



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

SUANNE BURGOS AZEVEDO

**PERFIL DOS LINFÓCITOS DE MEMÓRIA EM
DIFERENTES PROTOCOLOS DE VACINAÇÃO
PARA A COVID-19**

SALVADOR - BAHIA

2025

SUANNE BURGOS AZEVEDO

**PERFIL DE LINFÓCITOS DE MEMÓRIA EM INDIVÍDUOS
VACINADOS PARA COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Profa. Dra. Luciana Santos Cardoso

Salvador, BA
2024

A994 Azevedo, Suanne Burgos

Perfil dos linfócitos de memória em indivíduos vacinados para Covid-19/
Suanne Burgos Azevedo. – Salvador, 2024.

81 f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Santos Cardoso.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de
Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2024.

Inclui referências e anexos.

1. SARS-CoV-2. 2. Vacinação. 3. Células T de memória. 4. Células B de
Memória. 5. Células T auxiliares foliculares. 6. Citocinas. I. Cardoso,
Luciana Santos. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 614.47

Responsável técnica Maria de Fátima Mendes Martinelli – CRB/5-551
Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA-SIBI



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

TERMO DE APROVAÇÃO

A DISSERTAÇÃO:

"PERFIL DOS LINFÓCITOS DE MEMÓRIA EM INDIVÍDUOS VACINADOS PARA A COVID-19"

Elaborada por:

SUANNE BURGOS AZEVEDO.

Foi aprovada por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Imunologia como requisito parcial à obtenção do título de **MESTRE**.

Salvador, Bahia, 31 de outubro de 2024.

BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCIANA SANTOS CARDOSO
Data: 22/03/2025 16:32:38-0300
Verifique em <https://validar.id.gov.br>

Profa. Dra. Luciana Santos Cardoso (Orientadora)
Universidade Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente
gov.br LÉA CRISTINA DE CARVALHO CASTELLUCCI
Data: 21/03/2025 09:02:55-0300
Verifique em <https://validar.id.gov.br>

Profa. Dra. Léa Cristina de Carvalho Castellucci
Universidade Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente
gov.br CARINA CARVALHO DOS SANTOS
Data: 21/03/2025 09:03:00-0300
Verifique em <https://validar.id.gov.br>

Profa. Dra. Carina Carvalho dos Santos
Faculdade de Farmácia-Universidade Federal da Bahia

Dedico este trabalho a minha avó Hilda que por
ventura da vida não está presente para me ver
concluí-lo, porém sei que estará sempre comigo
em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por não ter me deixado fraquejar em nenhum momento. A minha familia pelo apoio e dedicação, destaco aqui minha mãe, Selma da Silva Burgos e minha irmã Hanna Gabriela Burgos da Silva, por me apoiarem e estarem do meu lado em todos os momentos da minha vida, amo vocês! E meus amigos que estiveram durantetodo esse periodo me apoiando e me dando força para continuar.

Gostaria de agradecer também a Dra. Luciana Santos Cardoso pelo projeto e orientação. Aprendi muito nesses anos que estive no laboratorio e recebi muita atenção e compreensão durante esse tempo do desenvolvimento do trabalho, ela esteve em todas as etapas de desenvolvimento desse estudo e não me deixou desamparda me apoiando e ajudando em todas dificuldades que eu tive.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, em especial Jordana Batista e Pergentino Neto que me ajudaram a terminar toda parte experimental do trabalho, e aos meus colegas do Serviço de Imunologia (SIM) do HUPES que me auxiliaram também e ao SIM como todo, emdestaque o professor Dr. Paulo Machado e Dr. Edgar Carvalho.

Agradeço ao corpo docente e discente do Programa de pós-graduação de Imunologia, aprendi muito com todos aqueles que passaram pelo meu caminho durante esse período.

Agradeço também a agencia de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxilio financeiro fornecido durante o Mestrado.

“A maior recompensa pelo nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma”.

John Ruskin

RESUMO

A COVID-19 é uma doença que teve seu início na cidade de Wuhan, na China, e rapidamente se alastrou por todo o mundo levando a Organização Mundial de Saúde a declarar pandemia em Março de 2020. Devido ao grande numero de óbitos registrados pela doença, o avanço científico em busca de formas de prevenção e tratamento contra o SARS-CoV-2 levou ao desenvolvimento de diferentes plataformas de vacina. Pesquisas avaliando a eficácia das vacinas após a imunização mostraram diferentes resultados quanto a resposta induzida pela vacinação devido as diferentes vacinas disponíveis. Com isso, entender melhor sobre a resposta imune celular em diferentes protocolos é importante para entender melhor sobre a resposta induzida pela vacina. Nosso objetivo nesse trabalho foi avaliar o perfil de linfócitos T e B de memória e T foliculares em indivíduos vacinados para a COVID-19. Coletamos amostras de sangue periferico de 12 indivíduos vacinados para COVID-19 , separamos as celulas monocleares e cultivamos com antígeno RBD do SARS-CoV-2 as culturas, e avaliamos os linfócitos T e B de memória e T foliculares por citometria de fluxo. Além disso, foram avaliados os níveis de IFN- γ e IL-10 no sobrenadante das culturas por ELISA. Como resultado, encontramos maiores freqüencias de celulas T EMRA e T EM nos participantes vacinados e nos subgrupos também (homólogo, heterólogo, 3 e 4 doses). Encontramos maior expressão de IFN- γ e TGF- β pelas celulas T EM, e maiores níveis de IL- 10 e IFN- γ no sobrenadante das culturas estimuladas nos participantes vacinados. Nossos resultados sugerem que independente do esquema vacinal, a resposta imune é semelhante e efetora.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; Vacinação; Células T de Memória; Células B de Memória; Células T Auxiliares Foliculares; Citocinas

ABSTRACT

COVID-19 is a disease that began in the city of Wuhan, China, and quickly spread across the world, leading the World Health Organization to declare a pandemic in March 2020. Due to the high number of deaths caused by the disease, scientific advancements in the search for prevention and treatment methods against SARS-CoV-2 led to the development of different vaccine platforms. Research evaluating the efficacy of vaccines after immunization showed varying results regarding the immune response induced by vaccination, due to the different vaccines available. Therefore, understanding more about the cellular immune response under different protocols is important to better comprehend the vaccine-induced response. Our objective in this study was to evaluate the profile of memory T and B lymphocytes and follicular T cells in individuals vaccinated against COVID-19. We collected peripheral blood samples from 12 vaccinated individuals, separated mononuclear cells, cultured them with the SARS-CoV-2 RBD antigen, and analyzed the memory T and B lymphocytes and follicular T cells using flow cytometry. Additionally, levels of IFN- γ and IL-10 in the culture supernatants were measured by ELISA. As a result, we found higher frequencies of EMRA and EM T cells in vaccinated participants and across subgroups (homologous, heterologous, 3 and 4 doses). We observed increased expression of IFN- γ and TGF- β by EM T cells, as well as higher levels of IL-10 and IFN- γ in the supernatants of stimulated cultures from vaccinated participants. Our results suggest that, regardless of the vaccination protocol, the immune response is similar and effective.

Keywords: SARS-CoV-2; Vaccination; Memory T Cells; Memory B Cells; T Follicular HelperCells; Cytokines

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

ANIVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CGs - centros germinativos

COVs - família Coronaviridae

ECA2 - enzima conversora de angiotensina 2

NAb - anticorpos neutralizantes

OMS - Organização Mundial de Saúde

PRR - Receptores de reconhecimento padrão

RBD - domínio de ligação ao receptor

S - glicoproteína Spike

SDRA - síndrome do desconforto respiratório agudo

T_{CM} - células T de memória central

T_{EM} - as células T efetoras de memória

T_{EMRA} - células T de memória efetora terminalmente diferenciada

T_{FH} - células T foliculares circulantes

T_{NAIVE} - células T naive

T_{PH} - celulas T foliculares periferias

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	COVID-19	12
2.2	Resposta imune humoral e das células de memória na infecção e vacinação da COVID-19	13
2.3	Vacinas para COVID-19 no Brasil	17
3	HIPÓTESES E OBJETIVOS	22
4	PERFIL DOS LINFÓCITOS DE MEMÓRIA EM DIFERENTES PROTOCOLOS DE VACINAÇÃO PARA A COVID-19	23
4.1	INTRODUÇÃO	23
4.2	METODOLOGIA	27
4.2.1	População do estudo	27
4.2.2	Separação e cultura de células mononucleares do sangue periférico dos indivíduos vacinados e convalescentes para COVID-19	29
4.2.3	Avaliação do fenótipo de linfócitos T e B de memória, células T foliculares circulantes e citocinas por citometria de fluxo	29
4.2.4	ELISA no sobrenadante das culturas de células	31
4.2.5	Análises estatísticas	32
4.2.6	Considerações éticas e de biossegurança	32
4.3	RESULTADOS	34
4.3.1	Dados demográficos	34
4.3.2	Subpopulações dos linfócitos T de memória em indivíduos vacinados para o SARS-CoV-2	36
4.3.3	Perfil de linfócitos B de memória e T foliculares específicos para o antígeno RBD do SARS-CoV-2	37
4.3.4	Determinação dos níveis de IL-10 e IFN-γ no sobrenadante das culturas de CMSp	38
4.3.5	Frequência das subpopulações de linfócitos T de memória específicos para o antígeno RBD do SARS-CoV-2	39
4.3.6	Expressão intracelular de citocinas nas células de memória estimuladas com antígeno RBD	40
4.3.7	Perfil das subpopulações de linfócitos T de memória na vacinação homóloga e heteróloga	41
4.3.8	Expressão intracelular de citocinas nas células de memória estimuladas com antígeno RBD na vacinação homóloga e heteróloga	42
4.3.9	Perfil de linfócitos B e células de memória T folicular na	43

	vacinação homóloga e heteróloga	
4.3.1.1	Determinação dos níveis de IL-10 e IFN-γ no sobrenadante das culturas na vacinação homóloga e heteróloga	44
4.3.1.2	Perfil de da subpopulações de linfócitos T de memória na vacinação com 3 e 4 doses	45
4.3.1.3	Expressão intracelular de citocinas nas células de memória estimuladas com antígeno RBD na vacinação com 3 e 4 doses	46
4.3.1.4	Perfil de linfócitos B e celulas T folicular nos diferentes na vacinação com 3 e 4 doses	47
4.3.1.5	Determinação dos níveis de IL-10 e IFN-γ no sobrenadante das culturas na vacinação com 3 e 4 doses	48
5	DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
	ANEXOS	66

1. INTRODUÇÃO GERAL

Na cidade de Wuhan, na China, foram registrados os primeiros casos de uma infecção respiratória causada por um vírus, o SARS-CoV-2, agente responsável pela COVID-19. Trata-se de um Betacoronavírus (HARRISON, et al; 2020), que se espalhou rapidamente em todo mundo levando a Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarar pandemia em março de 2020 (OMS, 2020). Os indivíduos infectados podem apresentar desde sintomas leves, até a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e inflamação não controlada, que pode estender a falência de múltiplos órgãos. A gravidade da doença está relacionada a uma desregulação do sistema imunológico que prejudica a erradicação do vírus (BAKHIET; TAURIN, 2020). Até o início de novembro de 2022, foram registrados mais de 695.000.000 casos confirmados de COVID-19 e mais de 6.800.000 mortes no mundo (Coronavírus última situação (Covid-19) | TRT Português, [s.d.]), sendo no Brasil foram confirmados mais de 37.000.000 casos e 700.000 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE; 2024).

Em 2002 e em 2012, respectivamente, outras duas espécies de coronavírus levaram a duas epidemias, a síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) na China, e no Oriente Médio a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), ambos patógenos zoonóticos e semelhantes ao SARS-CoV-2 (HU, et al; 2020). Embora a similaridade entre as espécies, o SARS-CoV-2 tem uma maior taxa de transmissão (HARRISON, et al; 2020). Sua transmissão ocorre principalmente pelas vias respiratórias, ainda que tenha sido detectado no trato gastrointestinal, saliva e urina, que seriam possíveis vias de contágio, onde o vírus entra em contato com outros indivíduos e inicia seu processo infeccioso (GUAN et al., 2020).

Após a contaminação, o SARS-CoV-2 inicia seu processo de infecção celular através de uma das proteínas estruturais presentes em sua superfície, a *spike* (S) (HARRISON, et al; 2020). A fusão do vírus com as células ocorre através da ligação entre uma das subunidades da proteína S (o domínio de ligação ao receptor, também conhecido como RBD) com a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (KIRTIPAL, 2020), receptor expresso em diversas células

nos humanos, que participa da regulação do sistema renina-angiotensina (GHEBLAWI et al., 2020). Esse mecanismo de infecção leva ao processo de replicação viral e acaba desencadeando uma resposta imunológica com intuito de erradicar o vírus do organismo (KIRTIPAL, 2020).

A resposta imune eficaz contra o vírus é dependente principalmente da expressão de interferons tipo I e III, contudo, o SARS-CoV-2 inibe a expressão dessas citocinas com o intuito de escapar do sistema imune, prejudicando a resposta imune inata efetiva (GUSEV et al, 2022). A resposta imune celular atua contra o vírus e se mostra eficiente no combate a COVID-19, onde os linfócitos T respondem a抗ígenos específicos desenvolvendo uma resposta positiva realizada pelas linfócitos T CD4⁺ que recrutam outras células do sistema imunológico, e ativando linfócitos T CD8⁺ que eliminam diretamente as células infectadas através da citotoxicidade específica (BOECHAT et al., 2021). Os linfócitos B participam da resposta imune celular e humoral, pois se diferenciam em plasmócitos e começam a secretar anticorpos específicos para neutralizar o vírus, juntamente com as células T foliculares circulantes (T_{FH}) que estimulam a produção de anticorpos de alta afinidade (TORBATI et al.; 2021).

Ao decorrer da pandemia, diferentes plataformas de vacina foram desenvolvidas para combater a COVID-19, mostrando sua eficiência e proteção (CAI et al., 2021), e a Organização Mundial da Saúde (OMS) avaliou e autorizou o início de estudos clínicos em diversas categorias, incluindo vacina inativada, vacina atenuada, vacina vetorial, RNA e DNA, subunidades proteicas e vacinas com partículas semelhantes a vírus (LI et al., 2022). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou quatro vacinas que foram disponibilizadas à população: CoronaVac, ChAdOx1 nCoV-19 (AztraZeneca), BNT162b2 (Pfizer-Biontech) e Ad26.Com V2.Janssen (PAULA et al., 2022). Entretanto estudos mostram que a imunidade obtida por meio da vacinação de duas doses contra a COVID-19 declinou com o tempo, resultando em uma proteção reduzida sugerindo a necessidade de uma dose extra (WILDER-SMITH; MULHOLLAND, 2021). Ademais, os métodos heterólogos de imunização podem ser uma alternativa quando a disponibilidade de vacinas é limitada (AU; CHEUNG, 2022), portanto, é crucial compreender mais profundamente a resposta imunológica de memória que ocorre nos indivíduos imunizados com diversas plataformas de vacina.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 COVID-19

A família Coronaviridae (COVs) é composta por diferentes linhagens de vírus que possuem a capacidade de infectar mamíferos e algumas espécies de aves (V'KOVSKI et al; 2021). Uma das classificações de gênero deste agrupamento são os Betacoronavirus, grupo em que encontramos patógenos como SARS-CoV e MERS-CoV, que podem levar ao desenvolvimento de infecções no trato respiratório (GORBALENYA et al.; 2020). No final do ano de 2019, um novo vírus pertencente a mesma família, foi descrito como agente etiológico da COVID-19, o SARS-CoV-2. Os primeiros casos foram registrados em indivíduos na província de Hubei, em sua capital Wuhan, China. Os pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 apresentavam febre, dispneia, tosse e infiltração pulmonar, entre outros sintomas que se assemelhavam à pneumonia. (HU et al;2021). Devido a sua alta taxa de transmissão e o surgimento de casos em diversos países, a Organização Mundial de Saúde declarou pandemia em Março de 2020 (MURALIDAR et al., 2020). Até setembro de 2023 mais de 695.000.000 de casos foram registrados no mundo, sendo mais de 6.000.000 de mortes confirmadas pela COVID-19 (TRT, 2023). O Brasil é o quinto país com o maior número de casos registrados, sendo mais de 37.783.855 milhões de casos confirmados e mais de 705.000 óbitos pela doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

Mesmo semelhante a outros vírus, o SARS-CoV-2 tem sua estrutura e características individuais que influenciam na sua forma de infecção e transmissão. É um vírus de RNA fita simples sentido positivo, com quatro proteínas estruturais importantes para seu processo de replicação e formação, a glicoproteína de membrana (M), a glicoproteína do nucleocapsídeo (N), a glicoproteína do envelope (E) e a glicoproteína Spike (S), (GUSEV, E et al. 2022). A proteína N está fosforilada junto ao genoma do vírus, enquanto a proteína M e E estão ligadas ao envelope viral (KIRTIPAL, 2020). A proteína

Spike (S) é responsável por mediar a entrada do vírus na célula do hospedeiro e para desenvolver essa função, é clivada pela protease semelhante à furina (TMPRSS2) em duas subunidades (S1 e S2) que têm a função, respectivamente, de intermediar a ligação com as células e induzir a fusão das membranas celular e viral (YANG H. RAO Z.; 2021). A subunidade S1 é dividida em dois domínios o N-terminal (NTD) e o domínio de ligação ao receptor (RBD), sendo o RBD responsável pela ligação ao receptor da enzima conversora de angiotensina humana 2 (ECA2) presente nas células do hospedeiro e a partir dessa ligação inicia o processo de infecção das células (YANG H. RAO Z.; 2021), sendo a principal estrutura que desencadeia respostas imunológicas (WANG MY, et al. 2020). Sua conformação muda ‘para cima’ a fim de tornar-se disponível para o acesso do receptor e ‘para baixo’ para impossibilitar a ligação. (JACKSON CB, et al. 2022). A partir desse contato, a infeciosidade é determinada e, posteriormente, o SARS-CoV-2 segue por dois caminhos para a entrada na célula, ou pela fusão direta das membranas ou por endocitose (KIRTIPAL, 2020).

Antes do processo de infecção celular e depois da infecção estabelecida, o sistema imune inato é ativado e inicia sua resposta. Receptores de reconhecimento padrão (PRR) reconhecem células infectadas e ativam cascatas de sinalização celular que promovem a secreção de citocinas inflamatórias e antivirais (MAISON D. DENG Y. GERSCHENSON M; 2023). O sistema imune adaptativo também é ativado através da apresentação de抗ígenos para células B e linfócitos T pelo do MHC de classe I e II, e mantém essa resposta sustentada pela secreção de citocinas como IFN- γ , IL-2 e IL-4 (D PRIMORAC; et al, 2022). Com esse estímulo, os linfócitos T têm um importante função antiviral sistêmica, participam da ativação de linfócitos B por meio das células T foliculares (TFH) (Z CHEN ; E. JOHN WHERRY; 2020). Os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos de vida curta, entram nos linfonodos e passam por um processo de maturação e afinidade onde secretam anticorpos capazes de auxiliar no combate a infecções e proteger de infecções posteriores (K. RÖLTGEN; D. SCOTT; 2021). Todo esse processo de reconhecimento e ativação do sistema imune estabelece uma resposta de memória após a infecção, capaz de responder a uma segunda exposição ao vírus e proteger contra as reinfecções.

(MITTELSTAEDT N; et al. 2021)

2.2 Resposta imune humoral e das células de memória na infecção e vacinação da COVID-19

Tanto a imunidade humoral quanto a imunidade celular estão envolvidas na imunopatogênese da COVID-19 (NI et al; 2020). Entre as células do sistema imune que desempenham importante papel na infecção pelo SARS-CoV-2, estão as células de memória (SETTE; CROTTY, 2020). A indução de memória específica para SARS-CoV-2 por células B é importante na proteção contra reinfecções a curto e longo prazo (COX; BROKSTAD, 2020). Rodda e colaboradores mostraram a persistência de células B de memória específicas para SARS-CoV-2 no período de 1 a 3 meses do início dos sintomas em indivíduos que tiveram COVID-19 leve, além de apresentar um aumento ao longo do tempo e características funcionais (RODDA et al., 2021). Em outro estudo com indivíduos que tomaram vacinas de mRNA, foi observado a persistência de células B de memória funcional que duraram por 6 meses e responderam a variantes do vírus (GOEL et al., 2021). Newell e colaboradores mostraram uma correlação negativa entre a frequência de células B de memória do sangue periférico e a duração dos sintomas clínicos em indivíduos convalescentes. Esses mesmos autores mostraram ainda que células B de memória ($\text{IgM}^+ \text{ CD24}^+ \text{ naive}^{\text{neg}}$) se correlacionaram diretamente com as respostas de anticorpos específicos do vírus que permaneceram estáveis ao longo do tempo (NEWELL et al., 2021).

Outra célula que também contribui na imunopatogênese da COVID-19 são as células T. Em um estudo com indivíduos que tomaram diferentes tipos de vacina, avaliados no período de 5-6 meses após a vacinação, observou-se que as células T respondiam de forma efetiva as variantes do SARS-CoV-2, porém o reconhecimento mediado por células B foi reduzido na variante Omicron (TARKE et al., 2022). Colaborando com o resultado descrito anteriormente, outro estudo observou o aumento precoce de células T específicas para SARS-CoV-2 em pacientes com a doença leve (TAN et al., 2021). Zhao e colaboradores mostram que a indução de células T CD4^+ específicas contra epítópos compartilhados

entre MERS-CoV e SARS-CoV mostrou-se efetiva e protetora (ZHAO et al, 2016). Experimentos com macaco *Rhesus* convalescentes que tiveram células T CD8⁺ depletadas mostraram uma redução na efetividade da resposta imune quando submetidos a uma segunda exposição ao SARS-CoV-2 (MACMAHAN et al, 2021). Rodda e colaboradores mostraram que indivíduos recuperados que apresentaram sintomas leves foram capazes de desenvolver células T de memória que não só persistiram, mas em alguns casos aumentaram numericamente ao longo de três meses após o início dos sintomas. Além disso, os linfócitos de memória específicos para SARS-CoV-2 exibiram características associadas à imunidade antiviral potentes produzindo IFN-γ e expandindo após reencontro com抗ígenos (RODDA et al., 2020). Usando pools de peptídeos de HLA-classes I e II, Grifoni e colaboradores avaliaram as respostas das células T CD4⁺ e CD8⁺ em indivíduos convalescentes não hospitalizados. Eles encontraram que todos os indivíduos recuperados estabeleceram respostas de T CD4⁺ de memória e 70% estabeleceram respostas de memória CD8⁺ ao SARS-CoV-2 (GRIFONI et al. 2020). Peng e colaboradores mostraram que existe uma proporção maior dos linfócitos de memória T CD8⁺ específicos para proteína Spike (em vez de CD4⁺) nos indivíduos com doença leve em comparação com aqueles que desenvolveram a doença grave (Peng et al., 2020). Entretanto, este mesmo estudo mostrou que existem proporções mais altas de células T CD4⁺ capazes de produzir mais de uma citocina (INF-γ, TNF-α, IL-2) do que células T CD8⁺ (PENG et al., 2020).

As células T foliculares são importantes na ativação de linfócitos B e na produção de anticorpos no centro germinativo (KRAWCZYK et al., 2007) e a sua participação na resposta imune ao SARS-CoV-2 também merece atenção. Com isso, foi realizada uma avaliação dessas células em pacientes infectados com SARS-CoV-2 e sua presença foi detectada em 100% dos indivíduos participantes, e sua persistência pelo período de seis meses (JORDAN, 2021). Junto a isso, resultados de um estudo que avaliou indivíduos que tomaram a vacina de mRNA mostram células T _{FH} específicas para o SARS-CoV-2 no linfonodo humano após a vacinação. (MUDD et al., 2022). Uma avaliação de células T CD4⁺ em indivíduos recuperados e sem contato prévio com o vírus, mostrou uma indução robusta da subpopulação de células T _{FH} e Th1 específicas

de antígeno após a vacinação em ambos os grupos (PAINTER, Mark M. et al. 2021). Estudo de observação prospectiva de uma paciente com a forma leve da doença, mostrou um aumento do número de células T auxiliares foliculares, células T CD4⁺ ativadas, assim como aumento do título de anticorpos específicos no sangue antes mesmo da resolução dos sintomas (THEVARAJAN et al., 2020). Em um outro estudo avaliando o perfil de linfócitos de pacientes convalescentes da COVID-19, Sekine e colaboradores mostraram que as células T CD4⁺ específicas para抗ígenos da superfície viral do SARS-CoV-2 foram polarizadas em direção a um perfil de auxiliar folicular T circulante (cT_{FH}), sugerindo um papel fundamental na geração de respostas de anticorpos específicos, enquanto as células T CD4⁺ específicas do nucleocapsídeo do vírus foram direcionadas a um perfil Th1 ou Th1/Th17 (SEKINE et al., 2020). Kaneko e colaboradores mostraram ao avaliar cortes histológicos de paciente que morrem por COVID-19 que os centros germinativos (CGs) dos linfócitos B estavam amplamente ausentes durante a fase aguda do COVID-19. A falta de CGs foi acompanhada pela ausência de células B que expressam BCL6 ou células T_{FH}, que são indispensáveis para a geração de CGs (KANEKO et al., 2020).

Devido ao pouco tempo de circulação do vírus dentro da população, as informações sobre a duração de anticorpos ainda não estão totalmente estabelecidas. Já foi descrito o declínio de anticorpos após a soroconversão de indivíduos assintomáticos e que apresentaram sintomas leves. (SEOW et al., 2020). Em outro estudo, houve uma redução do nível de anticorpos neutralizantes (NAb) no período de 1 a 4 meses após o início dos sintomas (CRAWFORD et al., 2020), diminuição que também foi relatada por Haveri e colaboradores, que indicaram que a proteção mediada por Nabs pode ser prejudicada, principalmente depois de uma doença leve (HAVERI A. et al.;2021), o que pode acabar prejudicando a resposta pelo sistema imune. Em contrapartida, uma avaliação longitudinal no período de 6 meses identificou a persistência de anticorpos neutralizantes em mais de 85% dos indivíduos participantes do estudo (NOH J Y et al, 2021). Com base nessas informações, compreender melhor sobre a resposta imunológica ao SARS-CoV-2 é necessário, principalmente sobre a resposta imune celular que pode garantir a proteção da população independente da resposta humoral.

2.4 Vacinas para COVID-19 no Brasil

A necessidade de proteger a população e prevenir a propagação do SARS-CoV-2, incentivou a busca para entender melhor as características do vírus e desenvolver intervenções como, um tratamento eficaz e vacinação da população. A partir disso, a divulgação de informações como o sequenciamento do genoma viral e a colaboração entre indústrias farmacêuticas, permitiu o avanço na produção de vacinas contra a COVID-19 (JL GOLOB, et al; 2021). Diferentes estudos divulgaram progresso em ensaios pré-clínicos de vacinas contra o SARS-CoV e MERS-CoV, que colaboraram com uma redução no tempo de desenvolvimento das vacinas contra o SARS-CoV-2, devido a semelhanças entre os vírus (SU; DU; JIANG, 2020). Com isso, diferentes plataformas de vacinas começaram seu desenvolvimento, e a Organização Mundial de Saúde (OMS) analisou e aprovou o início de ensaios clínicos em diferentes categorias, vacina inativada, vacina atenuada, vetorial, RNA e DNA, subunidade proteica e vacinas de partículas semelhantes ao vírus (LI et al., 2022). No Brasil, quatro tipos de vacina foram aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e distribuídas entre a população, a CoronaVac, ChAdOx1 nCoV-19 (AztraZeneca), BNT162b2 (Pfizer-Biontech) e Ad26.COV2.S (Janssen). Até setembro de 2023 cerca de 1.028.000 indivíduos tomaram a 3º dose de reforço completando o esquema vacinal em todos os estados do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023b).

A CoronaVac® é uma vacina de vírus inativada desenvolvida pela Sinovac Biotech aprovada pela OMS para uso emergencial em junho de 2021. Em 17 de março de 2022, foram administradas mais de dois bilhões de doses da CoronaVac em 52 nações e jurisdições, sendo a maioria delas regiões de baixa ou média renda. Portanto, a vacina CoronaVac tem desempenhado um papel crucial no enfrentamento da pandemia de COVID-19 (JIN et al., 2022). Sua eficácia foi relatada em um estudo de fase 3, randomizado, aleatório e sob controle de placebo, onde voluntários vacinados de 18 a 59 anos, sem antecedentes de COVID-19 e com exames de PCR negativos, demonstraram que CoronaVac® possui alta efetividade contra o desenvolvimento de sintomas

da COVID-19, além de um perfil seguro e tolerável (TANRIOVER et al., 2021). Em outro estudo, resultados promissores da vacina de vírus inativado mostraram que a CoronaVac pode estimular uma resposta de células T CD4⁺ específica para antígenos, produzindo um padrão de citocinas efetoras com inflamação reduzida em idosos, além do desenvolvimento de respostas humorais com altostítulos contra diferentes cepas do SARS-CoV-2 em adultos e idosos (COSTA P et al., 2022). Embora tenha sido relatado nesses estudos uma boa proteção induzida pela vacinação com vírus inativado, resultados apontam que apesar do desenvolvimento de anticorpos após a vacinação, a imunidade humoral obtida diminuiu após 28 dias desde a imunização total com CoronaVac. A velocidade de redução dos anticorpos neutralizantes (NAb) foi superior à do IgG específico para proteína Spike (JUSAK NUGRAHA et al., 2022).

A vacina ChAdOx1® (AztraZeneca), foi desenvolvida pela Universidade de Oxford (Oxford, Reino Unido), é uma vacina de adenovírus de chimpanzé que contém a proteína Spike do SARS-CoV-2 (VOYSEY et al., 2021). Estudos randomizados em três países diferentes após a aplicação de duas doses da vacina ChAdOx1® mostraram a eficácia da vacina com poucos relatos de eventos adversos, assegurando a aplicação na população (VOYSEY et al., 2020). Informações fornecidas em outro trabalho indicou que a imunização com vacinas de vetor viral ChAdOx1® voltadas para o SARS CoV-2 (AZD1222/AZD2816) também apresentaram resultados positivos contra variantes como, Gamma (P.1) e Delta (B.1.617.2) (SPENCER et al., 2022). ChAdOx1® nCoV-19 parece ser mais bem tolerado em pessoas mais velhas do que em pessoas mais jovens, e possui uma imunogenicidade similar em todas as idades após uma dose adicional (RAMASAMY et al., 2020). Pesquisas realizadas no Quênia avaliando a vacina ChAdOx1® nCoV-19 (AZD1222) em adultos, revelaram que a segurança, a imunogenicidade e a eficácia contra a infecção assintomática entre adultos foi similar a observada em outras regiões do mundo, concluíndo que a vacina é segura e imunogênica (CHERUIYOT; ORINDI; WARIMWE, 2023).

Outra vacina aprovada para uso no Brasil contra COVID-19 foi a BNT162b2® (Pfizer-Biontech) é uma vacina de mRNA modificado, administrada em

nanopartículas lipídicas entregues às células do indivíduo, que codificam a glicoproteína spike (S) do SARS-CoV-2 (PATEL et al., 2022). As células do hospedeiro produzem a proteína S, passando por todo processo de glicosilação, clivagem de subunidade e dobramento adequado de proteínas, semelhante ao que ocorre na infecção natural. Posteriormente, as células do sistema imune reconhecem essa proteína e iniciam seu processo de resposta (VERBEKE et al., 2021). Em ensaios randomizados avaliando sua eficácia, participantes que receberam duas doses da vacina mostraram resultados de 95% na prevenção da COVID-19, sem diferenças significantes nos subgrupos (idade, sexo, etnia, e presença de doenças preexistentes) com baixa ocorrência de eventos adversos entre os participantes (POLACK et al., 2020). Em estudos posteriores que acompanharam indivíduos vacinados com duas doses da BNT162b2®, mostrou que a vacina é segura e exibiu um histórico tolerável de eventos adversos. Sua efetividade contra a Covid-19 atingiu 91,3% após o período de 6 meses. Mesmo com uma redução gradual na eficácia da vacina, a BNT162b2® apresentou um perfil de segurança favorável e se mostrou extremamente eficaz na prevenção da doença (THOMAS et al., 2021).

A vacina Ad26.COV2.S® (Janssen) consiste em um adenovírus humano tipo 26 (Ad26) recombinante e incapaz de replicação , que codifica uma proteína spike SARS-CoV-2, conectada à membrana em uma configuração estabilizada, essa vacina foi produzida e desenhada pelas empresas farmacêuticas Janssen da Johnson & Johnson. Sua eficácia foi comprovada em um estudo que avaliou a aplicação de uma única dose da Ad26.COV2.S, e mostrou que sua aplicação impediu a infecção sintomática e a assintomática por COVID-19, além de ser eficiente contra a doença grave, hospitalização e óbito (SADOFF et al., 2021). Uma única dose de Ad26.COV2.S proporcionou 52,9% de defesa contra a Covid-19 de grau moderado a grave-crítico. A eficácia diferiu entre as variantes e observou uma maior proteção contra COVID-19 severa, casos que necessitavam assistência médica e óbito, e proteção permaneceu por 6 meses (SADOFF et al., 2022). Sua eficácia contra variantes foi avaliada também em outro estudo, que mostrou uma redução de anticorpos neutralizantes contra as variantes B.1.351 e P.1. Porém, anticorpos não neutralizantes funcionais e respostas de células T foram consideravelmente mantidas contra essas

variantes (ALTER et al., 2021). A vacina Ad26.COV2.S® em um regime primário de dose única e uma dose de reforço homóloga ou heteróloga desencadeia respostas imunológicas humorais e celulares que protegem uma proteção rigorosa contra a infecção por SARS-CoV-2, COVID-19, hospitalização e óbitos ligados à COVID-19, além de doenças causadas por variantes emergentes do SARS-CoV-2 (LE GARS et al., 2022).

A vacinação da população trouxe efeitos benéficos como a queda acelerada no número de infecções sintomáticas e óbitos por COVID-19, diversos estudos suscitaram dúvidas sobre a redução da imunidade causada pela vacina em grupos vacinados, devido ao passar do tempo e à emergência de variantes da doença. Informações recentes indicam que a imunidade adquirida através da vacinação de duas doses contra a COVID-19 diminuiu com o passar do tempo, levando a uma proteção diminuída contra o SARS-CoV-2 de forma selvagem e variantes preocupantes (WILDER-SMITH; MULHOLLAND, 2021), isso indicou a necessidade de uma dose adicional. Além disso, os regimes de vacinação heterólogos em vez dos homólogos podem ser uma opção quando a disponibilidade de vacinas é restrita (AU; CHEUNG, 2022). Um ensaio clínico randomizado confirmou que os esquemas heterólogos e homólogos de ChAdOx1® e BNT162b2® são capazes de gerar respostas imunes sólidas, reforçando a adaptabilidade na introdução de vacinas de mRNA e vetores virais, sujeitas a questões logísticas e de fornecimento (LIU et al., 2021). Em um estudo de coorte retrospectivo com profissionais de saúde, mostrou resultados onde as vacinas de vetor viral e vírus inativado tem o potencial de reduzir consideravelmente a infecção, internação e óbito, quando complementadas com uma terceira dose da vacina de mRNA da Pfizer/BioNTech, mesmo com o aparecimento de uma nova variante do SARS-CoV-2. A proteção diminuiu ao longo de 180 dias, sem considerar se já havia tido COVID-19 antes, reforçando a necessidade de outra dose de reforço (MARRA et al., 2023). Uma meta-análise apresentou resultados que demonstraram que os reforços heterólogos e homólogos da COVID-19 proporcionam uma proteção adequada, sendo os reforços heterólogos mais aconselháveis (ZHANG et al., 2023). Colaborando com os resultados que sugerem o reforço vacinal heterólogo, um estudo desenvolvido por Yorsaeng e colaboradores revelou que os indivíduos que

receberam a terceira dose da vacina ChAdOx1® nCoV-19 (AZD1222) após as duas doses da CoronaVac tinham níveis mais elevados de IgG específico para RBD de pico, imunoglobulina total e IgA anti-S1 em comparação com os da CoronaVac® de duas doses, vacinados com AZD1222 de duas doses e indivíduos que já foram infectados (YORSAENG et al., 2021).

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

Hipóteses

H0: Indivíduos com diferentes esquemas vacinais para COVID-19, apresentam o mesmo perfil dos linfócitos de memória, independente do tipo de vacina aplicada.

H1: Indivíduos com diferentes esquemas vacinais para COVID-19, apresentam diferentes perfis dos linfócitos de memória devido ao tipo de vacina aplicada.

Objetivo Geral

Avaliar o perfil de linfócitos T e B de memória e T foliculares em indivíduos vacinados para a COVID-19.

Objetivos específicos

Em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos vacinados para COVID-19:

- 1) Avaliar o perfil de linfócitos T de memória ($CD4^+CD45RO^+CCR7^{+/-}$) específicos para o antígeno RBD do SARS-CoV-2;
- 2) Avaliar o perfil de linfócitos B de memória ($CD4^+CD19^+CD27^+$) específicos para o antígeno RBD do SARS-CoV-2;
- 3) Investigar a frequência de células T foliculares circulantes (cT_{FH}) $CD4^+PD1^+CXCR5^+$;
- 4) Avaliar o perfil de linfócitos T e B de memória e cT_{FH} nos diferentes protocolos utilizados;
- 5) Avaliar a expressão de citocinas intracelulares (INF- γ , IL-10) nos linfócitos T e B e no sobrenadante das culturas.

Capítulo 1: PERFIL DOS LINFÓCITOS DE MEMÓRIA EM DIFERENTES PROTOCOLOS DE VACINAÇÃO PARA A COVID-19

4.1 INTRODUÇÃO

No final do ano de 2019, um surto de pacientes com sintomas relacionados a uma pneumonia de origem desconhecida foram relatados por diversas instituições de saúde locais na cidade de Wuhan, na China (ZHU et al., 2020). A identificação de um novo vírus, semelhante a outros vírus que levaram a epidemias no passado, levou a descoberta de um novo patógeno, o SARS-CoV-2, agente etiológico responsável pela COVID-19 (PARASKEVIS et al., 2020), doença que se disseminou rapidamente por todos os países levando a declaração do surto de COVID-19 em Janeiro de 2020. Apesar dos estudos iniciais terem apontado que o meio de transmissão seria o consumo de peixes e animais silvestres em um único mercado local de animais selvagens, sugerindo uma possível transmissão de animal para humano, as pesquisas recentes evidenciaram a disseminação do SARS-CoV-2 de pessoa para pessoa através do contato direto, sendo os principais sintomas febre, tosse, fadiga e dispneia (LAI et al., 2020).

Antes da pandemia do SARS-CoV-2, um novo coronavírus capaz de infectar humanos surgiu em 2002 como resultado de uma mutação proveniente de hospedeiro não humano. Foi determinado que esse vírus, conhecido como SARS-CoV, foi o agente causador do surto de SARS que atingiu a província de Guangdong, na China. A propagação do SARS-CoV foi limitada ao contato direto com pessoas infectadas, e sua infectividade foi mínima durante a fase de incubação. Em uma diferente época, a Síndrome Respiratória do Oriente Médio-CoV (MERS-CoV) surgiu após o aparecimento de um novo coronavírus humano relatado pela primeira vez no Oriente Médio em 2012. As manifestações clínicas do MERS-CoV incluíram infecção assintomática, síndrome do desconforto respiratório agudo, choque séptico, falência de múltiplos órgãos e morte (TIRELLI et al., 2023). O SARS-CoV-2 possui características semelhantes outros dois agentes etiológicos, e é transmitido através de gotículas maiores e aerossóis gerados ao respirar, falar, espirrar ou tossir e em menor grau, também

pode ser transmitido através de superfícies infectadas. (PUHACH; MEYER; ECKERLE, 2022). É um vírus composto por RNA fita simples, encapsulado e de sentido positivo. O seu genoma contém quatro proteínas estruturais principais: Spike (S), envelope (E), nucleocapsídeo (N) e membrana (M) (YU et al., 2023).

Seu mecanismo de entrada nas células do hospedeiro envolve duas formas de acesso, podendo ser através da ligação direta com a superfície celular ou o escape dos endossomos. As duas formas de acesso envolvem a interação sequencial de duas subunidades de proteína spike (S), a subunidade S1 distal e a subunidade S2, localizada de maneira mais próxima a membrana viral (LIM, 2022). A subunidade S1 estabelece uma ligação com o receptor enzimam conversora de angiotensina 2 (ECA2) através do seu domínio de ligação ao receptor (RBD), provocando alterações conformacionais que revelam um "sítio S2" interno, que auxilia na fusão da membrana (SUBHOMOI BORKOTOKY; DEY; ZAVED HAZARIKA, 2022). Ao invadir as células hospedeiras, o vírus possui diversos mecanismos principais que podem resultar em danos generalizados, impactando os sistemas orgânicos como, a toxicidade viral direta, danos e inflamação das células endoteliais, que resultam na formação de microtrombos e disfunção microvascular, ativação excessiva do sistema imunológico inato e síndrome da tempestade de citocinas, além de desregulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, ocasionando lesões nos tecidos por vasoconstrição e permeabilidade vascular e permeabilidade vascular (BALDELLI et al., 2022).

Após sua infecção, o sistema imunológico do hospedeiro é capaz de reconhecer os抗ígenos virais e responder a esses estímulos. Ao detectarem a proteínas do SARS-CoV-2, os receptores TLR2, iniciam uma resposta imunológica inata, resultando na liberação de TNF- α e IFN- γ no organismo. A via antiviral IFN representa um dos principais mecanismos inatos contra infecções virais. Ao mesmo tempo, as células do hospedeiro também produzem citocinas e quimiocininas, tais como IL-6 e TNF, dando origem à tempestade de citocinas (MAISON; DENG; GERSCHENSON, 2023). Na resposta imune adaptativa, estudos indicam que as células B, células T CD4 $^{+}$ (células T auxiliares) e células

T CD8⁺ (células citotóxicas) desempenham um papel crucial no controle do SARS-CoV-2. As células T auxiliares foliculares CD4⁺ (T_{FH}) e as células B nos tecidos linfoides secundários auxiliam na maturação da afinidade do anticorpo e na mudança de isotipo de forma complexa, resultando em proteção imunológica. (SHEN et al., 2023). Uma das principais funções das células T CD4⁺ é a de atrair células efetoras adicionais para o local do antígeno viral, a partir da ativação do gene CCL3/4/5 (MIP-1s) e da quimiocina CXCL1, exclusiva das células T CD4⁺ (SILVA et al., 2022). Além disso, as células T CD8⁺ contra o vírus, com capacidade citolítica contra células infectadas, são identificadas já no primeiro dia após o início dos sintomas. Normalmente, sua rápida indução acontece na primeira semana e chega a alcançar o pico em 2 semanas. Essa dinâmica de células T CD8⁺ específicas do vírus está ligada a melhores desfechos de infecção pelo SARS-CoV-2, bem como à sua habilidade de gerar grandes quantidades de moléculas citotóxicas, como IFN-γ e granzima B e perfurinas. (SHEN et al., 2023). Após a erradicação do vírus, células de memória permanecem no organismo para controlar possíveis reinfecções. Essas células são divididas em subpopulações que possuem diferentes funções, células naïve (T_{NAIVE}) e células T de memória central (T_{CM}), as células T efetoras de memória (T_{EM}) e células T de memória efetora terminalmente diferenciada (T_{EMRA}) (SAULE, et al., 2006). As células T_{NAIVE} e T_{CM}, presentes principalmente nos linfonodos, desempenham funções de maneira mais tardia. Por outro lado, as células T efetoras de memória (T_{EM}) e as células T de memória efetor terminalmente diferenciadas (T_{EMRA}) estão situadas em tecidos inflamados onde exercem funções efetoras de maneira imediata, produzindo citocinas e respostas de citotóxicas (CACCAMO N et al; 2005).

Diante da situação epidemiológica que preocupa todo o mundo, iniciou-se o processo de desenvolvimento de vacinas com diferentes plataformas. A vacinação é responsável por gerar respostas imunes de memória e proteger os indivíduos de reinfecções, diminuindo as chances do desenvolvimento das doenças (RAHMANI et al., 2022). Diferentes plataformas de vacinas foram incluídas na lista de uso emergencial da Organização Mundial da Saúde (OMS), ou receberam autorização de uso emergencial, para a distribuição e aplicação entre a população como, vacina de vetor viral, de mRNA ou vírus inativado (LIU;

YE, 2022). Estudo em indivíduos vacinados com a vacina de vetor viral, Ad26.COV2.S (Janssen) observou que a imunização gerou respostas imunológicas humorais e celulares por um período de 8 meses após a vacinação. Adicionalmente, notaram um aumento de anticorpos que neutralizam variantes do SARS-CoV-2 (BAROUCH et al., 2021). Estudos envolvendo a ChAdOx1 (AstraZeneca) mostraram que essa vacina é segura e bem tolerada, demonstrando proteção detectável por um período de até 6 meses (SOBIESZCZYK et al., 2022). A vacina inativada (CoronaVac) mostrou uma eficácia de 83,7% a prevenção da necessidade de assistência e em casos moderados e graves foi de 100% (TANRIOVER et al., 2021). A vacinação com dose dupla da BNT162b2 (Pfizer), vacina de mRNA foi avaliada em um estudo multinacional controlado por placebo, proporcionou 95% de proteção contra a Covid-19 em indivíduos com 16 anos ou mais (POLACK et al., 2020). Esse conjunto de dados mostra a eficácia da vacinação contra COVID-19 e a importância de entender como sistema imune responde a essas diferentes exposições. Com isso, é importante entender melhor sobre a resposta imunológica de memória desencadeada nos indivíduos vacinados com diferentes plataformas de vacina. O objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de linfócitos T e B de memória e T foliculares em indivíduos vacinados para a COVID-19.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 População do estudo

Foi realizado um estudo de corte transversal nos indivíduos vacinados e convalescentes da COVID-19 no período de Março a Novembro de 2023. Um questionário online utilizando a plataforma do *google forms* foi divulgado por meio virtual, para a população responder informações sobre o esquema vacinal que foi aplicado e a infecção por COVID-19. A partir disso, selecionamos 12 indivíduos doadores de plasma, de ambos os sexos (figura 1). Os indivíduos deveriam estar assintomáticos por pelo menos 30 dias. Foram incluídos indivíduos maiores de 18 anos, ambos os性os e não incluídos no menores de 18 anos, gestantes, indivíduos com imunodeficiências e em uso de imunossupressores.

Com base nas informações coletadas através do questionário, separamos em grupos que realizaram diferentes esquemas vacinais em: vacinação homóloga ou heteróloga e vacinação com 3 e 4 doses. As informações sobre a vacinação foram conferidas no cartão de vacinação físico ou no aplicativo para celular fornecido pelo Governo Federal do Brasil, o ConectSUS. Todos os indivíduos de todos os grupos doarão 30 mL de sangue total, coletado em tubos contendo heparina, para as análises propostas no estudo.

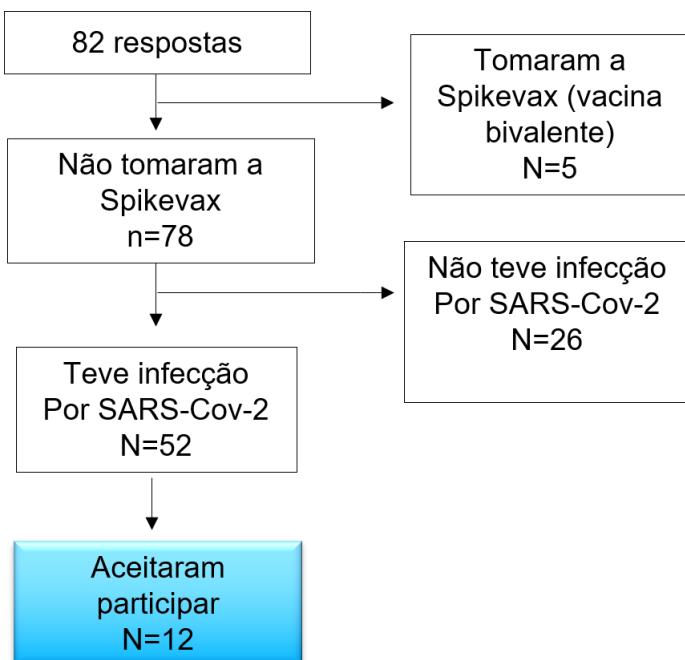


Figura 1: Fluxograma de seleção dos participantes

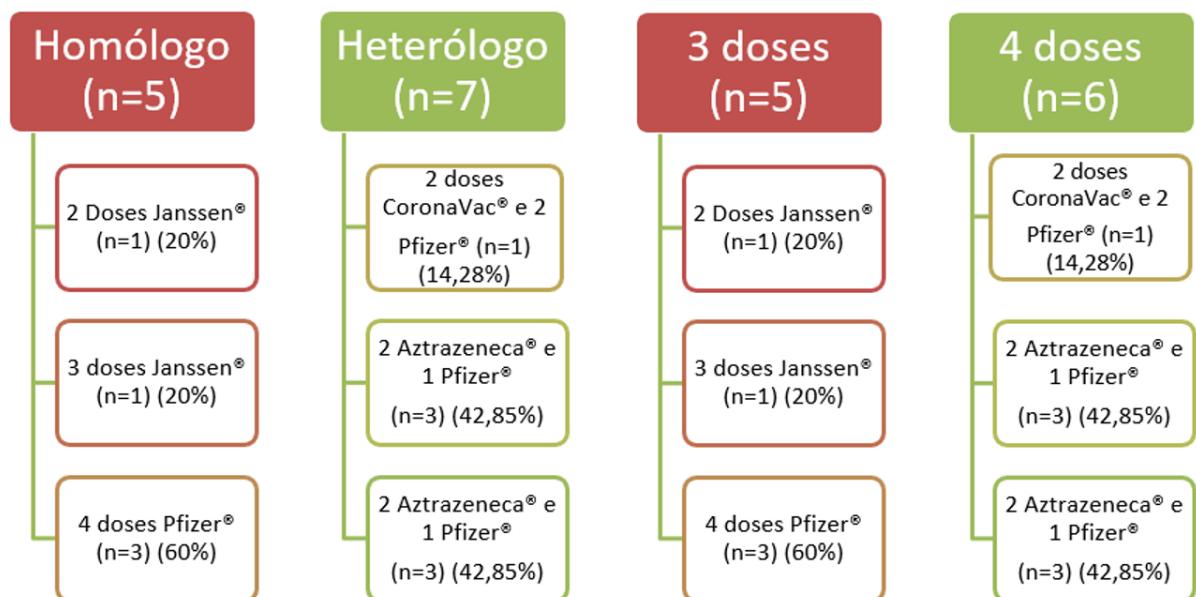


Figura 2: Esquema vacinal dos subgrupos da população estudada.

4.2.2 Separação e cultura de células mononucleares do sangue periférico dos indivíduos vacinados e convalescentes para COVID-19

Foram coletados 30mL de sangue total em tubos contendo heparina para que fossem separadas as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) por meio do gradiente de concentração Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Mississauga, ON, Canada). Foi ajustado a uma concentração de 1×10^7 células/mL em meio RPMI, contendo 10% de soro fetal bovino inativado, penicilina 100U/mL, estreptomicina 100 μ L/mL, L-glutamina 2mM, 30mM HEPES (Life technologies GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). Em seguida, um total de 2×10^6 CMSP foram estimuladas com 2 μ g/mL da proteína RBD em RPMI completo e semeadas em placas de 24 poços a 37°C e 5% de CO₂, por um período de três a cinco dias para diferenciação em células de memória. As células foram estimuladas ainda com 50 fL de toxóide tetânico (TT) como controle positivo da ativação de células de memória.

4.2.3 Avaliação do fenótipo de linfócitos T e B de memória, células T foliculares circulantes e citocinas por citometria de fluxo

Finalizado o tempo de cultivo, foi adicionada brefeldina A (10 μ g/ml; Sigma, St. Louis, MO) pelo período de 4h e incubada 37°C e 5% de CO₂. Para marcação das células, foram adicionados 20 μ l/poço de anticorpos específicos para moléculas de superfície das células T e B de memória e células T foliculares, diluídos em solução de diluição de anticorpos (tampão salina fosfato - PBS 1x +azida 1M + fração V de albumina bovina - BSA) e as placas serão incubadas, protegidas da luz por 15 minutos a 4°C. Foram realizadas 3 lavagens sucessivas utilizando-se solução de lavagem (PBS 1x + azida 1M + BSA), em seguida as células serão ressuspensas em 200 μ l de formaldeído 2%, e adquiridas utilizando-se o aparelho FACSCanto (Becton Dickinson), num total de 200.000 eventos.

A estratégia de análise empregada teve como objetivo caracterizar fenotipicamente através da análise dos marcadores de superfície celular as

subpopulações de linfócitos de memória T CD4⁺CD45RO⁺CCR7^{+/−} e B (CD4⁺CD19⁺CD27⁺), além das células foliculares (T_{FH} - CD4⁺PD1⁺CXCR5⁺) com anticorpos monoclonais contra marcadores de superfície celular, conjugados com fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e “cycrhome” (CY): PE-Cy7”, PerCP-Cy5.5, “Allophycocyanin” (APC), da eBioscience™ utilizando citometria de fluxo.

A população de Linfócitos foi selecionada pela fluorescência inespecífica da dispersão direta (*from the forward scatter* - FSC) e dispersão lateral (*from the side scatter* - SSC) (Figura 2A). Para avaliar o perfil das células T de memória dos indivíduos vacinados para COVID-19, as culturas celulares foram estimuladas comantígeno RBD foram marcadas de acordo com a expressão de moléculas de superfície CD45RO, CCR7 e CD45RA, para classificá-las em: células T naïve (CD45RO[−] CCR7⁺ ou CD45RA⁺ CCR7⁺), células T de memória central (T_{CM} CD45RO⁺ CCR7⁺ ou CD45RA[−] CCR7⁺), células T efetoras de memória (T_{EM}; CD45RO⁺ CCR7[−] ou CD45RA[−] CCR7[−]) ou células T de memória efetora terminalmente diferenciada (T_{EMRA}; CD45RO[−] CCR7[−] ou CD45RA⁺ CCR7[−]) (Figura 2B). Além disso, selecionamos a população dos linfócitos B (CD3^{neg}CD19⁺) (Figura 2F), das células B de memória (CD19⁺CD27⁺) (Figura 2G), e a população de células T folicular, separando em Folicular helper (PD1^{hi}CXCR5⁺) e Peripheral helper (PD1^{hi}CXCR5^{neg}) (Figura 2E).

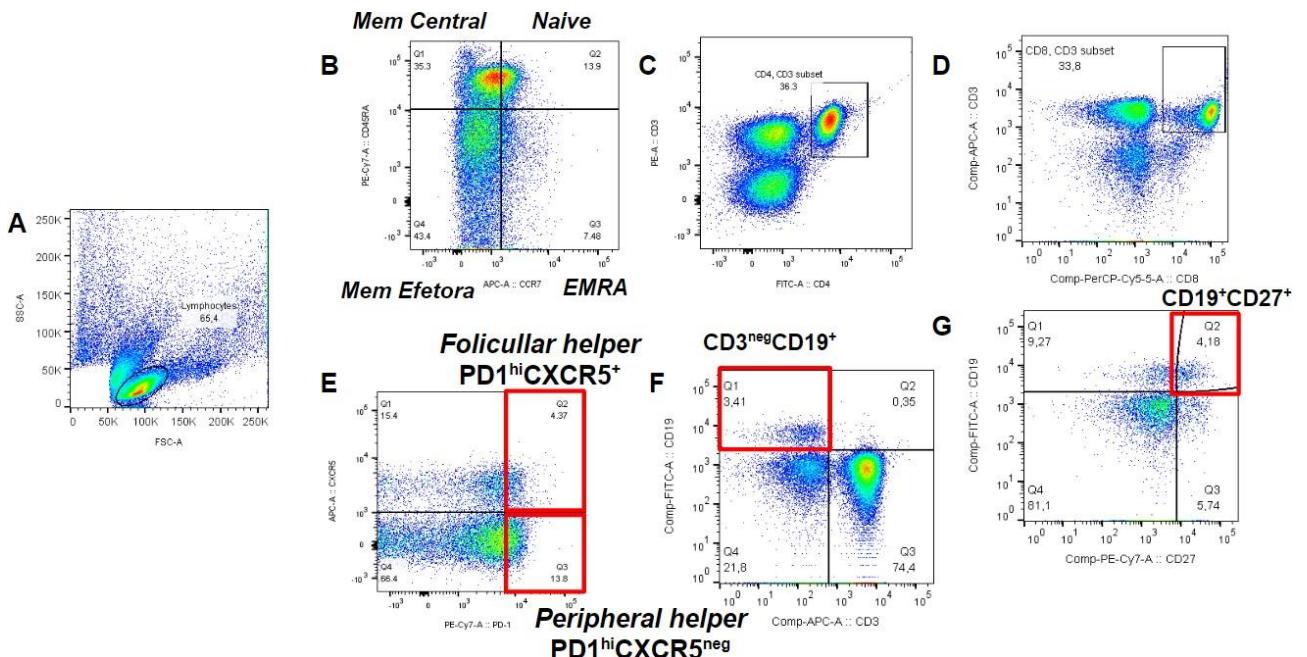


Figura 3 Plots representando a estratégia de seleção das populações de células analisadas (A-G).

4.2.4 ELISA no sobrenadante das culturas de células

As placas de microtitulação com 96 poços foram revestidas com um volume de 50 µl de 2 µg /mL de antígeno recomendado no kit para a citocina específica diluído em PBS 1x filtrado durante a noite a 4°C. As placas foram então bloqueadas por 2h a 37°C usando 200µL de ELISpot a 5% em 1x solução salina tamponada com fosfato (PBS). As amostras de soro/plasma foram então diluídas 1:50 em PBS 1x e 100 µL de cada amostra foram aplicados à placa de ELISA, revestida e incubada por 2 h a 37°C. As placas foram lavadas e incubadas com anticorpos marcados com HRP (Sigma Aldrich, MI, EUA), diluídos a 1: 2000 em albumina bovina (BSA) a 5% em PBS 1x. Após incubação por mais 1h em temperatura ambiente, as placas foram lavadas e reveladas com substrato TMB/E (Merck Millipore, MA, EUA). Finalmente, a reação será interrompida com 1M H₂SO₄ e os valores de densidade óptica foram lidos a 450nm (Spectramax, Molecular Devices Corporation Sunnyvale, CA.). O controle de soro negativo foi executado cada vez que o ensaio foi realizado. O valor de corte para amostras de soropositividade será definido como o valor médio na densidade óptica 450 (em uma diluição de 1:50) para as 16 amostras de soro negativas mais 3 desvios padrão (SDs).

4.2.5 Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando-se o programa GraphPadPrism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA EUA). As diferenças entre as frequências de linfócitos de memória e a expressão de citocinas dos indivíduos convalescentes e vacinados para COVID-19 foram avaliadas com o teste Mann-Whitney para análises não pareado e não paramétrico. As frequências de células positivas são expressas em mediana (mínimo e máximo) da porcentagem ou a média de intensidade de fluorescência (MIF). As diferenças de concentração de anticorpos entre os grupos de pacientes convalescentes e vacinados foram determinadas pelo teste t de Student. As concentrações de anticorpos foram expressas em média e desvio padrão (pg/mL). A análise de correlação entre citometria de fluxo, dados de ELISA de imunoglobulina sérica total e dados clínicos foi realizada usando coeficientes de correlação de Pearson para conjuntos de dados iguais ou maiores que 35 valores ou correlação não paramétrica de Spearman para conjuntos de dados com menos de 35 valores. A significância estatística será estabelecida no intervalo de confiança de 95%.

4.2.6 Considerações éticas e de biossegurança

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Farmácia (número do parecer 4.697.661), da Universidade Federal da Bahia. Todas as informações obtidas através das análises das amostras coletadas foram mantidas sob sigilo e só teve acesso às mesmas, a equipe clínica e de pesquisadores. Todo o trabalho foi desenvolvido de acordo com os critérios da Regulamentação de Bioética no Brasil, Resolução 466/2012 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde e resoluções complementares.

Os doadores incluídos na pesquisa foram abordados conforme descrição anterior, aos próprios indivíduos ou a seus responsáveis, quando foram explicados os propósitos da pesquisa, operacionalização, possíveis riscos e

assistência, informações também contidas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A eles foi disponibilizado tempo para pensar se concordam ou não em participar, antes que sejam entrevistados mediante questionário e assinem o TCLE.

Os experimentos seguiram as normas de Biossegurança de acordo com a Lei no. 11.105 de março de 2005. Os indivíduos que fazem parte dos grupos estudados assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) autorizando a utilização dos dados de prontuário e coleta e armazenamento de materiais biológicos.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Dados demográficos

Para avaliar o perfil dos linfócitos de memória e células T foliculares em indivíduos vacinados para COVID-19, recrutamos indivíduos partir das respostas fornecidas ao questionário, dos 83 que responderam, 12 indivíduos que tomaram a vacina e tiveram infecção foram selecionados e aceitaram participar.

Individuos que responderam ao questionário (n = 82)	
Idade (média) (DP)	35,15 ($\pm 11,10$)
Gênero feminino (n) (%)	52 (63%)
Gênero masculino (n) (%)	30 (37%)
Infecção (n) (%)	52 (63%)

Individuos recrutados para análise imunológica (n = 12)	
Idade (média) (DP)	31,73 ($\pm 9,96$)
Gênero feminino (n) (%)	6 (50%)
Gênero masculino (n) (%)	6 (50%)
Infecção (n) (%)	12 (100%)

Tabela 1. Características demográficas da população total que respondeu o questionário e foram recrutados para participar do estudo.

	Plataforma de vacinas (n=12)		Número de doses (n=11)		
	Homólogo (n=5) (100%)	Heterólogo (n=7) (100%)	valor de p	3 Doses (n=5) (100%)	4 Doses (n=6) (100%)
Idade (média) (DP)	35,8 (\pm 11,65)	27,86 (\pm 7,15)	ns ^a	35,2 (\pm 13,63)	27 (\pm 4,05)
Gênero feminino (n) (%)	2 (40%)	4 (57,14%)	0,02 ^b	4 (80%)	1 (16,66%)
Infecção (n) (%)	5 (100%)	7 (100%)	-	5 (100%)	6 (100%)

^aTeste de Mann-Witney; ^bTeste exato de Fisher.

Tabela 2. Características demográficas dos subgrupos da população estudada.

4.3.2 Subpopulações dos linfócitos T de memória em indivíduos vacinados para o SARS-CoV-2

Foi avaliada a frequência das subpopulações de células T _{NAIVE}, células T de memória central (T_{CM}), células Tefetoras de memória (T_{EM}) ou células T de memória efetora terminalmente diferenciada (T_{EMRA}) nas culturas de CMSp sem estímulo (WS), estimuladas com antígeno RBD (RBD) e com antígeno do toxóide tetânico (TT). Não foram observadas alterações na frequência das subpopulações de células de memória e entre os grupos.

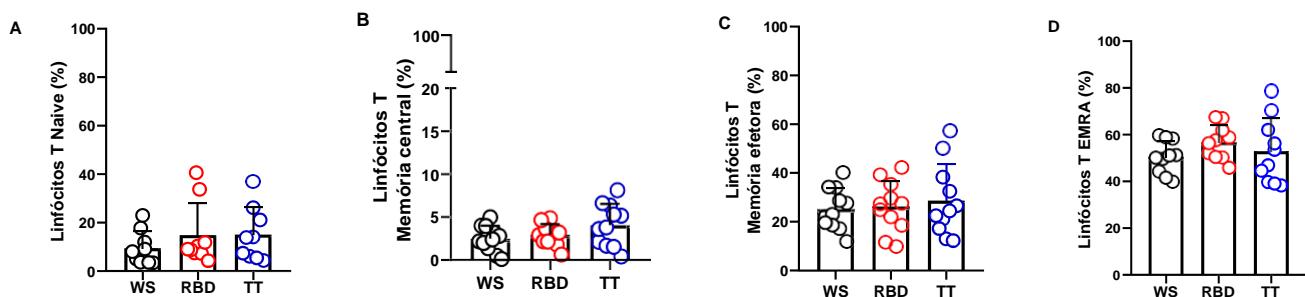


Figura 4: Subpopulações de linfócitos de memória em culturas de CMSp sem estímulo (WS), estimuladas com antígeno RBD (RBD) e com antígeno do toxóide tetânico (TT). Frequência de linfócitos de memória NAIVE (A) memória efetora (T_{EM}) (B) memória central (T_{CM}) (C) e EMRA (T_{EMRA}) (D) (Teste de Mann-whitney). O histograma e as barras representam a média e + DP.

4.3.3 Perfil de linfócitos B de memória e T foliculares específicos para o antígeno RBD do SARS-CoV-2

Nas infecções virais, os Linfocitos B tem um papel fundamental na diferenciação em plasmocitos e na produção de anticorpos que atuam na neutralização, protegendo os individuos de reinfecções (POLLARD, BIJKER; 2020). Nesse contexto, as células T foliculares (T_{FH}) desempenham um papel fundamental auxiliando na produção de anticorpos pelos linfócitos B (ALONSO et al; 2021), e nos locais inflamatarios, fora dos tecidos não linfoideos, as celulas T foliculares periferias (T_{PH}) atuam exercendo a mesma função (YOSHITOMI H; 2022). Avaliamos o perfil dos linfócitos B baseado na expressão de $CD3^+CD19^+CD27^+$ e também a frequênciа de células T_{FH} e T_{PH} marcando a expressão das moléculas $PD1^+$ e $CXCR5^+$. Não foram observadas alterações entre as populações WS, RBD e TT na frequênciа de células B e dos linfócitos Tfh periféricos, enquanto houve um aumento da frequênciа de células T folicular auxiliar estimuladas com antígeno RBD ($p<0,03$; Figura 5B).

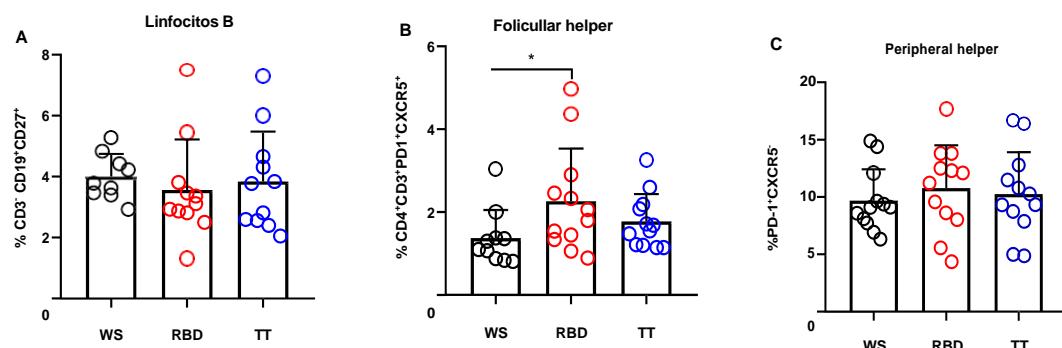


Figura 5: Frequênciа dos linfócitos B de memória (A), das células T foliculares helper (B) e células T folicular periférica (C) nas culturas sem estímulo (WS) estimuladas com antígeno RBD (RBD) e com antígeno do toxóide tetânico (TT) * $p<0,03$ (Teste de Mann-whitney). O histograma e as barras representam a média e + DP.

4.3.4 Determinação dos níveis de IL-10 e IFN- γ no sobrenadante das culturas de CMSP

As citocinas expressas pelas células são importantes para a sinalização, desenvolvimento de uma resposta imunológica efetiva e para a regulação da resposta como, por exemplo, a IL-10 que tem função de regular as respostas inflamatórias (SARAIVA M; O'GARRA A. 2010) e o IFN- γ , citocina importante na resposta antiviral que aumenta as funções antimicrobianas e induz a um efeito antiviral nas células (KAK, et al; 2018). Estudos relataram aumentos significativos no número de células T secretoras de IFN- γ específicas para os抗igenos do toxóide tetânico (MAYER S; et al, 2002). Com isso, avaliamos os níveis de IL-10 e IFN- γ no sobrenadante das culturas de CMSP sem estímulo (WS), estimuladas com antigo RBD (RBD) e com toxóide tetânico (TT). Observamos aumento dos níveis de IL-10 ($p<0,002$; Figura 6A) e IFN- γ ($p<0,04$; Figura 6B) nas culturas estimuladas com RBD, e o aumento de IFN- γ nas culturas estimuladas com TT ($p<0,007$; Figura 6B).

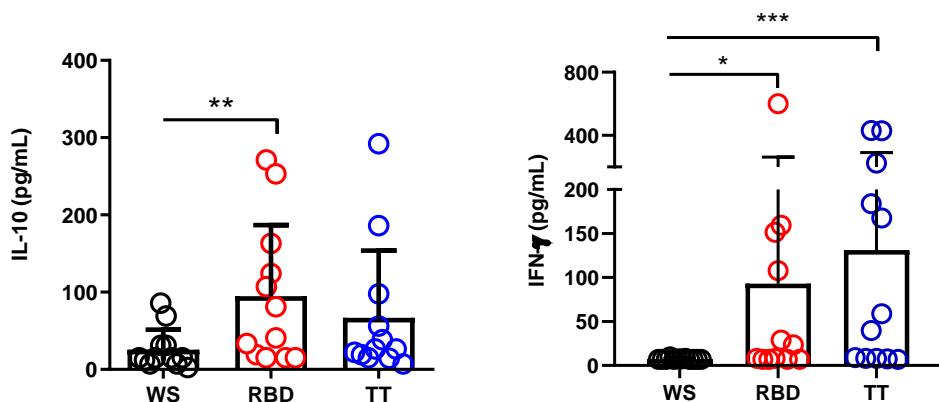


Figura 6: Níveis de citocinas no sobrenadante das culturas de CMSP nas culturas sem estímulo (WS) estimuladas com antígeno RBD (RBD) e com antígeno do toxóide tetânico (TT). Dosagem de IL-10 (A) e IFN- γ (B). * $p < 0,04$ ** $p < 0,002$ (Teste de Mann-whitney). O histograma e as barras representam a média e + DP.

4.3.5 Frequência das subpopulações de linfócitos T de memória específicos para o antígeno RBD do SARS-CoV-2

Quando comparamos as diferentes subpopulações de células de memória estimuladas com antígeno RBD observamos maior frequência de células T_{EM} ($p<0,0017$) e T_{EMRA} ($p <0,0001$) em comparação às populações T_{CM} . As populações de celulas T_{EMRA} também foram maiores quando comparadas as populações T_{NAIVE} , T_{CM} e T_{EM} (Figura 7A)

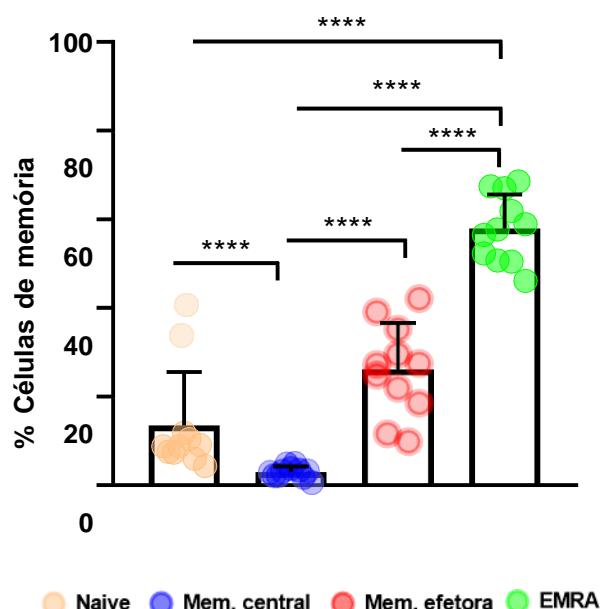


Figura 7: Frequência das subpopulações de linfócitos T de memória em culturas de CMSp estimuladas com RBD (A). ** $p < 0,0017$; *** $p <0,0001$ (Teste Kruskal-Wallis). O histograma e as barras representam a média e + DP.

4.3.6 Expressão intracelular de citocinas nas células de memória estimuladas com antígeno RBD

Foi avaliada a expressão de citocinas pelas subpopulações de células de memória estimuladas com antígeno RBD. Observamos uma maior expressão intracelular de IFN- γ na subpopulação T_{CM} quando comparada as subpopulações T_{NAIVE} e T_{EMRA} ($p<0,04$; Figura 8A). Identificamos a maior expressão de TGF- β na subpopulação de células T_{CM} quando comparada as populações T_{NAIVE} ($p<0,04$) e T_{EMRA} ($p < 0,0008$) e maior produção da citocina na subpopulação T_{EM} quando comparada a pulação T_{EMRA} ($p<0,04$; Figura 8B). Não observamos diferença estatística na expressão de IL-10 pelas subpopulações (Figura 8C)

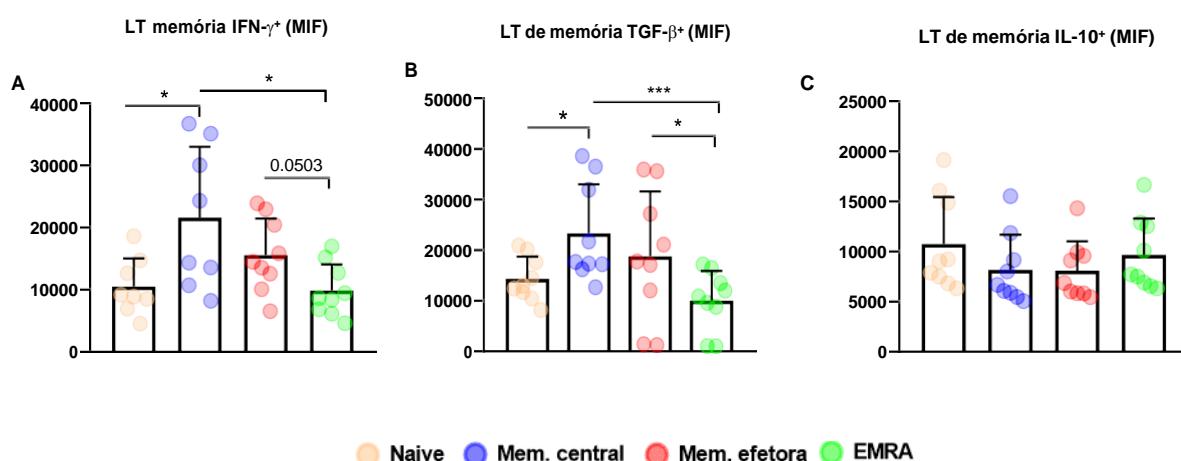


Figura 8: Intensidade de fluorescência de citocinas pelas subpopulações de linfócitos de memória. Frequência das subpopulações de linfócitos T de memória expressando IFN- γ (A) TGF- β (B) IL-10 (C) em culturas estimuladas com antígeno RBD * $p < 0,04$ (Mann-whitney) *** $p < 0,0008$ (Teste de Kruskal Wallis). O histograma e as barras representam a média e + DP.

4.3.7 Perfil das subpopulações de linfócitos T de memória na vacinação homóloga e heteróloga

Foi analisada a frequência das subpopulações de células de memória nos grupos de vacinação homóloga e heteróloga. Observamos uma maior frequência de linfócitos na população T_{EMRA} e T_{EM} nos grupos homóloga e heteróloga, quando comparados a subpopulação de linfócitos T_{NAIVE} e T_{CM} ($p<0,04$ e $p<0,007$, respectivamente; Figura 9A). Não foram observadas diferenças estatísticas nos distintos protocolos avaliados.

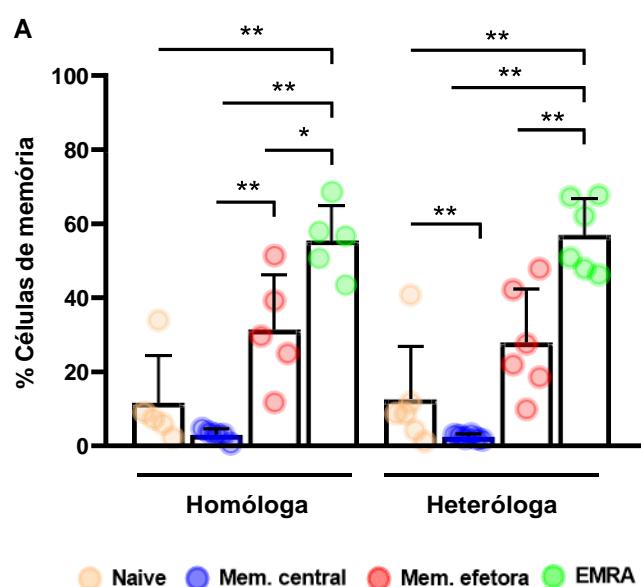


Figura 9: Frequência dos subgrupos das células de memória em diferentes esquemas de vacinação homóloga e heteróloga (A) * $p <0,04$ p ** $<0,007$ (Teste de Mann-whitney). O histograma e as barras representam a média e + DP.

4.3.8 Expressão intracelular de citocinas nas células de memória estimuladas com antígeno RBD na vacinação homóloga e heteróloga

Foi analisada a expressão das citocinas nas subpopulações de celulas de memória nos grupos de vacinação homologa e heteróloga e encontramos que aexpressão de TGF- β foi maior na população de células T_{CM} quando comparadosa população de células T_{EMRA} ($p<0,02$; Figura 10B).

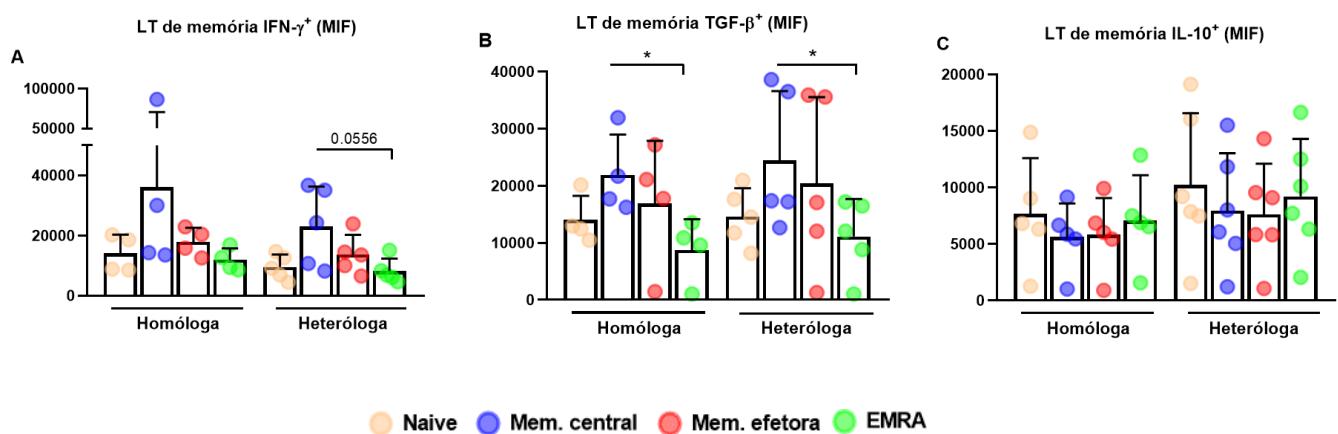


Figura 10: Níveis de citocinas pelas subpopulações de linfócitos de memória. Frequência das subpopulações de linfócitos T de memória expressando IFN- γ (A) TGF- β . (B) IL-10 (C) em culturas de celulas de indivíduos com protocolos de vacina diferentes, estimuladas com antígeno RBD. * $p <0,02$ (Teste de Mann-whitney). O histograma e as barras representam a média e + DP.

4.3.9 Perfil de linfócitos B e células de memória T folicular na vacinação homóloga e heteróloga

Foi analisado o perfil dos linfócitos B regulatórias, das células T folicular auxiliar (T_{FH}) e periférica (T_{PH}) nos subgrupos de vacinação homóloga e heteróloga. Observamos maior frequência de linfócitos B regulatórios no subgrupo da população homóloga quando comparado ao grupo de vacinação hieróloga ($p<0,01$; Figura 9A) e maior frequência de células T folicular periférica em ambos grupos($p <0,007$; Figura 11B)

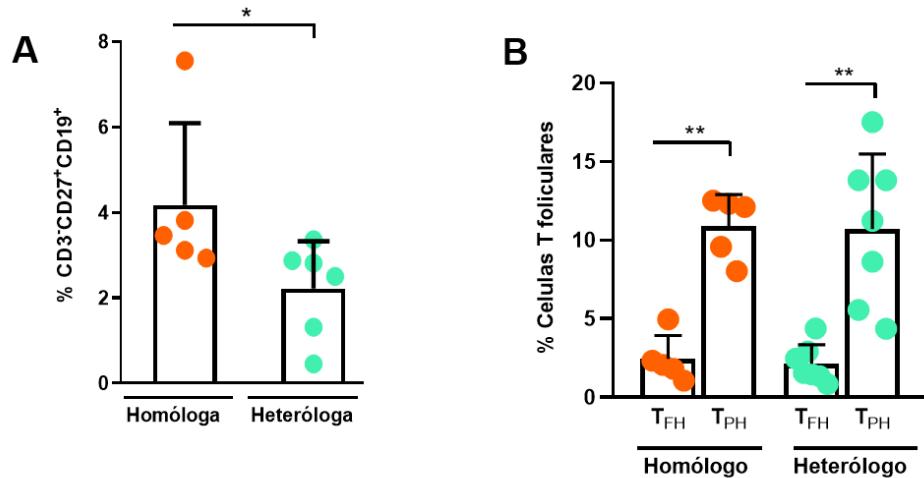


Figura 11: Frequência das células B regulatórias (A), das células T auxiliar (T_{FH}) auxiliares e periféricas (T_{PH}) (B) em culturas estimuladas com antígeno RBD. * $p<0,01$ ** $p < 0,007$ (Teste de Mann-whitney). O histograma e as barras representam a média e + DP.

4.3.1.1 Determinação dos níveis de IL-10 e IFN- γ no sobrenadante das culturas na vacinação homóloga e heteróloga

Avaliamos a concentração de IL-10 e IFN- γ no sobrenadante das culturas de CMSP do grupo WS e RBD. Observamos um aumento na produção de IL-10 na população de células estimuladas com antígeno RBD no grupo de vacinação heteróloga ($p < 0,007$; Figura 12A). Não observamos diferenças estatísticas entre os grupos na produção de IFN- γ (Figura 12B).

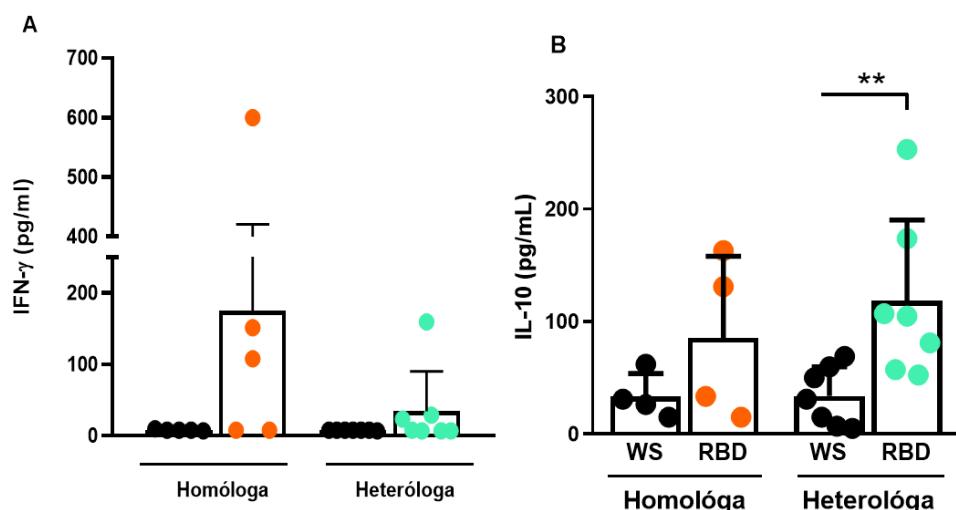


Figura 12: Níveis de citocinas no sobrenadante das culturas de CMSP nas culturas sem estímulo (WS) e estimuladas com antígeno RBD (RBD) nos grupos de vacinação homóloga e heteróloga. Dosagem de IFN- γ (A) e IL-10 (B). $p < 0,007$ (Teste de Mann-whitney). O histograma e as barras representam a média e + DP.

4.3.1.2 Perfil de da subpopulações de linfócitos T de memória na vacinação com 3 e 4 doses

Analisamos a frequência das subpopulações de células de memória nos grupos de vacinação 3 e 4 doses. Observamos uma maior frequência de linfócitos na população T_{EMRA} e T_{EM} nos grupos homóloga e heteróloga, quando comparados a subpopulação de linfócitos T_{NAIVE} e T_{CM} ($p < 0,04$ $p < 0,007$; Figura 13A). Não identificamos diferença estatística entre os grupos.

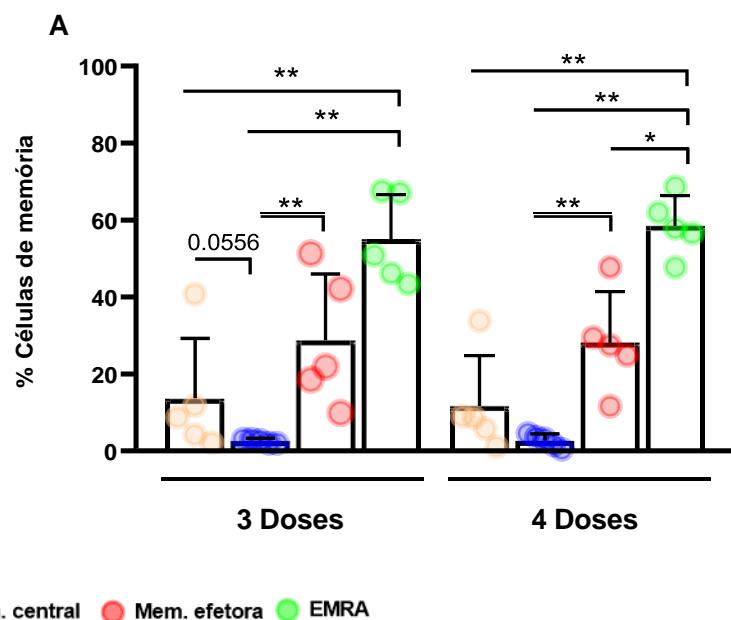


Figura 13: Frequência dos subgrupos das células de memória em diferentes esquemas de vacinação 3 e 4 doses (A) $*p < 0,04$ $**<0,007$ (Teste de Mann-whitney). O histograma e as barras representam a média e + DP.

4.3.1.3 Expressão intracelular de citocinas nas células de memória estimuladas com antígeno RBD na vacinação com 3 e 4 doses

Avaliamos a expressão das citocinas nas subpopulações de células de memória nos grupos de vacinação 3 e 4 doses não encontramos diferença entre as subpopulações (Figura 14).

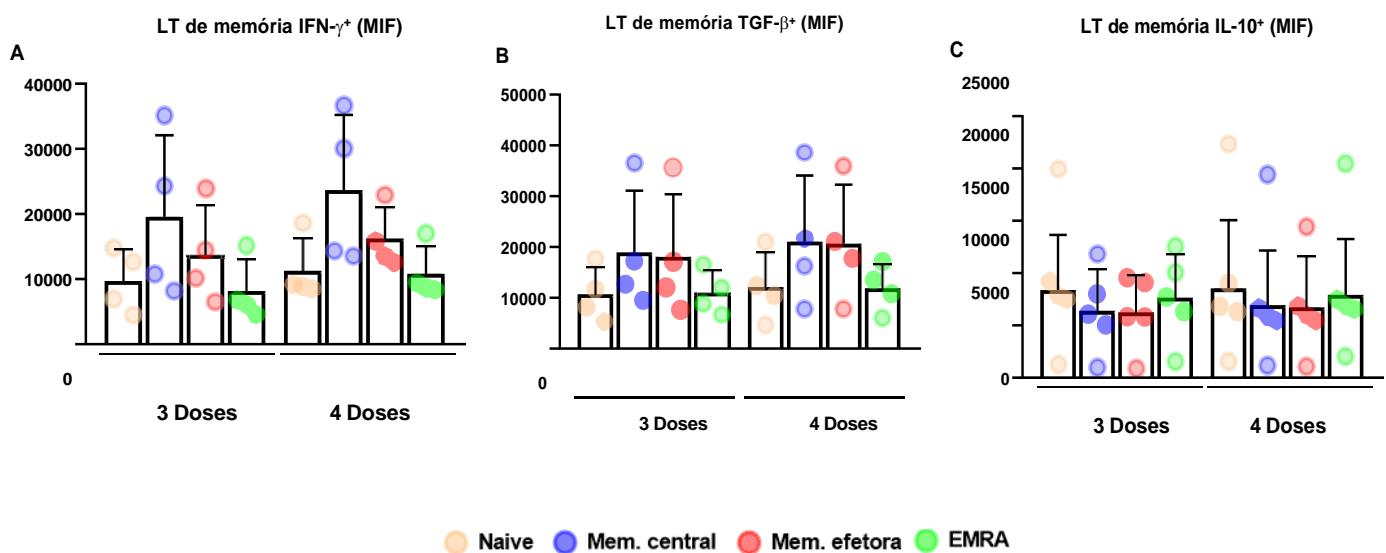


Figura 14: Intensidade de fluorescência de citocinas pelas subpopulações de linfócitos de memória. Frequência das subpopulações de linfócitos T de memória expressando IFN- γ (**A**) TGF- β . (**B**) IL-10 (**C**) em culturas estimuladas com antígeno RBD nos grupos de vacinação com 3 e 4 doses (teste Mann-whitney). O histograma e as barras representam a média e + DP.

4.3.1.4 Perfil de linfócitos B e celulas T folicular nos diferentes na vacinação com 3 e 4 doses

Avaliamos o perfil dos linfócitos B regulatórios, das células T folicular auxiliar e periférica nos subgrupos de vacinação com 3 e 4 doses. Observamos maior frequência de linfócitos B regulatórios no grupo WS da população com 3 doses quando comparado ao grupo estimulado com RBD ($p < 0,01$; Figura 15A) e maior frequência de células T folicular periférica em ambos grupos ($p < 0,007$; Figura 15B)

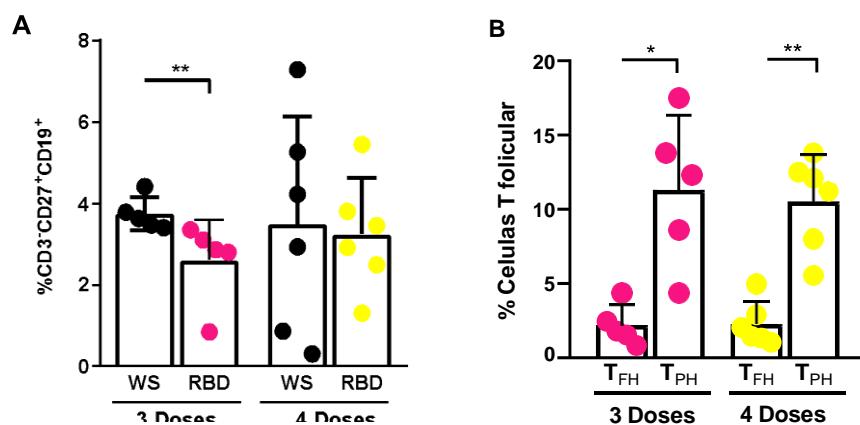


Figura 15: Frequência das células B regulatórias (A), das células T folicular auxiliar e periféricas (B) em culturas estimuladas com antígeno RBD nos subgrupos de vacinação com 3 e 4 doses. * $p < 0,01$ ** $p < 0,007$ (Teste de Mann-Whitney). O histograma e as barras representam a média e + DP.

4.3.1.5 Determinação dos níveis de IL-10 e IFN- γ no sobrenadante das culturas na vacinação com 3 e 4 doses

Avaliamos a concentração de IL-10 e IFN- γ no sobrenadante das culturas de CMSP do grupo WS e RBD. Observamos o aumento da produção de IL-10 na cultura estimulada com RBD no subgrupo de 3 doses ($p < 0,007$; Figura 16A). Não observamos diferença nas outras populações de célula.

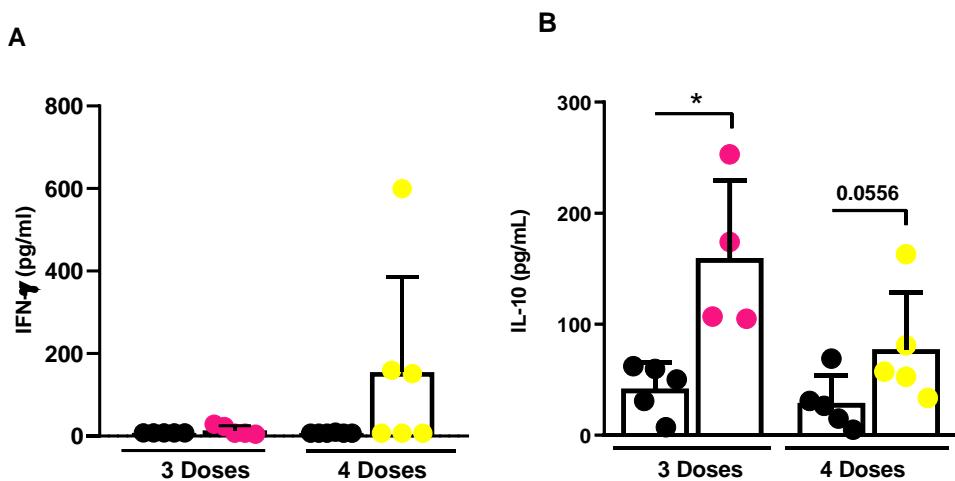


Figura 16: Níveis de citocinas no sobrenadante das culturas de CMSP nas culturas sem estímulo (WS) e estimuladas com antígeno RBD (RBD) nos grupos de vacinação homóloga e heteróloga. Dosagem de IFN- γ (A) e IL-10 (B). * $p < 0,007$ (Teste de Mann-whitney). O histograma e as barras representam a média e + DP.

4.4 DISCUSSÃO

A COVID-19 é uma doença causada pela infecção do vírus SARS-CoV-2 que se expandiu por todos os países, levando mais de 6.900.000 indivíduos à morte em todo mundo pela síndrome respiratória aguda grave (Coronavírus última situação (Covid-19) | TRT Português, [s.d.]), e mais de 700 mil mortes no Brasil (“Coronavírus Brasil”, 2024). Diante da pandemia, a urgência em buscar alternativas que prevenissem a infecção e diminuíssem os casos mais graves desencadeou a busca por vacinas e tratamentos como alternativa possível e eficaz, protegendo a população. Vacinas vetoriais baseadas em adenovírus, vacinas de subunidade recombinante, vacinas de ácido nucleico e vacinas inativadas estão entre os tipos de vacinas atualmente desenvolvidas contra o SARS-CoV-2 (DONG Y, et al; 2020).

Neste trabalho, avaliamos a resposta celular de memória e algumas citocinas importantes em indivíduos vacinados para COVID-19. A análise demográfica do estudo não mostrou diferenças na média da idade dos participantes em nenhum grupo avaliado. Entretanto, encontramos diferenças estatísticas com relação à proporção de gênero porém, esse dado foi encontrado ao acaso, já que não foram aplicados esquemas diferentes de vacinação com relação ao gênero. Porém, estudos mostram que pacientes do sexo masculino têm uma maior probabilidade de desenvolver a doença de forma mais grave (CAMACHO MOLL et al., 2023).

O presente estudo avaliou a subpopulações de linfócitos de memória nos indivíduos vacinados e não encontrou diferenças estatísticas entre os grupos WS, RBD e TT, contudo, quando avaliamos as subpopulações de células T de memória, nossos resultados mostraram maior frequência da população de células TEM e TEMRA em todos os indivíduos que participaram do estudo, e quando avaliamos por diferentes protocolos de vacinação também. Os receptores de migração dos linfonodos são expressos pelas células naïve (T NAIVE) e células T de memória central (T CM), que são abundantes nos linfonodos e exercem suas funções de maneira lenta. Em contraste, as células T s de memória efetora (T EM) e células T de memória efetora terminalmente diferenciada (T EMRA) expressam receptores

que estimulam a migração para tecidos inflamados, localizadas em locais de inflamação onde desempenham funções efetoras imediatas, como a produção de citocinas e respostas de citotoxicidade (CACCAMO N et al; 2005). Blackwell e colaboradores avaliaram os indivíduos após a vacinação com mRNA e relataram maiores populações substanciais de fenótipos respostas de células CD8⁺ T EM e T EMRA induzidas pela vacina, enquanto que as células T CD4⁺ consistiam principalmente de memória central T CM e memória efetora TEM (BLACKWELL K, et al 2023). Em outro estudo, Yang e colaboradores relataram um aumento das subpopulações de T EMRA e T NAIVE, e diminuição das subpopulações T CM e T EM em pacientes que tiveram infecções por SARS-CoV-2 após reforços da vacina COVID-19 inativada (M YANG, et al; 2024). Outro estudo teve como objetivo caracterizar a qualidade das células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas para vírus da dengue induzidas pela vacinação. As descobertas relatadas nesse trabalho, indicaram que a vacinação protetora contra o vírus da dengue induz células T EMRA CD4⁺ e CD8⁺ com múltiplas funções, o que implica que essas células T específicas para vírus podem contribuir para a imunidade protetora (GRAHAM N et al; 2020). Com esses resultados, identificamos a importância das células T de memória efetora e das células T de memória efetora terminalmente diferenciada na resposta contra reinfecções por SARS-CoV-2, elas desenvolvem suas funções efetoras protetoras esses individuos.

As células B de memória desempenham um papel importante na gravidade da reinfecção por COVID-19. Durante uma segunda exposição ao SARS-CoV-2, as células B de memória circulantes são ativadas e rapidamente se diferenciam em células secretoras de anticorpos que se ligam a proteína S do SARS-CoV-2 e impedem que o vírus entre nas células hospedeiras bloqueando a interação do domínio de ligação ao receptor (RBD) com o ACE2 (CHEN, S et al; 2022). Estudos mostraram a persistência de células B de memória por até 6 meses em pacientes que tiveram COVID-19, conferindo uma proteção parcial contra possíveis reinfecções (SOKAL A et al; 2021). Nossos resultados mostraram maior frequência de células B de memória nos indivíduos que tomaram vacina com esquema homólogo quando comparado ao grupo com esquema vacinal heterólogo. Entretanto, estudos mostram que a vacinação heteróloga com

reforço de mRNA resultou em respostas de anticorpos neutralizantes séricos e células B de memória significativamente maiores que aqueles indivíduos que tomaram reforço de ChAdOx1 (vacina de vetor viral) homólogo (KAKU V et al; 2021), essa vantagem obtida na vacinação heteróloga foi identificada também em outro estudo onde os indivíduos que receberam a vacina Pfizer-BioNTech oito semanas após a dose inicial da AstraZeneca apresentaram poucos efeitos colaterais e uma forte resposta de anticorpos dois semanas após a segunda dose de reforço (M BOROBIA, 2021). Apesar dos resultados, os indivíduos que tomaram vacina com esquema homólogo, apresentaram menor frequência células B de memória, garantindo também a proteção desse grupo.

Nossas análises se estenderam também a outras duas populações, as células T foliculares auxiliares ($CD4^+PD1^+CXCR5^+$) que fornecem sinais para às células B dentro do centro germinativo, sendo essenciais para reconhecimento e produção de anticorpos de longa duração (HALE et al; 2013) e as células T foliculares periféricas ($CD4^+PD1^+CXCR5^-$) que secretam CXCL13 de maneira intensa, uma quimiocina essencial para a formação de folículos linfoides em locais inflamatórios fora dos centros germinativos, e ajudam no estabelecimento da imunidade adquirida auxiliando as células B *in situ*, função semelhante as células T foliculares auxiliares (T PH) (YOSHITOMI H; 2022). Asashima e colaboradores mostraram que as células TPH ($PD-1^{hi} CXCR5^-$) induzem plasmablastos

$CXCR3^+$ por meio do IFN- γ na fase inicial da infecção viral aguda usando a COVID-19 como um modelo *in vivo* de infecção viral humana. (ASASHIMA et al, 2023). Em outro trabalho publicado, macacos *rhesus* foram separados por grupos, infundidos com plasma convalescente, normal ou sem infusão, e como resultado, observou-se um acúmulo temporário de células TFH proliferativas e monócitos pró-inflamatórios com perfil Th1 no sangue periférico. A infecção pelo SARS-CoV-2 produziu células TFH específicas para as proteínas spike e nucleocapsídeos do SARS-CoV-2, bem como o surgimento precoce de anticorpos IgG séricos antivirais (LAKSHMANAPPA S, et al; 2021). Nossos resultados mostraram maior frequência nas TPH quando comparadas a TFH auxiliares em todos os indivíduos que participaram do estudo e nos subgrupos

com diferentes esquemas vacinais. Esses resultados mostram a importância dessas células na imunopatogênese da COVID-19 e na proteção fornecida por essas populações celulares, desempenhando suas funções auxiliando a produção de anticorpos antivirais.

Avaliamos também a produção de citocinas pelas das células identificadas nesse estudo como, IL-10, IFN- γ e TGF- β . Analisamos a expressão dessas citocinas pelas células T de memória e avaliamos a produção de IL-10 e IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de CMSP. A IL-10 tem um papel importante no desenvolvimento de quadros leves da COVID-19, suprimindo a inflamação pulmonar local e induzindo o acúmulo de células T específicas do vírus, além de promover células T de memória residente nas superfícies da mucosa respiratória (NELSON C, et al; 2023). Contudo, outro estudo mostrou um papel ambíguo da IL-10, indicando que os níveis elevados da citocina protegem os pulmões enquanto interferem na eliminação viral, desde os estágios iniciais da infecção até a doença mais grave (LINDNER H, et al; 2021). Nossos dados não mostraram diferença na expressão de IL-10 pelos linfócitos T de memória entretanto, identificamos uma maior produção da citocina no sobrenadante das culturas de CMSP estimuladas com antígeno RBD, mostrando que outras células são fontes produtoras de IL-10, promovendo uma supressão da resposta imunológica que pode proteger esses indivíduos vacinados das formas mais graves da COVID-19 (SARAIVA; O'GARRA, 2010). Outra citocina analisada em nosso estudo foi o TGF- β , citocina responsável por regular a produção de citocinas inflamatórias, função relatada e em um estudo publicado que demonstrou que a neutralização do TGF- β aumentou significativamente a infiltração celular da circulação e dificultou a resolução do espessamento alveolar causado pela COVID-19 (SIMA, 2023). Porém, outros resultados relatados mostraram em casos de COVID-19 grave, uma resposta imune crônica que é direcionada pelo TGF- β (FERREIRA-GOMES M et al. 2021), mostrando diferentes papéis dessa citocina na patogênese causada pela infecção do SARS-CoV-2. O IFN- γ aumenta a resposta imune contra diferentes espécies de vírus e células cancerígenas, atuando como importante componente da imunidade celular, sendo possível alvo para efeitos terapêuticos de diversos tipos de

infecções e autoimunidades (KAK G et al; 2018). Como já foi relatado, quatro pacientes imunocomprometidos com COVID-19 se recuperaram sem nenhum sinal de hiperinflamação observado após o tratamento com interferon gama (VAN LAARHOVEN et al., 2021). Foi identificado uma maior expressão de TGF- β e IFN- γ pelas células de memória central e efetora mostrando que apesar dasua menor frequência, são as subopulações que mais expressam citocinas ao serem expostas ao antígeno RBD do SARS-CoV-2 e desenvolvem suas funções. Esses resultados que encontramos sugerem uma grande importância dessas citocinas na resposta imunológica contra COVID-19.

4.5 CONCLUSÃO

Diante do exposto, concluímos que nossos resultados mostraram um perfil das subpopulações de celulas T EM e T EMRA em todos os grupos avaliados, e uma maior frequência de celulas T foliculares periféricas, sendo as celulas T CM a subpopulação que mais expressa citocinas como TGF- β e IFN- γ . Observamos também maior frequencia de celulas B de memória no grupo de vacinação homóloga, sendo a única célula a apresentar diferença entre os grupos, com isso, concluímos que de maneira geral a resposta celular é semelhante e efetora independente do esquema vacinal ou da quantidade de doses aplicadas.

REFERÊNCIAS

- ALTER, G. et al. **Immunogenicity of Ad26.COV2.S vaccine against SARS-CoV-2 variants in humans.** Nature, p. 1–5, 9 jun. 2021.
- ASASHIMA, H. **PD-1highCXCR5–CD4+ peripheral helper T cells promote CXCR3+ plasmablasts in human acute viral infection.** Cell Reports, v. 41, n. 1, 31 jan. 2023.
- AU, W. Y.; CHEUNG, P. P.-H. **Effectiveness of heterologous and homologous covid-19 vaccine regimens: living systematic review with network meta-analysis.** BMJ, p. e069989, 31 maio 2022.
- BAKHIET M, Taurin S. **SARS-CoV-2: Targeted managements and vaccine development.** Cytokine Growth Factor Rev. 2021 Apr; 58:16-29. doi: 10.1016/j.cytofr.2020.11.001. Epub 2020 Dec 1. PMID: 33293238; PMCID: PMC7706592
- BALDELLI, L. et al. **SARS-CoV-2 Infection and Liver Disease: A Review of Pathogenesis and Outcomes.** Gut and Liver, v. 17, n. 1, p. 12–23, 2 dez. 2022.
- BAROUCH, D. H. et al. **Durable Humoral and Cellular Immune Responses 8 Months after Ad26.COV2.S Vaccination.** The New England Journal of Medicine, 14 jul. 2021.
- BOECHAT JL, Chora I, Morais A, Delgado L. **The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology - Current perspectives.** Pulmonology. 2021;27(5):423-437. doi:10.1016/j.pulmoe.2021.03.008
- CACCAMO N, et al. **Differential requirements for antigen or homeostatic cytokines for proliferation and differentiation of human Vgamma9Vdelta2 naive, memory and effector T cell subsets.** Eur J Immunol. 2005 Jun;35(6):1764-72. doi: 10.1002/eji.200525983. PMID: 15915537.
- CAMACHO MOLL, M. E. et al. **Sex, Age, and Comorbidities Are Associated with SARS-CoV-2 Infection, COVID-19 Severity, and Fatal Outcome in a Mexican Population: A Retrospective Multi-Hospital Study.** Journal of Clinical Medicine, v. 12, n. 7, p. 2676, 3 abr. 2023.
- CHEN, Shiru et al. **The role of B cells in COVID-19 infection and vaccination.** Frontiers in immunology, v. 13, p. 988536, 2022.
- CHEN, Zeyu; JOHN WHERRY, E. **T cell responses in patients with COVID-19.** Nature Reviews Immunology, v. 20, n. 9, p. 529-536, 2020.
- CHERUIYOT, S.; ORINDI, B. O.; WARIMWE, G. M. Data for: **A phase Ib/II single-blinded, randomised, controlled study to determine safety, immunogenicity and efficacy of the candidate Coronavirus Disease**

(COVID-19) vaccine ChAdOx1 nCoV-19 in adults in Kenya. Harvard Dataverse, 1 jan. 2023.

Christine Nelson, et al; **IL-10 promotes tissue-resident memory T cells (T RM)in the respiratory tract during SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques.** J Immunol 1 May 2023; 210 (1_Supplement): 75.05. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.210.Supp.75.05>

Coronavírus Brasil. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 26 set. 2024.

Coronavírus última situação (Covid-19) | TRT Portuguese. Disponível em: <<https://www.trt.net.tr/portuguese/covid19>>.

COSTA P et al. **Humoral and cellular immune responses to CoronaVac up to one year after vaccination.** Frontiers in immunology, v. 13, 21 out. 2022.

COX, REBECCA J, AND KARL A BROKSTAD. “**Not just antibodies: B cells and T cells mediate immunity to COVID-19.**” Nature reviews. Immunology, 1–2. 24 Aug. 2020, doi:10.1038/s41577-020-00436-4.

CRAWFORD, Katharine H. D. et al. **Dynamics of Neutralizing Antibody Titers in the Months After Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection.** The Journal of Infectious Diseases, [S. I.], p. 197–205, 30 set. 2020. DOI doi: 10.1093/infdis/jiaa618.

DA SAÚDE, Ministério. **Vacinômetro COVID-19.** [S. I.], 7 set. 2023. Disponível em: https://infoms.saude.gov.br/extensions/SEIDIGI_DEMAS_Vacina_C19/SEIDIGI_DEMAS_Vacina_C19.html. Acesso em: 7 set. 2023.b

DONG, Yetian et al. **A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates.** Signal transduction and targeted therapy, v. 5, n. 1, p. 237, 2020.

FERREIRA-GOMES, M., Kruglov, A., Durek, P. et al. **SARS-CoV-2 in severe COVID-19 induces a TGF-β-dominated chronic immune response that does not target itself.** Nat Commun 12, 1961 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22210-3>

GHEBLAWI, Mahmoud et al. **Angiotensin-converting enzyme 2: SARS-CoV-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system: celebrating the 20th anniversary of the discovery of ACE2.** Circulation research, v. 126, n. 10, p. 1456-1474, 2020.

GOEL, Rishi R. et al. **MRNA Vaccines Induce Durable Immune Memory to SARS-CoV-2 and Variants of Concern.** Science, [S. I.], v. 374, n. 6572, p. 1127-1132, 21 dez. 2021. DOI 10.1126/science.abm0829.

GOLOB JL, Lugogo N, Lauring AS, Lok AS. **SARS-CoV-2 vaccines: a triumph of science and collaboration.** JCI Insight. 2021 May 10;6(9): e149187. doi: 10.1172/jci.insight.149187. PMID: 33822773; PMCID: PMC8262277.

GORBALENYA, Alexander E. et al. **The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2**. Nature microbiology, v. 5, n. 4, p. 536-544, 2020

GRIFONI, Alba et al. **Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals**. Cell, v. 181, n. 7, p. 1489-1501. e15, 2020.

GUAN, Wei-jie et al. **Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China**. The new england journal of medicine, S.l, p. 1708-1720, 28 fev. 2020. DOI 10.1056/NEJMoa2002032.

Gusev, E. Sarapultsev, A.; Solomatina, L. Chereshnev, V. **SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19**. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 1716. <https://doi.org/10.3390/ijms23031716>

HALE, J. S. Distinct **Memory CD4⁺ T Cells with Commitment to T Follicular Helper- and T Helper 1-Cell Lineages Are Generated after Acute Viral Infection**. Cell Press, v. 38, n. 4, 18 abr. 2013.

HARRISON, Andrew G.; LIN, Tao; WANG, Penghua. **Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis**. Trends in immunology, v. 41, n. 12, p. 1100-1115, 2020.

HAVER A, et al. **Persistence of neutralizing antibodies a year after SARS-CoV-2 infection in humans**. Eur J Immunol. 2021 Dec;51(12):3202-3213. doi: 10.1002/eji.202149535. Epub 2021 Oct 8. PMID: 34580856; PMCID: PMC8646652.

HU, B., Guo, H., Zhou, P. et al. **Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19**. Nat Rev Microbiol 19, 141–154 (2021). 6 out. 2020. DOI <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.

JACKSON, C.B., Farzan, M., Chen, B. et al. **Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells**. Nat Rev Mol Cell Biol 23, 3–20 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>

JIN, L. et al. **CoronaVac: A review of efficacy, safety, and immunogenicity of the inactivated vaccine against SARS-CoV-2**. Human Vaccines & Immunotherapeutics, v. 18, n. 6, 25 jul. 2022.

JORDAN, S. C. **Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: relevance to acquired immunity and vaccine responses**. Clinical and Experimental Immunology, Los angeles, v. 204, n. 3, p. 310–320, 4 mar. 2021. DOI doi: 10.1111/cei.13582.

JUSAK NUGRAHA et al. **Kinetics of anti-SARS-CoV-2 responses post complete vaccination with coronavac: A prospective study in 50 health workers**. Deleted Journal, v. 11, n. 3, p. 227990362211041-227990362211041, 1 jul. 2022.

KAK, Gunjan, Raza, Mohsin and Tiwari, Brijendra K. "**Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases**" Biomolecular Concepts, vol. 9, no. 1, 2018, pp. 64-79. <https://doi.org/10.1515/bmc-2018-0007>

KAKU, V. O. P. I.; et al. **Broad anti-SARS-CoV-2 antibody immunity induced by heterologous ChAdOx1/mRNA-1273 prime-boost vaccination.** Science, v. 4, 14 dez. 2021.

KANEKO, Naoki et al. **Loss of Bcl-6-expressing T follicular helper cells and germinal centers in COVID-19.** Cell, v. 183, n. 1, p. 143-157. e13, 2020.

KIRTIPAL N, Bharadwaj S, Kang SG. **From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses.** Infect Genet Evol. 2020 Nov; 85:104502. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104502. Epub 2020 Aug 13. PMID: 32798769; PMCID: PMC7425554

KRAWCZYK CM, Shen H., Pearce EJ. **Memory CD4 T Cells Enhance Primary CD8 T-Cell Responses.** Infectar. Imun. 2007; 75 :3556–3560.

LAI, C.-C. et al. **Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges.** International Journal of Antimicrobial Agents, v. 55, n. 3, p. 105924, fev. 2020.

LE GARS, M. et al. **Immunogenicity and efficacy of Ad26. COV2 .S: An adenoviral vector-based COVID -19 vaccine.** Immunological. Reviews, v. 310, n. 1, p. 47–60, 11 jun. 2022.

LIM, S. P. **Targeting SARS-CoV-2 and host cell receptor interactions.** Antiviral Research, p. 105514, dez. 2022.

LINDNER HA, Velásquez SY, Thiel M and Kirschning T (2021) Lung Protection vs. **Infection Resolution: Interleukin 10 Suspected of Double-Dealing in COVID-19.** Front. Immunol. 12:602130. doi: 10.3389/fimmu.2021.602130

LIU, X. et al. **Safety and immunogenicity of heterologous versus homologous prime-boost schedules with an adenoviral vectored and mRNA COVID-19 vaccine (Com-COV): a single-blind, randomised, non-inferiority trial.** Lancet (London, England), v. 398, n. 10303, p. 856–869, 4 set. 2021.

M BOROBIA, A. et al. **Immunogenicity and reactogenicity of BNT162b2 booster in ChAdOx1-S-primed participants (CombiVacS): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial.** Elsevier, v. 398, 25 jun. 2021.

MAISON, D. P.; DENG, Y.; GERSCHENSON, M. **SARS-CoV-2 and the host-immune response.** v. 14, 19 jun. 2023.

MARRA, A. R. et al. **Longer-term effectiveness of a heterologous**

coronavirus disease 2019 (COVID-19) vaccine booster in healthcare workers in Brazil. Antimicrobial stewardship & healthcare epidemiology, v. 3, n. 1, 1 jan. 2023.

MAYER, S. et al. **Analysis of the Immune Response against Tetanus Toxoid: Enumeration of Specific T Helper Cells by the Elispot Assay.** Immunobiology, v. 205, n. 3, p. 282–289, 1 jan. 2002.

MCMAHAN K, et al. **Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques.** Nature. 2021 Feb;590 (7847):630-634. doi: 10.1038/s41586-020-03041-6. Epub 2020 Dec 4. PMID: 33276369; PMCID: PMC7906955.

Ministério da Saúde. Painel Coronavírus. [S. I.], 4 nov. 2022. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em: 5 nov. 2022.

MUDD, Philip A. et al. **SARS-CoV-2 mRNA vaccination elicits a robust and persistent T follicular helper cell response in humans.** Elsevier, [S. I.], v. 165, n. 4, p. 603–613, 17 fev. 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.026>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8695127/>.

MURALIDAR, Shibi et al. **The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2.** Biochimie, [S. I.], v. 179, p. 85–100, 22 set. 2020. DOI 10.1016/j.biochi.2020.09.018. 3.0303.

NEWELL KL, Clemmer DC, Cox JB, Kayode YI, Zoccoli-Rodriguez V, Taylor HE, et al. (2021) **As células B de memória comutadas e não comutadas detectadas durante a convalescença de SARS-CoV-2 correlacionam-se com a duração limitada dos sintomas.** PLoS ONE 16(1): e0244855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244855>

NI, LING ET AL. “**Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals.**” Immunity vol. 52,6 (2020): 971-977.e3. doi:10.1016/j.immuni.2020.04.023

NOH JY, et al. **Longitudinal Assessment of Antisevere Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Immune Responses for Six Months Based on the Clinical Severity of Coronavirus Disease 2019.** J Infect Dis. 2021 Sep 1;224(5):754-763. doi: 10.1093/infdis/jiab124. PMID: 34467985; PMCID: PMC7989218.dis/jiab124

Organização Mundial da Saúde (OMS) (COVID-19) pandemic: WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. In: Coronavirus disease (COVID-19) pandemic: WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. S.I, 4 nov. 2022.

PAINTER, Mark M. et al. **Rapid induction of antigen-specific CD4⁺ T cells is associated with coordinated humoral and cellular immunity to SARS-CoV-2 mRNA vaccination.** Immunity, v. 54, n. 9, p. 2133-2142. e3, 2021.

PARASKEVIS, D. et al. **Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event.** Infection, Genetics and Evolution, v. 79, p. 104212, abr. 2020.

PATEL, R. et al. **A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson. Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 7 fev. 2022.

PENG, Y., Mentzer, A.J., Liu, G. et al. **Broad and strong memory CD4⁺ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19.** Nat Immunol 21, 1336–1345 (2020).
<https://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>

POLACK, F. P. et al. **Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine.** New England Journal of Medicine, v. 383, n. 27, p. 2603–2615, 10 dez. 2020.

PRIMORAC, Dragan et al. **Adaptive immune responses and immunity to SARS-CoV-2.** Frontiers in Immunology, v. 13, p. 848582, 2022.

PUHACH, O.; MEYER, B.; ECKERLE, I. **SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics.** Nature Reviews Microbiology, 2 dez. 2022.

RAMASAMY, M. N. et al. **Safety and immunogenicity of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine administered in a prime-boost regimen in young and old adults (COV002): a single-blind, randomised, controlled, phase 2/3 trial.** The Lancet, v. 396, n. 10267, 18 nov. 2020.

RODDA, Lauren B. et al. **Functional SARS-CoV-2-Specific Immune Memory Persists after Mild COVID-19.** Elsevier, S.I, p. 169–183, 7 jan. 2021. DOI 10.1016/j.cell.2020.11.029.

RÖLTGEN, Katharina; BOYD, Scott D. **Antibody and B cell responses to SARS-CoV-2 infection and vaccination.** Cell host & microbe, v. 29, n. 7, p. 1063-1075, 2021.

SADOFF, J. et al. **Final Analysis of Efficacy and Safety of Single-Dose Ad26.COV2.S.** New England Journal of Medicine, 9 fev. 2022.

SADOFF, J. et al. **Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19.** New England Journal of Medicine, v. 384, n. 23, 21 abr. 2021.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. **The Regulation of IL-10 Production by Immune Cells.** Nature Reviews Immunology, v. 10, n. 3, p. 170–181, 15 fev. 2010.

SAULE, P. et al. **Accumulation of memory T cells from childhood to old age: Central and effector memory cells in CD4+ versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8⁺ compartment.** Mechanisms of Ageing and Development, v. 127, n. 3, p. 274–281, mar. 2006.

SEKINE, Takuya et al. **Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19.** Cell, v. 183, n. 1, p. 158-168. e14, 2020.

SEOW, Jeffrey et al. **Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans.** Nature Microbiology, [S. l.], v. 5, p. 1598–1607, 26 out. 2020. DOI <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00813-8>.

SETTE, ALESSANDRO, AND SHANE CROTTY. “**Pre-existing immunity to SARS-CoV-2: the knowns and unknowns.**” Nature reviews. Immunology vol. 20,8 (2020): 457-458. doi:10.1038/s41577-020-0389-z

SHAAN Lakshmanappa, Y. et al. **SARS-CoV-2 induces robust germinal center CD4 T follicular helper cell responses in rhesus macaques.** Nat Commun 12, 541 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20642-x>

SHEN, J. et al. **Innate and adaptive immunity to SARS-CoV-2 and predisposing factors.** Frontiers in Immunology, v. 14, 9 maio 2023.

SILVA, M. J. A. et al. **Adaptive immunity to SARS-CoV-2 infection: A systematic review.** Frontiers in Immunology, v. 13, 10 out. 2022.

SIMA, S. T. **Immunoregulatory Roles of TGF-β and IL-4 during Mouse-adapted SARS-CoV-2 Infection.** The Journal of Immunology, v. 210, 1 maio 2023.

SOBIESZCZYK, M. E. et al. **Durability of protection and immunogenicity of AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19) COVID-19 vaccine over 6 months.** Journal of Clinical Investigation, v. 132, n. 18, 15 set. 2022.

SOKAL, A. et al **Maturation and persistence of the anti-SARS-CoV-2 memory B cell response.** Cell, v. 184, 4 mar. 2021.

SPENCER, A. J. et al. **The ChAdOx1 vectored vaccine, AZD2816, induces strong immunogenicity against SARS-CoV-2 beta (B.1.351) and other variants of concern in preclinical studies.** eBioMedicine, v. 77, p. 103902, 1 mar. 2022.

SU, S.; DU, L.; JIANG, S. **Learning from the past: development of safe and effective COVID-19 vaccines.** Nature Reviews Microbiology, 16 out. 2020.

SUBHOMOI BORKOTOKY; DEY, D.; ZAVED HAZARIKA. **Interactions of angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) and SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain (RBD): a structural perspective.** v. 50, n. 3, p. 2713–2721, 23 dez. 2022.

TAN, Anthony T. et al. **Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T**

cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. Cell Report, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 1-19, 9 fev. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.celrep.20>

TANRIOVER, M. D. et al. **Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey.** The Lancet, v. 398, n. 10296, p. 213–222, 17 jul. 2021.

TARKE et al., 2022, Cell 185, 847–859 March 3, 2022 ^a 2022 Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.015>.

THEVARAJAN, I., Nguyen, T.H.O., Koutsakos, M. et al. **Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19.** Nat Med 26, 453–455 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0819-2>

THOMAS, S. J. et al. **Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine through 6 Months.** New England Journal of Medicine, v. 385, n. 19, p. 1761–1773, 15 set. 2021.

TIRELLI, C. et al. **Exploring the Role of Immune System and Inflammatory Cytokines in SARS-CoV-2 Induced Lung Disease: A Narrative Review.** Biology, v. 12, n. 2, p. 177, 1 fev. 2023.

TORBATI, E., Krause, K. L., & Ussher, J. E. (2021). **The Immune Response to SARS-CoV-2 and Variants of Concern.** Viruses, 13(10), 1911. <https://doi.org/10.3390/v13101911>

V'KOVSKI, Philip et al. **Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2.** Nature Reviews Microbiology, v. 19, n. 3, p. 155-170, 2021.

VAN LAARHOVEN, A. et al. **Interferon gamma immunotherapy in five critically ill COVID-19 patients with impaired cellular immunity: A case series.** Med, v. 2, n. 10, p. 1163-1170.e2, out. 2021.

VERBEKE, R. et al. **The dawn of mRNA vaccines: The COVID-19 case.** Journal of Controlled Release, v. 333, n. 1, p. 511–520, 10 maio 2021.

VOYSEY, M. et al. **Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: a pooled analysis of four randomised trials.** The Lancet, v. 397, n. 10277, fev. 2021.

WILDER-SMITH, A.; MULHOLLAND, K. **Effectiveness of an Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine.** New England Journal of Medicine, v. 385, n. 10, p. 946–948, 2 set. 2021.

YANG, Haitao; RAO, Zihe. **Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development.** Nature Reviews Microbiology, v. 19, n. 11, p. 685-700, 2021.

YORSAENG, R. et al. **Immunogenicity of a third dose viral-vectored COVID-19 vaccine after receiving two-dose inactivated vaccines in healthy adults.** Vaccine, dez. 2021.

YOSHITOMI H. **Peripheral Helper T Cell Responses in Human Diseases.** Front Immunol. 2022 Jul 8;13:946786. doi: 10.3389/fimmu.2022.946786. PMID: 35880181; PMCID: PMC9307902.

YU, S. et al. **SARS-CoV-2 Spike-Mediated Entry and Its Regulation by Host Innate Immunity.** Viruses, v. 15, n. 3, p. 639, 1 mar. 2023.

ZHANG, X. et al. **Effectiveness of homologous or heterologous immunization regimens against SARS-CoV-2 after two doses of inactivated COVID-19 vaccine: A systematic review and meta-analysis.** Human Vaccines & Immunotherapeutics, v. 19, n. 2, 21 jun. 2023.

ZHAO J, et al. **Memory CD4(+) T Cells Mediate Protective Immunity against Emerging Respiratory Coronaviruses.** Immunity. 2016 Jun 21;44(6):1379-91. doi: 10.1016/j.immuni.2016.05.006. Epub 2016 Jun 7. PMID: 27287409; PMCID: PMC4917442.

ZHU, N. et al. **A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019.** New England Journal of Medicine, v. 382, n. 8, 24 jan. 2020.

Cai, C., et al. (2021). A comprehensive analysis of the efficacy and safety of COVID-19 vaccines. *Molecular Therapy*, 29, 2794 - 2805. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.08.001>.

Paula, N, et al (2022). **Análise populacional da resposta da imunoglobulina G a diferentes vacinas contra COVID-19 no Brasil.** Vacinas , 11. <https://doi.org/10.3390/vaccines11010021> .

ANEXOS

Projeto de pesquisa perfil de linfócitos de memória em indivíduos vacinados para COVID-19

Você está sendo convidado a participar desse projeto de pesquisa para que possamos compreender a resposta imune celular de memória em indivíduos vacinados para COVID-19. Abaixo preparamos perguntas que vão nos ajudar a filtrar a população do estudo, e caso se encaixe nos nossos critérios, vamos convidá-los a participar. É importante ressaltar que a pandemia da COVID-19 levou a uma grande preocupação na população global, com inúmeros indivíduos que foram a óbito, e deixou sequelas em grande parte da população. Sendo assim, a vacinação contra COVID-19 tornou-se uma grande aliada durante a pandemia pois estimula a produção de anticorpos neutralizantes que bloqueiam a entrada do vírus na célula prevenindo possíveis infecções e reinfecções. Junto a isso, a resposta imune celular de memória ajuda a manter essa proteção também, pois as células que reconhecem os抗ígenos virais permanecem no corpo e conseguem responder de maneira rápida. Com isso, a comunidade científica vem buscando entender melhor sobre esse novo vírus, sua infecção e as complicações que ele pode causar.

Aprovado pelo Comitê de Ética
da Faculdade de Farmácia (número do parecer 4.697.661)

Programa de Pós Graduação em Imunologia - Universidade Federal da Bahia

E-mail para contato em caso de duvidas: projetocovid8@gmail.com

suanneburgos@gmail.com [Mudar de conta](#)



Não compartilhado

* Indica uma pergunta obrigatória

Sem título

Nome completo *

Sua resposta

Telefone para contato *

Sua resposta

E-mail para contato *

Sua resposta

Data de nascimento *

Data

dd/mm/aaaa

Gênero

Feminino

Masculino

Outro

Tomou vacina para COVID-19? *

Sim

Não

Quantas doses?

- 1 dose
- 2 doses
- 3 doses
- 4 doses

Qual vacina foi aplicada na PRIMEIRA dose ? *

- CoronaVac®
- AztraZeneca/Oxford®
- Pfizer®
- Janssen®
- Não aplicada

Data da PRIMEIRA dose:

Data

dd/mm/aaaa

Qual vacina foi aplicada na SEGUNDA dose ?*

- CoronaVac®
- AztraZeneca/Oxford®
- Pfizer®
- Janssen®
- Não aplicada

Data da SEGUNDA dose:

Data

dd/mm/aaaa

Qual vacina foi aplicada na TERCEIRA dose ?*

- CoronaVac®
- AztraZeneca/Oxford®
- Pfizer®
- Janssen®
- Não aplicada

Data da TERCEIRA dose:

Data

dd/mm/aaaa

Qual vacina foi aplicada na QUARTA dose ?

- CoronaVac®
- AztraZeneca/Oxford®
- Pfizer®
- Janssen®
- Não aplicada

Data da QUARTA dose:

Data

dd/mm/aaaa

Qual vacina foi aplicada na QUINTA dose ?

- CoronaVac®
- AztraZeneca/Oxford®
- Pfizer®
- Janssen®
- Não aplicada

Data da QUINTA dose:

Data

dd/mm/aaaa

Já teve COVID-19?

- Sim
 Não

Já teve COVID-19 mais de uma vez?

- Sim
 Não

Períodos da infecção (mês/ano):

ex:

1º infecção - agosto/2020

2º infecção - setembro/2021

Sua resposta

[Enviar](#)

[Limpar formulário](#)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL DE LINFÓCITOS DE MEMÓRIA EM INDIVÍDUOS CONVALESCENTES E VACINADOS PARA A COVID-19

Pesquisador: Luciana Santos Cardoso

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 45005621.1.0000.8035

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia

Patrocinador Principal: Universidade Federal da Bahia - UFBA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.697.661

Apresentação do Projeto:

As informações descritas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas desta Pesquisa submetido em 23/03/2021, intitulada "PERFIL DE LINFÓCITOS DE MEMÓRIA EM INDIVÍDUOS CONVALESCENTES E VACINADOS PARA A COVID-19".

Recentemente em dezembro de 2019, um surto de pneumonia ocorreu na cidade chinesa de Wuhan, sendo que a etiologia foi atribuída uma nova espécie de coronavírus, denominada de SARS-CoV-2 (ZHU et al., 2020), cuja estrutura viral se assemelha ao agente causador de uma outra epidemia de síndrome respiratória aguda, o SARS-CoV (Síndrome Respiratória Aguda Grave), que atingiu a China em 2002 (DROSTEN, 2003). São

descritas na literatura seis espécies de coronavírus capazes de causar doenças humanas, duas delas responsáveis por surtos de acometimento respiratório grave, em 2002 na China e em 2012 no Oriente Médio: SARS-CoV (Síndrome Respiratória Aguda Grave) e MERS-CoV (Síndrome Respiratória do Oriente Médio) (CHENG et al., 2005; KO et al., 2018; ZAKI, 2012).

Embora existam semelhanças estruturais entre essas três espécies de coronavírus, o SARS-CoV-2 dissemina-se rapidamente, de modo que, em 11 de março de 2020, a OMS considerou a doença provocada por esse vírus, a COVID-19, como uma pandemia (OMS, 2020a). Em 04 de janeiro de

Endereço: BARAO DE JEREMOABO 147
Bairro: ONDINA CEP: 40.170-115
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-6902 Fax: (71)3283-6919 E-mail: cepfar@ufba.br

Continuação do Parecer: 4.697.661

2021, a OMS indicou a existência de 83.322.449 casos confirmados de COVID-19 em todo o mundo, com 1.831.412 óbitos, sendo que o Brasil é o terceiro país mais afetado em número de casos, perdendo apenas para os Estados Unidos e Índia (OMS, 2021b). De acordo com dados do Ministério da Saúde, em 04 de janeiro de 2021, existiam no Brasil 7.733.746 casos confirmados de COVID-19 e 196.018 mortes pela doença, sendo São Paulo, Minas Gerais e a Bahia os estados com maior número de notificações (BRASIL, 2021). A Bahia, de acordo com boletim epidemiológico emitido pela SESAB em 03 de janeiro de 2021, apresentava 496.008 casos confirmados e 9.218 óbitos (BAHIA, 2021). De forma semelhante ao SARS-CoV, MERS-CoV e Influenza, o novo coronavírus é transmitido pelas vias respiratórias, embora tenha sido detectado no trato gastrointestinal, saliva e urina, que seriam possíveis vias de transmissão (GUAN et al., 2020). Após um período de incubação em torno de 2 a 7 dias, a apresentação clínica pode variar desde quadros leves/moderados de febre, tosse, náuseas, vômitos, diarreia e alterações no olfato/paladar a até quadros de insuficiência respiratória demandando ventilação mecânica invasiva. Aproximadamente 80% dos pacientes permanecem assintomáticos ou oligo-sintomáticos, mas 14% cursam com as formas mais graves e 6% precisam de cuidados de terapia intensiva. As formas graves acometem indivíduos mais idosos e/ou portadores de doenças cardio-vasculares, diabetes mellitus ou condições imunossupressoras. Nos diversos países, a mortalidade da COVID-19 vem variando entre 2,5% a 7,5% dos casos, a depender do continente (OMS, 2020b). Os perfis de carga viral e as respostas de anticorpos séricos podem ser úteis para orientar e planejar a adoção de medidas preventivas e terapêuticas para a COVID-19. O pico de carga viral de pacientes com infecções por MERS-CoV e SARS-CoV ocorre em torno de 7 a 10 dias após o início dos sintomas, o que pode estar associado a surtos populacionais e nosocomiais. Desde a sua descoberta, o SARS-CoV-2, em menos de três meses, provocou a maior crise de saúde mundial da história moderna e, à despeito disso, ainda não há um tratamento preventivo ou curativo definitivo para a doença. A maioria dos indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 apresentam a forma leve da COVID-19, mas não se sabe se isso pode induzir memória imunológica persistente que poderia contribuir para a imunidade protetora.

1.1 RESPOSTA IMUNE HUMORAL E DAS CÉLULAS DE MEMÓRIA NA INFECÇÃO PELO SARS-COV 2

A avaliação da resposta imune humorada na infecção pelo SARS-CoV 2 apresenta alguns desafios, uma vez que ainda o perfil de ativação inicial de anticorpos IgM/IgA, seguido de IgG na soroconversão parece não ocorrer de forma clássica nesta infecção. Tem sido relatados alguns indivíduos que apresentaram o teste de reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR) positivo para SARS-CoV 2, mas que não apresentaram anticorpos mesmo após meses da infecção, alguns que só

Endereço: BARÃO DE JEREMOABO 147
Bairro: ONDINA CEP: 40.170-115
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-6902 Fax: (71)3283-6919 E-mail: cepfar@ufba.br



Continuação do Parecer: 4.097.661

apresentam IgM positivo, mesmo seis meses após a infecção e outros perfis não usuais de produção de anticorpos contra SARS-CoV 2. É provável que os anticorpos neutralizantes se correlacionem melhor com a função efetora, apesar de existirem outros mecanismos de ação dos anticorpos, a exemplo da ativação do sistema complemento e da citotoxicidade celular dependente de anticorpos. Adicionalmente, ainda não está claro qual classe de anticorpo tem maior função efetora no combate ao vírus.

Tanto imunidade humoral quanto a imunidade celular estão envolvidas na imunopatogênese da COVID-19 (NI; AZKUR, 2020). Entre as células do sistema imune que desempenham importante papel na infecção pelo SARS-CoV-2 estão as células de memória (SETTE; CROTTY, 2020). A indução de memória específica para SARS-CoV-2 por células B é importante na proteção contra reinfecções a curto e longo prazo (COX; BROKSTAD, 2020). Newell e colaboradores mostraram uma correlação negativa entre a frequência de células B de memória do sangue periférico e a duração dos sintomas clínicos em indivíduos convalescentes. Esses mesmos autores mostraram ainda que células B de memória (IgM+CD24+naiveneg) se correlacionou diretamente com as respostas de anticorpos específicos do vírus e permaneceu estável ao longo do tempo (NEWELL et al., 2020). Já outro estudo, mostrou que a expansão de células B de memória atípicas é uma característica proeminente na infecção ativa por SARS-CoV-2. Entretanto, esse subtipo celular encontra-se diminuído nos indivíduos convalescentes, sendo as células B de memória clássicas as mais abundantes nesses indivíduos (OLIVIERO et al., 2020). Outro importante tipo celular de memória que também estariam contribuindo na patogênese da COVID-19 são as células T. Rodda e colaboradores mostraram que indivíduos recuperados que apresentaram sintomas leves foram capazes de desenvolver células T de memória que não só persistiram, mas em alguns casos aumentaram numericamente ao longo de três meses após o início dos sintomas. Além disso, os linfócitos de memória específicos para SARS-CoV-2 exibiram características associadas à imunidade antiviral potente: as células T de memória secretaram IFN- γ e expandiram após reencontro com抗ígenos (RODDA et al., 2020). Por outro lado, estudo realizado por Peng e colaboradores mostrou que não existe uma correlação entre as respostas das células T (produção de INF- γ) e dias após o desenvolvimento dos sintomas. Este mesmo estudo mostrou que linfócitos T de memória específicas para a proteína Spike de pacientes graves de COVID-19 apresentaram uma maior resposta comparados aos linfócitos de pacientes com a forma leve da doença (Peng et al., 2020). Usando pools de peptídeos "mega" prévios de HLA-classes I e II, Grifoni e colaboradores avaliaram as respostas das células T CD4+ e CD8+ em indivíduos convalescentes não

Endereço: BARAO DE JEREMOABO 147
Bairro: ONDINA **CEP:** 40.170-115
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3283-6902 **Fax:** (71)3283-6919 **E-mail:** cepfar@ufba.br

Página 03 de 10

Continuação do Parecer: 4.697.661

hospitalizados. Eles encontraram que todos os indivíduos recuperados estabeleceram respostas de T CD4+ de memória e 70% estabeleceram respostas de memória CD8+ ao SARS-CoV-2 (GRIFONI et al., 2020). Peng e colaboradores mostraram que existe uma proporção maior dos linfócitos de memória T CD8+ específica para proteína Spike (em vez de CD4+) nos indivíduos com doença leve em comparação àqueles com doença grave (Peng et al., 2020). Entretanto este mesmo estudo mostrou que existem proporções mais

altas de células T CD4+ capazes de produzir mais de uma citocina (INF-, TNF e IL-2) do que células T CD8+ (Peng et al., 2020). Zhang e colaboradores demonstrou que

existem três importantes cluster de células T de memória (CD8+TEM, CD8+TTE e CD4+TTE) no sistema imune adaptativo de pacientes com COVID-19 (ZHANG et al., 2020). Já em indivíduos que apresentaram síndrome aguda respiratória grave o perfil fenotípico de subpopulações de células T de memória, foram: células T CD4+TEM (memória central) e para as células CD8+TEM/TEMRA (memória efetora ou efetor terminalmente diferenciado) (WEISKOPF et al., 2020). Sabe-se que as células T foliculares tem um papel importante na ativação dos linfócitos B e indução da produção de anticorpos nos plasmócitos. Entretanto o papel destas células na infecção pelo SARS-CoV-2 ainda vem sendo elucidado. Estudo de observação prospectiva de uma paciente com a forma leve da doença, mostrou um aumento do número de células T auxiliares foliculares, células T

CD4+ ativadas, assim como aumento do título de anticorpos específicos no sangue antes mesmo da resolução dos sintomas (THEVARAJAN et al., 2020). Em um outro estudo avaliando o perfil de linfócitos de pacientes convalescentes da COVID-19, Sekine e colaboradores mostraram que as células T CD4+ específicas para抗genos da superfície viral do SARS-CoV-2 foram polarizadas em direção a um perfil de auxiliar folicular T circulante (cTfh), sugerindo um papel fundamental na geração de respostas de anticorpos específicos, enquanto as células T CD4+ específicas do nucleocapsídeo do vírus foram direcionadas a um perfil Th1 ou Th1/Th17 (Sekine et al., 2020). Kaneko e colaboradores mostraram ao avaliar cortes histológicos de paciente que morrem por COVID-19 que os centros germinativos (CGs) dos linfócitos B estavam amplamente ausentes durante a fase aguda do COVID-19. A falta de (CGs) foi acompanhada pela ausência de células B que expressam BCL6 ou células Tfh, que são indispensáveis para a geração de CGs. Além disso, uma análise da composição de células T CD4 in situ revelou um enriquecimento de células T que expressam TBET com um aumento concomitante de TNF, a qual poderia estar inibindo a diferenciação dessas células Tfh e favorecendo a polarização dos linfócitos para o perfil Th1 (Kaneko et al., 2020).

Endereço: BARAO DE JEREMOABO 147
Bairro: ONDINA CEP: 40.170-115
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-6902 Fax: (71)3283-6919 E-mail: cepfar@ufba.br

Continuação do Parecer: 4.697.661

Estudos mostraram a diminuição na concentração de imunoglobulinas específicas para SARS-CoV-2 meses após a infecção, levantando a preocupação de que a produção de anticorpos contra o vírus não seja durável. Sendo assim, se a imunidade humoral diminuir rapidamente nos indivíduos infectados, as pessoas podem correr o risco de reinfecção após a recuperação da COVID-19. Ainda não ficou claro até que ponto várias características da resposta imune das células T se associam ao soro/estado e ao curso clínico de COVID-19. No entanto, os linfócitos de memória podem fornecer imunidade humoral e celular permanente, mesmo que os títulos de anticorpos específicos para o SARS-CoV-2 do soro diminuam. Peng e colaboradores observaram uma correlação significativa entre os títulos de anticorpos específicos contra a proteína Spike e ambas as respostas dos linfócitos T totais e específicos para proteína Spike, assim como também houve correlação entre os títulos de anticorpos específicos do domínio RBD e ambas as respostas de células T totais e específicas para a proteína Spike. Além disso, níveis significativamente mais elevados de anticorpos contra as proteínas Spike e sítio RBD foram observados em pacientes com a forma grave em comparação a forma leve da COVID-19 (Peng et al., 2020). Diante do exposto, o presente trabalho objetiva avaliar a resposta imune celular de pacientes convalescentes e vacinados pela COVID-19 de modo a esclarecer o perfil e a frequência de linfócitos T e B de memória e células foliculares específicos para o domínio RBD do SARS-CoV 2 e sua relação com os títulos de seus anticorpos específicos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o perfil de linfócitos T e B de memória e T foliculares em indivíduos convalescentes e vacinados para a COVID-19.

Objetivo Secundário:

Em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos convalescentes e vacinados para COVID-19: I. Avaliar o perfil de linfócitos T de memória (CD4+CD45RO+CCR7+) específicos para o antígeno RBD do SARS-CoV-2; II. Avaliar o perfil de linfócitos B de memória (CD4 CD19+CD27+) específicos para o antígeno RBD do SARS-CoV-2; III. Investigar a frequência de células T foliculares (Tfh) CD4+PD1+CXCR5+; IV.

Nos indivíduos que receberam vacina avaliar o perfil de linfócitos T e B de memória e Tfh no D0 (ou pré vacina), D30, D120 e D360 após a vacina. V. Avaliar a expressão de citocinas intracelulares

Endereço:	BARAO DE JEREMOABO 147	CEP:	40.170-115
Bairro:	ONDINA		
UF:	BA	Município:	SALVADOR
Telefone:	(71)3283-6902	Fax:	(71)3283-6919
		E-mail:	cepfar@ufba.br

Continuação do Parecer: 4.697.681

(INF-, IL-10, IL-4, IL-5, IL-2) nos linfócitos T e B e no sobrenadante das culturas.VI. Correlacionar a frequência de linfócitos B de memória e de células T foliculares com os níveis de IgG e IgM específicos para o SARS-CoV-2.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos associados com a coleta de sangue podem incluir, desconforto no local da coleta, como exemplo dor leve e sangramento após retirada da agulha. Raramente ocorre desmaio ou infecções no local de punção. Caso isso aconteça, todos os cuidados serão tomados por profissionais devidamente habilitados.

Benefícios:

Não há benefício direto para o participante desse estudo. Trata-se de estudo que irá avaliar o perfil de linfócitos de memória em indivíduos convalescentes e vacinados para a COVID-19, testando a hipótese de que o perfil de linfócitos T e B de memória e T foliculares em indivíduos convalescentes e vacinados para a COVID-19 estão correlacionados com os títulos de anticorpos específicos contra o SARS-CoV-2. Somente no

final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Porém, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a elucidar os mecanismos de proteção duradoura contra a COVID-19.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de submissão de nova versão do protocolo a fim de sanar pendências apontadas no parecer.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os seguintes termos obrigatórios foram encaminhado:

- Declaração de confidencialidade;
- Termo de Compromisso para Utilização de Dados em Prontuários de Pacientes e de Bases de Dados em Projetos de Pesquisa;
- TCLE;
- Termo de compromisso do pesquisador;

Endereço: BARAO DE JEREMOABO 147
Bairro: ONDINA CEP: 40.170-115
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-6902 Fax: (71)3283-6919 E-mail: cepfar@ufba.br

Continuação do Parecer: 4.697.661

- Equipe detalhada;
- Declaração de inicio da coleta de dados após aprovação do CEP;
- Termo de anuência da instituição coparticipante (HEMOBA);
- Termo de anuência da instituição principal (FACFAR-UFBA);

Recomendações:

Recomenda-se que atualiza o cronograma do projeto para que fique igual ao cronograma enviado separadamente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto apresenta relevância científica e social. A respeito das pendências apontadas na avaliação anterior, nesta nova versão submetida o pesquisador esclarece:

1-Recrutamento dos participantes: Descreve-se no protocolo que o recrutamento dos indivíduos, tanto no LACTFAR como no HEMOBA será realizado após a avaliação no banco de dados dos resultados dos exames de RT-qPCR e sorologia para COVID19, onde aqueles com IgG positivo e PCR negativo serão convidados, por contato telefônico a participarem do projeto e se dirigirem ao laboratório para a coleta de sangue. Como no HEMOBA não é realizado o RT-PCR, os indivíduos com IgG positivo para o SARS-CoV serão contatados por telefone e, em relato de mais de 30 dias de doença ou histórico de vacinação serão convidados a participarem do estudo.

2- TCLE:

- 2.1- Foi inserido no TLCE o endereço e contato telefônico do CEP-FAR;
- 2.2- foi inserido no TCLE que o participante receberá uma via deste documento que ficará sob sua guarda;

3- Relativo ao risco de quebra de sigilo e confidencialidade, foi inserido na brochura que "Todas as informações obtidas através das análises das amostras coletadas serão mantidas sob sigilo e só terão acesso às mesmas, a equipe clínica e de pesquisadores"; No TCLE consta que "todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) e o sigilo dos dados do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei. Os seus dados serão protegidos por um código envolvendo letras e números que será dado a cada paciente e o arquivo contendo a identificação dos códigos será mantido em um banco de dados protegido por senha, na qual apenas o coordenador do projeto terá acesso."

Endereço: BARAO DE JEREMOABO 147
Bairro: ONDINA CEP: 40.170-115
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-6902 Fax: (71)3283-6919 E-mail: cepfar@ufba.br

Continuação do Parecer: 4.697.681

4- Quanto ao risco na coleta, foi descrito no protocolo que "todos os indivíduos de todos os grupos doarão 30 mL de sangue total, coletado em tubos contendo heparina, para as análises propostas no estudo." Os riscos associados com a coleta de sangue podem incluir, desconforto no local da coleta, como exemplo dor leve e sangramento após retirada da agulha. Raramente ocorre desmaio ou infecções no local de punção. Caso isso aconteça, todos os cuidados serão tomados por profissionais devidamente habilitados. Em caso de dor ou desconforto no local da coleta, você poderá colocar compressa de gelo no local. Você pode experimentar efeitos colaterais que não são conhecidos até o momento ou não foram relatados;

5 - Nesta nova submissão, a Faculdade de Farmácia figura como patrocinador principal do estudo;

6- Quanto ao grupo de indivíduos vacinados, o pesquisador esclarece que "os indivíduos elegíveis serão aqueles que fazem parte do plano nacional de imunização e que receberam a vacina por meio do Sistema Único de Saúde (SUS)."

7- Um novo cronograma foi inserido em arquivo em separado. No entanto ainda consta na brochura o cronograma desatualizado. Os cronogramas estão apresentados com especificação do mês de cada etapa. De acordo com as normas do CONEP, o cronograma deve descrever as etapas da pesquisa sinalizando os meses por número (por ex. mês 1 - revisão bibliográfica ; mes 2 - coleta, etc).

Considerações Finais a critério do CEP:

Atendendo a Res. 466/2012 e Norma Complementar vigente, torna-se necessário:

- 1) O envio de relatórios semestrais a partir desta data, para o CEP-FAR. O relatório final deverá ser encaminhado no prazo de 30 dias a contar do término da vigência do projeto, respeitado o cronograma aprovado neste CEP;
- 2) Para protocolos que estejam concorrendo a financiamento por edital de fomento, as fontes de financiamento deverão ser informadas ao CEP-FAR sob a forma de emenda, anexando o Termo de Outorga ou equivalente, incluindo as alterações na Folha de Rosto para documentar mudança no

Endereço: BARAO DE JEREMOABO 147
Bairro: ONDINA CEP: 40.170-115
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71) 3209-2000 Fax: (71) 3209-2010 E-mail: anafar@uol.com.br

Continuação do Parecer: 4.697.661

patrocinador principal;

- 3) Desenvolver o projeto conforme aprovado pelo CEP-FAR;
- 4) Apresentar informações sobre o desenvolvimento da pesquisa a qualquer momento, quando solicitadas por este Comitê;
- 5) Comunicar e justificar todas as alterações realizadas no projeto, bem como sua interrupção;
- 6) Manter em arquivo, sob sua guarda, por 05 anos, todos os dados coletados para a pesquisa, bem como outros documentos utilizados.
- 7) Ressalta-se o direito do participante da pesquisa em ficar com uma cópia do TCLE.

Tendo em vista que os aspectos éticos do presente protocolo de pesquisa estão consoantes as Resoluções nº 466/12 e nº 510/16 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), conclui-se que o pesquisador pode iniciar a execução do protocolo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJECTO_1693765.pdf	16/04/2021 09:17:31		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_v02.pdf	16/04/2021 09:17:13	Luciana Santos Cardoso	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_linfocitos_memoria_COVID_19_v02.pdf	16/04/2021 09:16:46	Luciana Santos Cardoso	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_Luciana_Cardoso_ok.pdf	23/03/2021 20:24:23	Luciana Santos Cardoso	Aceito
Cronograma	Cronograma_ok.pdf	23/03/2021 15:31:15	Luciana Santos Cardoso	Aceito
Outros	Decalaracao_de_inicio_de_coleta.pdf	27/01/2021 15:57:09	Luciana Santos Cardoso	Aceito

Endereço: BARAO DE JEREMOABO 147
 Bairro: ONDINA CEP: 40.170-115
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-6902 Fax: (71)3283-6919 E-mail: cepfar@ufba.br

Continuação do Parecer: 4.697.661

Outros	Declaracao_de_confidencialidade.pdf	27/01/2021 15:56:06	Luciana Santos Cardoso	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_utilizacao_de_dados.pdf	27/01/2021 15:54:58	Luciana Santos Cardoso	Aceito
Outros	Carta_de_encaminhamento.pdf	27/01/2021 15:54:12	Luciana Santos Cardoso	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia_HEMOBA.pdf	27/01/2021 15:53:38	Luciana Santos Cardoso	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia_LACTFAR.pdf	27/01/2021 15:53:20	Luciana Santos Cardoso	Aceito
Declaração de concordância	Termo_de_compromisso_do_pesquisador.pdf	27/01/2021 15:52:27	Luciana Santos Cardoso	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Equipe_detalhada.pdf	27/01/2021 15:52:09	Luciana Santos Cardoso	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Decalaracao_de_infraestrutura_Farmacelia.pdf	27/01/2021 15:51:12	Luciana Santos Cardoso	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 07 de Maio de 2021

Assinado por:
Ana Leonor Pardo Campos Godoy
(Coordenador(a))

Endereço: BARAO DE JEREMOABO 147	Bairro: ONDINA.	CEP: 40.170-115
UF: BA	Município: SALVADOR	
Telefone: (71)3283-6902	Fax: (71)3283-6919	E-mail: cepfar@ufba.br