

IARA DE LYS ANDRADE

**REATIVIDADE DE ANTICORPOS CONTRA PROTEÍNA N DE SARS-CoV-2 EM
PACIENTES COM DOENÇA AUTOIMUNE E EM TRATAMENTO COM
ANTICORPO MONOCLONAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Tiago Antônio de O. Mendes

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A553r
2022
Andrade, Iara de Lys, 1984-
Reatividade de anticorpos contra proteína N de
SARS-CoV-2 em pacientes com doença autoimune em
tratamento com anticorpo monoclonal / Iara de Lys Andrade. –
Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (48 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Referências bibliográficas: f. 45-48.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.527>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. COVID-19 (Doença). 2. Vacinas. 3. Doenças
autoimunes. 4. Anticorpos monoclonais. 5. Estudos
soroepidemiológicos. I. Mendes, Tiago Antônio de Oliveira,
1986-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Mestrado em Bioquímica
Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 616.2414

IARA DE LYS ANDRADE

**REATIVIDADE DE ANTICORPOS CONTRA PROTEÍNA N DE SARS-CoV-2 EM
PACIENTES COM DOENÇA AUTOIMUNE E EM TRATAMENTO COM
ANTICORPO MONOCLONAL**

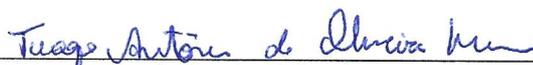
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2022.

Assentimento:



Iara de Lys Andrade
Autora



Tiago Antônio de Oliveira Mendes
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, gratidão pela vida e cada bênção recebidas!

Aos meus pais Imaculada e Joaquim, agradeço à vida.

Aos meus avós Francisco Romano, Ricardina, Maria de Lys e Geraldo Brandão (*in memorian*), por todo carinho, amor e zelo. Por contribuírem na minha educação e na minha essência.

Aos meus filhos Thiago e Letícia, pelo amor incondicional, paciência, por sempre estarem ao meu lado incentivando à realização dos meus sonhos e compreensão em momentos de ausência.

Ao meu namorado Victor Hugo Sousa Gonçalves, pelo companheirismo, carinho e auxílio na realização deste projeto.

Aos meus irmãos Luiz Carlos e Mayara por auxiliarem nesta caminhada.

Aos meus amigos Felipe Augusto, Diego Segregio e Kyko Garcia por cada palavra de carinho, por sempre contribuir nos momentos de desafios.

Ao professor e orientador Tiago Mendes pela oportunidade de realizar um sonho, que conduziu o trabalho com paciência e dedicação, sempre disponível em compartilhar todo seu vasto conhecimento.

Aos amigos do LBSMSB, Renato Senra, Larissa Monteiro, Janine Paiva, que contribuíram por cada etapa da realização deste projeto e por cada momento vivenciado no laboratório.

Às pessoas com quem convivi ao longo desse período, que incentivaram e que certamente tiveram impacto na minha formação acadêmica.

Aos pacientes da Clínica Infundir pelo carinho, credibilidade, contribuição e motivação para realização deste projeto.

Ao Dr. Gilson Arêdes, por contribuir e incentivar para realização do curso.

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada pela oportunidade de realização do curso.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo financiamento do trabalho.

"Todos os seus sonhos podem se tornar realidade se você tiver a coragem de persegui-los".

(Walt Disney)

RESUMO

ANDRADE, Iara de Lys, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Reatividade de anticorpos contra proteína N de SARS-CoV-2 em pacientes com doenças autoimunes e em tratamento com anticorpo monoclonal.** Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Pacientes com doença autoimune, como artrite reumatoide e espondilite anquilosante, podem apresentar alteração na resposta imune devido a patologia ou pelo uso constante de medicamentos imunossupressores ou imunobiológicos que afeta a resposta imunológica. Por isso, são considerados grupos de risco para covid-19 e podem também ter resposta e eficiência vacinal afetada. Considerando a indução de anticorpos contra antígenos do vírus SARS-CoV-2 como potencial marcador de resposta a vacina, este estudo objetivou a comparação da sororeatividade de anticorpos IgM e IgG contra a proteína N (nucleocapsídeo) grupos de indivíduos com doenças autoimunes e em uso de imunossupressores ou imunobiológicos em relação a indivíduos não acometidos por doença autoimune anteriormente e após a aplicação de vacina contra COVID-19. Para avaliação da soroprevalência, foram coletadas amostras de sangue de indivíduos em tratamento para doenças autoimunes, entre elas artrite reumatoide e espondilite anquilosante e em uso de anticorpos monoclonais (n=116). Estes indivíduos foram divididos nos seguintes grupos: infectados, não infectados, vacinados e não vacinados. A técnica de ELISA utilizando anticorpo secundário anti-IgM e anti-IgG foi utilizada para mensurar o nível de anticorpos em cada grupo de pacientes. Como resultado, foi observado uma maior concentração de IgM nos pacientes com doença autoimune do que nos indivíduos controle. Além disso, pacientes vacinados e em tratamento de apresentaram níveis de IgM alterados, indicando que a presença de doença autoimune e resposta a vacina pode ser diferente da população não afetada por doença autoimune.

Palavras-chave: Doença autoimune. Anticorpos monoclonais. Imunogenicidade. COVID19. Soroprevalência.

ABSTRACT

ANDRADE, Iara de Lys, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2022. **Reactivity of antibodies against SARS-CoV-2 N-protein in patients with autoimmune disease and treatment with monoclonal antibody.** Adviser: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Patients with autoimmune disease, such as rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis, may have an altered immune response due to pathology or the constant use of immunosuppressive or immunobiological drugs that affect the immune response. Therefore, they are considered risk groups for covid-19 and may also have an affected vaccine response and efficiency. Considering the induction of antibodies against SARS-CoV-2 virus antigens as a potential marker of vaccine response, this study aimed to compare the seroreactivity of IgM and IgG antibodies against N protein (nucleocapsid) in groups of individuals with autoimmune diseases and in use of immunosuppressants or immunobiologicals in relation to individuals not affected by an autoimmune disease before and after the application of a vaccine against COVID-19. To assess seroprevalence, blood samples were collected from individuals undergoing treatment for autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis, and using monoclonal antibodies (n=116). These individuals were divided into the following groups: infected, uninfected, vaccinated and unvaccinated. The ELISA technique using secondary anti-IgM and anti-IgG antibodies was used to measure the level of antibodies in each group of patients. As a result, a higher concentration of IgM was observed in patients with autoimmune disease than in control subjects. In addition, vaccinated and treated patients had altered IgM levels, indicating that the presence of autoimmune disease and vaccine response may be different from the population unaffected by autoimmune disease.

Keywords: Autoimmune disease. Monoclonal antibodies. Immunogenicity. COVID-19. Seroprevalence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Purificação e expressão da proteína N	27
Figura 2 - Caracterização dos pacientes com doença auto imune. Sexo; Faixa etária	29
Figura 3 - Caracterização dos pacientes com doença auto imune: patologia, medicamentos e vacina. (A) patologia; (B) medicamento; (C) vacina	31
Figura 4 - Soroprevalência de anticorpos da proteína N. 4A IgM e 5B IgG (anova – análise estatística somente tempo 0 controle, AR, EA)	33
Figura 5 - Soroprevalência de anticorpos da proteína N. 5A IgM e 5B IgG (anova – análise estatística somente tempo 0 controle, Infliximabe, tocilizumabe)	34
Figura 6 - Efeitos da vacina nos níveis de anticorpos em pacientes imunossuprimidos. 6A IgM e 6B IgG (anova – análise estatística somente tempo 0 controle, AR)	36
Figura 7 - Efeitos da vacina nos níveis de anticorpos em pacientes imunossuprimidos. (7A IgM e 7B IgG (anova – análise estatística somente tempo 0 controle, EA)	37
Figura 8 - Efeito da vacina em pacientes imunossuprimidos. (A IgM e B IgG (anova – análise estatística somente tempo 0 controle, Infliximabe)	39
Figura 9 - Efeito da vacina em pacientes imunossuprimidos. (A) IgM e (B) IgG (anova – análise estatística somente tempo 0 controle, Tocilizumabe).....	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
SARS-CoV2.....	9
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo geral:.....	20
2.2. Objetivos específicos:.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Comitê de ética	21
3.2. Caracterização dos pacientes	21
3.3. Coleta de amostras.....	22
3.4. Obtenção do vetor plasmidial, expressão e purificação da proteína N de SARS-CoV-2 recombinante.....	23
3.5. Ensaio de ELISA.....	24
3.6. Análises estatísticas	25
4. RESULTADOS:	25
4.1. Expressão e purificação da proteína N de SARS-CoV-2 recombinante	25
4.2. Caracterização do grupo de estudo	27
4.3. Soroprevalência de IgM e IgG contra proteína N de SARS-CoV-2 antes da vacinação contra COVID-19.....	32
4.4. Reatividade de IgM e IgG contra proteína N de SARS-CoV-2 após a vacinação contra COVID-19.....	35
5. DISCUSSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	45

1. INTRODUÇÃO

SARS-CoV2

Segundo Baggio, Jussara A Oliveira et al (2021), a doença causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, identificada na China no final de 2019 e denominada COVID-19 (do inglês *coronavirus disease*), foi declarada como uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em março de 2020, acumulando mais de 20 milhões de casos confirmados no Brasil, e mais de 583 mil mortes causadas por complicações da doença, até o final da semana epidemiológica 35, em 04 de setembro de 2021. Segundo a OMS, o Brasil é o terceiro país com mais casos confirmados da SARS-CoV-2, ficando atrás somente dos Estados Unidos da América e Índia, a qual é também considerada um país emergente e com problemas socioeconômicos semelhantes aos enfrentados pela população brasileira.

A primeira notificação de um caso confirmado de covid-19 no Brasil foi em 26 de fevereiro de 2020. Com base nos dados diários informados pelas Secretarias Estaduais de Saúde (SES) ao Ministério da Saúde, de 26 de fevereiro de 2020 a 26 de fevereiro de 2022, foram confirmados 28.744.050 casos e 648.913 óbitos por covid-19 no Brasil. Para o País, a taxa de incidência acumulada foi de 13.574,2 casos por 100 mil habitantes, enquanto a taxa de mortalidade acumulada foi de 306,4 óbitos por 100 mil habitantes, dados extraídos do boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, 2022.

Até o final da semana epidemiológica (SE) 8 de 2022, no dia 26 de fevereiro de 2022, foram confirmados 434.247.399 casos de covid-19 no mundo. Os Estados Unidos foram o país com o maior número de casos acumulados (78.931.739), seguido pela Índia (42.916.117), Brasil (28.744.050), França (22.699.443) e Reino Unido (18.854.972). Em relação aos óbitos, foram confirmados 5.944.313 no mundo até o dia 26 de fevereiro de 2022. Os Estados Unidos foram o país com maior número acumulado de óbitos (948.215), seguido do Brasil (648.913), Índia (513.724), Rússia

(343.178) e México (318.014). (Ministério da saúde, 2021 <https://coronavirus.saude.gov.br/>).

Em relação à taxa de mortalidade, o Sudeste foi a Região com maior valor de taxa na SE 8 (2,9 óbitos/100 mil hab.), seguido pelo Centro-Oeste (2,8 óbitos/100 mil hab.), Sul (2,6 óbitos/100 mil hab.), Nordeste (1,7 óbito/100 mil hab.) e Norte (1,4 óbito/100 mil hab.). A taxa de mortalidade para o Brasil, na SE 8 de 2022, foi de 2,4 óbitos por 100 mil habitantes.

Os sintomas da infecção pelo SARS-CoV-2 podem variar desde uma Síndrome Gripal (SG), com sinais e sintomas leves como febre, tosse, congestão nasal e fadiga, até uma Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), com sintomas como dispneia, saturação de O₂ ≤ 93%, frequência respiratória ≥ 30 respirações por minuto, pressão arterial de oxigênio (PaO₂) /fração inspirada de oxigênio (FIO₂) < 300, linfopenia e edema alveolar. No Brasil, foram notificados cerca de 1 775 816 casos de SRAG por COVID-19, sendo que 32,2% dos casos evoluíram para óbito. Entre os 342.636 óbitos de SRAG por COVID-19 notificados em 2021 até a semana epidemiológica 36, 59,5% apresentavam pelo menos uma comorbidade, sendo as doenças cardíacas, doenças cerebrovasculares, hipertensão arterial sistêmica e diabetes *mellitus* (DM), as mais frequentes (Baggio, Jussara A Oliveira et al., 2021).

Segundo Warren Levinson, a SARG (síndrome respiratória aguda grave) é uma doença transmitida por coronavírus, primeiramente detectada na China em novembro de 2002 e disseminou-se rapidamente a outros países. Antes da pandemia iniciada no final de 2019, ocorreram 8.300 casos e 785 óbitos, uma taxa de mortalidade de aproximadamente 9%.

A síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2) que causa a doença coronavírus 2019 (COVID-19) matou centenas de milhares de humanos em uma pandemia global. Covid-19 grave é frequentemente associado com linfopenia, inicialmente causando grande preocupação com o uso de agentes imunossupressores. Em alguns casos, isso levou à cessação ou atraso do tratamento da autoimunidade. No entanto, é cada vez mais evidente que a linfopenia é uma consequência e não uma causa de infecção. Enquanto o sistema imunológico elimina

o SARS-CoV-2 na maioria dos indivíduos, a fuga viral, a exaustão imunológica e a liberação elevada de citocinas podem levar à hiperativação da resposta imune inata, dano vascular e hipercoagulação, o que pode levar a morbidade significativa, sofrimento respiratório agudo, falência de vários órgãos e, em alguns casos, morte. Embora a imunoterapia possa ter algum valor no tratamento de COVID-19 graves, o desenvolvimento de uma vacina SARS-CoV-2 é considerado importante para proteger os não infectados. Um programa de vacinação deve ajudar a criar imunidade de rebanho contra o vírus COVID-19. Portanto, não só é relevante determinar como os tratamentos modificadores de doenças (DMT) influenciam a suscetibilidade à infecção e ao comprimento do estado portador, como também é importante considerar como o DMT pode influenciar a imunidade à reinfecção e potenciais respostas à vacina (Warren Levinson et al.,2021).

O controle da transmissão viral depende de técnicas de diagnóstico adequadas, isolamento social, uso de vacinas e rápido e eficiente acompanhamento hospitalar em casos graves da doença. Um grande impasse encontrado no diagnóstico clínico da COVID-19 tem sido a semelhança dos sintomas, que também são promovidos por outras doenças infecciosas virais, como a influenza (Wang et al., 2014).

Assim, as detecções de anticorpos contra antígenos virais específicos podem auxiliar na detecção de indivíduos infectados, bem como no acompanhamento da resposta humoral durante o percurso da infecção, incluindo estudo de produção de anticorpos após protocolos de vacinação.

O controle da pandemia também é dificuldade por diversos fatores associados a biologia do vírus e adesão da população a medidas de controle, como isolamento social e programas de vacinação. Entre estes desafios, estão a rapidez na mutação, bem como, a transmissibilidade dos vírus devido o surgimento de novas variantes do SARS-CoV-2 que foram associadas a novas ondas de infecções, às vezes em todo o mundo. Por exemplo, o aumento da transmissibilidade da variante delta foi associado, entre outros, a uma maior carga viral, maior duração da infecciosidade, e altas taxas de reinfecção, devido à sua capacidade de escapar da imunidade natural, que resultou no delta VoC rapidamente se tornando a variante globalmente dominante (Salim S.Abdool Karin, 2021).

Todos os vírus, incluindo o SARS-CoV-2, o vírus causador do COVID-19, mudam com o tempo. A maioria das mudanças tem pouco ou nenhum impacto nas propriedades do vírus. No entanto, algumas alterações podem afetar as propriedades do vírus, como a facilidade com que ele se espalha, a gravidade da doença associada ou o desempenho de vacinas, medicamentos terapêuticos, ferramentas de diagnóstico ou outras medidas de saúde pública e sociais. (<https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>).

A OMS, em colaboração com parceiros, redes especializadas, autoridades nacionais, instituições e pesquisadores vêm monitorando e avaliando a evolução do SARS-CoV-2 desde janeiro de 2020. Durante o final de 2020, o surgimento de variantes que representassem um risco aumentado para a saúde pública global levou à caracterização de Variantes de Interesse (VOIs) e Variantes de Preocupação (VOCs) específicas, a fim de priorizar o monitoramento e a pesquisa globais e, finalmente, informar a resposta contínua à pandemia COVID-19.

Segundo Aleem A et al. (2022), os VOCs estão associados a maior transmissibilidade ou virulência, redução na neutralização por anticorpos obtidos por meio de infecção natural ou vacinação, capacidade de evitar a detecção ou diminuição da eficácia terapêutica ou vacinal. Com base na recente atualização epidemiológica da OMS, em 11 de dezembro de 2021, cinco COVs de SARS-CoV-2 foram identificados desde o início da pandemia:

- Alfa (B.1.1.7): primeira variante de preocupação descrita no Reino Unido (Reino Unido) no final de dezembro de 2020;
- Beta (B.1.351): relatado pela primeira vez na África do Sul em dezembro de 2020;
- Gama(P.1): relatado pela primeira vez no Brasil no início de janeiro de 2021;
- Delta (B.1.617.2): relatado pela primeira vez na Índia em dezembro de 2020;

- Omicron (B.1.1.529): relatado pela primeira vez na África do Sul em novembro de 2021.

Todos os cinco relataram VOCs -Alpha(B.1.1.7); Beta(B.1.351); Gama (P.1); Delta(B.1.617.2); e Omicron (B.1.1.529) têm mutações no RBD e no NTD, das quais a mutação N501Y localizada no RBD é comum a todas as variantes, exceto a variante Delta, que resulta em maior afinidade da proteína spike para os receptores ACE 2, aumentando a ligação viral e sua subsequente entrada nas células hospedeiras. Juntamente com o NBD, o RBD serve como alvo de neutralização dominante e facilita a produção de anticorpos em resposta a anti-soros ou vacinas. Dois preprints recentes relataram que uma única mutação de N501Y sozinha aumenta a afinidade entre RBD e ACE2 aproximadamente dez vezes mais do que a cepa ancestral (N501-RBD). Curiosamente, a afinidade de ligação da variante Beta (B.1.351) e da variante Gama (P.1) com as mutações N417/K848/Y501-RBD e ACE2 foi muito menor do que a de N501Y-RBD e ACE2. (Aleem A et al.,2022).

Estrutura do SARS Cov-2 e a estrutura da proteína de interesse N:

As proteínas de superfície dos vírus, sejam proteínas do capsídeo ou glicoproteínas do envelope, correspondem aos principais antígenos contra os quais o hospedeiro dirige sua resposta imune aos vírus. Elas também são as determinantes da especificidade do tipo (frequentemente denominada sorotipo). Por exemplo, os tipos 1, 2 e 3 do poliovírus são diferenciados com base na antigenicidade de suas proteínas de capsídeo. É importante conhecer o número de sorotipos de um vírus, uma vez que as vacinas devem conter os sorotipos de proteína da matriz, nucleocapsídeo, envelope lipídico Espículas glicoproteicas Capsídeo prevalentes. Frequentemente desenvolve-se pequena proteção cruzada entre sorotipos distintos. Vírus que apresentam múltiplos sorotipos, isto é, que apresentam variantes antigênicos, exibem maior capacidade de evitar nossas defesas, uma vez que os anticorpos contra um sorotipo não protegem contra outro sorotipo (Warren Levinson et al, 2010).

Várias regiões genômicas virais conservadas, como o gene da RNA polimerase dependente de RNA (gene *RdRP*), o gene da proteína do nucleocapsídeo (gene *M*) e o gene da proteína do envelope (*Egene*), foram alvejados nos testes moleculares.

Como esse teste pode amplificar até mesmo níveis baixos do vírus e detectar a doença em um estágio inicial, é o método de detecção mais usado e confiável. No entanto, o desempenho do RT-PCR depende muito do RNA viral alvo selecionado e dos primers usados. Portanto, a Organização Mundial da Saúde pública de tempos em tempos protocolos padrão para a paridade do ensaio.

A proteína SARS – CoV-2 S está sendo usada como o principal antígeno-alvo no desenvolvimento de vacinas. O gene N é mais conservado e estável, com 90% de homologia de aminoácidos e menos mutações ao longo do tempo. As proteínas N de muitos coronavírus são altamente imunogênicas e são expressas abundantemente durante a infecção. Altos níveis de anticorpos IgG contra N foram detectados em soros de pacientes com SARS, e a proteína N é um antígeno representativo para a resposta das células T em um ambiente de vacina, induzindo proliferação de células T específicas para SARS e atividade citotóxica (Dutta et al, 2020).

A proteína N é um antígeno representativo para a resposta das células T em um ambiente de vacina, induzindo proliferação de células T específicas para SARS e atividade citotóxica, sendo a região intermediária ou C-terminal da proteína N do SARS-CoV é importante para a eliminação de anticorpos contra o SARS-CoV durante a resposta imune (Dutta et al, 2020).

O objetivo deste estudo foi utilizar proteína N (nucleocapsídeo), produzida e purificada por expressão heteróloga, como antígeno no acompanhamento da soroprevalência de anticorpos IgG e IgM em grupos de indivíduos com doenças autoimunes e em uso de imunossupressores ou imunobiológicos antes e depois do uso de vacinas. A sororeatividade foi acompanhada e comparada com um grupo de indivíduos não afetados por doença autoimune. Para isso, um total de 116 amostras de sangue foram coletadas com periodicidade mensal, ou, conforme a administração medicamentosa.

As hipóteses são que os pacientes com autoimunidade podem ser susceptíveis a infecção devido a necessidade de tratamento em clínicas e hospitais, podendo apresentar uma exacerbação na resposta imunológica, sendo assim alterando a indução de anticorpos para vacina para prevenção Covid 19.

Vacinas e Resposta imune

Atualmente, existem três tipos comuns de vacinas contra o vírus SARS-CoV-2: mRNA, vetor de adenovírus e vacinas inativadas. A vacina de mRNA geralmente consiste apenas no código genético para um único antígeno do SARS-CoV-2 (por exemplo, antígeno da proteína S), envolto em um invólucro e entregue por nanopartículas lipídicas. Quando a vacina de mRNA é injetada no corpo, as células humanas usam o código genético viral para produzir o antígeno codificado, então o corpo reage e produz anticorpos. Ao contrário das vacinas de mRNA, as vacinas de vetor de adenovírus geralmente usam o DNA do antígeno da proteína S. Em vez de usar nanopartículas lipídicas para fornecer o código genético ao corpo, as vacinas de vetores virais usam um vírus modificado (diferente do SARSCoV-2, como o adenovírus) como vetor para fornecer as informações genéticas. Quando esses adenovírus contendo DNA para a proteína S entram no corpo, as proteínas virais serão produzidas e ativam ainda mais as respostas imunes. As vacinas inativadas usam vírus SARS-CoV-2 inativados e a inativação viral é alcançada usando produtos químicos, calor ou radiação. Os vírus inativados contêm antígenos e, quando injetados no corpo, esses antígenos provocam uma resposta imune (Forchette et al, 2021).

Os indivíduos com doença autoimune são indicados como grupo prioritário para vacinação contra COVID-19, conforme protocolos do Ministério da Saúde.

As vacinas contra COVID-19 estão em três formas amplamente categorizadas de vacinas moleculares (Pfizer-BioNTech), de subunidade (Oxford-Astrazeneca) e baseadas em partículas virais inativadas (CoronaVac). As vacinas compartilham o mesmo objetivo de estimular o sistema imunológico contra SARS-CoV-2 com a geração de células de memória.

As vacinas usam antígenos provenientes de proteínas inteiras, peptídeos fragmentados ou vírus inteiros que geram resposta imune inicialmente com o auxílio de células apresentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas (DCs). Em particular, as DCs desempenham papéis essenciais na captura de moléculas, fragmentando-as em peptídeos menores e apresentando os peptídeos antigênicos em

seus MHC I e II (ou HLAs em humanos) para preparar células linfócitos T para o início da imunidade celular e humoral contra o vírus (Harapan Harapan et al., 2020).

As respostas imunes antivirais celulares e humorais, particularmente a imunidade adaptativa, são atores importantes na proteção contínua do hospedeiro contra vírus citopáticos. A presença de células T de memória e células B com a capacidade de produzir anticorpos neutralizantes imediatamente após a reintrodução de um patógeno fornece uma resposta constante e um alto nível de proteção ao hospedeiro, que por sua vez leva à imunidade protetora contínua (Harapan Harapan et al., 2020).

Doenças autoimunes

Doenças autoimunes compõem um grupo heterogêneo, cuja as causas não são totalmente compreendidas. Em comum, estas doenças envolvem a interação de inúmeros fatores que regulam importantes vias moleculares e celulares do organismo e afetam diretamente a resposta imunológica do indivíduo. O sistema imunológico, quando comprometidas, apresenta falhas pelo organismo em sustentar tolerância às suas próprias moléculas, gerando uma resposta forte e patológica para proteínas e antígenos próprios. As doenças autoimunes são associadas a fatores que incluem variantes como a genética, nível hormonal, exposição a xenobióticos, patógenos e variáveis epigenéticas. As doenças podem ser agravadas pela relação da interação dos fatores genéticos com os fatores ambientais, tais como dieta e estresse (Costa et al., 2019).

Estima-se que as doenças autoimunes afetam aproximadamente 3 % da população mundial, com alta incidência em países desenvolvidos e com maior frequência em mulheres. Em geral são doenças indetectáveis por longos períodos antes do desenvolvimento de sintomas detectáveis e progressivo dano tecidual que evolui para a destruição total do(s) tecido(s) afetado(s). Não existindo um teste diagnóstico definitivo para as doenças autoimunes, o diagnóstico clínico e histórico medido do indivíduo tornar-se essencial para caracterização da presença de uma doença autoimune (Costa et al., 2019).

De acordo com Costa et al., 2019, as doenças autoimunes apresentam diversas características gerais que são relevantes para a definição de seus mecanismos subjacentes. Podem ser sistêmicas ou órgão-específicas, dependendo da distribuição dos autoantígenos que são reconhecidos pelo sistema imune. Por exemplo, a formação de complexos imunológicos circulantes (compostos de autonucleoproteínas e anticorpos específicos) produz tipicamente doenças sistêmicas, como o lúpus eritematoso sistêmico (SLE, do inglês *systemic lupus erythematosus*).

Neste trabalho foram selecionados os grupos de indivíduos com as patologias Artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune crônica que afeta as articulações. Caracteriza-se por uma inflamação simétrica progressiva das articulações afetadas, resultando em destruição da cartilagem, erosão óssea e incapacidade. Embora inicialmente apenas algumas articulações sejam afetadas, em estágios posteriores muitas articulações são afetadas e sintomas extra-articulares são comuns. A prevalência varia de 0,4% a 1,3% da população, dependendo de ambos os sexos (as mulheres são afetadas duas a três vezes mais frequentemente do que os homens mais prevalentes. (Costa et al.,2019).

Conforme Costa, embora a causa da AR seja desconhecida, tanto fatores genéticos quanto ambientais mostraram-se contribuindo para o desenvolvimento da AR .Como é hipótese para outras doenças autoimunes, é provável que o estabelecimento inicial de AR exija dois eventos separados: (1) predisposição genética do respectivo paciente resultando na geração de células T e B autoreativas, e (2) um evento desencadeante, como infecções virais e bacterianas ou lesão tecidual, fornecendo as células ativadas de presente de antígeno (APCs) para ativar os linfócitos autoreativos previamente gerados, resultando em tolerância interrompida e posterior destruição de tecidos/órgãos. Portanto, a AR provavelmente se desenvolve em indivíduos geneticamente predispostos devido a uma combinação de variação genética, modificação epigenética e fatores ambientais iniciados por um evento estocástico (por exemplo, lesão ou infecção). Os fatores de risco para o desenvolvimento da AR foram relatados para incluir tabagismo, obesidade, exposição à luz UV, hormônios sexuais, drogas, alterações no microbioma do intestino, boca e pulmão, doença periodontal (periodontite) e infecções. Entre esses fatores, a ligação entre doenças periodontais e desenvolvimento de AR é especialmente interessante.

A espondilite ancilosa ou anquilosante (EA) é uma doença inflamatória crônica classificada no grupo das espondiloartrites que acomete preferencialmente a coluna vertebral, podendo evoluir com rigidez e limitação funcional progressiva do esqueleto axial. Assim, as formas mais iniciais de EA, nas quais o dano estrutural é menor ou inexistente, podem ser classificadas como espondiloartrites axiais. A EA envolve adultos jovens, com pico de incidência em homens dos 20 aos 30 anos, especialmente em portadores do antígeno HLA-B27, o que, no Brasil, representa cerca de 60% dos pacientes. As manifestações clínicas da EA incluem sintomas axiais, como dor lombar inflamatória, e sintomas periféricos, como artrite, entesite e dactilite. O sintoma inicial costuma ser lombalgia, caracterizada por dor noturna, de início insidioso, que não melhora com repouso (mas melhora com exercícios). Em estudo multicêntrico brasileiro, os pacientes que tiveram o início da espondiloartrite (incluindo EA) antes dos 40 anos, apresentavam predomínio de sintomas axiais; os pacientes, predominantemente do sexo feminino, com início de sintomas mais tardio apresentavam sintomas periféricos.

Esta análise pode também ser expandida para outras doenças autoimunes, considerando a resposta imunológica alterada destes pacientes que podem influenciar a evolução da infecção por SARS-CoV-2 e o desenvolvimento da COVID-19.

Para critério de estudo, foi selecionado grupo de indivíduos considerados como de risco para infecção com SARS-CoV-2 que são os pacientes com doença autoimune. Incluem-se neste grupo indivíduos com artrite reumatoide, espondilite anquilosante, lúpus, lúpus bolhoso, vasculite, polimiosite, artrite psoriásica, doença de Chron, esclerose múltipla e encefalite autoimune. Esses indivíduos frequentemente estão sob tratamento com substâncias imunossupressoras, incluindo anticorpos monoclonais. As principais medicações utilizadas são infliximabe, tocilizumabe, rituximabe, belimumabe, vedolizumabe, ocrelizumabe e adalimumabe.

O tratamento de doenças autoimunes é realizado por fármacos imunossupressores, do qual se destaca os anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais, como terapia alvo, têm alta especificidade com poucos efeitos colaterais e é foco de muitas pesquisas nas doenças que necessitam de tratamento clínico ou cirúrgicos agressivos. Os anticorpos monoclonais podem ser aplicados intactos ou

acoplados a outra molécula, tendo como objetivo afetar uma célula alvo, incluindo células do sistema imunológico (<http://www.sbai.org.br/revistas/Vol292/aplicacoes>).

Entre as doenças inflamatórias crônicas, a artrite reumatoide é uma artropatia inflamatória e destrutiva comum, caracterizada pela liberação de potentes citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF α e IL-1, que mediam efeitos sistêmicos e contribuem para a destruição articular. Muitos agentes terapêuticos têm sido propostos para antagonizar essas citocinas, entre os quais anticorpos monoclonais. Assim, há vinte anos, o anti-TNF α infliximab foi o primeiro anticorpo monoclonal a ser proposto em uma indicação não cancerosa, a artrite reumatoide. Desde então, vários outros anticorpos monoclonais e/ou antagonistas direcionados a citocinas (IL-1, IL-6, RANKL), mas também células T e B efetoras celulares imunes, foram avaliados não apenas na artrite reumatoide, mas também no lúpus sistêmico, doença de Crohn, esclerose múltipla ou espondilite anquilosante, conforme Semerano, L., & Boissier, M. C. (2009).

Segundo Semerano, L., & Boissier, M. C. (2009), os genes que codificam TNF α e interleucina-1 (IL-1) foram sequenciados em 1984 e as citocinas correspondentes identificadas como mediadores de inflamação e destruição articular. A responsabilidade do TNF α e IL-1 foi então claramente demonstrada em modelos experimentais de doença articular e na AR. Camundongos transgênicos que superexpressam TNF α apresentam inflamação e destruição poliarticulares. Essas descobertas permitiram definir essas duas citocinas como alvos terapêuticos interessantes e os ensaios clínicos de moléculas que interferem em sua ação confirmaram brilhantemente essa hipótese. O infliximab, o primeiro mAb anti-TNF α utilizado na década de 1990, demonstrou sua eficácia na AR, como monoterapia, mas principalmente em combinação com um tratamento convencional como o metotrexato. O adalimumab, um mAb anti-TNF α totalmente humanizado, induziu os mesmos resultados positivos alguns anos depois. Concomitantemente, o etanercept, uma forma solúvel do receptor TNF α acoplado a um fragmento Fc, também mostrou clara eficácia na AR.

Segundo Fabiola Atzeni et al., (2007), o infliximab é um anticorpo quimérico específico para TNF- α administrado por via intravenosa, consistindo em regiões humanas constantes e regiões murinas variáveis que se ligam especificamente ao

TNF- α humano com uma constante de associação de 10^{10} M⁻¹. A dose recomendada para o tratamento da doença de Crohn (DC) grave ativa em pacientes refratários é de 5 mg/kg em dose única [2]; no tratamento da artrite reumatoide (AR), é administrado na dose de 3 mg/kg semanas 0, 2 e 6, com dose de manutenção de 3 mg/kg a cada 8 semanas (6/ano) [3]. A dose pode ser aumentada para 10 mg/kg, ou o intervalo de infusão pode ser reduzido se uma resposta adequada não for alcançada.

Conforme Scott et al., (2017), o tocilizumab intravenoso (IV) e subcutâneo (SC) (RoActemra®), um antagonista do receptor de IL-6, é aprovado (\pm metotrexato) em vários países do mundo, para o tratamento de adultos com artrite reumatoide (AR) ativa moderada a grave. A extensa experiência clínica estabeleceu firmemente a eficácia e segurança de curto e longo prazo do tocilizumabe (monoterapia ou em combinação com DMARDs sintéticos convencionais (csDMARDs)] em adultos com AR estabelecida em estágio inicial e de longa duração.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

O objetivo geral desta dissertação foi o acompanhamento da soroprevalência de anticorpos IgM e IgG detectados utilizando como antígeno a proteína N de SARS-CoV-2 em pacientes com doença autoimune em tratamento com anticorpo monoclonal em clínica privada, antes e após vacinação contra COVID-19.

2.2. Objetivos específicos:

- Avaliação a soroprevalência de IgM e IgG contra proteína N de SARS-CoV-2 em pacientes com doença autoimune em tratamento com anticorpo monoclonal que não foram previamente infectados pelo vírus;

- Avaliação e comparação dos níveis de anticorpos IgM e IgG em pacientes com doença autoimune sob tratamento com anticorpos monoclonais e indivíduos controle após a vacinação com as vacinas CoronaVac, Oxford-AstraZeneca e Pfizer-BioNTech;
- Correlacionar os níveis de anticorpos antes e após a vacinação com as doenças autoimune.

- Correlacionar os níveis de anticorpos antes e após a vacinação obtidos com a medicação imunossupressora utilizada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Comitê de ética

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de Viçosa via Plataforma Brasil em caráter de urgência devido a estudo envolvendo a pandemia COVID-19 através do número 1556550 e aprovado sob número de parecer 4.344.007. Todos os pacientes e indivíduos do grupo controle que participaram deste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e estavam de acordo com todas as condições da pesquisa.

3.2. Caracterização dos pacientes

Para avaliação da soroprevalência em relação a reatividade contra a proteína N de SARS-CoV-2, foram coletadas amostras de sangue de indivíduos com doença autoimune sob tratamento com anticorpos monoclonais em clínica particular da cidade

Viçosa (Minas Gerais), resultando um número total de 116 amostras. Essas coletas tiveram uma periodicidade mensal, ou, conforme a administração medicamentosa. Sendo que para cada indivíduo foram coletadas um total de 6 amostras. O período de coleta de sangue venoso periférico foi de abril de 2021 a outubro de 2021.

Além das amostras, foram coletadas informações médicas do paciente descritas em prontuário médico, incluindo ocorrência prévia de infecção por SARS-CoV-2, indicação dos medicamentos (anticorpos monoclonais) utilizado pelo paciente e data da última infusão de anticorpos monoclonais. Informações relacionadas à vacina, incluindo qual tipo de vacina recebida e datas de administração, foram coletadas através de anamnese com os pacientes antes das coletas das amostras. Durante esta anamnese, outras informações foram coletadas. Entre elas estavam informações se o paciente era portador de alguma outra doença, se era tabagista, etilista, hipertenso, diabéticos e quais medicamentos utilizavam além dos anticorpos monoclonais, se apresentaram sintoma ou diagnóstico positivo de COVID-19 desde o início da pandemia. Pacientes que apresentaram sintoma ou diagnóstico confirmando infecção por SARS-CoV-2 foram excluídos deste estudo.

Os pacientes foram divididos em grupos de acordo com o tipo de doença autoimune apresentada e os anticorpos monoclonais utilizados. Além disso, eles também foram agrupados de acordo com o tipo de vacina contra COVID-19 recebida. O grupo controle selecionado foi composto de indivíduos com doença autoimune antes da vacinação. As amostras do grupo controle também foi coletada antes e após a vacinação. O grupo controle foi estratificado de acordo com o tipo de vacina contra COVID-19 recebida.

3.3. Coleta de amostras

As amostras foram coletadas de sangue venoso periférico com jelco nº 22 de pacientes com doença autoimune, antes da infusão de terapia imunobiológica prescrita. Foram coletados um tubo comercial de coleta com anticoagulante (ETDA) e identificados com siglas das iniciais do nome do paciente. Esta coleta foi realizada na Clínica privada Infundir, em Viçosa. Após a coleta, estas amostras ficaram armazenadas em temperatura ambiente por 1h. Em seguida transportadas em caixa térmica para o Laboratório de Biotecnologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. Os tubos anticoagulantes (ETDA) foram centrifugadas por 5 minutos em 5000 g. Após centrifugação, um total de 1 mL de plasma foi recolhido por pipetagem em cabine de biossegurança. Os plasmas foram identificados, armazenados e congelados em temperatura de -8°C.

3.4. Obtenção do vetor plasmidial, expressão e purificação da proteína N de SARS-CoV-2 recombinante

Inicialmente, a sequência da proteína N de SARS-CoV-2 foi obtida do banco de dados NCBI. A sequência de DNA codificadora do gene foi desenhada com otimização de códons para expressão em bactéria *E. coli*, sintetizada quimicamente por empresa terceirizada (FastBio Ltda) e clonada em vetor de expressão pET 28a(+) (Novagen, San Diego, CA, USA), com codificação para His-Tag na porção N- terminal do polipeptídeo para permitir purificação da proteína. Bactérias *E. coli* ArcticExpress (DE3) previamente submetidas a produção de células competentes por choque térmico foram transformadas com o plasmídeo contendo o gene codificador da proteína N de SARS-CoV-2 para a propagação dos vetores. A proteína recombinante foi expressa por cultivo a 37°C da bactéria transformada com o plasmídeo pET 28^a(+) em meio Luria-Bertani (LB) suplementado com kanamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL) até atingir densidade óptica entre 0,6 – 0,8, seguida pela expressão induzida por 0,5 mM de isopropyl β-D-thiogalactosídeo (IPTG) em meio LB a 18°C/16 h com agitação. As células foram lisadas por sonicação em tampão. O sobrenadante de proteínas solúveis foi submetido a cromatografia de afinidade em coluna de níquel Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Germany) equilibrada com tampão e as proteínas imobilizadas serão eluídas com imidazol 500 mM. Subsequentemente, os eluatos foram separados

por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 10/300 GL em sistema automatizado FPLC (Äkta Purifier, GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Germany), com fluxo de 1 mL/min e monitorizada pela leitura de absorvância em 280 nm. A fração de interesse foi coletada e analisada por SDS-PAGE 12% para avaliação o grau de pureza antes da utilização.

3.5. Ensaio de ELISA

Microplacas de 96 poços foram previamente sensibilizadas com 1 µg de proteína N de SARS-CoV-2 recombinante em tampão carbonato ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, pH 9,3). As microplacas foram sensibilizadas adicionando 50 microlitros do antígeno diluído em casa poço, sendo cobertas com filme transparente e incubadas por 18 horas a 4° C. As microplacas foram lavadas quatro vezes com PBS-0,05% Tween 20 e bloqueadas com PBS-T com BSA (albumina sérica bovina) 2% (0,1g de BSA em 5ml de PBS-T) por 1 hora a 37° C. Os soros dos pacientes e de indivíduos controle foram diluídos em PBS-T 0,05% BSA 2% e adicionados para incubação por 1 hora a temperatura de 37° C. Após cinco lavagens com PBS-0,05% Tween 20, anticorpos anti-IgG ou anti-IgM humano conjugado com peroxidase em título de 1:5000 (Sigma Aldrich) foram adicionados e as microplacas foram novamente incubadas por 1 hora a temperatura de 37° C. As microplacas foram novamente lavadas cinco vezes com PBS-0,05% Tween 20 e serão adicionados 100 µL por poço de substrato 3,3',5,5'-OPD (o- Phenylenediamine dihydrochloride) (Sigma-Aldrich, USA) diluído em uma concentração de 10 mg/mL em tampão citrato pH 5.0, contendo 10 mM de peróxido de hidrogênio. A reação foi parada após 10 minutos em temperatura ambiente com H_2SO_4 0,5M e a leitura de absorvância foi realizado em espectrofotômetro ajustado para comprimento de onda de 492 nm. Cada amostra foi avaliada em triplicata.

3.6. Análises estatísticas

Inicialmente, foi utilizado o teste de normalidade de dados de D'Agostino & Pearson, com $\alpha = 0,05$, para avaliar se os conjuntos de dados seguiam a distribuição normal ou Gaussiana. Quando apresentavam uma distribuição normal foi realizado um teste de ANOVA para comparação de múltiplos grupos seguida de correção de múltiplas comparações pelo teste de Bonferroni. No caso de uma distribuição não gaussiana, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de múltiplas comparações de Dunn. Em ambos os casos, foi considerado que as médias apresentaram diferença significativa quando $p < 0,05$. Nas representações gráficas “ * ” indica $p < 0,05$, “ ** “ $p < 0,005$, “ *** “ $p < 0,001$. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism™ (versão 6.01).

4. RESULTADOS:

4.1. Expressão e purificação da proteína N de SARS-CoV-2 recombinante

A transformação com o plasmídeo contendo o gene de interesse em cepa de *E. coli* (*Arctic Express*) foi realizada por choque térmico utilizando tratamento com cloreto de cálcio. A confirmação da transformação foi realizada por PCR de Miniprep utilizando iniciadores específicos para a sequência do promotor T7. As colônias positivas foram crescidas em 5mL de meio seletivo de LB mais antibióticos gentamicina (25ug/mL) e Kanamicina (100ug/mL) para expressão do plasmídeo a 37°C overnight. As células crescidas foram então inoculadas em meio LB sem antibiótico (1L) e incubadas a 30°C por aproximadamente 5h (ou até atingir a O.D.600nm de 0,6). Após a atingir a O.D. induzimos a expressão da proteína recombinante com a adição de IPTG (0,4mM) e as células são incubadas a 12°C por 24h. Após às 24h o pellet recuperado da cultura induzida foi ressuspendido (30-50mL)

em tampão de ligação (Fosfato de sódio 20mM, NaCl 500mM, e Imidazol 20mM, pH 7,4).

Após a análise de expressão das proteínas por SDS-PAGE e Western Blot, o pellet recuperado é submetido a sonicação (30% de amplitude, 10 s sonicando, 10 s de intervalo; por 2 minutos; sempre no gelo). Após a sonicação o pellet é centrifugado para separação das frações solúvel e insolúvel. A fração insolúvel foi utilizada para a purificação em FPLC (sistema AKTA – GE Healthcare). Primeiramente instalamos a coluna de Niquel (His-trap) no equipamento e a equilibramos com o tampão de ligação. Após o equilíbrio passamos a amostra (fração insolúvel) em um fluxo baixo (0,5mL/min). Coletamos a fração não ligada. Após a passagem de toda amostra, realizamos uma lavagem na coluna com o tampão de ligação até a absorbância de 280nm diminuir e atingir próximo a zero. Após a lavagem começamos a eluição com tampão de eluição (Ureia 8M, Fosfato de sódio 20mM, NaCl 500mM, e Imidazol 500mM, pH 7,4) em gradiente por 10 min em fluxo de 1mL/min. As frações obtidas para cada percentagem do tampão de eluição foram coletadas e posteriormente analisadas em SDS-PAGE e Western Blot (Figura 1). As frações correspondentes ao pico de maior absorbância e com maior pureza observada no gel, foram unidas e quantificadas por Bradford.

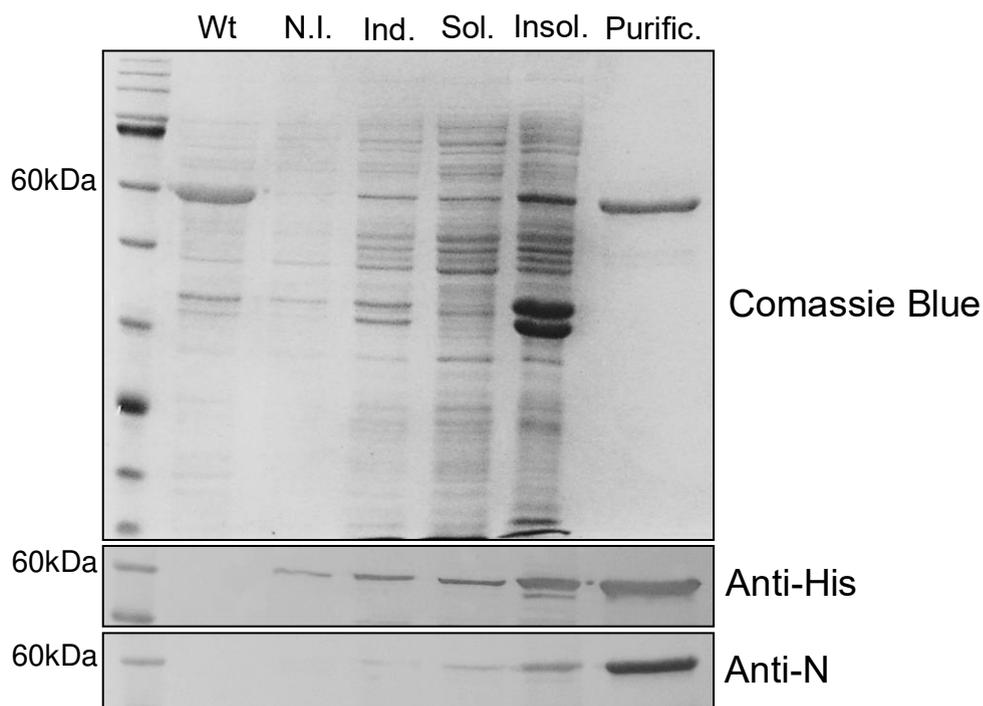


Figura 1 - Expressão e purificação da proteína N de SARS-CoV-2. Gel obtido por eletroforese em SDS-PAGE 12% corado por comassie blue e western blot obtido com anticorpo comercial contra his tag (Anti-His) e anticorpo comercial contra a proteína N (Anti-N). A primeira canaleta representa o padrão de peso molecular, seguida pelo extrato proteína de bactéria *E. coli* não transformada (Wt), *E. coli* transformada com o vetor e com indução de expressão não realizada (N.I), *E. coli* transformada com o vetor e com indução de expressão da proteína recombinante (Ind.), fração solúvel (Sol.) e insolúvel (Insol.) da *E. coli* transformada com o vetor e com indução de expressão da proteína recombinante e proteína purificada (Purific.).

4.2. Caracterização do grupo de estudo

Iniciamos as coletas em abril/2022, onde alguns pacientes já haviam sido vacinados. Todavia para realização deste estudo, utilizamos os seguintes critérios de exclusão, os indivíduos que foram infectados por COVID, ou com sintomas gripais, foram excluídos, independentes da etapa da análise. Indivíduos que durante a

pesquisa só obtivemos uma amostra de sangue e os que já haviam sido vacinados com a primeira dose da vacina.

Os critérios de inclusão foram os indivíduos que são portadores de doenças autoimunes, sendo selecionados os com artrite reumatoide e espondilite anquilosante e que estavam em uso dos anticorpos monoclonais, infliximabe e tocilizumabe, nos quais foram imunizados com as vacinas Coronavac e Astrazeneca.

Adotamos esses critérios, com objetivo de onde tivéssemos acompanhamento dos indivíduos, bem como periodicidade de tratamento, intervalos entre as doses vacinais e se no período da pesquisa apresentou algum sintoma ou testou positivo para COVID.

Vale ressaltar que as periodicidades das coletas eram mensais e bimestral, conforme administração do anticorpo monoclonal.

O nosso grupo controle, foram indivíduos com doença autoimune antes a primeira dose de vacina que estavam em tratamento com anticorpo monoclonal.

Coletamos um total de 36 amostras dos indivíduos com doença autoimune (Figura 2). Todos os pacientes realizavam tratamento com anticorpos monoclonais injetáveis em clínica particular na cidade de Viçosa, localizada no estado de Minas Gerais. Os pacientes pertenciam a ambos os sexos masculino e feminino, com idades que variam entre 0 a 80 anos, sendo o de maior prevalência o grupo de 30 a 60 anos. Destes pacientes, a maioria pertencia ao sexo feminino (Figura 2). A faixa etária de maior frequência nos pacientes deste estudo é acima de 40 anos (Figura 2). No período supracitado, apenas um paciente foi categorizado como infectado, através exame confirmatório por PCR em tempo real e por isso, ele foi excluído deste estudo. Os demais pacientes não indicaram sintomas ou positividade em testes de diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 desde o início da infecção.

Indivíduos por Faixa Etária

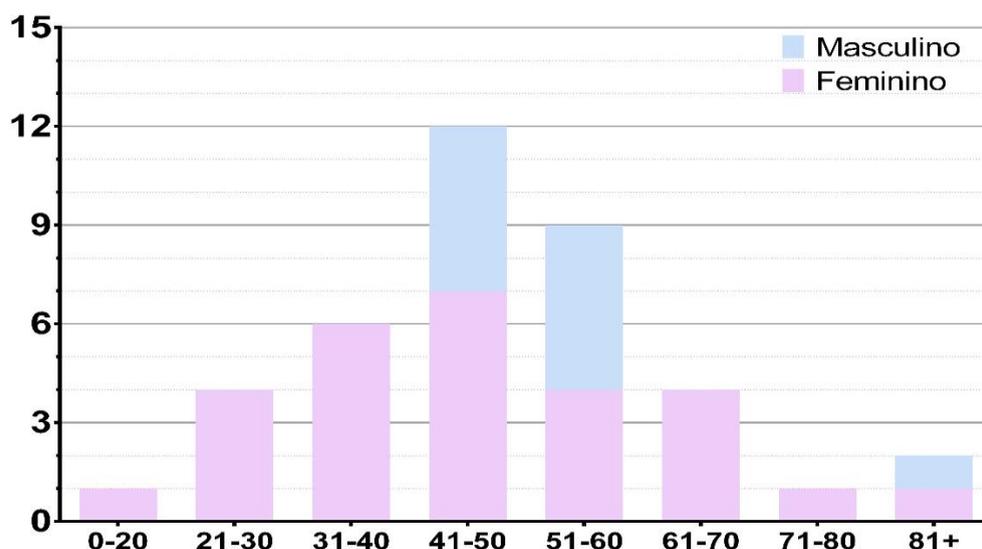


Figura 2 - Caracterização dos pacientes com doença auto imune utilizadas neste estudo. Estratificação dos dados por sexo e por faixa etária.

Os pacientes possuíam diagnóstico médico de diferentes doenças autoimunes, com maior frequência para artrite reumatoide e espondilite anquilosante (Figura 3A). Além disso, eles estavam sob tratamento com anticorpos monoclonais, dos quais os mais frequentes eram Infliximabe e Tocilizumabe (Figura 3B). O Infliximabe é um anticorpo monoclonal anti-TNF-alfa que se liga com alta afinidade a formas solúveis e transmembranais desta molécula importante do processo de inflamação. O Tocilizumabe é um anticorpo monoclonal recombinante humanizado com capacidade para se ligar ao receptor de IL-6 com alta afinidade, reduzindo a resposta inflamatória por supressão da atividade desta citocina. Considerando a elevada frequência de pacientes com artrite reumatoide e espondilite anquilosante, e o menor número de pacientes com outras doenças autoimune que poderiam comprometer a análise estatística pelo pequeno número de indivíduos, em análises posteriores somente os dados de pacientes com estas duas doenças foram utilizados. De modo similar, as próximas análises se concentraram apenas em pacientes que utilizam Infliximabe e Tocilizumabe.

Os pacientes com doença autoimune fizeram parte do grupo de risco para COVID-19 que foram vacinados primeiro, considerando os protocolos do Ministério da Saúde. Além disso, por possuírem idade acima de 40 anos, foram vacinados precocemente comparando ao restante da população, incluindo o grupo controle utilizado neste estudo. Assim, eles foram vacinados preferencialmente com vacina CoronaVac e Oxford-AstraZeneca, que foram disponibilizadas mais precocemente nos sistemas de saúde.

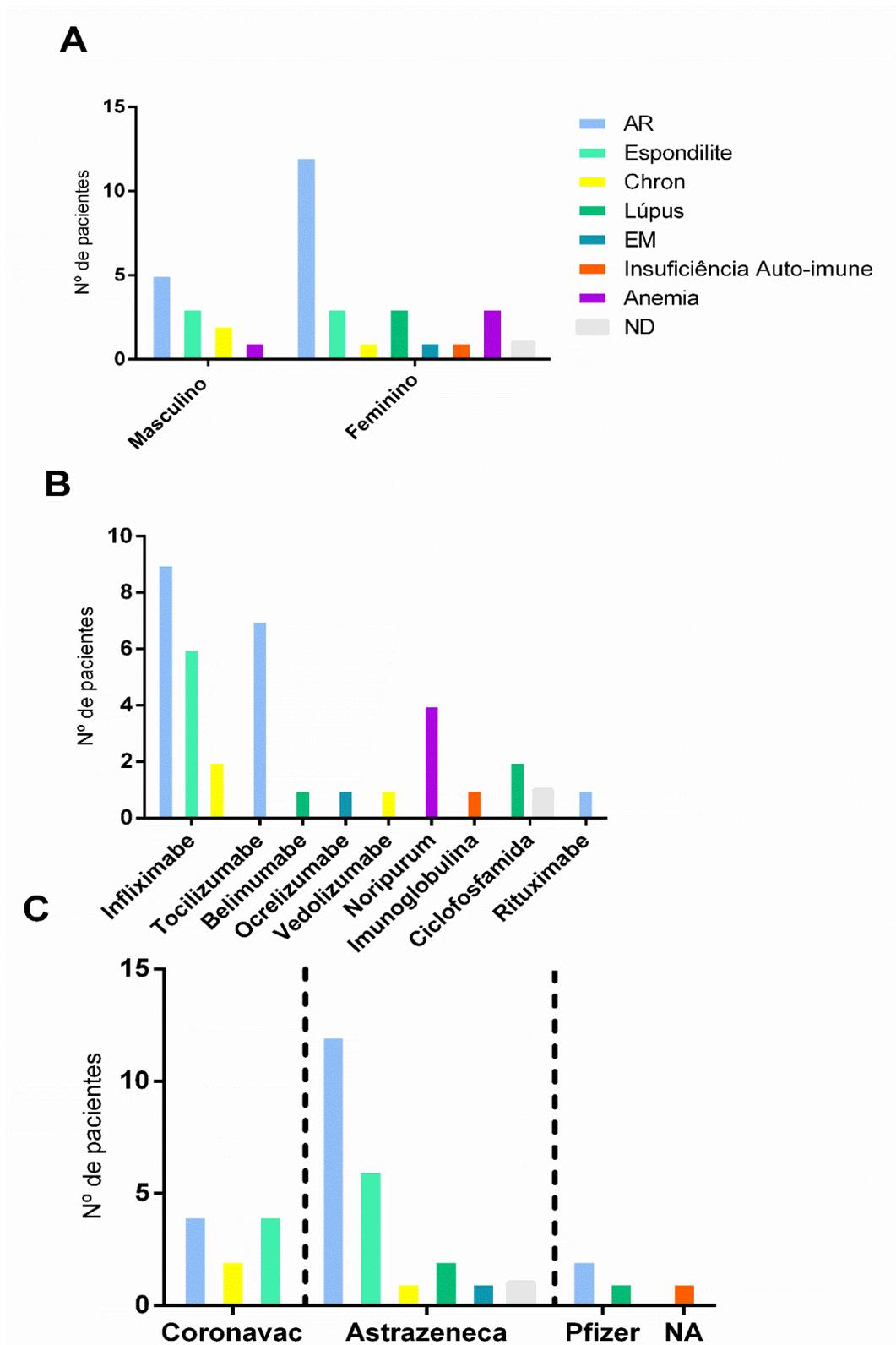


Figura 3 - Caracterização dos pacientes com doença autoimune que participaram deste estudo. (A) Patologia indicada por prontuário médico; (B) Medicamentos utilizados conforme prontuário da clínica privada do município de Viçosa, MG; (C) Indicação de vacina recebida informada durante anamnese.

4.3. Soroprevalência de IgM e IgG contra proteína N de SARS-CoV-2 antes da vacinação contra COVID-19

Inicialmente, foi determinado por ELISA os níveis de anticorpos IgG e IgM em pacientes com doença autoimune (artrite reumatoide e espondilite anquilosante) em relação a indivíduos que não possuem doença autoimune (Figura 4). Ambos os grupos de indivíduos provavelmente não tiveram contato com o vírus previamente, avaliado por ausência de resultado de diagnóstico sorológico e molecular e ausência de sintoma seu e de moradores do mesmo domicílio desde o início da pandemia. Embora este critério não seja o mais exato para selecionar grupos de pacientes que não tiveram contato com SARS-CoV-2, na ausência de análise molecular (PCR em tempo real) controlada e constante previamente, este critério foi o mais adequado e viável para não reduzir o número de pacientes aptos para participar do estudo.

Quando avaliado os níveis de IgM (Figura 4A), interessantemente o grupo com artrite reumatoide e espondilite anquilosante apresentaram maiores níveis deste artigo contra proteína N do vírus comparada com o grupo controle, mesmo sem contato prévio com vírus. De fato, indivíduos com doença autoimune apresentam maior produção global de anticorpos e este fato pode se refletir em anticorpos contra SARS-CoV-2. Alguns trabalhos têm demonstrado que o agravamento da COVID-19 pode ter um componente de autoimunidade, indicando que anticorpos contra antígenos próprios poderiam ser induzidos pelos vírus. Assim, doenças autoimunes e COVID-19 poderiam ter um fator em comum, como anticorpos, que sugere uma explicação porque os níveis de IgM contra o vírus são altos em pacientes com doença autoimune.

Por outro lado, quando observado os níveis de IgG de pacientes com doença autoimune (Figura 4B), foram encontrados valores menores do que de indivíduos não infectados do grupo controle. Indicando que a imun conversão de IgM para IgG deve ser mais eficiente somente na presença do vírus, mesmo em pacientes com artrite reumatoide e espondilite anquilosante.

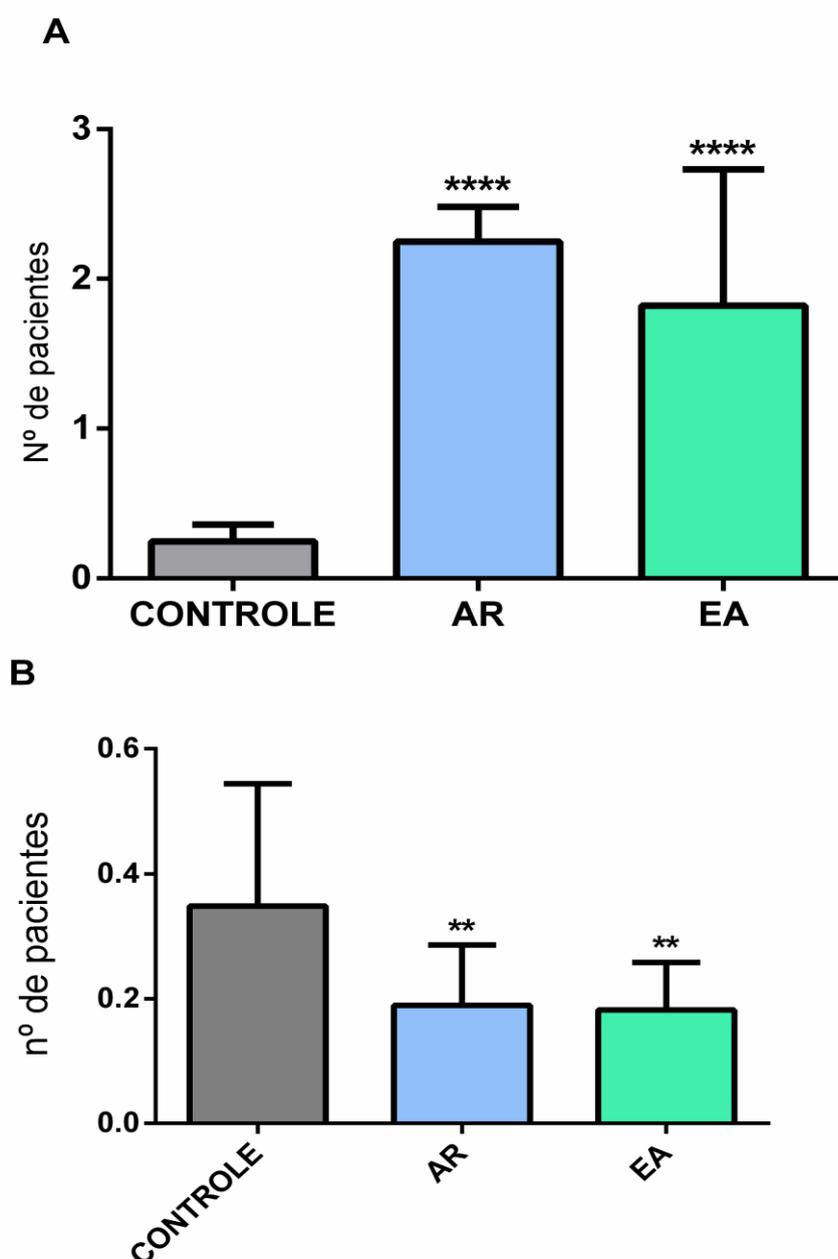


Figura 4 - Soroprevalência de anticorpos contra proteína N recombinante de SARS-CoV-2 em indivíduos com e sem doença autoimune antes do contato com o vírus ou vacinação contra a COVID-19. (A) Reatividade de anticorpos IgM e (B) reatividade de anticorpos IgG. AR, artrite reumatoide e EA, espondilite anquilosante. **, p-valor menor que 0,005 e ***, p-valor menor que 0,001.

Quando avaliado a influência do tratamento com anticorpos monoclonais na sororeatividade de IgM e IgG contra proteína N (Figura 5), um mesmo resultado foi encontrado, com maior nível de IgM e níveis semelhantes de IgG. Além da explicação

acima, o tratamento imunossupressor com estes anticorpos pode ter efeito maior sobre os níveis de IgG e por isso, regula sua quantidade.

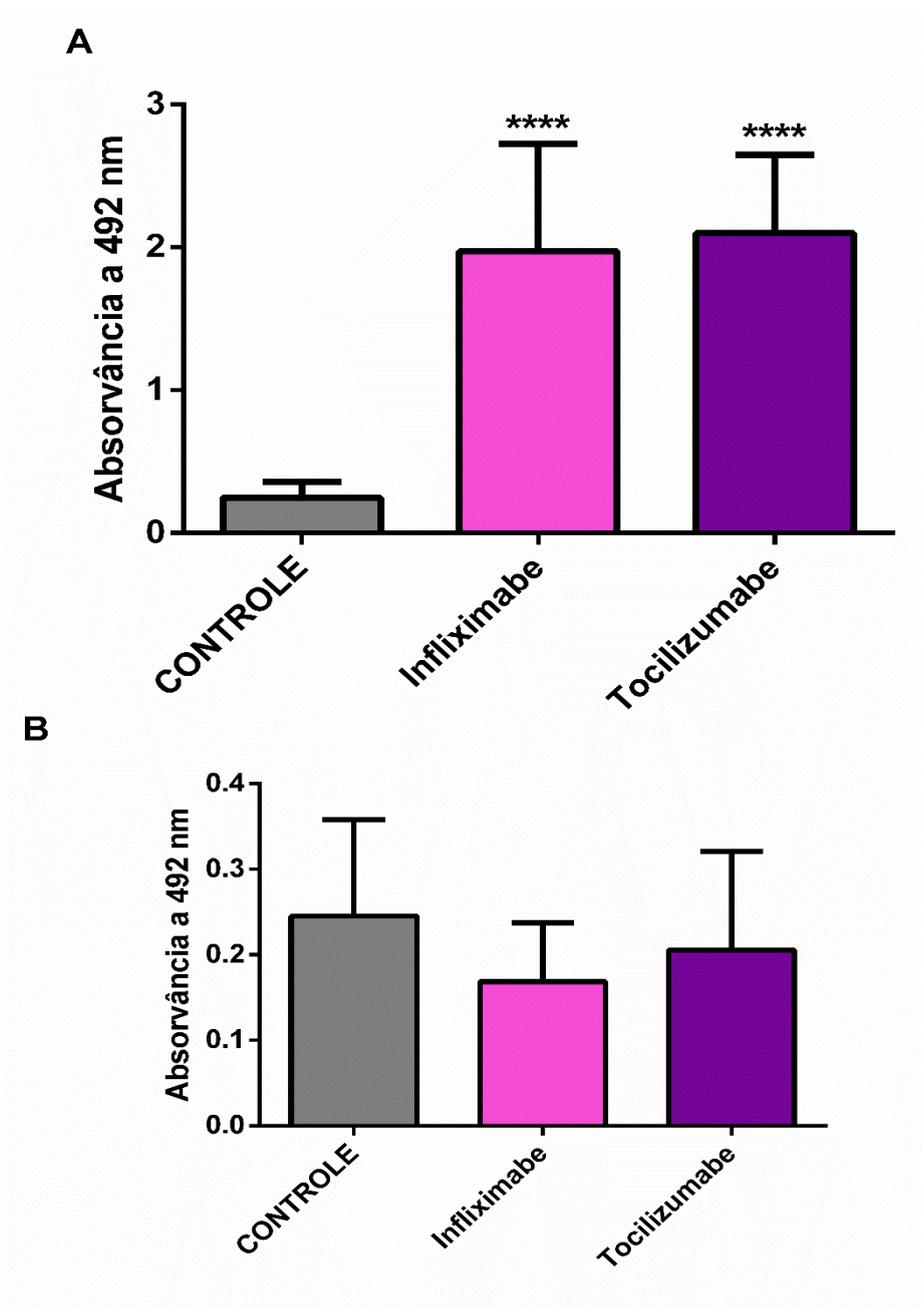


Figura 5 - Soroprevalência de anticorpos contra proteína N recombinante de SARS-CoV-2 em indivíduos com doença autoimune em tratamento com anticorpo monoclonal Infliximabe ou Tocilizumabe antes do contato com o vírus ou vacinação contra a COVID-19. (A) Reatividade de anticorpos IgM e (B) reatividade de anticorpos IgG. ***, p-valor menor que 0,001.

4.4. Reatividade de IgM e IgG contra proteína N de SARS-CoV-2 após a vacinação contra COVID-19

Após a primeira dose da vacina contra COVID-19, novas amostras foram coletadas e os níveis dos anticorpos foram novamente mensurados. Ao comparar os níveis de anticorpos IgM entre pacientes com artrite reumatoide e indivíduos controle após vacina (Figura 6A), pode-se observar níveis significativamente aumentados deste anticorpo nos pacientes com doença autoimune independente do tipo de vacina utilizada. Por outro lado, os níveis de anticorpo IgG não apresentaram diferença (Figura 6B), indicando novamente que a doença autoimune pode gerar uma indução exacerbada de IgM, porém sem soroconversão acompanhada de IgG. Hipotetizando que a soroconversão é essencial para produção de uma resposta imunológica para gerar proteção adequada, estes resultados podem sugerir um atraso de imunoc conversão que pode afetar a eficácia das vacinas para pacientes com artrite reumatoide, necessitando de mais resultados para avaliar esta possibilidade. Por outro lado, deve-se também realizar estudos posteriores para avaliar se o uso da vacina contribui para exacerbar a produção de IgM nestes pacientes, desta forma contribuindo para o agravamento da artrite reumatoide.

Por outro lado, o resultado de reatividade de anticorpos foi diferente para espondilite anquilosante (Figura 7), no qual os níveis de IgM e IgG foram estatisticamente semelhante ao grupo controle. Este resultado sugere que as doenças autoimunes diferentes podem ter mecanismos específicos que vão resultar em eficácia vacinal diferenciada e devem ser estudadas isoladamente.

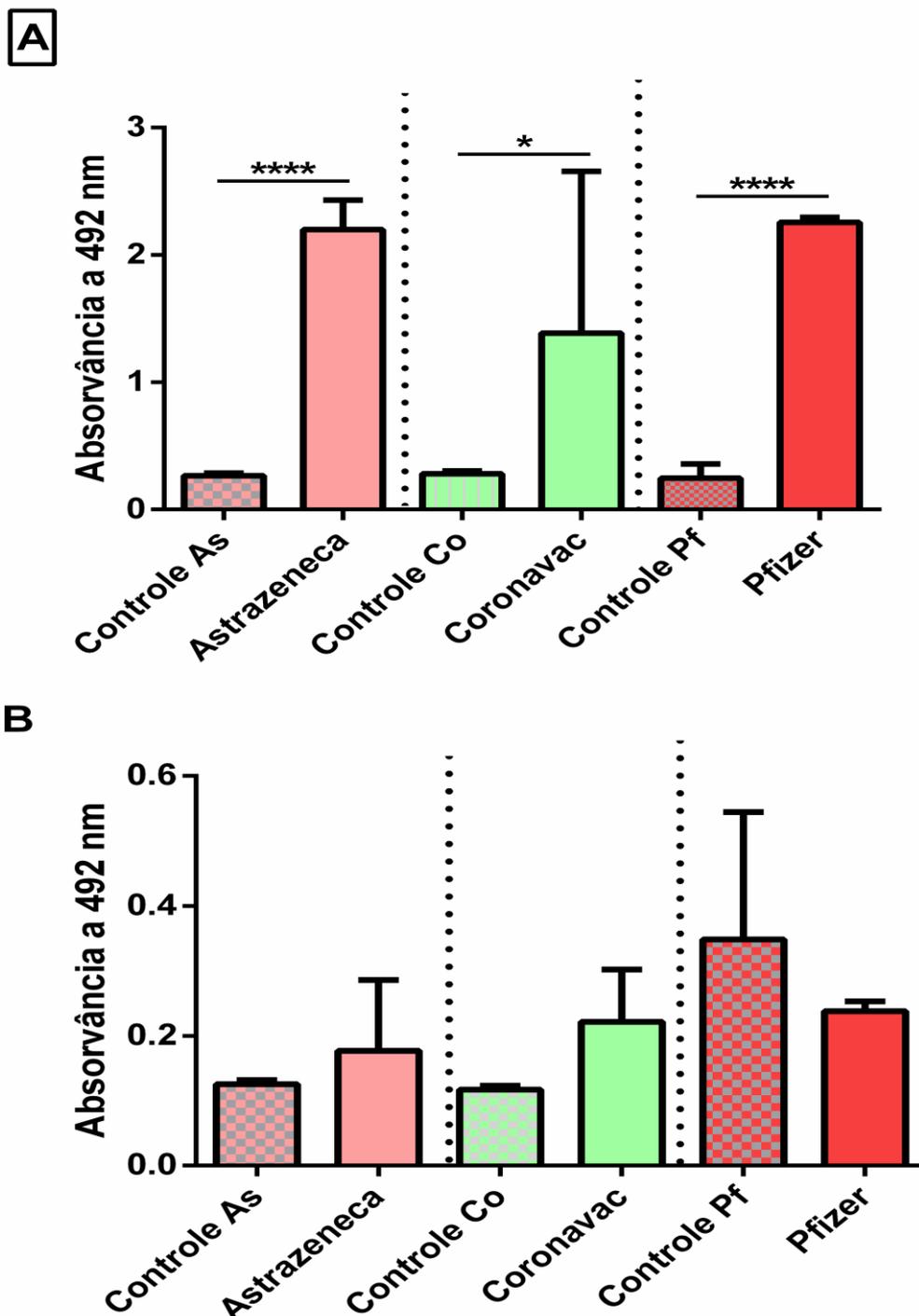


Figura 6 - Efeitos da vacina nos níveis de anticorpos em pacientes com artrite reumatoide após a vacinação contra COVID-19. (A) Reatividade de IgM e (B) reatividade IgG. Os controles de cada vacina são compostos por indivíduos sem doença autoimune e que receberam as mesmas vacinas. As amostras foram coletas em tempos proporcionais de recebimento de dose para comparação entre o grupo controle e com doença autoimunidade (30 dias após a primeira dose). *, p-valor menor que 0,05 e ***, p-valor menor que 0,001.

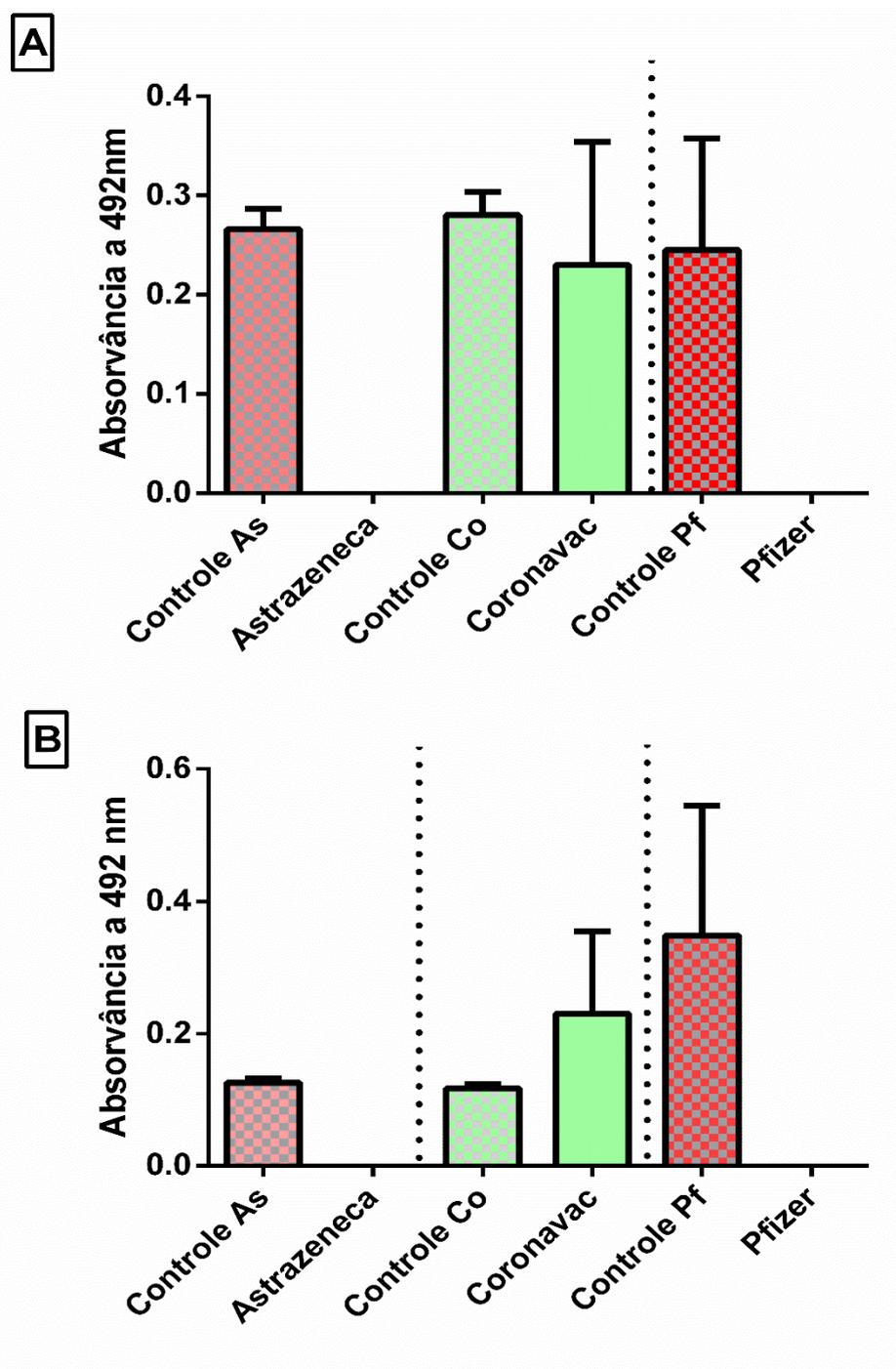


Figura 7 - Efeitos da vacina nos níveis de anticorpos em pacientes com espondilite anquilosante após a vacinação contra COVID-19. (A) Reatividade de IgM e (B) reatividade IgG. Os controles de cada vacina são compostos por indivíduos sem doença autoimune e que receberam as mesmas vacinas. As amostras foram coletas em tempos proporcionais de recebimento de dose para comparação entre o grupo controle e com doença autoimunidade (30 dias após a primeira dose). *, p-valor menor que 0,05 e ***, p-valor menor que 0,001

O uso dos anticorpos monoclonais também influenciou mais os níveis de IgM do que os níveis IgG após a primeira dose das vacinas (Figura 8 e 9). O Infliximabe induziu maiores níveis de IgM para a vacina AstraZeneca-Oxford, comparado ao grupo controle. Já o anticorpo monoclonal Tocilizumabe induziu um maior nível de anticorpos IgM em ambas as vacinas AstraZeneca-Oxford e Pfizer-BioNTech. Para ambos os anticorpos monoclonais, não foi observado nenhuma diferença do grupo controle em relação aos níveis de IgG. Os anticorpos monoclonais utilizados bloqueiam a ação de fatores inflamatórios, reduzindo a resposta imunológica inflamatória existente em pacientes com doenças autoimune. Estes anticorpos possuem ação imunossupressora, reduzindo a resposta imunológica global do paciente. Apesar deste efeito, os resultados obtidos sugerem não haver diferenças nos níveis de anticorpos IgG em relação a pacientes controle, sugerindo que para este parâmetro de resposta, não haveria interferência na eficácia vacinal. Apesar disso, é importante destacar que a resposta imune de proteção de uma vacina é complexa e envolve ambos fatores humoral e celular e análise baseada apenas em níveis de anticorpos podem ser incompletas, embora informativa. Assim, para concluir sobre o real impacto dos tratamentos com anticorpos monoclonais, são necessários novos estudos que avaliem de forma mais global a resposta imunológica pós vacina deste grupo de pacientes, incluindo caracterização da resposta celular e de memória.

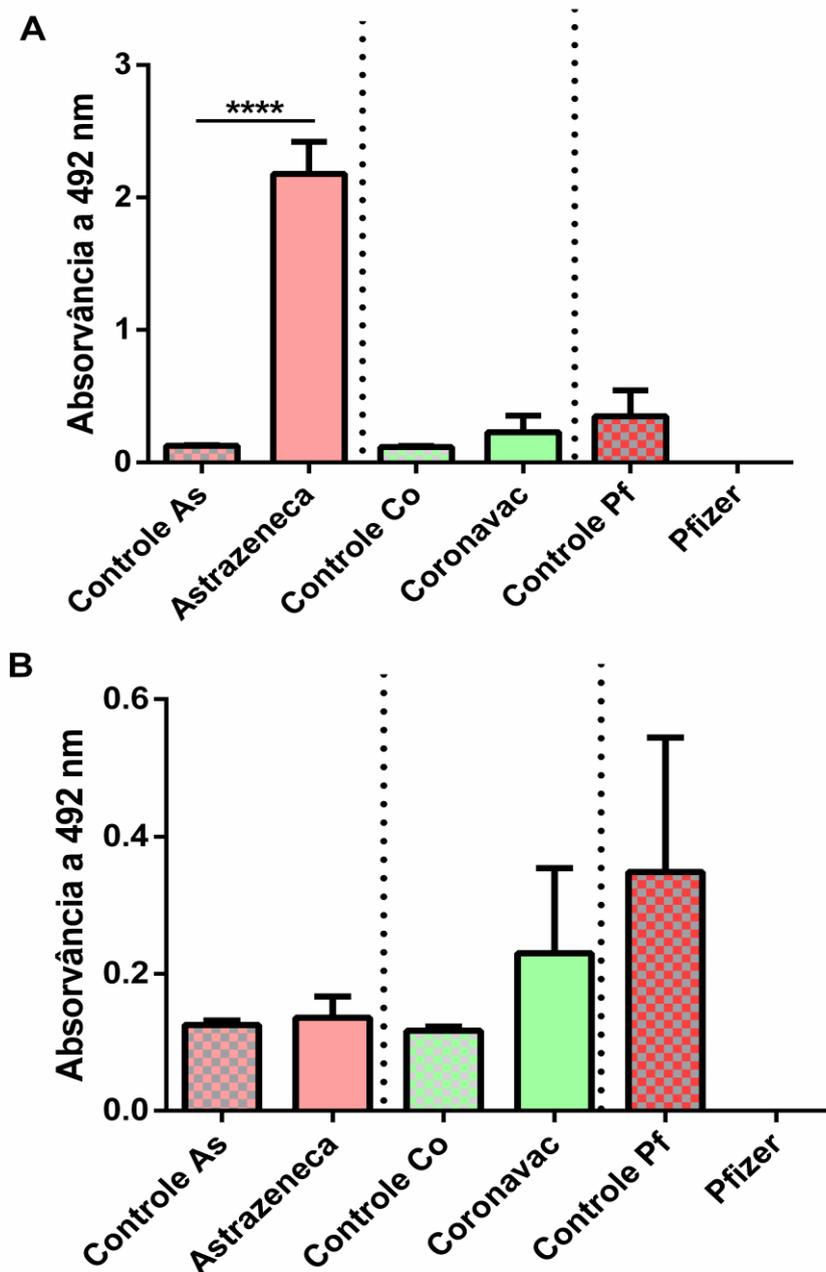
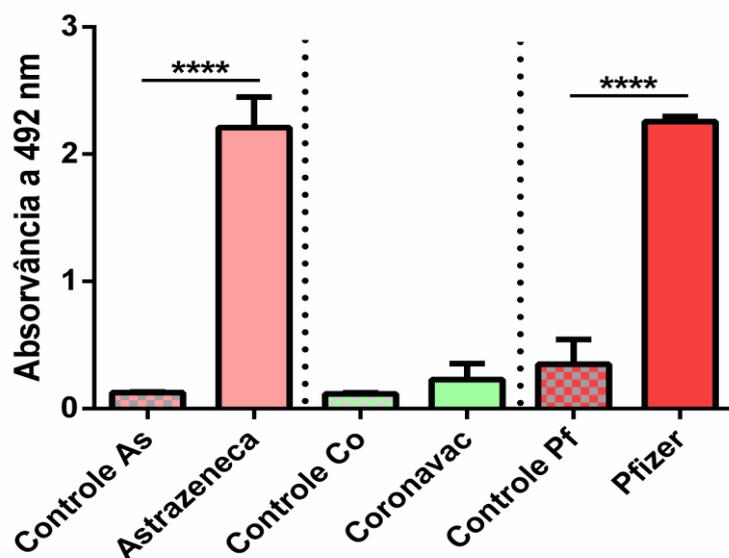


Figura 8 - Efeitos da vacina nos níveis de anticorpos em pacientes tratados com anticorpo monoclonal Infliximabe após a vacinação contra COVID-19. (A) Reatividade de IgM e (B) reatividade IgG. Os controles de cada vacina são compostos por indivíduos sem doença autoimune e sem tratamento com anticorpos monoclonais e que receberam as mesmas vacinas. As amostras foram coletas em tempos proporcionais de recebimento de dose para comparação entre o grupo controle e com doença autoimunidade (30 dias após a primeira dose). ***, p-valor menor que 0,001.

A



B

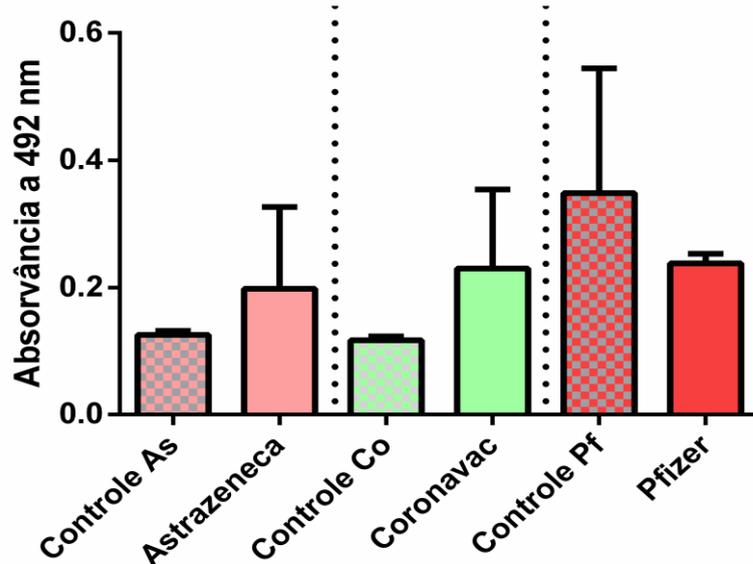


Figura 9 - Efeitos da vacina nos níveis de anticorpos em pacientes tratados com anticorpo monoclonal Tocilizumabe após a vacinação contra COVID-19. (A) Reatividade de IgM e (B) reatividade IgG. Os controles de cada vacina são compostos por indivíduos sem doença autoimune e sem tratamento com anticorpos monoclonais e que receberam as mesmas vacinas. As amostras foram coletas em tempos proporcionais de recebimento de dose para comparação entre o grupo controle e com doença autoimunidade (30 dias após a primeira dose). ***, p-valor menor que 0,001.

5. DISCUSSÃO

De acordo com D´Silva (2021), as doenças autoimunes são caracterizadas pela existência de autoanticorpos e reações inflamatórias perpetuadas devido à perda da tolerância imunológica e sistema imunológico desregulado, levando a danos e mau funcionamento de órgãos. Essas lesões imunomediadas também existem no COVID-19.

Segundo D´Silva (2021) as reações imunes semelhantes na infecção por SARS-CoV-2 e doenças autoimunes. Tanto COVID-19 quanto autoimune doenças apresentam vários sintomas clínicos envolvendo diferentes órgãos e sistemas, como o sistema hematológico, sistema cardiovascular, sistema digestivo, rins, pulmões, sistema neurológico e pâncreas. A lesão de órgão é causada por resposta imune descontrolada caracterizada por produção excessiva de citocinas e superativação de células imunes, e a quebra da tolerância imunológica levando à produção de autoanticorpos. Infecção por SARS-CoV-2 pode desencadear reatividade cruzada através do mimetismo molecular, levando à autoimunidade em pacientes com COVID-19, conforme demonstrado em figura abaixo:

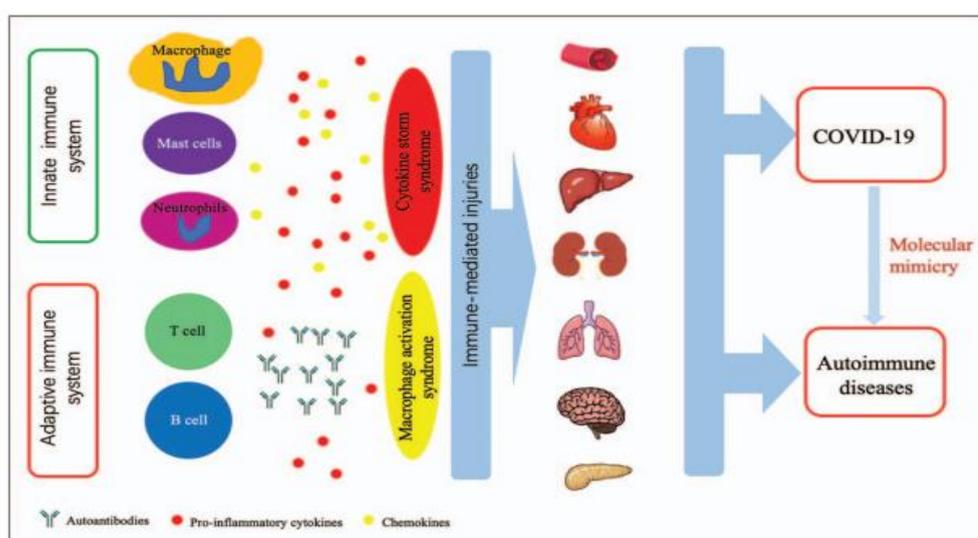


Figura 10 - Resposta imunológica comparada de COVID-19 e doenças autoimunes. Fonte: D'Silva, Kristin M. Wallace, Zachary S. COVID-19 and rheumatoid arthritis, Current Opinion in Rheumatology: May 2021 - Volume 33 - Issue 3 - p 255-261 doi: 10.1097/BOR.0000000000000786

Os resultados obtidos nas amostras de Elisa no tempo 0, ou seja, antes da primeira dose da vacina sugerem que pode haver uma proteção desses indivíduos autoimunes e em tratamento com anticorpo monoclonal.

O estudo realizado por Roongta et al (2020) aponta que paciente com COVID-19 com doenças reumatológicas subjacentes estão surgindo principalmente na forma de pequenas séries de casos e um registro global. A partir desses dados, parece que nossos pacientes, embora imunossuprimidos, não são particularmente suscetíveis à infecção por coronavírus e, se infectados, não apresentam resultados significativamente piores do que outros pacientes.

Segundo Moody (2021), a imunidade adaptativa do corpo reconhece e responde contra alvos (antígenos) expressos por patógenos estranhos, mas geralmente não para direcionar autoantígenos. Contudo, se o sistema imunológico se tornar disfuncional, as células imunes adaptativas podem reagir aos autoantígenos, que pode resultar em doença autoimune. As infecções virais são bem relatadas como associadas ou exacerbar, doenças autoimunes, como esclerose múltipla (EM) e lúpus eritematoso sistêmico (LES). Em pacientes com COVID-19, tanto EM e LES de início recente, como a ocorrência de outras patologias do tipo autoimune, foram relatadas. Além disso, a presença de autoanticorpos, com e sem associações conhecidas com doenças autoimunes. Aqui nos descrever os mecanismos da autoimunidade induzida por vírus e resumir alguns dos relatórios sobre as doenças autoimunes e auto-reatividade que são relatadas com associadas com infecção por SARS-CoV-2.

É importante entender os fenômenos biológicos e clínicos observados durante e após a infecção ou vacinação. Atualmente, observações clínicas e estudos laboratoriais indicam que o SARS-CoV-2 causam desregulação das respostas imunes que podem associar infecção por SARS-CoV-2 e autoimunidade. A identificação de mecanismos e os auto-alvos sendo reconhecidos pelo sistema imunológico, bem como o acompanhamento de relatos de casos clínicos, podem fornecer mais informações sobre as respostas terapêuticas e vacinais. Além disso, eles fornecerão informações iniciais sobre as doenças autoimunes associadas que podem surgir em indivíduos suscetíveis (Moody et al., 2021).

Conforme demonstrado no estudo realizado por Magliulo e colaboradores (2022), uma associação estatisticamente significativa entre hipogamaglobulinemia IgG/IgM e ausência de soropositividade após a vacinação. Isso foi preditivo mesmo quando corrigido para idade e uso concomitante de medicamentos. A baixa IgM foi associada a uma probabilidade negativa de soropositividade após as vacinas SARS-CoV-2 em um estudo recente, mas essa associação não foi encontrada com outros tipos de imunoglobulina. A hipogamaglobulinemia é uma complicação conhecida do tratamento contínuo com RTX, particularmente em pacientes com AAV, uso prévio de CYC e exposição concomitante a glicocorticóides. A associação entre hipogamaglobulinemia e respostas humorais prejudicadas a outras vacinas recomendadas em pacientes com AIRD está bem estabelecida.

Em relação se a soropositividade se correlaciona com a imunidade protetora da infecção por SARS-CoV-2, ainda não tem existam muita pesquisas, embora a resposta humoral seja conhecida por ser um substituto importante para a imunidade, como demonstrado *in vitro* e *in vivo*, as respostas das células T também desempenham um papel importante na imunidade mediada por células. Estudos recentes avaliando a resposta de células T em pacientes à vacinação em terapia com depleção de células B mostraram que as respostas parecem permanecer intactas, embora provavelmente prejudicadas, em pacientes com depleção de células B e soronegativos. Portanto, embora os dados sobre as respostas humorais sugiram que o atraso da vacinação pós-RTX confere uma melhor imunogenicidade da vacina, há muito a aprender sobre a resposta imune completa e se o atraso da vacinação é absolutamente necessário, dada a evidência emergente de que as respostas das células T podem ocorrer independentemente da produção de anticorpos et al Magliulo (2022).

Neste estudo, analisando o resultado do ELISA, foi observado uma maior concentração de IgM nos indivíduos com artrite reumatoide e espondilite anquilosante do que indivíduos controles com doença autoimune antes da primeira dose da vacina, independente do fabricante. Além disso, esses maiores níveis de IgM foram também presentes nos indivíduos com doença autoimune vacinados com a primeira dose, independentemente do tipo de vacina. Todas as amostras do grupo controle ficaram abaixo do ponto de corte de absorbância (*cut off*= 0,4872). Portanto, tais resultados sugerem que pode haver diferenças de níveis bases de resposta imune contra o vírus

e resposta imune induzida por vacina em indivíduos com doença autoimune. Novos estudos devem ser realizados para aprofundar no entendimento destas diferenças e se elas influenciam o curso de infecção ou desenvolvimento de doença grave, bem como, se afetam a eficácia vacinal de induzir uma resposta protetiva. Tais análises poderão auxiliar no entendimento do comprometimento do sistema imunológico nestes pacientes, bem como auxiliar no desenvolvimento de vacinas mais adequadas e eficientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Aguirre S, Silber AM, Brito ME, Ribone ME, Lagier CM, Marcipar IS. Design, construction, and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection. *J Clin Microbiol*. 2006 Oct;44(10):3768-74.

Aleem A, Akbar Samad AB, Slenker AK. Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19). 2022 May 12. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 34033342.

Baggio, Jussara A Oliveira et al. "Severe Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) Caused by COVID-19: A Regional Factor." "Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) Causada por COVID-19: Um Fator Regional." *Arquivos brasileiros de cardiologia* vol. 117,5 (2021): 976-977. doi:10.36660/abc.20210803

Baker D, Roberts CAK, Pryce G, Kang AS, Marta M, Reyes S, Schmierer K, Giovannoni G, Amor S. COVID-19 vaccine-readiness for anti-CD20-depleting therapy in autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol*. 2020 Nov;202(2):149-161. doi: 10.1111/cei.13495. Epub 2020 Aug 1. PMID: 32671831; PMCID: PMC7405500.

Cassaniti, I., Novazzi, F., Giardina, F., Salivaró, F., Sachs, M., Perlini, S., Bruno, R., Mojoli, F., Baldanti, F., 2020. Performance of VivaDiag™ COVID-19 IgM/IgG Rapid Test is inadequate for diagnosis of COVID-19 in acute patients referring to emergency room department. *Journal of Medical Virology*.

Costa, A. L. P.; Silva-Júnior, A. C. S.; Pinheiro, A. L. FATORES ASSOCIADOS A ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DAS DOENÇAS AUTOIMUNES. *Arq Catarin Med* 2019, 48, 92-106.

http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2018/Relatorio_PCDT_EA.pdf, acessado em 21/01/2022.

DE COCK, Diederik; HYRICH, Kimme. Malignancy and rheumatoid arthritis: epidemiology, risk factors and management. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, v. 32, n. 6, p. 869-886, 2018.

D'Silva, Kristin M.^{a,b,c}; Wallace, Zachary S.^{a,b,c} COVID-19 and rheumatoid arthritis, *Current Opinion in Rheumatology*: May 2021 - Volume 33 - Issue 3 - p 255-261 doi: 10.1097/BOR.0000000000000786.

E.J. Gamero-de-Luna, E. Gamero-Estévez, Mutaciones, variantes y cepas de SARS-CoV-2, *Medicina de Familia. SEMERGEN*, Volume 47, Issue 3, 2021, Pages 208-209, ISSN 1138-3593, <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2021.01.001>.

European Centre for Disease Prevention and Control. An overview of the rapid test situation for COVID-19 diagnosis in the EU / EEA, 2020.

Fabiola Atzeni, Andrea Doria, Mario Carrabba, Maurizio Turiel, Piercarlo Sarzi-Puttini, Potential target of infliximab in autoimmune and inflammatory diseases, *Autoimmunity Reviews*, Volume 6, Issue 8, 2007, Pages 529-536, ISSN 1568-9972, <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2007.03.009>.

Forchette L, Sebastian W, Liu T. A Comprehensive Review of COVID-19 Virology, Vaccines, Variants, and Therapeutics. *Curr Med Sci*. 2021 Dec;41(6):1037-1051. doi: 10.1007/s11596-021-2395-1. Epub 2021 Jul 9. PMID: 34241776; PMCID: PMC8267225.

FURER, Victoria et al. Immunogenicity and safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in adult patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases and in the general population: a multicentre study. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 80, n. 10, p. 1330-1338, 2021.

GOELDNER, Isabela et al. Rheumatoid arthritis: a current view. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 47, p. 495-503, 2011.

Jin, Y., Cai, L., Cheng, Z., Cheng, H., Deng, T., Fan, Y., Fang, C., Huang, D., Huang, L., Huang, Q., Han, Y., Hu, B., Hu, F., Li, B., Li, Y., Liang, K., Lin, L., Luo, L.-S., Ma, J., Ma, L.-L., Peng, Z.-Y., Pan, Y.-B., Pan, Z.-Y., Ren, X.-Q., Sun, H.-M., Wang, Y., Wang, Y.-Y., Weng, H., Wei, C.-J., Wu, D.-F., Xia, J., Xiong, Y., Xu, H.-B., Yao, X.-M., Yuan, Y.-F., Ye, T.-S., Zhang, X.-C., Zhang, Y.-W., Zhang, Y.-G., Zhang, H.-M., Zhao, Y., Zhao, M.-J., Zi, H., Zeng, X.-T., Wang, Y.-Y., Wang, X.-H., 2020. A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standard version). *Military Medical Research* 7, 1–23.

Kouzmitcheva, G.A., Petrenko, V.A., Smith, G.P., 2001. Identifying Diagnostic Peptides for Lyme Disease through Epitope Discovery. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8, 150–160. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.1.150-160.2001>

Li, Z., Yi, Y., Luo, X., Xiong, N., Liu, Y., Li, S., Sun, R., Wang, Y., Hu, B., Chen, W., Zhang, Y., Wang, J., Huang, B., Lin, Y., Yang, J., Cai, W., Wang, X., Cheng, J., Chen, Z., Sun, K., Pan, W., Zhan, Z., Chen, L., Ye, F., 2020. Development and Clinical Application of a Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. *Journal of Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/jmv.25727>

Magliulo D, Wade SD, Kyttaris VC. Immunogenicity of SARS-CoV-2 vaccination in rituximab-treated patients: Effect of timing and immunologic parameters. *Clin Immunol*. 2022 Jan;234:108897. doi: 10.1016/j.clim.2021.108897. Epub 2021 Nov 27. PMID: 34848357; PMCID: PMC8627008.

Mendes, T.A. de O., Cunha, J.L.R., Lourdes, R. de A., Luiz, G.F.R., Lemos, L.D., Santos, A.R.R. dos, Câmara, A.C.J. da, Galvão, L.M. da C., Bern, C., Gilman, R.H., Fujiwara, R.T., Gazzinelli, R.T., Bartholomeu, D.C., 2013. Identification of Strain-Specific B-cell Epitopes in *Trypanosoma cruzi* Using Genome-Scale Epitope Prediction and High-Throughput Immunoscreening with Peptide Arrays. *PLoS*

Neglected Tropical Diseases 7, e2524.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002524>

Menezes-Souza, D., Mendes, T.A. de O., Gomes, M. de S., Bartholomeu, D.C., Fujiwara, R.T., 2015. Improving Serodiagnosis of Human and Canine Leishmaniasis with Recombinant *Leishmania braziliensis* Cathepsin L-like Protein and a Synthetic Peptide Containing Its Linear B-cell Epitope. PLoS Neglected Tropical Diseases. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003426>

Ministério da Saúde. Brasil. [<https://coronavirus.saude.gov.br/>]. 2020.

Moody, R.; Wilson, K.; Flanagan, KL; Jaworowski, A.; Plebanski, M. Adaptive Immunity and the Risk of Autoreactivity in COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 8965. <https://doi.org/10.3390/ijms22168965>

OMS,2020. Organização Mundial da Saúde.
 [<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen.>]

Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L., Guo, L., Guo, R., Chen, T., Hu, J., Xiang, Z., Mu, Z., Chen, X., Chen, J., Hu, K., Jin, Q., Wang, J., Qian, Z., 2020. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Communications* 11, 1620. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>

Roongta, R., Ghosh, A. Managing rheumatoid arthritis during COVID-19. *Clin Rheumatol* 39, 3237–3244 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10067-020-05358-z>

Rong, X., Yang, L., Chu, H., Fan, M., 2020. Effect of delay in diagnosis on transmission of COVID-19. *Mathematical Biosciences and Engineering* 17,2725–2740.

Wang, C., Yu, H., Horby, P.W., Cao, B., Wu, P., Yang, S., Gao, H., Ni, M.Y., Dai, X., Liu, F., Kin, N. Van, Liem, N.T., Hien, T.T., Li, Y., Yang, J., Wu, J.T.,Zheng, Y., Leung, G.M., Farrar, J.J., Cowling, B.J., Uyeki, T.M., Li, L., 2014. Comparison of Patients Hospitalized With Influenza A Subtypes H7N9, H5N1, and 2009 Pandemic H1N1. *Clinical Infectious Diseases* 58, 1095–1103. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu053>

Zhao, J., Yuan, Q., Wang, H., Liu, W., Liao, X., Wang, X., Yuan, J., Li, T., Li, J., Qian, S., Hong, C., 2020. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clinical Infectious Diseases* published, 1–22.

VERBEKE, Rein et al. The dawn of mRNA vaccines: The COVID-19 case. *Journal of Controlled Release*, v. 333, p. 511-520, 2021.

SANMARTI, Raimon; RUIZ-ESQUIDE, Virginia; HERNÁNDEZ, Maria Victoria. LIN, J. et al. Blocking of YY1 reduce neutrophil infiltration by inhibiting IL-8 production via the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in rheumatoid arthritis. *Clinical & Experimental*

Immunology, v. 195, n. 2, p. 226-236, 2019. Current topics in medicinal chemistry, v. 13, n. 6, p. 698-704, 2013.

SCHERER, Hans Ulrich; HÄUPL, Thomas; BURMESTER, Gerd R. The etiology of rheumatoid arthritis. *Journal of autoimmunity*, v. 110, p. 102400, 2020.

Scott, L.J. Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs* 77, 1865–1879 (2017). <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0829-7>

Semerano, L., & Boissier, M. C. (2009). Les anticorps monoclonaux dans les maladies immunes inflammatoires chroniques [Monoclonal antibodies in chronic autoimmune inflammatory diseases]. *Medecine sciences: M/S*, 25(12), 1108–1112. <https://doi.org/10.1051/medsci/200925121108>.