



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA  
BAHIA FACULDADE DE MEDICINA  
DA BAHIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



## **Resposta imune humoral associada a COVID longa**

Jéssica de Jesus Silva

Orientador: Prof. Dra. Viviane Sampaio Boaventura

Dissertação apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Salvador (Bahia)  
2023

## **RESUMO**

**INTRODUÇÃO:** A COVID – 19 é uma doença causada pelo SARS-CoV-2 e provoca diferentes manifestações clínicas, desde pacientes assintomáticos até caso que necessitam de cuidados em UTI. Após o período de quatro semanas, a maioria dos acometidos se recuperam, porém há relatos de permanência dos sintomas além desse período o que começou a ser tratado como COVID longa. Com isso é necessário identificar marcadores que possam apoiar o diagnóstico ou identificar precocemente os casos do risco de desenvolver a COVID longa.

**OBJETIVO:** Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi identificar, entre moléculas relacionadas a resposta imune humoral, potenciais biomarcadores de prognóstico e diagnóstico de COVID longa. **MATERIAIS E MÉTODOS:**

Avaliamos os dados clínicos de pacientes na fase aguda e tardia subdividindo os grupos entre pacientes recuperados e pacientes que evoluíram para a COVID longa, e realizamos a dosagem de anticorpos, citocinas e quimiocinas desses pacientes na fase aguda e na tardia da doença. **RESULTADOS:** Analisamos a cinética de produção de anticorpos IgA, IgG, IgM e subclasses de IgG ao longo da progressão da doença pelo ELISA e a dosagem de citocinas e quimiocinas por Luminex e investigamos a relação desses biomarcadores quanto à progressão da doença. Com isso, tivemos níveis estatisticamente significantes de IgM anti S1 na fase aguda dos pacientes que se recuperaram da COVID – 19 e níveis maiores de IgM anti nucleocapsídeo nos pacientes que evoluíram para a COVID longa na fase tardia. Houve diferença também nos níveis de IL-27 e TNF $\alpha$  na fase aguda dos pacientes que persistiram com sintomas.

**CONCLUSÕES:** Níveis mais elevados de IgM S1 na fase aguda da COVID – 19 pode ser um bom indicador de prognóstico contra o desenvolvimento da COVID longa, assim como IL-27, TNF $\alpha$  e IgM anti nucleocapsídeo pode ser apontados como potenciais marcadores de mau prognóstico.

**Palavras-chave:** 1. COVID-19; 2. COVID longa; 3. Biomarcadores.

## SUMMARY

**INTRODUCTION:** COVID-19 is a disease caused by SARS-CoV-2 and causes different clinical manifestations, from asymptomatic patients to cases that have passed from ICU care. After the four-week period, most of those affected recovered, but there are reports of symptoms persisting beyond this period, which began to be treated as long-COVID. With this, it is necessary to identify markers that can support the diagnosis or early identify cases at risk of developing COVID-long. **OBJECTIVE:** In view of the above, the objective of this study was to identify, among clues related to the humoral immune response, potential biomarkers of prognosis and diagnosis of long-term COVID. **MATERIALS AND METHODS:** We evaluated the clinical data of patients in the acute and late phases, subdividing the groups between recovered patients and patients who evolved to long-term COVID-19, and we measured the efficacy, cytokines and chemokines of these patients in the acute and late phases of COVID-19. illness. **RESULTS:** We analyzed the kinetics of production of IgA, IgG, IgM and IgG subclasses throughout the progression of the disease by ELISA and the dosage of cytokines and chemokines by Luminex and investigated the relationship of these biomarkers with regard to disease progression. Thus, statistically significant levels of anti S1 IgM in the acute phase of patients who recovered from COVID-19 and higher levels of anti-nucleocapsid IgM in patients who evolved to long COVID in the late phase. There was also a difference in the levels of IL-27 and TNF $\alpha$  in the acute phase of patients who persisted with symptoms. **CONCLUSIONS:** Higher levels of IgM S1 in the acute phase of COVID-19 can be a good prognostic indicator against the development of long-term COVID, as well as IL-27, TNF $\alpha$  and IgM anti nucleocaps can be identified as markers of poor prognosis.

**Keywords:** 1. COVID-19; 2. Long COVID; 3. Biomarkers.

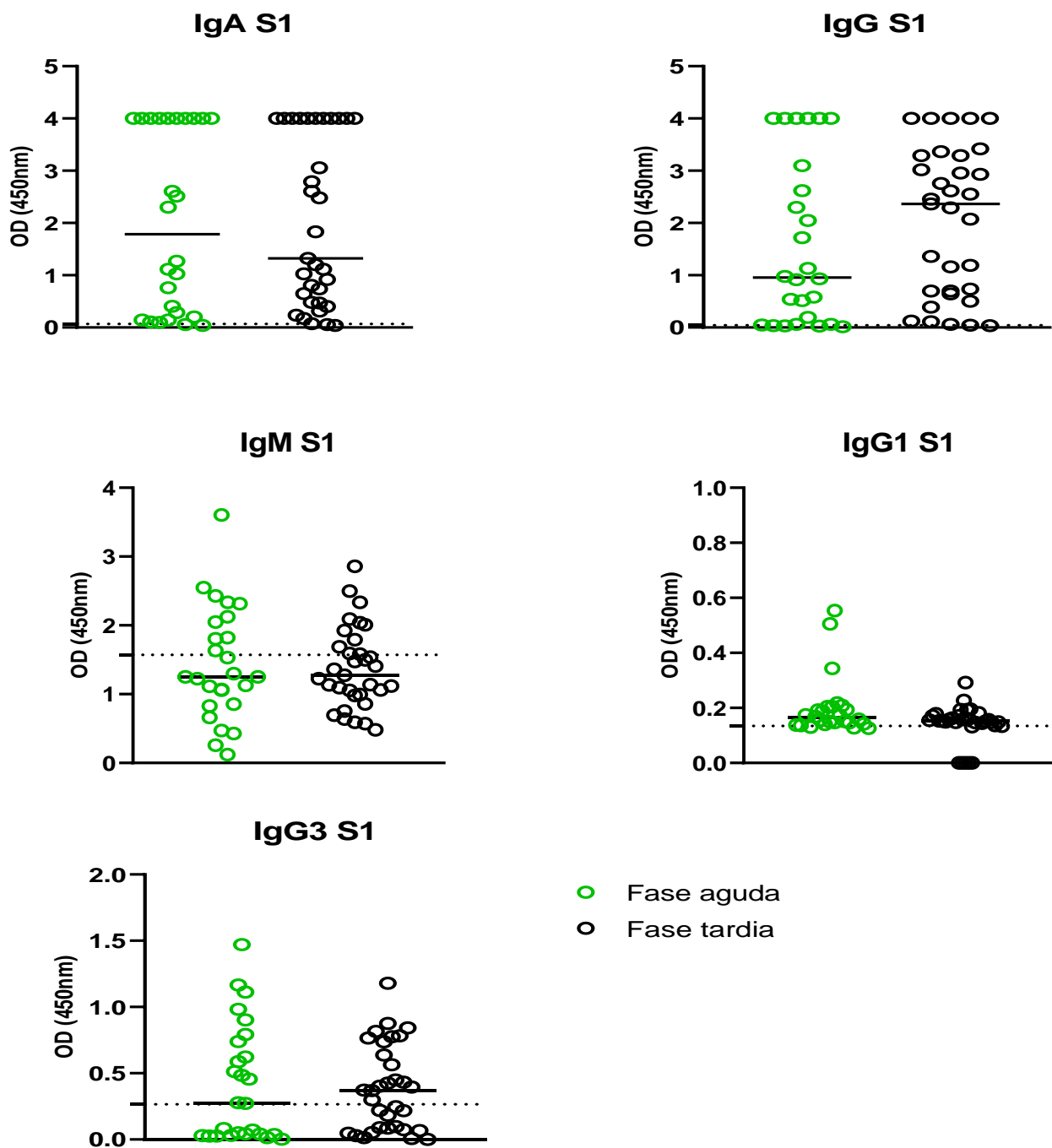
**Tabela 1** – Descrição das metodologias usadas na dosagem de anticorpos e suas respectivos resultados de sensibilidade/especificidade.

NCP				S1			
	Método para ELISA	Sensibilidade	Especificidade		Método para ELISA	Sensibilidade	Especificidade
<b>IgG</b>	In - house	62,10%	87,50%	<b>IgG</b>	EUROIMMUN REF.: EI 2606-9601-2 G	94,40%	99,60%
<b>IgA</b>	In - house	55,14%	87,50%	<b>IgA</b>	EUROIMMUN - REF.: EI 2606-9601 A	84.6%	98.3%
<b>IgM</b>	EUROIMMUN - REF.: EI 2606-9601-2 M	88.2%	98.6%	<b>IgM</b>	In - house	75,64%	77,70%
<b>IgG1</b>	In - house	55,14%	53,84%	<b>IgG1</b>	In - house	85,50%	63,63%
<b>IgG3</b>	In - house	74,68%	100%	<b>IgG3</b>	In - house	74,68%	100%

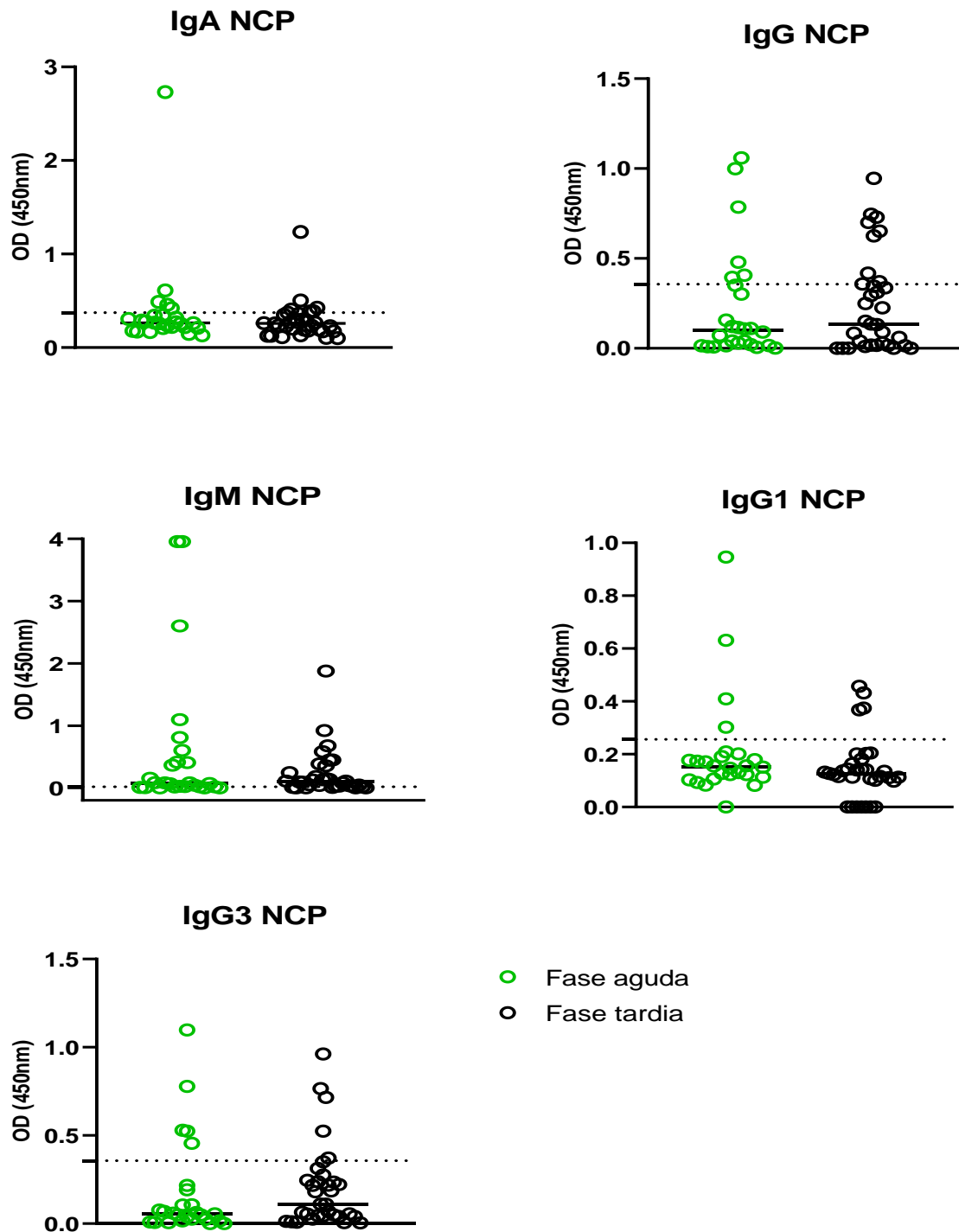
Fonte: Elaborado pela autora

**Tabela 2** - Características clínicas dos pacientes na fase aguda e na fase tardia

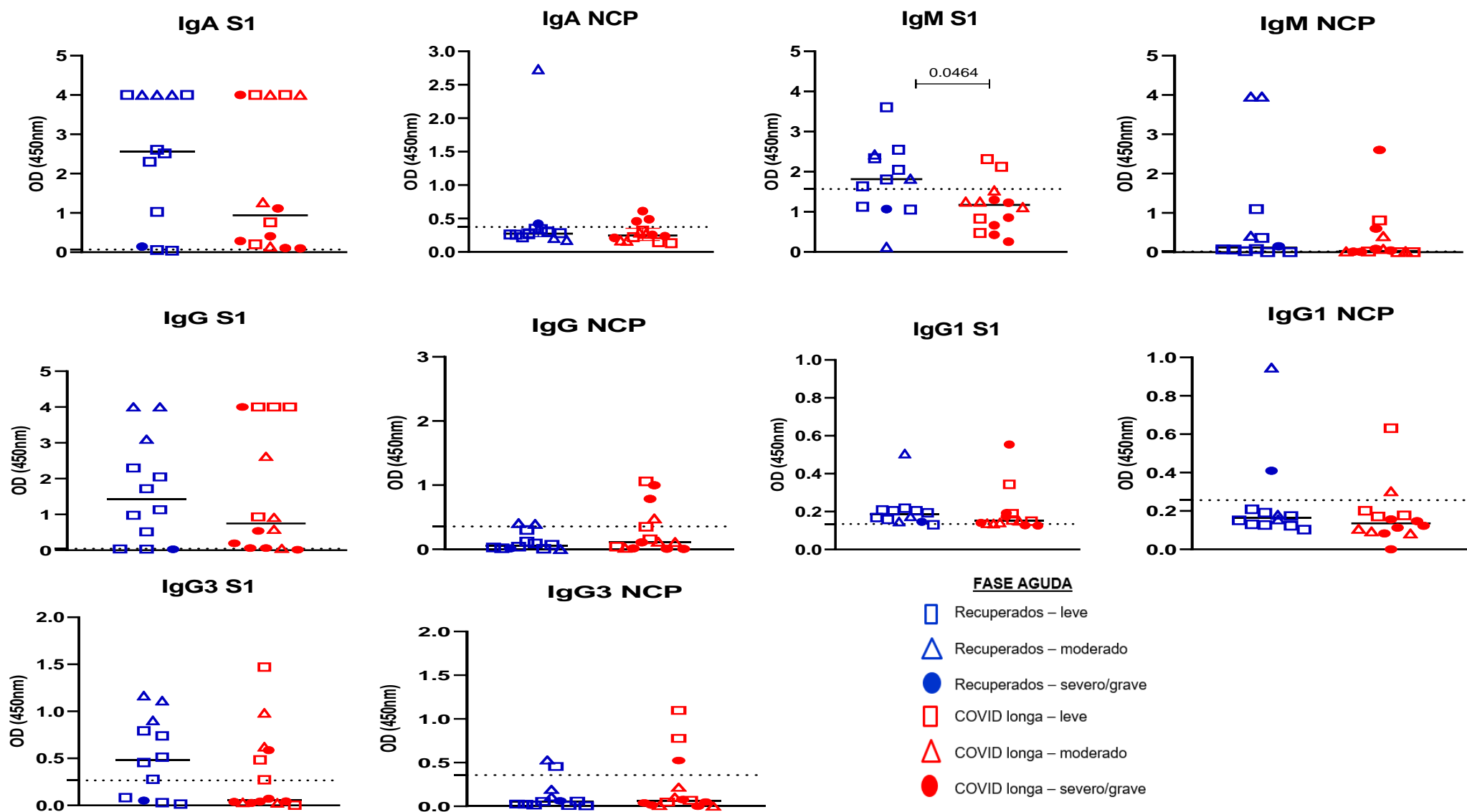
	Fase aguda (n=26)		Fase tardia (n=33)	
	Recuperados	COVID longa	Recuperados	COVID longa
<b>N</b>	12	14	14	19
<b>Sexo - Feminino (%)</b>	6 (50%)	8 (57%)	4 (29%)	11 (58%)
<b>Idade - Mediana (IQR)</b>	35 (24 - 49)	51,5 (26 - 69)	52 (34,5 - 63,5)	53 (42 - 63)
<b>Gravidade da doença</b>				
<i>Leve</i>	8 (67%)	4 (28,5%)	8 (57%)	10 (53%)
<i>Moderado</i>	3 (25%)	4 (28,5%)	6 (43%)	7 (37%)
<i>Severo/crítico</i>	1 (8%)	6 (43%)	0 (0%)	2 (10%)
<b>Tempo de início de sintomas</b>	20 (11 - 29,5)	10,5 (6 - 30)	125,5 (93,7 - 208,3)	147 (47 - 311)
<b>Comorbidades</b> <i>Sim</i>	5 (41%)	8 (57%)	6 (43%)	12 (63%)
<b>Sintomas persistentes</b>	(NA)		(NA)	
<i>Fadiga</i>		7 (50%)		11 (58%)
<i>Respiratórios</i>		10 (71%)		18 (94,5%)
<i>Sensoriais</i>		1 (7%)		4 (22%)
<i>Dor</i>		9 (63%)		17 (90%)
<i>Cognitivos</i>		6 (42%)		5 (27%)
<i>Outros</i>		8 (57%)		11 (58%)



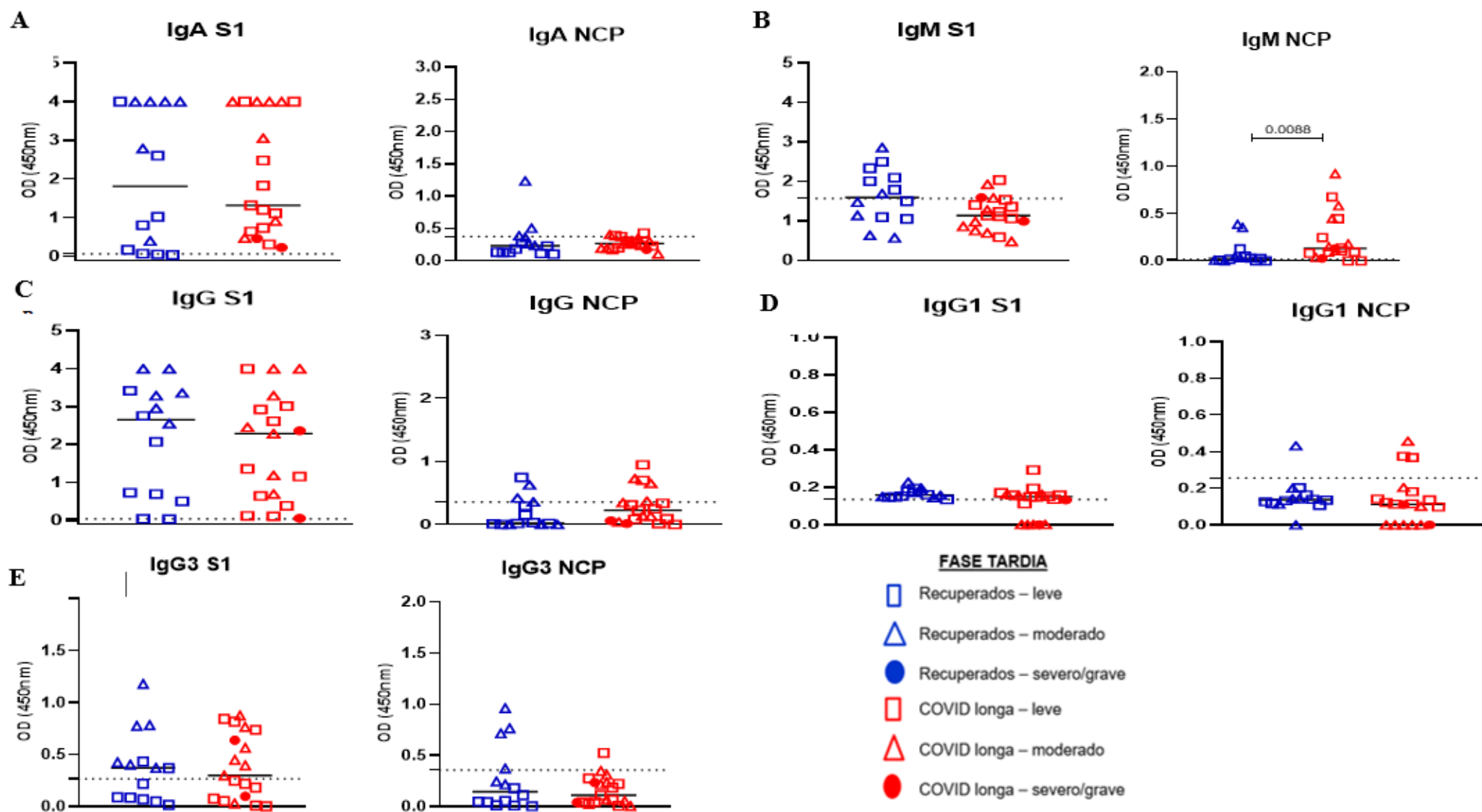
**Figura 5.** Resultados gerais da doagem de IgA, IgM, IgG e subclasses de IgG específicos para S1 contra SARS – CoV – 2 na fase aguda e tardia da COVID – 19. As dosagens da fase aguda foram feitas em amostras coletadas em até 30 dias após o início dos sintomas e na fase tardia, 10 meses de início de sintomas. Os dados foram expressos com os níveis de densidade ótica (OD) fornecidos pelo espectrofotômetro após leitura das placas. Gráficos de modelo *scatter plot* mostram os valores da mediana com intervalo interquartil e a linha tracejada indica o valor de corte. O teste estatístico aplicado foi o teste Mann-Whitney e os valores de p considerados estatisticamente significantes foram aqueles menores e iguais a 0,05.



**Figura 6.** Resultados gerais da dosagem de IgA, IgM, IgG e subclasses de IgG específicos nucleocapsídeo contra SARS – CoV – 2 na fase aguda e tardia da COVID – 19. As dosagens da fase aguda foram feitas em amostras coletadas em até 30 dias após o início dos sintomas e na fase tardia, 10 meses de início de sintomas. Os dados foram expressos com os níveis de densidade ótica (OD) fornecidos pelo espectrofotômetro após leitura das placas. Gráficos de modelo *scatter plot* mostram os valores da mediana com intervalo interquartil e a linha tracejada indica o valor de corte. O teste estatístico aplicado foi o teste Mann-Whitney e os valores de p considerados estatisticamente significantes foram aqueles menores e iguais a 0,05.

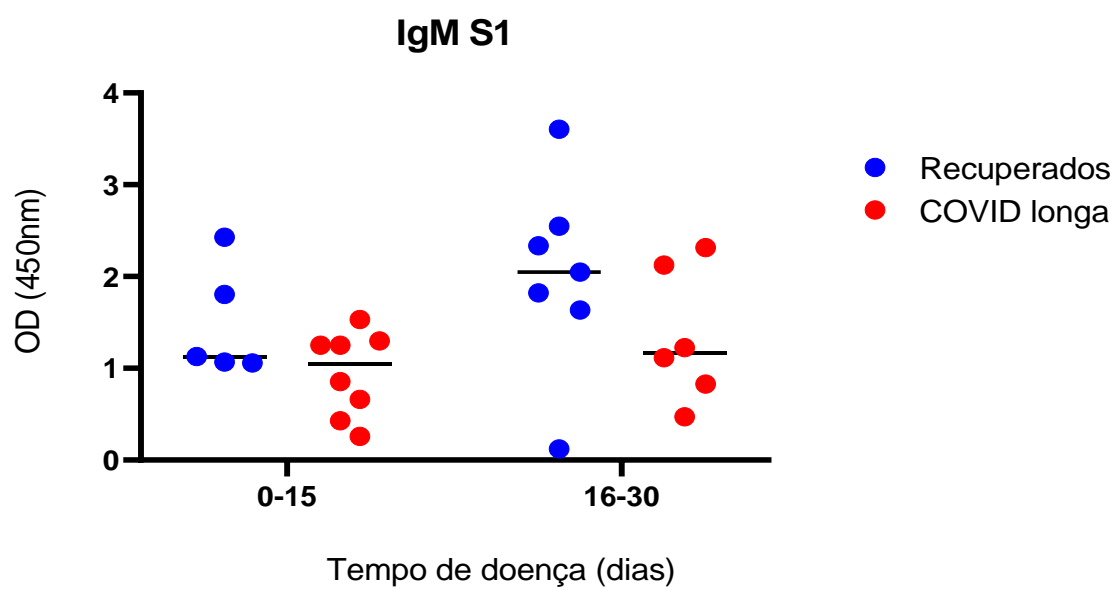


**Figura 7 – A, B, C, D e E** - Níveis de anticorpos IgA, IgM, IgG e subclasses IgG1 e IgG3 específicos para S1 e nucleocapsídeo em pacientes positivos para SARS-CoV-2 na fase aguda. As dosagens comparam os valores do grupo recuperado versus os que evoluíram para COVID longa, e foram feitas em amostras coletadas em até 30 dias de início de sintomas (mediana de 20 dias para recuperados versus 10,5 dias para pacientes que evoluíram para COVID longa). Os dois grupos também foram subdivididos em pacientes recuperados com doença leve, moderado e severo/grave, assim como pacientes com COVID longa com doença leve, moderado e severo/grave. Amostras pré pandêmicas (7 amostras) foram usadas como controle negativo para o ELISA *in-house*. Os dados foram expressos com os níveis de densidade ótica (OD) fornecidos pelo espectrofotômetro após leitura das placas. Gráficos de modelo scatter plot mostram os valores da mediana com intervalo interquartil e a linha tracejada indica o valor de corte. O teste estatístico aplicado foi o teste Mann-Whitney e os valores de p considerados estatisticamente significantes foram aqueles menores e iguais a 0,05.

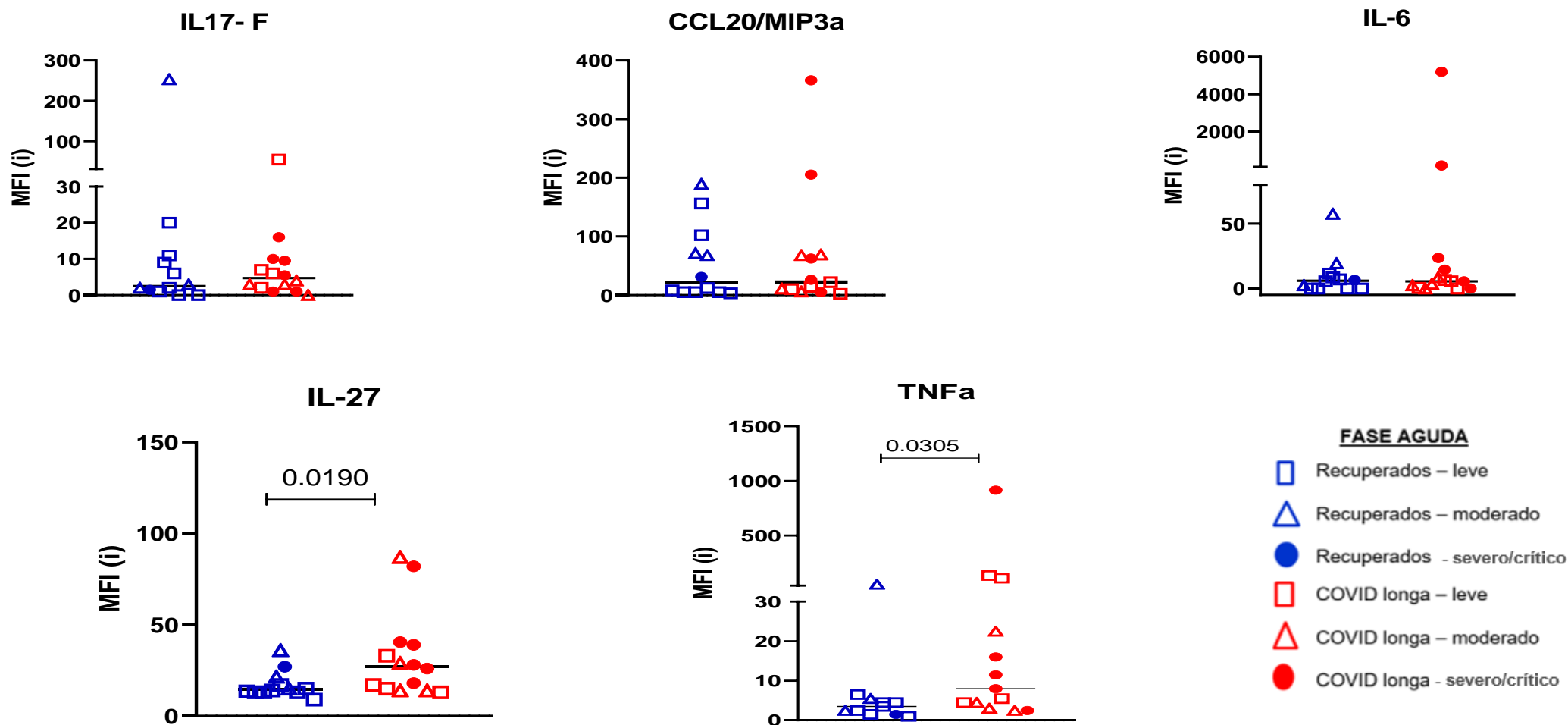


**Figura 8 – A, B, C, D e E** - Níveis de anticorpos IgA, IgM, IgG e subclasses IgG1 e IgG3 específicos para S1 e nucleocapsídeo em pacientes positivos para SARS-CoV-2 na fase tardia. As dosagens comparam os valores do grupo recuperado versus os que evoluíram para COVID longa, e foram feitas em amostras coletadas em até 10 meses de início de sintomas (mediana de 125,5 dias para recuperados versus 147 dias para pacientes que evoluíram para COVID longa). Os dois grupos também foram subdivididos em pacientes recuperados com doença leve, moderado e severo/grave, assim como pacientes com COVID longa com doença leve, moderado e severo/grave. Amostras pré-pandêmicas (7 amostras) foram usadas como controle negativo para o ELISA *in-house*. Os dados foram expressos com os níveis de densidade óptica (OD) fornecidos pelo espectrofotômetro após leitura das placas. Gráficos de modelo scatter plot mostram os valores da mediana com intervalo interquartil e a linha tracejada indica o valor de corte. O teste estatístico aplicado foi o teste Mann-Whitney e os valores de *p* considerados estatisticamente significantes foram aqueles menores e iguais a 0,05.

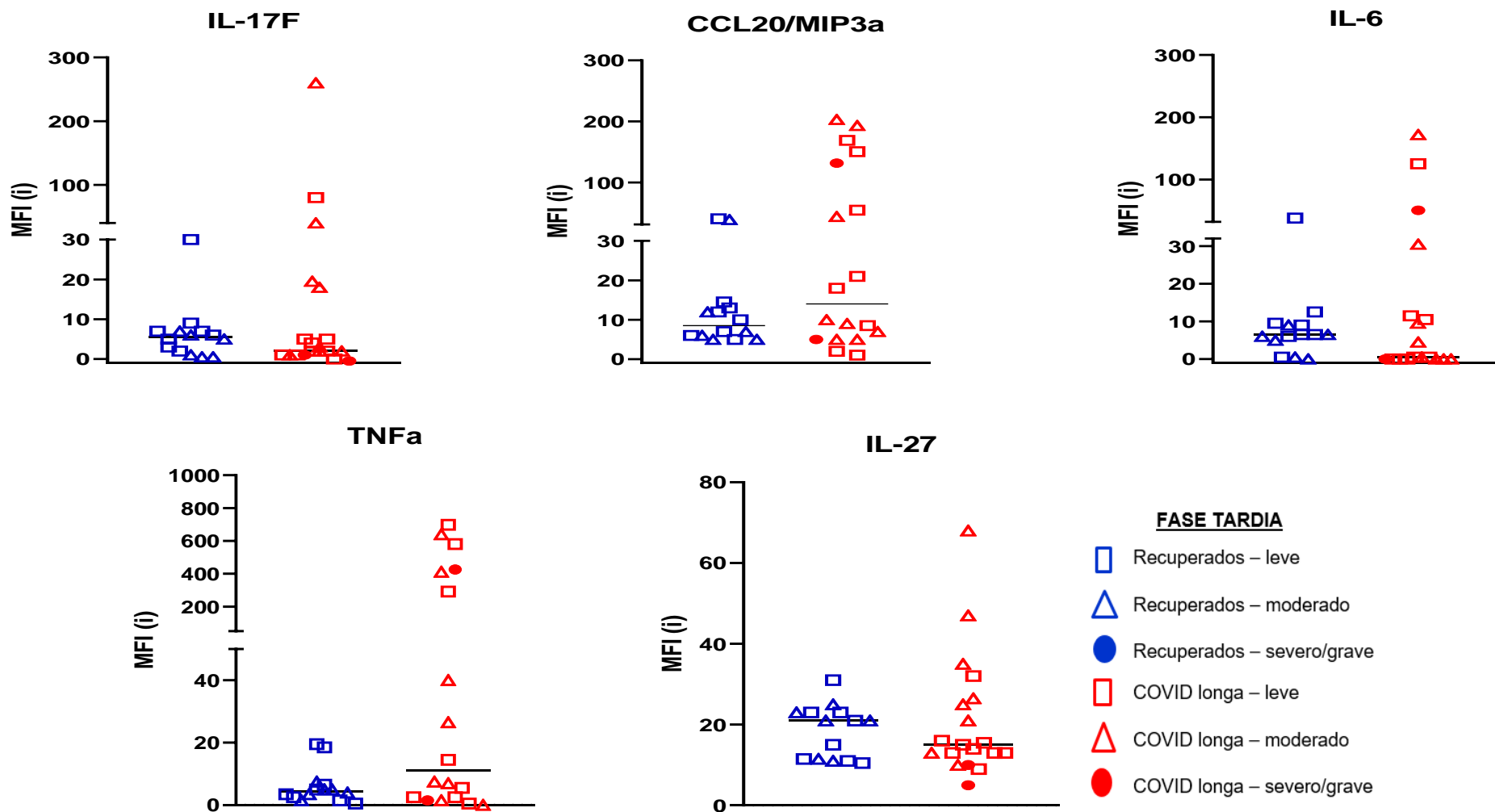




**Figura 9** - Dosagem dos níveis de anticorpo IgM específicos para S1 na fase aguda da COVID – 19 entre os pacientes recuperados e com COVID longa, comparando com o tempo médio de sintomas classificando entre 0-15 dias e 16-30 dias.



**Figura 10** – Dosagem de citocinas com níveis significativos em pacientes positivos para SARS-CoV-2 na fase aguda. As dosagens comparam os valores do grupo recuperado versus o que evoluiu para COVID longa, e foram realizadas em amostras coletadas em até 30 dias de início de sintomas (mediana de 20 dias para recuperados versus 10,5 dias para pacientes que evoluíram para COVID longa). Os dois grupos também foram subdivididos em pacientes recuperados com doença leve, moderado e severo/grave, assim como pacientes com COVID longa com doença leve, moderado e severo/grave. Os dados foram expressos com os níveis de intensidade de fluorescência fornecidos pelo leitor de placas. Gráficos de modelo scatter plot mostram os valores da mediana com intervalo interquartil. O teste estatístico aplicado foi o teste Mann-Whitney e os valores de p considerados estatisticamente significantes foram aqueles menores e iguais a 0,05. Valores que fugiam da normalidade e que causavam anomalias nos dados obtidos, foram retirados por meio da identificação de outlines no Graphpad prisma.



**Figura 11** - Dosagem de citocinas com níveis significativos em pacientes positivos para SARS-CoV-2 na fase tardia. As dosagens comparam os valores do grupo recuperado versus o que evoluiu para COVID longa, e foram realizadas em amostras coletadas em até 30 dias de início de sintomas (mediana de 125,5 dias para recuperados versus 147 dias para pacientes que evoluíram para COVID longa). Os dois grupos também foram subdivididos em pacientes recuperados com doença leve, moderado e severo/grave, assim como pacientes com COVID longa com doença leve, moderado e severo/grave. Os dados foram expressos com os níveis de intensidade de fluorescência fornecidos pelo leitor de placas. Gráficos de modelo scatter plot mostram os valores da mediana com intervalo interquartil. O teste estatístico aplicado foi o teste Mann-Whitney e os valores de p considerados estatisticamente significantes foram aqueles menores e iguais a 0,05. Valores que fugiam da normalidade e que causavam anomalias nos dados obtidos, foram retirados por meio da identificação de outliers no Graphpad prisma.