas

nas mesmas condições de cultivo, sem a adição de ConA. Foi comparada a variação de corrente entre os picos para os gráficos de voltametria cíclica das leituras realizadas na ausência e na presença de células para cada um dos grupos analisados. Análise estatística pelo teste t de student não paramétrico (Mann-Whitney). Valores de P menores que 0,05 ($P < 0,05$) são considerados como indicativo de significância e está representada por ** sobre as barras. O gráfico apresenta médias $\pm$ SD.

As leituras das amostras em eletrodos foram analisadas de acordo com a variação de corrente (μA) dos picos dos gráficos gerados para o eletrodo sem e com amostra, o que indicaria a corrente gerada apenas pela presença das células, descontando os valores de corrente pelo ferricianeto de potássio, GQD e PLL da imobilização das células.

FIGURA 40 – PADRÃO DE LEITURA DA TÉCNICA DE VOLTAMETRIA CÍCLICA PARA DEPOSIÇÃO DE GQD.



FONTE: A AUTORA (2022).

NOTA: Deposição de GQD em eletrodos de carbono. A curva em azul representa a primeira leitura pela voltametria cíclica, enquanto a curva vermelha e verde representam as leituras 2 e 3, respectivamente. Esse teste teve por finalidade funcionalizar a superfície do eletrodo com grupamentos de ácido carboxílico, o que permite a posterior imobilização de PLL e células no mesmo.

4 DISCUSSÃO

Apesar de biossensores já serem utilizados para diagnóstico de doenças, a principal aplicação deles é a partir da resposta imune humoral, detectando se o paciente adquiriu anticorpos contra a doença, como o exemplo de um sensor eletroquímico do tipo SPE para detecção de anticorpos IgM específico para dengue em amostras de soro (PARKASH et al., 2020). Entretanto, há casos em que não há produção de anticorpos apesar de ser infectado pelo patógeno ou que a proteção humoral seja de curta duração, assim como apresentado no estudo de Geurtsvankessel et al. (2022), pacientes vacinados para COVID-19 que mantinham a imunidade contra o SARS-CoV-2 pela presença de células T $CD4^+$ e $CD8^+$, faltando a presença de anticorpos neutralizantes, mas que devido à resposta imune celular limitaram o desenvolvimento de casos graves da doença e auxiliaram na prevenção. Considerando, então, o potencial da imunidade celular como alternativa aos métodos tradicionais de diagnóstico para COVID-19, a hipótese levantada no presente documento se baseia no diagnóstico imunoeletroquímico. Para tal, foram realizados experimentos que apoiassem a leitura de espécies reativas em sensores eletroquímicos devido à ativação de células T, como a análise da proliferação das células Jurkat pelo ensaio de FTIR e os ensaios de produção de ROS e RNS (apenas nitrito) por DCFH-DA e Griess, respectivamente.

Os dados obtidos pelo ensaio de proliferação de linfócitos utilizando FTIR apresentaram dois pontos relevantes: o surgimento de um novo pico em 1600 cm^{-1} e a redução de pico em 3500 cm^{-1} . Segundo os autores Wood et al. (1998) e Wald et al. (2015), a redução do pico em 3500 cm^{-1} devido a presença de meio residual nas amostras controles, enquanto o padrão do novo pico presente em 1600 cm^{-1} segue o mesmo apresentado por células T $CD8^+$ e $CD4^+$. Sendo assim, é possível afirmar que no período de cinco dias incubadas com concanavalina A as células Jurkat foram capazes de se proliferar, e isso foi detectado pela técnica de FTIR. Ensaio futuros de proliferação de linfócitos marcados com CFSE ou anticorpos contra proteínas específicas de células T podem ser realizados em um citômetro de fluxo para fornecer mais dados que corroborem com os resultados do FTIR.

A verificação quanto a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio durante a proliferação dos linfócitos T tinha por objetivo confirmar os dados teóricos sobre os linfócitos e determinar qual substância de fato estava sendo lida nos biossensores, se era uma combinação das duas espécies reativas ou apenas uma

delas. O ensaio de Griess realizado não apresentou diferença estatística entre os grupos estimulados e não estimulados, confirmando com dados da literatura que apresentam apenas a informação de produção de RNS em outros tipos celulares. Fagócitos, APCs e células B, devido à expressão de fator citosólico de neutrófilos 1 (*neutrophil cytosolic factor 1* ou NCF1, em inglês), responsável pela explosão oxidativa, produzem RNS quando estimulados por fatores inflamatórios ou interações com células T. O mesmo não é observado em células T, as quais expressam níveis baixos de NCF1 (ZHONG; YAU; HOLMDAHL, 2019).

Já quanto à produção de ROS na ativação de células T há diversas publicações teóricas e experimentais que corroboram esta informação, além de apresentar os papéis da ROS na imunidade celular e descrever como ocorre a formação dessas substâncias. Como já apresentado anterior, quando estimuladas com diferentes agentes, ocorre a produção de ROS por 5-lipoxigenase, NOX-2 e mitocôndrias em células T. A estimulação de TCR eleva a produção de $O_2^{\cdot-}$ pelo complexo mitocondrial III (CIII) e a de H_2O_2 pela ativação de NOX-2 (PENG et al., 2021; YAROSZ; CHANG, 2018; BELIKOV; SCHRAVEN; SIMEONI, 2015). Quanto ao resultado experimental, Tatla et al. (1999) quantificou a produção de ROS em diversas condições de cultivo para PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*, em inglês), que condizem com os nossos achados utilizando a célula Jurkat nos experimentos. Os resultados obtidos no presente documento pelos ensaios de proliferação e produção de ROS sugerem que no processo de proliferação das células T há a geração de espécies oxidantes, tais como peróxido de hidrogênio e radical superóxido (BELIKOV; SCHRAVEN; SIMEONI, 2015). Ensaios futuros para a confirmação da identidade do oxidante são necessários devido à oxidação da sonda DCFH-DA por outras substâncias além das citadas anteriormente (CHEN et al., 2010).

Para o ensaio realizado nesta dissertação quanto a leitura de células Jurkat controle e induzidas nos biossensores SPE, as análises estatísticas pelo teste t de *student* não paramétrico (Mann-Whitney) apresentou significância ($P < 0,05$) quando comparando o grupo não induzido para proliferação e o grupo induzido com concanavalina A. Dessa forma, os ensaios de proliferação de linfócitos lidos por FTIR e a detecção de ROS por DCFH-DA corroboram com a hipótese levantada no projeto, reforçando o potencial da utilização de biossensores para realizar o diagnóstico baseado em respostas imunes celulares.

5 CONCLUSÕES

No período de cinco dias as células Jurkat apresentaram indícios de proliferação na presença de concanavalina A, como se pode analisar pelos dados da espectroscopia de infravermelho. Nessa condição, as células Jurkat foram levadas à produção de espécies reativas de oxigênio, embora o mesmo não foi observado para a produção de nitritos, uma espécie reativa de nitrogênio.

Essas análises corroboraram o que foi encontrado com o uso de detecção eletroquímica da ativação celular. Nossos resultados, ainda que preliminares, indicam o potencial da utilização da plataforma eletroquímica para o diagnóstico rápido e *point-of-care* de doenças, com análises baseadas em respostas imunes celulares.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A pesquisa bibliográfica sobre diagnóstico baseado em respostas imunes celulares ao longo da última década demonstrou que não houve forte desenvolvimento de tecnologias novas, havendo predominância dos métodos de ELISA, ELISpot e FACS.

Visando o uso de biossensores como alternativa no diagnóstico, os eletrodos impressos de carbono para detectar a presença de espécies reativas de oxigênio produzidas durante a proliferação de células Jurkat parece promissor, sendo necessárias novas análises para concluir o modelo.

A análise *in silico* das correlações entre BCoV e SARS-CoV-2 demonstrou que os dois vírus podem conferir imunidade cruzada devido ao compartilhamento de vários epítomos comuns. Além disso, há indicativos da exposição humana ao gado quanto ao desenvolvimento da pandemia de COVID-19.

PERSPECTIVAS

As próximas etapas para a conclusão do projeto de utilizar uma plataforma eletroquímica como diagnóstico de COVID-19 baseado em respostas imunes celulares incluem, além dos ensaios já citados para confirmação da ativação de linfócitos e do perfil celular por citometria de fluxo com marcação de CFSE ou anticorpos contra proteínas específicas de células T, a ampliação no número amostral e utilização células tanto de animais de teste quanto de humanos imunizados contra COVID-19, realizando a estimulação dos linfócitos com antígenos do SARS-CoV-2, para, então, concluir os resultados com a leitura das células por voltametria cíclica nos biossensores SPE.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2015.
- ABDUL-RASOOL, S.; FIELDING, B. C. Understanding Human Coronavirus HCoV-NL63. **Open Virol J**, v. 4, p. 76-84, 2010.
- ABUBAKAR, I. et al. How should I interpret an interferon gamma release assay result for tuberculosis infection? **Thorax**, v. 68, nº 3, p. 298-301, 2013.
- AGARWAL, S. et al. Differential positive TSPOT assay responses to ESAT-6 and CFP-10 in health care workers. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 101S, p. S83-S91, 2016.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br>>. Acesso em: 29 maio 2022.
- AGUADO-DOMÍNGUEZ, E. et al. Computer-Assisted Definition of the Inflammatory Infiltrates in Patients With Different Categories of Banff Kidney Allograft Rejection. **Front Immunol**, v. 10, 2019.
- ALEKA, Y. et al. Whole Blood Stimulation Assay as a Treatment Outcome Monitoring Tool for VL Patients in Ethiopia: A Pilot Evaluation. **J Immunol Res**, v. 2020, 2020.
- ALVES, H. A. Imunidade adaptativa: Linfócitos T. 2021. Disponível em: <https://jaleko-files.s3-sa-east-1.amazonaws.com/apostila-web/607b3d5e93435_linfocitos-t.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2022.
- ANGKAWANISH, T. et al. The elephant interferon gamma assay: a contribution to diagnosis of tuberculosis in elephants. **Transbound Emerg Dis**, v. 60, 2013.
- ANTUNEZ, C. et al. Recognition of iodixanol by dendritic cells increases the cellular response in delayed allergic reactions to contrast media. **Clin Exp Allergy**, v. 41, nº 5, 2011.
- ARRIETA-VILLEGAS, C. et al. Evaluation of P22 Antigenic Complex for the Immuno-Diagnosis of Tuberculosis in BCG Vaccinated and Unvaccinated Goats. **Front Vet Sci**, v. 7, 2020.
- ATANACKOVIC, D. et al. Surface molecule CD229 as a novel target for the diagnosis and treatment of multiple myeloma. **Haematologica**, v. 96, nº 10, 2011.
- AVUMEGAH, M. S. et al. Cell-mediated and serology-based tests for *Mycobacterium ulcerans* disease: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 14, p. 1-15, 2020.
- BACHER, P. et al. Antigen-reactive T cell enrichment for direct, high-resolution analysis of the human naive and memory Th cell repertoire. **J Immunol**, v. 190, nº 8, 2013.
- BANAS, B. et al. Clinical validation of a novel enzyme-linked immunosorbent spot assay-based in vitro diagnostic assay to monitor cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity in kidney transplant recipients: a multicenter, longitudinal, prospective, observational study. **Transpl Int**, v. 31, nº 4, p. 436-450, 2018.

BARDROFF, M. O. et al. **IL-18 binding molecules**. Depositante: Novartis Ag. WO2014037899A2. Depósito em: 05 set. 2013. Concessão: 13 mar. 2014.

BARNES, H. et al. Hypersensitivity pneumonitis: Current concepts in pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Allergy**, v. 77, nº 2, p. 442-453, 2022.

BELIKOV, A. V.; SCHRAVEN, B.; SIMEONI, L. T cells and reactive oxygen species. **J Biomed Sci**, v. 22, 2015.

BERNITZ, N. et al. Parallel testing increases detection of *Mycobacterium bovis*-infected African buffaloes (*Syncerus caffer*). **Vet Immunol Immunopathol**, v. 204, p. 40-43, 2018.

BEZOS, J. et al. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. **Res Vet Sci**, v. 97, p. 44-52, 2014.

BOGGIATTO, P. M.; KANIPE, C. R.; PALMER, M. V. Enhanced Detection of *Mycobacterium bovis*-Specific T Cells in Experimentally-Infected Cattle. **Front Vet Sci**, v. 8, 2021.

BORGSTRÖM, E. et al. Detection of proliferative responses to ESAT-6 and CFP-10 by FASCIA assay for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Immunol Methods**, v. 370, 2011.

BOYLE, J. **A cell mediated immune response assay with enhanced sensitivity**. Depositante: Cellectis Limited. WO2013000021A1. Depósito em: 27 jun. 2012. Concessão: 03 jan. 2013.

BOYLE, J. et al. **An assay for measuring cell-mediated immunoresponsiveness**. Depositante: Cellectis Limited. WO2011075773A1. Depósito em: 21 dez. 2010. Concessão: 30 jun. 2011.

BOYLE, J. **Peptide composition and uses thereof**. Depositante: Qiagen Sciences, Llc. WO2016065199A1. Depósito em: 22 out. 2015. Concessão: 28 abr. 2016.

BOYLE, J.; MANKTELOW, E. **An assay of cell mediated immune responsiveness**. Depositante: Cellectis Limited. WO2012145786A1. Depósito em: 20 abr. 2012. Concessão: 01 nov. 2012.

BRUNET, M.; MILLÁN, O. Getting immunosuppression just right: the role of clinical biomarkers in predicting patient response post solid organ transplantation. **Expert Rev Clin Pharmacol**, v. 14, nº 12, p. 1467-1479, 2021.

BRUSSOW, H, BRUSSOW, L. Clinical evidence that the pandemic from 1889 to 1891 commonly called the Russian flu might have been an earlier coronavirus pandemic. **Microb Biotechnol**, v. 14, p. 1860-1870, 2021.

BURRELL, C. J.; HOWARD, C. R.; MURPHY, F. A. Coronaviruses. In: BURRELL, C. J. (Org.). Fernner and White's Medical Virology. 5. ed. Massachusetts: **Academic Press**, 2016. p. 437-446.

BURROWS, S. R.; MOSS, D. J.; KHANNA, R. Understanding human T-cell-mediated immunoregulation through herpesviruses. **Immunol Cell Biol**, v. 89, nº 3, 2011.

BUTLER, K. S. et al. Development of antibody-tagged nanoparticles for detection of transplant rejection using biomagnetic sensors. **Cell Transplant**, v. 22, nº 10, 2013.

CADER, F. Z. et al. Mass cytometry of Hodgkin lymphoma reveals a CD4⁺ regulatory T-cell-rich and exhausted T-effector microenvironment. **Blood**, v. 132, nº 8, p. 825-836, 2018.

CALAS-BLANCHARD, C.; CATANANTE, G.; NOGUER, T. Electrochemical Sensor and Biosensor Strategies for ROS/RNS Detection in Biological Systems. **Electroanalysis**, v. 26, p. 1277-1286, 2014.

CANNELLA, A. P. et al. Antigen-specific acquired immunity in human brucellosis: implications for diagnosis, prognosis, and vaccine development. **Front Cell Infect Microbiol**, 2012.

CASAL, C. et al. Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. **Vet Microbiol**, v. 170, 2014.

CESTARI, V. R. F. et al. Social vulnerability and COVID-19 incidence in a Brazilian metropolis. **Cien Saude Colet**, v. 26, p. 1023-1033, 2021.

CHEN, W. et al. In Vivo Electrochemical Biosensors for Reactive Oxygen Species Detection: A Mini-Review. **Anal Lett**, v. 45, p. 156-167, 2012.

CHEN, X. et al. Reactive Oxygen Species Regulate T Cell Immune Response in the Tumor Microenvironment. **Oxid Med Cell Longev**, 2016.

CHEN, Y.; LI, L. SARS-CoV-2: virus dynamics and host response. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, p. 515-516, 2020.

CHRISTIANS, U.; KLAWITTER, J.; KLAWITTER, J. Biomarkers in Transplantation--Proteomics and Metabolomics. **Ther Drug Monit**, v. 38, 2016.

CHUANG, H. C.; TAN, H. C. MAP4K Family Kinases and DUSP Family Phosphatases in T-Cell Signaling and Systemic Lupus Erythematosus. **Cells**, v. 8, nº 11, 2019.

CHUNG, W. et al. CXCR3 ligands in pleural fluid as markers for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 21, nº 12, p. 1300-1306, 2017.

CLARKE, C. et al. Development and evaluation of a diagnostic cytokine-release assay for *Mycobacterium suricattae* infection in meerkats (*Suricata suricatta*). **BMC Vet Res**, v. 13, nº 2, 2016.

COJOCARU, G. S. et al. **Lsr antibodies, and uses thereof for treatment of cancer**. Depositante: Compugen Ltd. WO2013190555A1. Depósito em: 19 jun. 2013. Concessão: 27 dez. 2013.

COPAESCU, A. et al. An Updated Review of the Diagnostic Methods in Delayed Drug Hypersensitivity. **Front Pharmacol**, v. 11, 2021.

COPAESCU, A. et al. Dose Dependent Antimicrobial Cellular Cytotoxicity-Implications for ex vivo Diagnostics. **Front Pharmacol**, v. 12, 2021.

COPAESCU, A. et al. The Role of In Vivo and Ex Vivo Diagnostic Tools in Severe Delayed Immune-Mediated Adverse Antibiotic Drug Reactions. **J Allergy Clin Immunol Pract**, v. 9, nº 5, p. 2010-2015, 2021.

COPPOLA, M. et al. Cell-Mediated Immune Responses to in vivo-Expressed and Stage-Specific *Mycobacterium tuberculosis* Antigens in Latent and Active Tuberculosis Across Different Age Groups. **Front Immunol**, v. 11, 2020.

CRAVENS, P. D. et al. The neonatal CNS is not conducive for encephalitogenic Th1 T cells and B cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neuroinflammation**, v. 10, 2013.

CURRIU, M. et al. Screening NK-, B- and T-cell phenotype and function in patients suffering from Chronic Fatigue Syndrome. **J Transl Med**, v. 11, 2013.

DE WAAL, C. R. et al. Development of a cytokine gene expression assay for the relative quantification of the African elephant (*Loxodonta africana*) cell-mediated immune responses. **Cytokine**, v. 141, 2021.

DEBORSKA-MATERKOWSKA, D. et al. Diagnostic utility of monitoring cytomegalovirus-specific immunity by QuantiFERON-cytomegalovirus assay in kidney transplant recipients. **BMC Infect Dis**, v. 18, 2018.

DECKERT, J. et al. **Cd37-binding molecules and immunoconjugates thereof**. Depositante: Immunogen, Inc. WO2011112978A1. Depósito em: 11 mar. 2011. Concessão: 05 set. 2011.

DECKERT, J.; TAVARES, D. J.; PARK, P. U. **Cd20 antibodies and uses thereof**. Depositante: Immunogen Inc. US20110195022A1. Depósito em: 10 fev. 2011. Concessão: 11 ago. 2011.

DERNIVOIX, K. et al. Field performance of six *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigens in a 20h interferon gamma release assay in Belgium. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 189, p. 17-27, 2017.

DEROUAZI, M.; BELNOUE, E. **A novel complex comprising a cell penetrating peptide, a cargo and a tlr peptide agonist**. Depositante: Amal Therapeutics Sa. WO2016146260A1. Depósito em: 16 mar. 2016. Concessão: 22 set. 2016.

DESAI, D. Urban densities and the Covid-19 pandemic: Upending the sustainability myth of global megacities. **ORF Occasional Paper**, v. 244, p. 1-4, 2020.

DEY, S. et al. Tracking antigen specific T-cells: Technological advancement and limitations. **Biotechnol Adv**, v. 37, nº1, p. 145-153, 2019.

DIEDERICH, J. M. et al. Neurofascin and Compact Myelin Antigen-Specific T Cell Response Pattern in Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy Subtypes. **Front Neurol**, v. 9, 2018.

DJAOUD, Z.; PARHAM, P. HLAs, TCRs, and KIRs, a Triumvirate of Human Cell-Mediated Immunity. **Annu Rev Biochem**, v. 89, p. 717-739, 2020.

DODDAM, S. N.; PEDDIREDDY, V.; AHMED, N. *Mycobacterium tuberculosis* DosR Regulon Gene Rv2004c Encodes a Novel Antigen with Pro-inflammatory Functions

and Potential Diagnostic Application for Detection of Latent Tuberculosis. **Front Immunol**, v. 8, 2017.

DORNELL, J. **Humoral vs Cell-Mediated Immunity**. 2021. Disponível em: <<https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/humoral-vs-cell-mediated-immunity-344829>>. Acesso em: 04 jun. 2022.

DORSA, A. C. C. et al. Eficiência dos municípios de Mato Grosso do Sul: uma abordagem baseada em fronteira determinística. **Interações**, v. 21, p. 663-680, 2020.

DOSANJH, D. P. et al. Novel *M tuberculosis* antigen-specific T-cells are early markers of infection and disease progression. **PLoS One**, v. 6, nº 12, 2011.

DUTTA, D. K.; RHODES, K.; WOOD, S. C. *In silico* prediction of Ebola Zaire GP(1,2) immuno-dominant epitopes for the Balb/c mouse. **BMC Immunol**, v. 16, 2015.

ECKELMAN, B. P. et al. **Multispecific polypeptide constructs having constrained cd3 binding and related methods and uses**. Depositante: Inhibrx, Inc. WO2019200022A1. Depósito em: 10 abr. 2019. Concessão: 17 out. 2019.

ECKL-DORNA, J. et al. Poor association of allergen-specific antibody, T- and B-cell responses revealed with recombinant allergens and a CFSE dilution-based assay. **Allergy**, v. 70, nº 10, 2015.

EIRIN, M. E. et al. Identification and evaluation of new *Mycobacterium bovis* antigens in the in vitro interferon gamma release assay for bovine tuberculosis diagnosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 95, nº 6, p. 795-801, 2015.

EJAZI, S. A. et al. Investigation of the antigenicity and protective efficacy of Leishmania promastigote membrane antigens in search of potential diagnostic and vaccine candidates against visceral leishmaniasis. **Parasit Vectors**, v. 13, 2020.

ELGRISHI, N. et al. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **J Chem Educ**, v. 95, p. 197-206, 2018.

ENOMOTO, J.; MATHARU, Z.; REVZIN, A. Electrochemical Biosensors for On-Chip Detection of Oxidative Stress from Cells. In: CADENAS, E. (Org.). Methods in Enzymology. v.526. Massachusetts: **Academic Press**, 2013. p. 107-121.

FAZELI, B. et al. Recent Updates and Advances in Winiwarer-Buerger Disease (Thromboangiitis Obliterans): Biomolecular Mechanisms, Diagnostics and Clinical Consequences. **Diagnostics (Basel)**, v. 11, nº 10, 2021.

FIORANI, F. et al. Delayed-type hypersensitivity skin test against *Neospora caninum* in heifers with undetectable specific antibodies. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 72, 2020.

FIORETOS, T.; LANDBERG, N.; SANDEN, C. **Novel agents and uses thereof**. Depositante: Thoas Fioretos et al. WO2021111005A1. Depósito em: 07 dez. 2020. Concessão: 10 jun. 2021.

FORSBERG, G. et al. **Anti-il1rap antibody compositions**. Depositante: Cantargia Ab. WO2020035577A1. Depósito em: 15 ago. 2019. Concessão: 20 fev. 2020.

FREITAS, A. A. et al. Alterations to antigen-specific immune responses before and after multidrug therapy of leprosy. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 83, nº 2, 2015.

FRIEDMANN, D. et al. Bronchoalveolar Lavage Fluid Reflects a TH1-CD21low B-Cell Interaction in COVID-Related Interstitial Lung Disease. **Front Immunol**, v. 11, 2021.

GALBIATI, V. et al. Drug allergy: diagnostic possibilities with *in vitro* tests. **Front Pharmacol**, 2016.

GARCÍA-ELORRIAGA, G. et al. Interferon γ in patients with HIV/AIDS and suspicion or latent tuberculosis infection. **Asian Pac J Trop Med**, v. 6, nº 2, 2013.

GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. **Methods Mol Biol**, p. 531-352, 1999.

GELUK, A.; DUTHIE, M. S.; SPENCER, J. S. Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease. **Lepr Rev**, v. 82, nº 4, 2011.

GERACE, E. et al. Stimulation of Bovine Whole-Blood Samples Cultured in Media Supplemented with Recombinant Interleukin-7 (IL-7) and IL-12 Extends the Life Span of the Gamma Interferon Assay To Detect *Mycobacterium bovis*-Infected Cattle. **J Clin Microbiol**, v. 54, nº 9, 2016.

GEURTSVANKESSEL, C. H. et al. Divergent SARS-CoV-2 Omicron-reactive T and B cell responses in COVID-19 vaccine recipients. **Sci Immunol**, v. 7, 2022.

GILBERT, M. et al. Global distribution data for cattle, buffaloes, horses, sheep, goats, pigs, chickens and ducks in 2010. **Sci Data**, v. 5, 2018.

GLEICHMANN, N.; STEWARD, K. **Innate vs Adaptive Immunity**. 2020. Disponível em: <<https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/innate-vs-adaptive-immunity-335116>>. Acesso em: 4 jun. 2022.

GOLCALVES, R. B. et al. **Epitopes, mono- or multiepitopic peptide compounds and leishmania vaccines**. Depositante: Institut de Recherche pour le Developpement IRD Institut Pasteur de Tunis. FR3081870A1. Depósito em: 30 maio 2018. Concessão: 06 dez. 2019.

GOOSEN, W. J. et al. IP-10 Is a Sensitive Biomarker of Antigen Recognition in Whole-Blood Stimulation Assays Used for the Diagnosis of *Mycobacterium bovis* Infection in African Buffaloes (*Syncerus caffer*). **Clin Vaccine Immunol**, v. 22, nº 8, 2015.

GOOSEN, W. J. et al. The stability of plasma IP-10 enhances its utility for the diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in African buffaloes (*Syncerus caffer*). **Vet Immunol Immunopathol**, v. 173, p. 17-20, 2016.

GOVINDARAJ, D. et al. Immunogenic peptides: B & T Cell Epitopes of Per a 10 Allergen of *Periplaneta americana*. **Mol Immunol**, v. 80, p. 24-32, 2016.

GRAHAM, R. P.; SMYRK, T. C.; ZHANG, L. Evaluation of langerhans cell infiltrate by CD1a immunostain in liver biopsy for the diagnosis of primary biliary cirrhosis. **Am J Surg Pathol**, v. 36, nº 5, 2012.

GUO, L. et al. Elevated serum IL-21 levels are associated with stable immune status in kidney transplant recipients and a mouse model of kidney transplantation. **Aging (Albany NY)**, v. 12, nº 18, p. 18396-18414, 2020.

GUO, Y. et al. **Identification of vsig8 as the putative vista receptor and its use thereof to produce vista/vsig8 modulators**. Depositante: Immunext, Inc. WO2016090347A1. Depósito em: 05 dez. 2015. Concessão: 09 jun. 2016.

GURUNG, R. B. et al. Lymphoproliferative and gamma interferon responses to stress-regulated *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* recombinant proteins. **Clin Vaccine Immunol**, v. 21, nº 6, 2014.

GUVEN, G.; LOZANO-SANCHEZ, P.; GUVEN, A. Power Generation from Human Leukocytes/Lymphocytes in Mammalian Biofuel Cell. **Int J Electrochem** v. 2013, p. 1-11, 2013.

HALLAB, N. Diagnosis of Metal Hypersensitivity in Orthopedics. **Oper Tech Orthop**, v. 27, nº 3, 2017.

HAMMOND, P. W. et al. **Human anti-cancer antibodies**. Depositante: Theraclone Sciences, Inc. WO2011031833A2. Depósito em: 09 set. 2010. Concessão: 17 mar. 2011.

HAN, Z. et al. Fine level epitope mapping and conservation analysis of two novel linear B-cell epitopes of the avian infectious bronchitis coronavirus nucleocapsid protein. **Virus Research**, v. 171, nº 1, p. 54-64, 2013.

HANSEN, G. **Monoclonal antibodies directed to cd20**. Depositante: Aratana Therapeutics Inc. US20170002084A1. Depósito em: 04 mar. 2011. Concessão: 05 jan. 2017.

HASOKSUZ, M.; KILIÇ, S.; SARAÇ, F. Coronaviruses and SARS-COV-2. **Turk J Med Sci**, v. 50, p. 549-556, 2020.

HAUMONTE, J. B. et al. Enhanced prevalence of plasmatic soluble MHC class I chain-related molecule in vascular pregnancy diseases. **Biomed Res Int**, 2014.

HO, J. et al. Detecting Renal Allograft Inflammation Using Quantitative Urine Metabolomics and CXCL10. **Transplant Direct**, v. 2, nº 6, 2016.

HU, B. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nat Rev Microbiol**, v. 19, p. 141-154, 2021.

HUGHES, V. et al. Interferon gamma responses to proteome-determined specific recombinant proteins: potential as diagnostic markers for ovine Johne's disease. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 155, nº 3, p. 197-204, 2013.

HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical sensors definitions and classification. **Pure Appl Chem**, v. 63, nº 9, p. 1247-1250, 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho. Pesquisa da Pecuária Municipal. 2021**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#notas-tabela>>. Acesso em: 10 out. 2021.

INSTITUTO BUTANTAN. **Seis fatos sobre a ômicron, a variante mais transmissível da COVID-19.** 2022. Disponível em: <<https://butantan.gov.br/noticias/seis-fatos-sobre-a-omicron-a-variante-mais-transmissivel-da-covid-19>>. Acesso em: 27 maio 2022.

ISLAM, A. R. M. T. et al. Are meteorological factors enhancing COVID-19 transmission in Bangladesh? Novel findings from a compound Poisson generalized linear modeling approach. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 28, p. 11245-11258, 2021.

JACKSON, C. B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 23, p. 3-20, 2022.

JESPERSEN, M. C. et al. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic Acids Res**, v. 45(W1), p. W24-W29, 2017.

JO, Y.; HONG, A.; SUNG, H. Density or Connectivity: What Are the Main Causes of the Spatial Proliferation of COVID-19 in Korea? **Int J Environ Res Public Health**, v. 18, 2021.

JONES, G.; VORDERMEIER, H. **Diagnostische reagenzien**. Depositante: UK Secretary of State for Environment Food and Rural Affairs. EP3141908A1. Depósito em: 18 jul. 2011. Concessão: 27 mar. 2019.

JoVE Science Education Database. Immunology. ELISPOT Assay: Detection of IFN- γ Secreting Splenocytes. **JoVE**, Cambridge, MA, 2022.

JUNG, J. et al. Diagnostic usefulness of dynamic changes of CMV-specific T-cell responses in predicting CMV infections in HCT recipients. **J Clin Virol**, v. 87, p. 5-11, 2017.

JUNGENSEN, G. MIKKELSEN, H. GRELL, S. N. Use of the johnin PPD interferon-gamma assay in control of bovine paratuberculosis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 148, 2012.

JUSTEN, Á. **COVID-19 Boletins informativos e casos do coronavírus por município por dia.** 2021. Disponível em: <<https://brasil.io/dataset/covid19/caso/>>. Acesso em: 10 out. 2021.

KANDARIAN, F. et al. A Flow Cytometry-Based Cytotoxicity Assay for the Assessment of Human NK Cell Activity. **J Vis Exp**, v. 126, 2017.

KARABULUT, S. et al. Clinical significance of serum interleukin-17 levels in colorectal cancer patients. **J BUON**, v. 21, nº 5, p. 1137-1145, 2016.

KAVCIC, U.; KARLOVITS, I.; ZULE, J. Deinking of Screen-Printed Electrodes Printed on Invasive Plant-Based Paper. **Sustainability**, v. 12, 2020.

KEVADIYA, B. D. et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. **Nat Mater**, v. 20, p. 593-605, 2021.

KIM, S. H. et al. Diagnostic Usefulness of Cytomegalovirus (CMV)-Specific T Cell Immunity in Predicting CMV Infection after Kidney Transplantation: A Pilot Proof-of-Concept Study. **Infect Chemother**, v. 47, nº 2, 2015.

KIM, T. et al. Applications of Voltammetry in Lithium Ion Battery Research. **J Electrochem Sci Technol**, v. 11, p. 14-25, 2020.

KIMURA, M. et al. Usefulness of lymphocyte stimulation test for the diagnosis of intestinal cow's milk allergy in infants. **Int Arch Allergy Immunol**, v.157, nº 1, p. 58-64, 2012.

KOCHETKOVA, M. et al. **Chemokine receptor heteromultimers, compounds that bind thereto and uses thereof**. Depositante: Adelaide Research & Innovation Pty Ltd. WO2011123903A1. Depósito em: 08 abr. 2011. Concessão: 13 out. 2011.

KOHMO, S. et al. CXCL12 as a biological marker for the diagnosis of tuberculous pleurisy. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 92, nº 3, 2012.

KOLLIPARA, K. R. **B cell clonal immunotoxin and use thereof**. Depositante: Transgene Biotek Ltd. WO2012107932A1. Depósito em: 18 abr. 2011. Concessão em: 16 ago. 2012.

KONSTANTINOU, G. N. et al. The role of casein-specific IgA and TGF- β in children with food protein-induced enterocolitis syndrome to milk. **Pediatr Allergy Immunol**, v. 25, nº 7, 2014.

KRAWCZYK, N. R., VIEIRA, V. L. Homogeneidade e heterogeneidade nos sistemas educacionais: Argentina, Brasil, Chile e México. **Cad Pesqui**, v. 36, p. 673-704, 2006.

KUMAR, S. et al. Aspects of Point-of-Care Diagnostics for Personalized Health Wellness. **Int J Nanomedicine**. 2021.

KUZNETSOVA, N. F.; MARTYNOVA, G. P.; PROKHORENKOV, V. I. **Diagnostic technique for early congenital latent syphilis**. Depositante: State educational institution of higher professional education "Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation" RU2421730C1. Depósito em: 09 abr. 2010. Concessão: 20 jun. 2011.

LABAN, K. G. et al. Zirconium-89-labelled rituximab PET-CT in orbital inflammatory disease. **EJNMMI Res**, v. 9, nº 1, 2019.

LAHIRI, R. et al. Development of a mouse food pad model for detection of sub clinical leprosy. **Lepr Rev**, v. 82, nº 4, 2011.

LEBIODA, L.; CABRAL, G. O.; TEZZA, R. A Homogeneidade da Inclusão Digital no Brasil: Sonho ou Realidade? **Rev Inf Soc Contemp**, v. 3, p. 1-18, 2019.

LEE, C. H. et al. Potential CD8+ T Cell Cross-Reactivity Against SARS-CoV-2 Conferred by Other Coronavirus Strains. **Front Immunol**, v. 11, 2020.

LEE, Y. J. et al. Combination of Glomerular C4d and Morphologic Glomerular Lesions as a Possible Indicator in the Diagnosis of Acute or Chronic Active Antibody-Mediated Rejection. **Transplant Proc**, v. 51, nº 8 p. 2660-2666, 2019.

LI, J.; LIU, J. **Novel anti-cd19 antibodies**. Depositante: Wuxi Biologics Co., Ltd. WO2019057100A1. Depósito em: 20 set. 2018. Concessão: 28 mar. 2019.

LI, J.; MEI, Q. **Novel anti-cd3epsilon antibodies**. Depositante: Wuxi Biologics Co., Ltd. WO2019057099A1. Depósito em: 20 set. 2018. Concessão: 28 mar. 2019.

LIANG, H. **Nanoparticles, Compositions Thereof, and Methods of Use, and Methods of Making the Same**. Depositante: Colorado School of Mines. US20140141089A1. Depósito em: 11 fev. 2010. Concessão: 22 maio 2014.

LIM, Y. X. et al. Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. **Diseases**, v. 4, nº 3, p. 26, 2016.

LIN, C. Y. et al. Suppression of pro-inflammatory T-cell responses by human mesothelial cells. **Nephrol Dial Transplant**, v. 28, nº 7, 2013.

LIU, L. et al. **The double targeting antibodies of anti-IGF1R and CD3 specificity, the minicircle dna containing this pair of targeting antibodies expression cassette and application**. Depositante: Shenzhen Institute of Advanced Technology of CAS. CN107573416A. Depósito em: 30 jun. 2016. Concessão: 12 jan. 2018.

LOMBARDO, G. et al. Papular dermatitis due to *Leishmania infantum* infection in seventeen dogs: diagnostic features, extent of the infection and treatment outcome. **Parasit Vectors**, v. 7, 2014.

LUO, W. et al. Identification of a novel immunodominant antigen Rv2645 from RD13 with potential as a cell-mediated immunity-based TB diagnostic agent. **J Infect**, v. 71, nº 5, 2015.

MAHMOUDI, S. et al. Early detection of *Toxoplasma gondii* infection by using a interferon gamma release assay: A review. **Exp Parasitol**, v. 172, p. 39-43, 2017.

MAHR, A. et al. **Novel peptides, combination of peptides and scaffolds for use in immunotherapeutic treatment of various cancers**. Depositante: Immatics Biotechnologies GmbH. US20170056486A1. Depósito em: 26 aug. 2016. Concessão: 02 mar. 2017.

MALLEY, R.; LU, Y.; ZHANG, F. **Multiple antigen presenting immunogenic composition, and methods and uses thereof**. Depositante: Children's Medical Center Corporation. WO2012155007A1. Depósito em: 11 maio 2012. Concessão: 15 nov. 2012.

MAMISHI, S. et al. Diagnosis of latent tuberculosis infection among immunodeficient individuals: review of concordance between interferon-gamma release assays and the tuberculin skin test. **Br J Biomed Sci**, v. 71, nº 3, 2014.

MANUEL, O.; AVERY, R. K. Update on cytomegalovirus in transplant recipients: new agents, prophylaxis, and cell-mediated immunity. **Curr Opin Infect Dis**, v. 34, nº 4, p. 307-313, 2021.

MARGETA, I. et al. Evaluation of cell-mediated immune response by QuantiFERON Monitor Assay in kidney transplant recipients presenting with infective complications. **Medicine (Baltimore)**, v. 99, nº 27, 2020.

MARTINS, G. et al. 3D-printed electrode as a new platform for electrochemical immunosensors for virus detection. **Anal Chim Acta**, v. 1147, p. 30-37, 2021.

MATHIEU, E. et al. **A global database of COVID-19 vaccinations**. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/covid-vaccinations?country=>>>. Acesso em: 29 maio 2022.

MATZ, M. et al. The selective biomarker IL-8 identifies IFTA after kidney transplantation in blood cells. **Transpl Immunol**, v. 39, p. 18-24, 2016.

MCELHANEY, J. et al. **Methods of determining cell mediated response**. Depositante: Advanced Medical Research Institute Of Canada, University Of Connecticut, THE KINGDOM OF THE NETHERLANDS, represented by THE MINISTER OF PUBLIC HEALTH, WELFARE AND SPORTS, on behalf of THE MINISTER, THE NETHERLANDS VACCINE INSTITUTE, Eberhard Karls Universitat Tübingen. WO2013113092A1. Depósito em: 30 jan. 2013. Concessão: 08 ago. 2013.

MENEZES, M. E.; LIMA, L. M.; MARTINELLO, F. Diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2 por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). **Rev Bras Anal Clin**, 2020.

METKAR, S. K.; GIRIGOSWAMI, K. Diagnostic Biosensors in Medicine - A Review. **Biocatal Agric Biotechnol**, v. 17, p. 271-283, 2019.

MIKKELSEN, H. et al. Correlation of antigen-specific IFN- γ responses of fresh blood samples from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infected heifers with responses of day-old samples co-cultured with IL-12 or anti-IL-10 antibodies. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 147, p. 69-76, 2012.

MIKKELSEN, H. et al. Novel antigens for detection of cell mediated immune responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 143, 2011.

MIKKELSEN, H. et al. Review of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigen candidates with diagnostic potential. **Vet Microbiol**, v. 152, p. 1-20, 2011.

MIKOS, H. et al. The clinical role of serum concentrations of selected cytokines: IL-1 β , TNF- α and IL-6 in diagnosis of autoimmune thyroid disease (AITD) in children. **Autoimmunity**, v. 47, nº 7, 2014.

MILLÁN, O. et al. Advantages of plasmatic CXCL-10 as a prognostic and diagnostic biomarker for the risk of rejection and subclinical rejection in kidney transplantation. **Clin Immunol**, v. 229, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Como se proteger?** 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/como-se-proteger>>. Acesso em: 29 maio 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Diagnóstico**. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/diagnostico#:~:text=Diagnóstico%20clínico,sintomas%20características%20da%20covid-19>>. Acesso em: 2 jun. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Painel Coronavírus**. 2022. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br>>. Acesso em: 27 maio 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Plano Nacional de Operacionalização da Vacinação contra a COVID-19 - PNO**. 2022. Disponível em:

<<https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/vacinas/plano-nacional-de-operacionalizacao-da-vacina-contra-a-covid-19>>. Acesso em: 29 maio 2022.

MÖHNLE, P. et al. MicroRNAs 143 and 150 in whole blood enable detection of T-cell immunoparalysis in sepsis. **Mol Med** v. 24, nº 54, 2018.

MOLLOY, M. et al. **Anti-human vista antibodies and use thereof**. Depositante: Michael Molloy et al. WO2017181109A1. Depósito em: 14 abr. 2017. Concessão: 19 out. 2017.

MORALES-NARVÁEZ, E.; DINCER, C. The impact of biosensing in a pandemic outbreak: COVID-19. **Biosens Bioelectron**, v. 163, p. 112274, 2020.

MOSS, P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. **Nat Immunol**, v. 23, p. 186-193, 2022.

MOTAMED, K. et al. **Sparc binding aptamers and uses thereof**. Depositante: Abraxis Bioscience, Llc. WO2011137441A2. Depósito em: 02 maio 2011. Concessão: 03 nov. 2011.

MURPHY, K. Imunobiologia de Janeway. 8. ed. Porto Alegre: **Editora ArtMed**, 2014.

NALLANI, M. et al. **Polymersomes comprising a covalently bound antigen as well as methods of making and uses thereof**. Depositante: Acm Biolabs Pte Ltd. WO2020053325A1. Depósito em: 12 set. 2019. Concessão: 19 mar. 2020.

NALLANI, M. et al. **Polymersomes comprising a soluble encapsulated antigen as well as methods of making and uses thereof**. Depositante: Acm Biolabs Pte Ltd. WO2019145475A2. Depósito em: 25 jan. 2019. Concessão: 01 ago. 2019.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). **Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines**. 2022. Disponível em: <<https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>> Acesso em: 29 maio 2022.

NEMES, B. et al. T Cell Subset Profile and Appearance of Donor-specific Antibodies in Primary and Retransplanted Kidney Recipients. **Transplant Proc**, v. 51, nº 4, p. 1215-1225, 2019.

NEWMAN, A. M. et al. Systems-level analysis of age-related macular degeneration reveals global biomarkers and phenotype-specific functional networks. **Genome Med**, v. 4, 2012.

NIGAM, L. K. et al. C4d-negative antibody-mediated rejection: A pathologist's perspective and clinical outcome. **Saudi J Kidney Dis Transpl**, v. 29, nº 1, p. 39-49, 2018.

NISHINAGA, T. Organic Redox Systems: Synthesis, Properties, and Applications. Nova Jersey: **John Wiley & Sons**, 2015.

NISHIOKA, S. A. **Sete coronavírus causam doenças em humanos**. UNA-SUS, 2020. Disponível em: <<https://www.unasus.gov.br/especial/covid19/markdown/111>>. Acesso em: 24 maio 2022.

NORENBERG, J.; LARSON, R. S. **Non-invasive diagnostic agents of cancer and methods of diagnosing cancer, especially leukemia and lymphoma**. Depositante: UNM Rainforest Innovations. US20120070372A1. Depósito em: 02 dez. 2011. Concessão: 22 mar. 2012.

OH, B. R. et al. Multiplexed Nanoplasmonic Temporal Profiling of T-Cell Response under Immunomodulatory Agent Exposure. **ACS Sens**, v. 1, nº 7, p. 941-948, 2016.

OKTEM-OKULLU, S. et al. Multiplex-PCR-Based Screening and Computational Modeling of Virulence Factors and T-Cell Mediated Immunity in *Helicobacter pylori* Infections for Accurate Clinical Diagnosis. **PLoS One**, v. 10, nº 8, 2015.

ONTIVEROS, N. et al. Ex-vivo whole blood secretion of interferon (IFN)- γ and IFN- γ -inducible protein-10 measured by enzyme-linked immunosorbent assay are as sensitive as IFN- γ enzyme-linked immunospot for the detection of gluten-reactive T cells in human leucocyte antigen (HLA)-DQ2.5(+) -associated coeliac disease. **Clin Exp Immunol**, v. 175, nº 2, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Coronavirus disease (COVID-19) Q&A**. 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-covid-19>>. Acesso em: 29 maio 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Coronavirus disease (COVID-19)**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_3>. Acesso em: 26 maio 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)**. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers#tab=tab_1>. Acesso em: 24 maio 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Tracking SARS-CoV-2 variants**. 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>>. Acesso em: 27 maio 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. 2022. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 27 maio 2022

PARKASH, O. et al. Development and Evaluation of an Electrochemical Biosensor for Detection of Dengue-Specific IgM Antibody in Serum Samples. **Diagnostics**, 2021.

PARSONS, S. D. C. et al. The Kinetics of the Humoral and Interferon-Gamma Immune Responses to Experimental *Mycobacterium bovis* Infection in the White Rhinoceros (*Ceratotherium simum*). **Front Immunol**, v. 8, 2017.

PARSONS, S. D. et al. Antigen-Specific IP-10 Release Is a Sensitive Biomarker of *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. **PLoS One**, v. 11, nº 5, 2016.

PARSONS, S. D. et al. Development of a diagnostic gene expression assay for tuberculosis and its use under field conditions in African buffaloes (*Syncerus caffer*). **Vet Immunol Immunopathol**, v. 148, 2012.

PAUL, S. et al. Development and validation of a broad scheme for prediction of HLA class II restricted T cell epitopes. **J Immunol Methods**, v. 422, p. 28-34, 2015.

PAVIA, C. S., WORMSER, G. P. COVID-19: Is there a role for Western blots and skin testing for determining immunity and development of a vaccine? **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 98, nº 4, 2020.

PEIRIS, J. S. M. Coronaviruses. In: RICHMAN, D. D. (Org.). Clinical Virology. 4. ed. Nova Jersey: **John Wiley & Sons**, 2016. p. 1243-1265.

PENG, H-Y. et al. Metabolic reprogramming and Reactive Oxygen Species in T cell immunity. **Front Immunol**, 2021.

PÉREZ-PORCUNA, T. M. et al. *Mycobacterium tuberculosis* infection in young children: analyzing the performance of the diagnostic tests. **PLoS One**, v. 9, nº 5, 2014.

PÉREZ-SANCHO, M. et al. Interferon-gamma responses in sheep exposed to virulent and attenuated *Brucella melitensis* strains. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 160, 2014.

PETCHAKUP, C. et al. Label-free quantitative lymphocyte activation profiling using microfluidic impedance cytometry. **Sens Actuators B Chem**, v. 339, 2021.

PHILLIPS, E. J. et al. Controversies in drug allergy: Testing for delayed reactions. **J Allergy Clin Immunol**, v. 143, nº 1, p. 66-73, 2019.

PICONE, O. et al. Determination of rubella virus-specific humoral and cell-mediated immunity in pregnant women with negative or equivocal rubella-specific IgG in routine screening. **J Clin Virol**, v. 112, p. 27-33, 2019.

PIRSON, C. et al. Highly purified mycobacterial phosphatidylinositol mannosides drive cell-mediated responses and activate NKT cells in cattle. **Clin Vaccine Immunol**, v. 22, nº 2, 2015.

PLAIN, K. M. et al. Enhancement of the interferon gamma assay to detect paratuberculosis using interleukin-7 and interleukin-12 potentiation. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 149, p. 28-37, 2012.

POHANKA, M. Screen Printed Electrodes in Biosensors and Bioassays. A Review. **Int J Electrochem Sci**, v. 15, p. 11024-11035, 2020.

POIRIER, N.; MARY, C. **Non-antagonistic antibodies directed against the alpha chain of the il7 receptor extracellular domain and use thereof in cancer treatment**. Depositante: Ose Immunotherapeutics. WO2017149394A1. Depósito em: 28 fev. 2017. Concessão: 08 set. 2017.

PORTAL de mapas do IBGE. 2022. Disponível em: <<https://poortaldemapas.ibge.gov.br/portal.php#homepage>>. Acesso em: 15 abr 2022.

QIAN, X. et al. **Novel anti-cldn18.2 antibodies**. Depositante: Mabspace Biosciences (Suzhou) Co., Limited. WO2021032157A1. Depósito em: 20 ago. 2020. Concessão: 25 fev. 2021.

RABANT, M. et al. Urinary C-X-C Motif Chemokine 10 Independently Improves the Noninvasive Diagnosis of Antibody-Mediated Kidney Allograft Rejection. **J Am Soc Nephrol**, v. 26, nº 11, 2015.

RANTSI, T. et al. Predicting tubal factor infertility by using markers of humoral and cell-mediated immune response against *Chlamydia trachomatis*. **Am J Reprod Immunol**, v. 80, nº 5, 2018.

RAWTHER, S. S. et al. Diagnosis of paratuberculosis in goats by cell mediated immune response, conventional and molecular diagnostic techniques. **Trop Anim Health Prod**, v. 44, nº 4, 2012.

RECHE, P. A. Potential cross-reactive immunity to SARS-CoV-2 from common human pathogens and vaccines. **Front Immunol**, v. 11, 2020.

REDOX reactions. 2012. Disponível em: <<http://www.wiley.com/college/boyer/0470003790/reviews/redox/redox.htm>>. Acesso em: 13 jun. 2022.

REN, H. et al. Early forecasting of the potential risk zones of COVID-19 in China's megacities. **Sci Total Environ**, v. 729, 2020.

RIEDEL, S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. **Proc (Bayl Univ Med Cent)**, v. 18, p. 21-25, 2005.

RITACCO, V.; KANTOR, I. N. La tuberculosis a 110 años del Premio Nobel de Koch [Tuberculosis 110 years after the Nobel Prize awarded to Koch]. **Medicina (B Aires)**, v. 75, nº 6, p. 396-403, 2015.

ROGERS, R. et al. Clinical experience with a novel assay measuring cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity by flow cytometry and intracellular cytokine staining to predict clinically significant CMV events. **BMC Infect Dis**, v. 20, nº 1, 2020.

ROMANO, A. et al. Diagnosis and management of drug hypersensitivity reactions. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, p. 67-73, 2011.

ROMANO, A. et al. Non-immediate Cutaneous Reactions to Beta-Lactams: Approach to Diagnosis. **Curr Allergy Asthma Rep**, v. 17, nº 4, 2017.

ROOS, E. O. et al. Cytokine gene expression assay as a diagnostic tool for detection of *Mycobacterium bovis* infection in warthogs (*Phacochoerus africanus*). **Sci Rep**, v. 9, nº 1, 2019.

ROOS, E. O. et al. IP-10: A potential biomarker for detection of *Mycobacterium bovis* infection in warthogs (*Phacochoerus africanus*). **Vet Immunol Immunopathol**, v. 201, p. 43-48, 2018.

ROSSI, R. S. et al. Detecção de coronavírus em amostras de fezes diarreicas de búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no Estado de São Paulo. **Pesq Vet Bras**, v. 37, p. 802-804, 2017.

RUAN, H. et al. The screening of pivotal gene expression signatures and biomarkers in renal carcinoma. **J Cancer**, v. 10, nº 25, p. 6384-6394, 2019.

RUDOLPH, N.; SCHOON, H-A.; SCHÖNIGER, S. Immunohistochemical characterisation of immune cells in fixed equine endometrial tissue: a diagnostic relevant method. **Pferdeheilkunde Equine Med**, v. 33, nº 6, p. 524-537, 2017.

SAIF, L. J. et al. Coronaviruses. In: ZIMMERMAN, J. J. (Org.). Diseases of Swine. 11. ed. Nova Jersey: **John Wiley & Sons**, 2019. p. 488-523.

SALDANHA, E. P. et al. **Estudo da Dimensão Territorial do Estado de Mato Grosso do Sul: Regiões de Planejamento**. Campo Grande. 2015. Disponível em: <http://www.semagro.ms.gov.br/wp-content/uploads/2017/06/estudo_dimensao_territorial_2015.pdf>. Acesso em: 10 out. 2021.

SALIAN, V. S. et al. COVID-19 Transmission, Current Treatment, and Future Therapeutic Strategies. **Mol Pharmaceutics**, v. 18. p. 754-771, 2021.

SAMPAIO, L. H. et al. Immunologically reactive *M. leprae* antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. **BMC Infect Dis**, v. 11, 2011.

SANTOSH, U. P.; RENUKANADA, G. S.; ABHILASH, S. Role of Adenosine Deaminase in Common Chronic ENT Infections. **J Clin Diagn Res**, v. 10, nº 3, 2016.

SCHIEGNITZ, E. et al. Proinflammatory cytokines as serum biomarker in oral carcinoma-A prospective multi-biomarker approach. **J Oral Pathol Med**, v. 47, nº 3, p. 268-274, 2018.

SCHOFFELEN, T. et al. Diagnosis of *Coxiella burnetii* infection: comparison of a whole blood interferon-gamma production assay and a Coxiella ELISPOT. **PLoS One**, v. 9, nº 8, 2014.

SCIAN, M. J. et al. Gene expression changes are associated with loss of kidney graft function and interstitial fibrosis and tubular atrophy: diagnosis versus prediction. **Transplantation**, v. 91, nº 6, 2011.

SHAH, V. K. et al. Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From the Past. **Front Immunol**, v. 11, 2020.

SILACCI, M. et al. **FGFR3 Binding Molecules**. Depositante: Cilag GmbH International. US20180280527A1. Depósito em: 02 abr. 2018. Concessão: 04 out. 2018.

SILVA, D. C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Quim Nova**, v. 34, nº2, p. 300-305, 2011.

SIPKA, S. Az allergia laboratóriumi diagnosztikájának rövid hazai története, a jelen lehetőségei és a jövő perspektívája [Short history of laboratory diagnostics of allergy in Hungary, current possibilities and future perspectives]. **Orv Hetil**, v. 156, 2015.

SMITH, K. et al. Cell-Mediated Immunological Biomarkers and Their Diagnostic Application in Livestock and Wildlife Infected With *Mycobacterium bovis*. **Front Immunol**, v. 12, 2021.

SMITH, K. et al. Use of the MILLIPLEX® bovine cytokine/chemokine multiplex assay to identify *Mycobacterium bovis*-infection biomarkers in African buffaloes (*Syncerus caffer*). **Vet Immunol Immunopathol**, v. 231, 2021.

SORENSEN, B. et al. **Peptides derived from viral proteins for use as immunogens and dosage reactants**. Depositante: Bionor Immuno As. WO2013182661A1. Depósito em: 06 jun. 2013. Concessão: 12 dez. 2013.

SPITS, H. et al. **Aml antigens and uses thereof**. Depositante: Aimm Therapeutics B.V. WO2016209079A1. Depósito em: 24 jun. 2016. Concessão: 29 dez. 2016.

STEPANOVA, H. et al. Different immune response of pigs to *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection. **Vet Microbiol**, v. 159, 2012.

STIPP, D. T. **Deteção do coronavírus bovino em episódios de diarreia neonatal em rebanhos bovinos brasileiros**. Universidade Estadual de Londrina. 2007. Disponível em: <https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UEL_d6ab51dd5ba70f15cd9cfe37dd888718>. Acesso em: 10 out. 2022.

SUCIU-FOCA, N. et al. **Diagnosis and Treatment of Cancer Expressing ILT3 or ILT3 Ligand**. Depositante: The Trustees Of Columbia University In The City Of New York. WO2013033734A1. Depósito em: 04 set. 2012. Concessão: 07 mar. 2013.

SUHAIL, S. et al. Role of Oxidative Stress on SARS-CoV (SARS) and SARS-CoV-2 (COVID-19) Infection: A Review. **Protein J**, v. 39, p. 644-656, 2020.

SUPURAN, C. T. Coronaviruses. **Expert Opin Ther Pat**, v. 31, nº 4, p. 291-294, 2021.

SUWANNASAEN, D. et al. Human immune responses to *Burkholderia pseudomallei* characterized by protein microarray analysis. **J Infect Dis**, v. 203, nº 7, 2011.

SZYLOVEC, A. et al. Brazil's Actions and Reactions in the Fight against COVID-19 from January to March 2020. **Int J Environ Res Public Health**, v. 18, 2021.

TAKEDA, Y. et al. TRAV7-2*02 Expressing CD8⁺ T Cells Are Responsible for Palladium Allergy. **Int J Mol Sci**, v. 18, nº 6, 2017.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Molecular analysis of the bovine coronavirus S1 gene by direct sequencing of diarrheic fecal specimens. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, 2008.

TALEAT, Z.; KHOSHROO, A.; MAZLOUM-ARDAKANI, M. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008-2013). **Microchim Acta**, v. 181, p. 865-891, 2014.

TANG, W. et al. Diagnostic value of combined islet antigen-reactive T cells and autoantibodies assays for type 1 diabetes mellitus. **J Diabetes Investig**, v. 12, nº 6, p. 963-969, 2021.

TATLA S. et al. The role of reactive oxygen species in triggering proliferation and IL-2 secretion in T cells. **Free Radic Biol Med**, 1999.

TERRA, R. et al. Efeito do exercício no sistema imune: resposta, adaptação e sinalização celular. **Rev Bras Med Esporte**, v. 18, nº 3, p. 208-214, 2012.

The PharmaLetter. **Brazilian deal to develop COVID-19 vaccine in Ceará**. 2021. Disponível em: <<https://www.thepharmaletter.com/in-brief/brief-brazilian-deal-to-develop-covid-19-vaccine-in-ceara>>. Acesso em: 8 out. 2021.

TILOCCA, B. et al. Molecular basis of COVID-19 relationships in different species: a one health perspective. **Microbes Infect**, v. 22, p. 218-220, 2020.

TOELLNER, K. M.; BICKNELL, R. **Conjugated vaccine**. Depositante: University of Birmingham. US20160136287A1. Depósito em: 27 out. 2015. Concessão: 19 maio 2016.

TOMIC, S. et al. Size-dependent effects of gold nanoparticles uptake on maturation and antitumor functions of human dendritic cells in vitro. **PLoS One**, v. 9, nº 5, 2014.

TORRE-CISNEROS, J. et al. Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients: SET/GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations. **Transplant Rev (Orlando)**, v. 30, nº 3, 2016.

TRIEU, V. et al. **Peripheral blood sparc antibodies and uses thereof**. Depositante: Abraxis Bioscience, Llc. WO2011153431A2. Depósito em: 03 jun. 2011. Concessão: 11 abr. 2013.

ULRICH, L. et al. Experimental infection of cattle with SARS-CoV-2. **Emerg Infect Dis**, v. 26, p. 2979-2981, 2020.

VAN DER HEIJDEN, E. M. et al. Field application of immunoassays for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in the African buffalo (*Syncerus caffer*). **Vet Immunol Immunopathol**, v. 169, p. 68-73, 2016.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova**, v. 30, 2007.

VLASOVA, A. N.; SAIF, L. J. Bovine Coronavirus and the Associated Diseases. **Front Vet Sci**, v. 8, 2021.

WALD, N. et al. An infrared spectral signature of human lymphocyte subpopulations from peripheral blood. **The Analyst**, 2015.

WALLS, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 181, p. 281-292, 2020.

WANG, J. Decentralized Electrochemical Monitoring of Trace Metals: From Disposable Strips to Remote Electrodes. **Analyst**, v. 119, p. 763-766, 1994.

WOLFRAM, D. et al. Differentiation between acute skin rejection in allotransplantation and T-cell mediated skin inflammation based on gene expression analysis. **Biomed Res Int**, v. 2015, 2015.

WOOD, B. R. et al. FTIR microspectroscopic study of cell types and potential confounding variables in screening for cervical malignancies. **Biospectroscopy**, 1998.

WU, D. et al. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. **Int J Infect Dis**, v. 94, p. 44-48, 2020.

WU, D.; YOTNDA, P. Production and Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cancers. **J Vis Exp**, v. 57, 2011.

WYNNE, J. W. et al. Production and proteomic characterisation of purified protein derivative from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **Proteome Sci**, v. 10, nº 1, 2012.

YAN, Y.; CHANG, L.; WANG, L. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. **Rev Med Viral**, 2020.

YAO, H. et al. Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. **Cell**, v. 183, p. 730-738, 2020.

YAROSZ, E. L.; CHANG, C-H. The role of reactive oxygen species in regulating T cell-mediated immunity and disease. **Immune Netw**, 2018.

ZHANG, J. et al. Genotype characteristics and immunological indicator evaluation of 311 hemophagocytic lymphohistiocytosis cases in China. **Orphanet J Rare Dis**, v. 15, 2020.

ZHANG, N.; HUBER, H. **Generation, characterization and uses thereof of anti-her 3 antibodies**. Depositante: Merck Sharp & Dohme Corp. WO2011044311A2. Depósito em: 07 out. 2010. Concessão: 14 abr. 2011.

ZHANG, Y. **Anti-programmed death-ligand 1 (pd-l1) antibodies and therapeutic uses thereof**. Depositante: Shenzhen Runshin Bioscience. WO2018150224A1. Depósito em: 16 fev. 2017. Concessão: 23 ago. 2018.

ZHONG, J.; YAU, A. C. Y.; HOLMDAHL, R. Regulation of T Cell Function by Reactive Nitrogen and Oxygen Species in Collagen-Induced Arthritis. **Antioxidants & Redox Signaling**. 2020.

ZHOU, H. et al. Identification of novel bat coronaviruses sheds light on the evolutionary origins of SARS-CoV-2 and related viruses. **Cell**, v. 184, p. 4380-4391, 2021.

ZHOU, J. et al. CD8+ T-cell mediated anti-malaria protection induced by malaria vaccines; assessment of hepatic CD8+ T cells by SCBC assay. **Hum Vaccin Immunother**, v. 13, nº 7, p.1625-1629, 2017.

ZHU, J. et al. HIP1R acts as a tumor suppressor in gastric cancer by promoting cancer cell apoptosis and inhibiting migration and invasion through modulating Akt. **J Clin Lab Anal**, v. 34, nº 9, 2020.

APÊNDICE

1 PREPARO DE SOLUÇÕES

1.1 Tampão fosfato salino

O tampão fosfato salino (*phosphate saline buffer* ou PBS, em inglês) foi preparado diluindo 8 g de cloreto de sódio (NaCl), 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 1,44 g de fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄) e 0,24 g de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) em um litro de água ultrapura. O tampão foi esterilizado por autoclavagem a 121 °C por 40 minutos. A solução é mantida estéril em todos os usos e armazenada a 4 °C.

1.2 Solução de leitura de eletrodos

A solução utilizada para realizar as leituras dos eletrodos de carbono é composta por PBS [1X] + 1 mM de ferricianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆]). A solução foi preparada adicionando 1 mg de K₃[Fe(CN)₆] em 10 mL de PBS [1X] e armazenada a 4°C.

1.3 Solução de lavagem de eletrodos

A lavagem dos eletrodos de carbono é realizada utilizando uma solução de 0,5 M de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e 0,1 M de KCl. O preparo foi feito diluindo 0,037 mg de KCl e 2,5 mL de H₂SO₄ 1M em água deionizada q.s.p. 5 mL. A solução de lavagem é armazenada em temperatura ambiente.

1.4 Diclorofluoresceína-diacetato

A solução de 2,7-diclorohidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) a 1000 µM foi preparada adicionando 0,5 mg de DCFH-DA em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) estéril. O preparo desta solução é realizado imediatamente antes do uso da mesma e toda a solução não utilizada no ensaio deve ser descartada.

1.5 Padrão de Nitrito de Sódio

Para construir a curva padrão da técnica de Griess para detecção de nitritos, foi preparada uma solução de nitrito de sódio (NaNO₂) 1000 µM diluindo 6,9 mg de NaNO₂ em 100 mL de água ultrapura.

O padrão foi diluído em estoques de nitrito de sódio 200 μM adicionando-se 60 μL do padrão 1000 μM em 240 μL de água ultrapura. Ambas as soluções são armazenadas a 4°C.

1.6 Poli L-lisina

A Poli L-lisina (PLL) utilizada para imobilizar os linfócitos no eletrodo de carbono foi preparada diluindo 100 mg de PLL em 1 mL de água ultrapura, resultando em uma concentração de 0,1% w/v. A solução é armazenada a 4°C.