UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E

BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA

MESTRADO ACADÊMICO

RUALDO VALDERRAMA FILHO

CONSTRUÇÃO DE UMA PLATAFORMA PARA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA À VACINAÇÃO CONTRA SARS-CoV-2 EM INDIVÍDUOS HIV-POSITIVOS: UMA ABORDAGEM EX VIVO PARA A LIBERAÇÃO DE CITOCINAS

Araraquara, SP
2024

Rualdo Valderrama Filho

CONSTRUÇÃO DE UMA PLATAFORMA PARA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA À VACINAÇÃO CONTRA SARS-CoV-2 EM INDIVÍDUOS HIV-POSITIVOS: UMA ABORDAGEM EX VIVO PARA A LIBERAÇÃO DE CITOCINAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa
Coorientador: Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior

Araraquara, SP
2024

Valderrama Filho, Rualdo.
V144c Construção de uma plataforma para avaliação da resposta imunológica à vacinação contra SARS-CoV-2 em indivíduos HIV-positivos: uma abordagem ex vivo para a liberação de citocinas / Rualdo Valderrama Filho. – Araraquara, 2024.
87 f. : il.

Orientador: Paulo Inácio da Costa.
Coorientador: João Pessoa Araújo Junior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Imunologia.

1. COVID-19. 2. Vacinação. 3. Imunidade celular. 4. Ativação linfocitária. 5. Testes de liberação de citocinas. I. Costa, Paulo Inácio da, orient. II. Araújo Junior, João Pessoa, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Construção de uma plataforma para avaliação da resposta imunológica à vacinação contra SARS-CoV-2 em indivíduos HIV-positivos: uma abordagem *ex vivo* para a liberação de citocinas

AUTOR: RUALDO VALDERRAMA FILHO

ORIENTADOR: PAULO INACIO DA COSTA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO INACIO DA COSTA (Participaçao Virtual)
Departamento de Analises Clinicas / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. ORIVALDO PEREIRA RAMOS (Participaçao Virtual)
Departamento de Ciências Exatas e Naturais / Centro Universitário de Araraquara - UNIARA

Profa. Dra. IRACILDA ZEPPONE CARLOS (Participaçao Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 24 de abril de 2024

Dedico este trabalho a minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos difíceis da minha trajetória acadêmica e para você, caro colega cientista, acadêmico e curioso, que tira proveito dos conhecimentos aqui estabelecidos.

Agradecimentos

A realização deste trabalho acadêmico contou com o apoio e a colaboração de muitas pessoas, às quais expresso a minha gratidão. Em especial, agradeço aos meus pais, Rualdo Valderrama e Aparecida Ednea Tita Valderrama, que me deram suporte e incentivo em todos os momentos. À minha irmã Flávia Tita Valderrama e ao meu cunhado Marcio Jeremias Braga, que me acompanharam e me motivaram. Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa, e ao meu coorientador, Prof. Dr. João Pessoa Araújo Junior, pela confiança, amizade, orientação e ensinamentos que me transmitiram. À UNESP, pela infraestrutura e recursos humanos disponibilizados, em especial aos funcionários da Secção de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, que me auxiliaram em todas as etapas. À Fundação do Instituto de Biociências (Fundibio), pelo apoio desprendido ao meu projeto de mestrado. À parceria do departamento de Medicina da UFSCar (Universidade Federal de São Carlos) e da prefeitura de São Carlos-SP, em especial do Centro de Atendimento de Infecções Crônicas "Ana Cláudia Lucato Cianflone" (CAIC), pelo acolhimento, apoio e colaboração neste projeto de pesquisa. Aos meus colegas de laboratório, pelo convívio agradável, pela ajuda mútua e pelos conselhos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. E a Deus, pela minha existência e pela força para vencer os obstáculos que surgiram durante este trabalho.

Resumo

Este projeto de pesquisa teve como objetivo o desenvolvimento de uma plataforma para avaliar a expressão ex vivo das citocinas produzidas pelas células T desenvolvidas na imunização contra SARS-CoV-2 em indivíduos infectados pelo HIV. Para isso, os participantes foram divididos em três grupos conforme os níveis de linfócitos T CD4+ no sangue periférico, e o plasma e células sanguíneas dos doadores foram utilizados em diferentes testes imunológicos. Para isso, os níveis de anticorpos neutralizantes para SARS-CoV-2 foram detectados no plasma, e a quantificação de imunoglobulinas IgG e IgM totais não apresentou variações significativas entre os grupos. Além disso, a expressão relativa dos transcritos de citocinas expressos por células mononucleares do sangue periférico (CMSP ou a sigla em inglês PBMC) foi determinada após estímulo com o replicon viral ccSARS-CoV-2 e peptídeos sintéticos da região RBD da proteína Spike, visando avaliar a resposta celular específica à vacinação. A estimulação viral mostrou-se mais efetiva no período de exposição de 24 horas, comparado ao período de 12 horas, como demonstrado pela expressão relativa de citocinas quantificada por RT-qPCR seguida pela análise de correlação de PERSON R que apresentou com índice muito forte (0,97) entre IFN-ɣ / IP-10 e (0,95) com IL-1β / IL-17A e nula (-0,19 a -0,85) entre TNF-α e as demais citocinas estudadas. Esses dados sugerem que a plataforma pode ser uma ferramenta valiosa para avaliar a eficácia das vacinas contra SARS-CoV-2, indicando o *timing* ideal para doses de reforço e potencialmente contribuindo para o desenvolvimento de novas vacinas.

Palavras-chave: COVID-19; vacinação; imunidade celular; ativação linfocitária; testes de liberação de citocinas.

Abstract

The aim of this research project was to develop a platform to assess the ex vivo expression of cytokines produced by T cells developed during immunization against SARS-CoV-2 in HIV-infected individuals. To do this, the participants were divided into three groups according to the levels of CD4+ T lymphocytes in the peripheral blood, and the donors' plasma and blood cells were used in different immunological tests. For this, the levels of neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 were detected in the plasma, and the quantification of total IgG and IgM immunoglobulins showed no significant variations between the groups. In addition, the relative expression of cytokine transcripts expressed by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was determined after stimulation with the ccSARS-CoV-2 viral replicon and synthetic peptides from the RBD region of the Spike protein, in order to assess the specific cellular response to vaccination. Viral stimulation proved to be more effective in the 24-hour exposure period compared to the 12-hour period, as demonstrated by the relative expression of cytokines quantified by RT-qPCR followed by PERSON R correlation analysis which showed a very strong index (0.97) between IFN-ɣ / IP-10 and (0.95) with IL-1β / IL-17A and null (-0.19 to -0.85) between TNF-α and the other cytokines studied. These data suggest that the platform can be a valuable tool for assessing the efficacy of SARS-CoV-2 vaccines, indicating the optimal timing for booster doses and potentially contributing to the development of new vaccines.

Keywords: COVID-19; vaccination; cellular immunity; lymphocyte activation; cytokine release tests.

Estado da Arte

O objetivo deste projeto foi construir uma plataforma com o propósito futuro de medir a resposta vacinal contra o SARS-CoV-2 em participantes com infecção pelo HIV, através da análise das expressões de células T CD4+ e CD8+ em resposta a estímulos específicos. Para tal, foram usadas células mononucleares de sangue periférico (PBMC) obtidas de amostras de sangue dos participantes da pesquisa e estimuladas ex vivo com o vírus inativado pelo calor e peptídeos sintéticos derivados da região RBD da proteína Spike do SARS-CoV-2. A resposta imune celular foi avaliada pelo teste de liberação de citocinas: TNF-α, IFN-γ, IL1β, IL-17A e IP10. Com isso, os resultados obtidos permitem uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta imunológica celular à vacinação contra COVID-19.

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema simplificado da estrutura genômica do SARS-CoV-2. 16
Figura 2: Variantes SARS-CoV-2 representadas em uma árvore filogenética não enraizada com barra de escala indicando a distância genética em 2 de janeiro de 2023. 17
Figura 3: Representação da geração de uma resposta imune a antígeno vacinal. 21
Figura 4: Representação da estrutura básica de um anticorpo IgG e IgM. 34
Figura 5: Fluxograma de trabalho. 35
Figura 6: Termociclagem utilizada na quantificação viral: 40
Figura 7: Curva padrão da concentração de cópias de RNA: 41
Figura 8: Resultado do controle de umidade: 42
Figura 9: Ciclos da reação de transcrição reversa: 43
Figura 10: Representação dos controles de qualidade utilizados na citometria de fluxo. 47
Figura 11: Separação celular para obtenção de PBMC: 48
Figura 12: Extração de RNA utilizando trizol: 51
Figura 13: Termociclagem utilizadas na técnica do RT-qPCR: 53
Figura 14: Representação das amplificações de GAPDH. 53
Figura 15: Representação das amplificações de mRNA pela metodologia de RT-qPCR: 53
Figura 16 Faixa Etária dos Participantes da Pesquisa: 56
Figura 17: Representação da separação dos grupos conforme os resultados de linfócitos CD4+ com os gates obtidos pela citometria de fluxo. 57
Figura 18: Imuno fenotipagem linfocitária dos grupos analisados. 59
Figura 19: Concentração das Imunoglobulinas totais IgG e IgM e neutralizantes contra SARS-CoV-2 em ralação a quantidades de células T CD4+. 61
Figura 20: Expressão de TNF-α nos devidos grupos analisados. 62
Figura 21: Expressão de IFN-ɣ nos devidos grupos analisados. 63
Figura 22: Expressão de IP-10 nos devidos grupos analisados. 63
Figura 23: Expressão de IL-1β nos devidos grupos analisados. 64
Figura 24: Expressão de IL-17A nos devidos grupos analisados. 64
Figura 25: Repersentação baseada nos resultados preliminares do processo de estimulação do teste realizado: 70

Lista de Quadros

Quadro 1: Tipos de Vacinas para controle da COVID-19.....18
Quadro 2: Efeitos colaterais provocados por vacinas contra SARS-CoV-2 23
Quadro 3: Cálculos utilizados para detecção de anticorpos neutralizantes SARS-CoV-2.....45
Quadro 4: Sequencias dos primers utilizadas no ensaio do RT- qPCR:.....51

Lista de Tabelas

Tabela 1: Interpretação dos resultados dos anticorpos neutralizantes:.....45
Tabela 2: Valores de referência da citometria de fluxo:.....46
Tabela 3: Informação da população: 56
Tabela 4: Média das células T em relação aos três grupos de participantes: 59
Tabela 5: Correlação de Person (r) entre as citocinas testadas com estímulo de SARS-CoV-2: 67

Lista de Abreviaturas e Siglas

°C	Graus Celsius
APC	Células Apresentadoras de antígenos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EC	Efeitos colaterais
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
hs	Horas
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
PVHIV	Pessoas vivendo com HIV
pH	Potencial Hidrogeniônico
RBD	Domínio de Ligação ao Receptor
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa Quantitativa
S1	Subunidade 1 da proteína Spike
S2	Subunidade 1 da proteína Spike
Spike	Proteínas S
SRAG	Síndrome respiratória aguda grave
VLPs	Vacinas de partículas semelhantes a vírus
µg	Micrograma
µL	Microlitro

Lista de Símbolos

Δ	Letra grega Delta (maiúscula)
α	Letra grega Alfa (minúscula)
β	Letra grega Beta (minúscula)
γ	Letra grega Gama (minúscula)

Sumário

Resumo 5
Abstract 6
Lista de Figuras 8
Lista de Quadros 9
Lista de Tabelas 10
Lista de Abreviaturas e Siglas 11
Lista de Símbolos 12
Sumário 13
1. INTRODUÇÃO 14
1.1 SARS-CoV-2 (COVID - 19) 14
1.1.1 A doença 14
1.1.2 O agente 14
1.1.3 Diagnóstico 17
1.1.4 Vacinação contra SARS-CoV-2 17
1.1.5 Infecção por HIV (PVH) e a COVID-19 27
1.1.6 Citocinas na COVID-19 28
1.2 Imunoglobulinas 33
1.2.1 Imunoglobulinas IgM e IgG totais 33
1.2.2 Anticorpos Neutralizantes para SARS-CoV-2 (COVID-19) 34
2. OBJETIVOS 35
2.1 Geral 35
2.2 Específicos 35
3. PARTICIPANTES DA PESQUISA 36
3.1.1 Critérios de inclusão 37
3.1.2 Critério de exclusão 37
3.1.3 Coleta de material 37
3.1.4 Riscos e Benefícios 38
4. METODOLOGIA 38
4.1 Cultura de células BHK-21 contendo o replicon SARS-COV-2 38
4.2 Extração e purificação do RNA viral utilizando partículas magnéticas 39
4.3 Ensaio de RT-qPCR para quantificação viral no sobrenadante de cultura celular 39
4.4 Quantificação viral do sobrenadante de células BHK-21 contendo replicon ccSARS-COV-2 40
4.5 Processo de liofilização 41

4.6 Peptídeos da região Spike (S) do vírus SARS-CoV-2 42
4.7 Ensaio de RT-qPCR para detecção do vírus SARS-CoV-2 nos participantes 42
4.8 Detecção de anticorpos neutralizantes de SARS-CoV-2 43
4.9 Detecção de anticorpos IgG e IgM 45
4.10 Ensaio imunofenotipagem por Citometria de Fluxo 45
4.11 Ensaio de citocinas pós-indução ex vivo de PBMC 47
4.11.1 Obtenção de PBMC da amostra dos participantes 48
4.11.2 Padronização das quantidades de células PBMC 49
4.11.3 Desenvolvimento do Teste Imunoenzimático para Citocinas Secretadas 49
4.12 Desenvolvimento do Teste qPCR para citocinas expressas 49
4.12.1 Extração de RNA 49
4.13 Análise estatística 54
5. RESULTADOS 56
5.1 Caracterização dos participantes 56
5.1.1 Faixa Etária dos Participantes da Pesquisa 56
5.1.2 Carga viral para HIV 56
5.1.3 Ciclo vacinal 57
5.1.4 Condições gerais dos participantes 57
5.1.5 RT-qPCR para SARS-CoV-2 57
5.1.6 Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo 57
5.2 Anticorpos 59
5.3 RT-qPCR para identificação das citocinas 61
6. DISCUSSÃO 65
7. CONCLUSÃO 72
7.1 Resposta Imunológica em PVHIV e SARS-CoV-2 72
7.2 Classificação Baseada nas Células T CD4+ 72
7.3 Células T CD8+ e Resposta Imune 72
7.4 Deficiência da Ativação de Células T em Casos Graves de SARS-CoV-2 72
7.5 Anticorpos Neutralizantes e Imunoglobulinas 72
7.6 Correlações entre Citocinas e Resposta Imune 73
7.6.1 Papel da Citocina TNF-α 73
7.6.2 Citocinas IFN-ɣ e IP-10 73
7.6.3 Citocinas IL-1ß e IL-17A 73
7.7 Conclusão geral 73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 75

1. INTRODUÇÃO

A vacinação ou a infecção prévia por SARS-CoV-2 conferem proteção contra a reinfecção e a evolução para formas graves de COVID-19. A imunização induz uma resposta imune específica que reconhece o vírus e o elimina mais rapidamente, reduzindo o risco de transmissão e complicações. O cuidado às pessoas e às populações se beneficiaria de metodologias acuradas para estimar a magnitude e a duração da proteção imune contra a infecção por SARS-CoV-2 e contra a síndrome respiratória aguda grave (SRAG) causadas por esse agente. Nesse sentido, a avaliação da resposta imunológica, incluindo os tipos de anticorpos e as células T contra os antígenos do SARS-CoV-2 pode ser valiosa para determinar a duração da proteção proporcionadas pelas vacinas contra infecções, reinfecções ou doença grave. Ensaios de liberação de citocinas poderiam ser utilizados para avaliar a resposta imune celular e prover correlatos de proteção contra SARS-CoV-2 para pacientes vacinados ou naturalmente infectados (Barreiro *et al*., 2022).

1.1 SARS-CoV-2 (COVID - 19)

No início de 2020, um novo coronavírus foi designado como SARS-CoV-2 pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) após surgir na cidade de Wuhan, China. A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 11 de fevereiro de 2020, nomeou oficialmente a doença causada por esse vírus como Doença do Coronavírus-2019 (COVID-19), que se manifestou inicialmente como um surto de pneumonia viral incomum (Hu *et al.*, 2021; Hui *et al.*, 2020 e Sun *et al.*, 2020).

1.1.1 A doença

A COVID-19 pode causar síndrome gripal, síndrome respiratória aguda grave com insuficiência respiratória, ou mesmo ter desfecho letal. Os sintomas relacionados à COVID-19 incluem tosse seca, febre, falta de ar, dor de garganta, cefaleia, mialgia, fadiga e diarreia na maioria dos pacientes. Casos graves podem evoluir para pneumonia associada à SRAG e hipoxemia refratária e têm sido relacionados com a infecção pulmonar grave, insuficiência respiratória, juntamente com danos e disfunções orgânicas (Chen *et al.*, 2020; Hui *et al.*, 2020).

1.1.2 O agente

Os coronavírus são um grupo de vírus de RNA envelopados que infectam mamíferos e aves e causam doenças respiratórias, neurológicas, hepáticas e entéricas, agudas e/ou crônicas. Esses

vírus são cosmopolitas entre os continentes habitados e foram descobertos na primeira metade do século XX (Weiss; Leibowitz, 2011). Os coronavírus pertencem à ordem Nidovirales, família Coronaviridae, subfamília Orthocoronavirinae e se dividem em quatro gêneros: Alphacoronavirus (αCoVs), Betacoronavirus (βCoVs), Gammacoronavirus (γCoVs) e Deltacoronavirus (δCoVs) (Cui; Li; Shi, 2019).

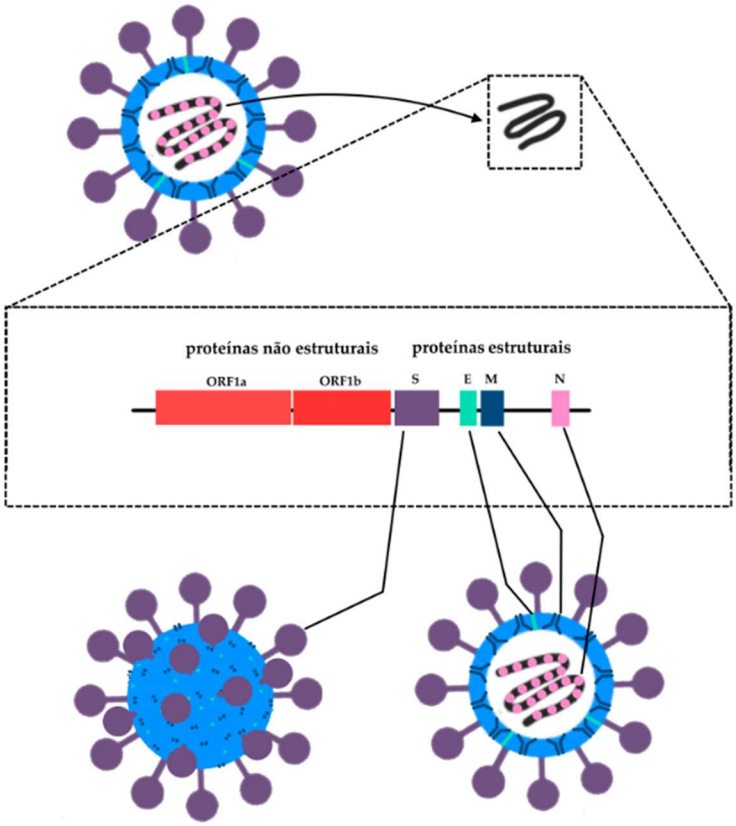
O nome "corona" se deve à aparência de "coroa" que esses vírus apresentam ao serem observados por microscopia eletrônica, devido às espículas ou proteínas S (Spike) que se projetam do envelope viral e que permitem a ligação aos receptores das células hospedeiras(Peiris, 2016).

A Spike, é responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira é denominada RBD (Receptor Binding Domain). É formada por duas subunidades, onde a subunidade S1 reconhece e realiza a ligação com o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2) que está presente em diversas células humanas, especialmente no trato respiratório, e a subunidade S2 realiza a fusão da membrana viral com a célula hospedeira (Singh; Jakhar; Sehrawat, 2020).

Anticorpos, incluindo os que neutralizam o vírus, são rapidamente produzidos após a infecção, muitos dos quais se ligam à proteína S, especialmente ao domínio RBD, embora outros epítopos neutralizantes também estejam presentes nas regiões S1 e S2(Planchais *et al.*, 2022).

O genoma dos coronavírus é composto por fitas simples de RNA de sentido positivo (+ssRNA), que ficam enroladas e associadas às proteínas do nucleocapsídio no interior do virion. Por serem de sentido positivo, essas fitas funcionam como RNAs mensageiros que podem ser traduzidos pelos ribossomos das células hospedeiras. Os coronavírus possuem os maiores genomas conhecidos entre os vírus de RNA, com mais de 30 kb de extensão. A organização dos genes no genoma desses vírus segue um padrão específico que pode ser observado na maioria das espécies conhecidas. O genoma se divide em duas porções: uma na extremidade 5' e outra na extremidade 3'. Na extremidade 5' encontra-se a ORF1a/b que codifica proteínas não estruturais como as proteases (ORF1a) e maquinaria de replicação (polimerase/helicase, ORF1b), além de proteínas regulatórias/auxiliares. Na extremidade 3' do genoma do coronavírus encontram-se as proteínas estruturais do vírus seguindo a ordem S (Spike) – E (envelope) – M (de membrana) – N (nucleocapsídio), podendo conter também a hemaglutinina (HE), além de proteínas regulatórias/auxiliares (proteínas não estruturais) (Figura 1). No total, em torno de 30 proteínas são codificadas pelo vírus (Forni *et al.*, 2017; Peiris, 2016).

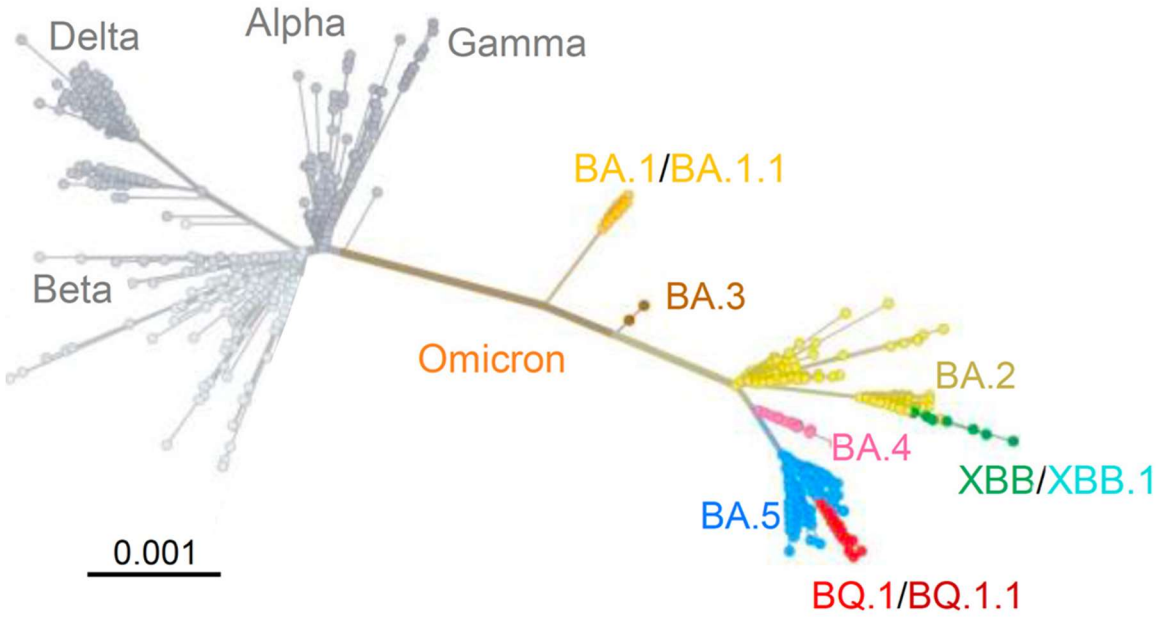
Figura 1: Esquema simplificado da estrutura genômica do SARS-CoV-2.



Fonte: FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ, 2023

Ao longo da pandemia da COVID-19, algumas mutações podem conferir vantagens seletivas ao vírus, como maior capacidade de infectar ou escapar da resposta imune. Essas mutações podem originar novas linhagens ou variantes do SARS-CoV-2, que podem ter um impacto na eficácia das vacinas e dos tratamentos disponíveis. Na Figura 2, podemos observar as principais linhagens e variantes do SARS-CoV-2 (Instituto Butantan, 2023).

Figura 2: Variantes SARS-CoV-2 representadas em uma árvore filogenética não enraizada com barra de escala indicando a distância genética em 2 de janeiro de 2023.



Fonte: imagem modificada de Wang *et al.*, 2023.

1.1.3 Diagnóstico

Uma forma de identificar a presença do SARS-CoV-2 no organismo é através de testes que variam em termos de qualidade, benefícios e limitações, conforme o propósito que se busca, seja para o manejo clínico, a prevenção de transmissão ou a formulação de estratégias de saúde pública. Os testes rápidos de antígeno (Imuno cromatográfico) são bastante utilizados para o diagnóstico da COVID-19, sendo indicados entre 3 a 7 dias após o surgimento dos sintomas para aumentar a sensibilidade, servindo assim para o rastrear desta infecção em locais de alto risco ou na comunidade para identificar rapidamente as pessoas infectadas e evitar a disseminação do vírus, mas o método mais confiável e preciso ainda é o RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa Quantitativa), que amplifica e quantifica o RNA viral nas secreções respiratórias, tecidos ou saliva, sendo altamente sensíveis e específicos para o diagnóstico de COVID-19 (Christensen; Azar; Turbett, 2022; Santos *et al.*, 2020).

1.1.4 Vacinação contra SARS-CoV-2

No último mês de 2022, após ensaios de eficácia, o primeiro imunizante contra SARS-CoV-2 foi aprovado (utilização emergencial). Assim como os EUA, vários outros países também aprovaram o primeiro esquema vacinal de dose única (Janssen) e com duas doses, tendo um intervalo de 3 a 4 semanas. Após o período de 5 a 6 meses da aplicação destes primeiros

imunizantes, observou-se uma diminuição na efetividade vacinal que levou a utilização das doses de reforço, através do imunizante de mRNA da Pfizer (Israel) e depois com outras vacinas, designada para melhorar a resposta imunológica (Nealon *et al.*, 2024).

As vacinas em desenvolvimento ou já em uso contra o SARS-CoV-2 (Quadro 1), que podem ser classificadas de acordo com a tecnologia empregada na sua produção. A imunização utilizando vírus inativados contêm vírus inteiros ou fragmentos do vírus que foram inativados por agentes químicos ou físicos. O mecanismo da vacina de vetor viral utiliza um outro vírus como vetor para transportar um gene do SARS-CoV-2 e expressá-lo nas células hospedeiras. A formação da vacina de ácido nucleico é composta por RNA ou DNA que codificam uma proteína do SARS-CoV-2 e são capazes de induzir a síntese dessa proteína nas células do indivíduo vacinado. A composição das vacinas de partículas semelhantes a vírus (VLPs) contêm estruturas que imitam a forma e a composição do vírus, mas sem o seu material genético (World Health Organization, 2021).

Entre as novas plataformas vacinais, destacam-se as vacinas de mRNA e a de vetores virais, que têm sido utilizadas no combate à pandemia de COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2. Essas vacinas consistem em introduzir na célula do hospedeiro um material genético que codifica uma proteína do vírus alvo, geralmente a proteína S, que é responsável pela entrada do vírus na célula. Esse material genético pode ser o mRNA sintético, no caso das vacinas de mRNA, ou um DNA inserido em um vetor viral não patogênico, no caso das vacinas de vetores virais. O objetivo é fazer com que a célula do hospedeiro expresse a proteína viral e a apresente às células do sistema imune, estimulando tanto a resposta humoral quanto a celular (Rosa *et al.*, 2021; Ura *et al.*, 2022).

As vantagens dessas plataformas vacinais são o baixo custo, a rapidez na produção e a possibilidade de induzir uma imunidade robusta e duradoura contra o vírus alvo. No entanto, elas também apresentam alguns desafios, como a necessidade de armazenamento em baixas temperaturas, a potencial indução de reações inflamatórias e a falta de dados sobre a eficácia e a segurança em longo prazo (Canaltech, 2023).

Quadro 1: Tipos de Vacinas para controle da COVID-19.

Vacina / Fabricante	Tipo de vacina	Composição
Ad26.COV2.S Johnson e Johnson Janssen	Vetor viral não replicante	Vetor recombinante do adenovirus tipo 26 incompetente da replicação-que expressa a proteína spike SARS-CoV-2 em uma conformação estabilizada. (5 × 1010 vp).

		Ácido cítrico monohidratado, citrato trissódico di-hidratado, etanol, 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HBCD), polissorbato 80, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e ácido clorídrico.
AZD1222 Vacina ChAdOx1 nCoV-19 AstraZeneca/Universidade de Oxford	Vetor viral não replicante	Adenovírus de chimpanzé que codifica a glicoproteína spike do SARS-CoV-2 (ChAdOx1-S) um, pelo menos 2,5 × 108 unidades infecciosas (Inf.U)um Produzido em células geneticamente modificadas de rim embrionário humano (HEK) 293 e por tecnologia de ADN recombinante L-Histidina Cloridrato de L-Histidina monohidratado Hexahidrato de cloreto de magnésio Polisorbato 80 (E 433) Etanol. Sacarose Cloreto de sódio Edetato dissódico (di-hidratado). Água injetável.
BBIBP-COrV Sinopharm/Instituto de Produtos Biológicos de Pequim	Vírus inativado	Vírus inativado 19nCoV-CDC-Tan-HB02 Excipientes: hidrogenofosfato dissódico, cloreto de sódio, dihidrogenofosfato de sódio, adjuvante hidróxido de alumínio.
BNT16b2 Pfizer/BioNtech	Baseado em RNA	Um ácido ribonucleico mensageiro sintético (mRNA) que codifica a proteína spike do SARS-CoV-2, lipídios ((4-hidroxibutil) azanediil)bis(hexano-6,1-diil)bis(2-hexildecanoato), 2-[(polietilenoglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina e colesterol), cloreto de potássio, fosfato monobásico de potássio, cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico di-hidratado e sacarose.
CIGB-66 Abdala Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia (CIGB)	À base de proteínas	Proteína recombinante do domínio de ligação ao receptor do vírus SARS-CoV-2 (RBD) 0,05 mg, Tiomersal 0,025 mg, Gel de hidróxido de alumínio (Al^{3+}), Hidrogenofosfato dissódico Dihidrogenofosfato de sódio di-hidratado Cloreto de sódio.
Convidecia™ Ad5-nCoV CanSino	Vetor viral não replicante	A vacina recombinante do novo coronavírus (vetor do adenovírus tipo 5). Manitol, sacarose, cloreto de sódio, cloreto de magnésio, polissorbato 80, glicerina, N-(2-hidroxietil), piperazina-N- (ácido 2-etanossulfônico) (HEPES), água estéril para injeção como solvente.
CoronaVac Sinovac Biotecnologia	Vírus inativado	Estirpe CN02 inactivada do SARS-CoV-2 criada com pilhas. Vero Hidróxido de alumínio, hidrogenofosfato dissódico dodecahidratado, dihidrogenofosfato de sódio monohidratado, cloreto de sódio.
Covaxin Bharat Biotecnologia	Vírus inativado	6 μg de antígeno SARS-CoV-2 inativado de virion inteiro (cepa: NIV-2020-770), e outros ingredientes inativos, como gel de hidróxido de

		alumínio (250 µg), agonista TLR 7/8 (imidazoquinolinona) 15 µg, 2-fenoxietanol 2,5 mg e solução salina® tampão fosfato até 0,5 m.
Coviran Barkat Grupo Industrial Shifa Pharmed	Vírus inativado	Partículas virais inativadas e uma mistura de 2% de adjuvante® Alhidrogel (hidróxido de alumínio).
CVnCoV CureVac	Baseado em RNA	NA
EpiVacCorona VETOR	À base de proteínas	NA
Gam-COVID-Vax Sputnik V Instituto de Pesquisa Gamaleya	Vetor viral não replicante	Dois componentes vetoriais, rAd26-S e rAd5-S. Tris (hidroximetil) aminometano, cloreto de sódio, sacarose, cloreto de magnésio hexahidratado, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) sal dissódico di-hidratado, polissorbato-80, etanol 95% e água injetável.
KoviVac Centro Chumakov	Vírus inativado	NA
mRNA-1273 Moderna	Baseado em RNA	Um ácido ribonucleico mensageiro sintético (mRNA) que codifica a proteína spike do SARS-CoV-2. A vacina também contém os seguintes ingredientes: lipídios (SM-102, 1,2-dimiristoil-rac-glicero-3-metoxipolietilenoglicol-2000 (PEG2000-DMG), colesterol e 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC)), trometamina, cloridrato de trometamina, ácido acético, acetato de sódio e sacarose.
NVX-CoV2373 Novavax	À base de proteínas	SARS-CoV-2 rS com adjuvante matriz-M1 (antígeno de 5 µg e adjuvante de 50 µg).
QazVac **QazCovid-In** Instituto de Pesquisa Cazaque para Problemas de Segurança Biológica	Vírus inativado	NA
Wuhan Sinopharm/Academia Chinesa de Ciências	Vírus inativado	NA
ZF2001 Instituto de Microbiologia, Academia Chinesa de Ciências e Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceutical	À base de proteínas	NA

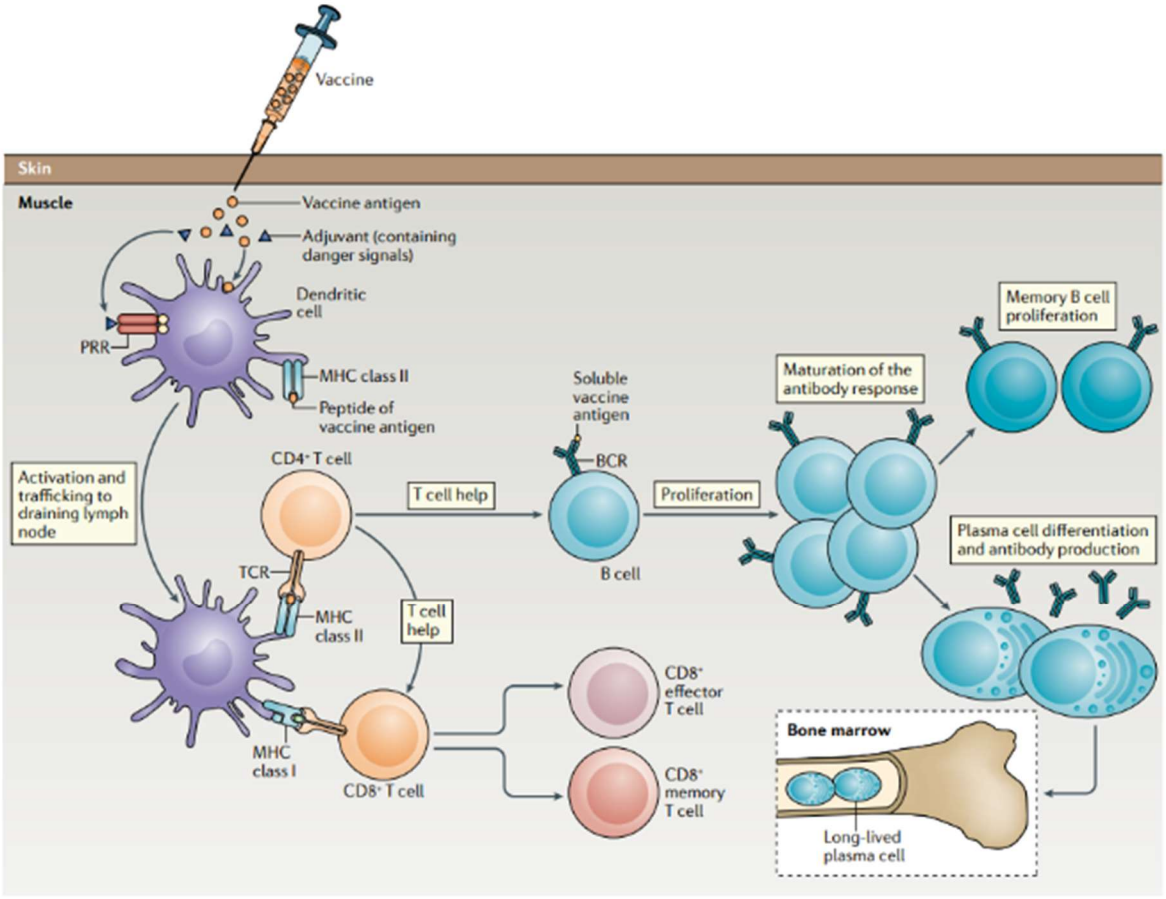
Fonte: Quadro modificado de Fiolet *et al.*, 2022.

Está sendo estudada uma possível forma de aplicação das vacinas de DNA, por meio intranasal. Essa via ainda não foi usada por nenhuma das vacinas de DNA em fase de testes clínicos. Porém, a aplicação nasal poderia evitar problemas relacionados ao uso de agulhas, como riscos de contaminação, descarte inadequado, desconforto e custo. Além disso, como a maioria das infecções por SARS-CoV-2 começa nas mucosas, a via intranasal poderia estimular respostas imunes mais eficazes, pois poderia alcançar facilmente o sistema imunológico da mucosa (Khalid; Poh, 2023).

O estímulo vacinal impulsiona uma resposta imunológica de tal forma a garantir um estado de proteção no indivíduo. Esta resposta imune direcionada ao antígeno vacinal envolve a participação de células dendríticas, neutrófilos, monócitos, linfócitos T citotóxicos (LT CD8+), linfócitos T auxiliares (LT CD4+), linfócitos B, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (Silva *et al.*, 2021), conforme ilustra na Figura 3.

Figura 3: Representação da geração de uma resposta imune a antígeno vacinal.
A vacina é injetada no músculo e a proteína da vacina é capturada por células dendríticas, que são ativadas por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) por sinais de perigo presentes no adjuvante, e então transportadas para o linfonodo mais próximo. Lá, a apresentação de peptídeos da proteína da vacina por moléculas de MHC na célula dendrítica ativa as células T por meio de seu receptor (TCR). Em conjunto com a sinalização (por antígeno solúvel) através do receptor de célula B (BCR), as células T estimulam o desenvolvimento das células B no linfonodo. Nesse local, o desenvolvimento das células B dependente das células T levar à maturação da resposta de anticorpos para aumentar a afinidade e induzir diferentes isotipos. A produção de plasmócitos de curta duração, que secretam ativamente anticorpos específicos para a proteína da vacina, produz um aumento rápido nos níveis de anticorpos no soro nas próximas 2 semanas. Células B de memória também são produzidas, que medeiam a memória imunológica. Plasmócitos de longa duração que podem continuar produzindo anticorpos por décadas

migram para ocupar nichos na medula óssea. Células T de memória CD8+ podem se proliferar rapidamente quando encontram um patógeno, e células T efetoras CD8+ são importantes para a eliminação de células infectadas.



Fonte: Pollard & Bijker, 2021.

O reforço vacinal é necessário no caso de vacinas que apresentam receptores com baixa eficácia ou em pessoas com imunodeficiência, onde o primeiro ciclo vacinal não gera a proteção imunológica adequada. Ocorrem casos que mesmo com este reforço na vacinação, a resposta imunológica não seja suficiente (Kamar *et al.*, 2021).

A vacina estimula o organismo a produzir uma defesa imune que se enfraquece com o passar do tempo após a imunização, o que é um fenômeno natural da resposta imune e um assunto frequente de estudo da duração da vacina. Independentemente de ser vacina inativada, vacina de proteína recombinante, vacina de vetor de adenovírus ou vacina de mRNA, a imunidade tende a diminuir gradualmente após cerca de seis meses do término do esquema vacinal. No reforço vacinal, a vacinação homóloga pode ativar uma forte resposta imune de memória e gerar rapidamente uma grande quantidade de anticorpos com maior diversidade e maturidade, o que pode manter uma duração mais longa e um nível protetor de anticorpos mais alto. Já a vacinação heteróloga consiste em usar uma combinação de vacinas de diferentes fabricantes ou diferentes abordagens técnicas, onde o sistema imune produzirá uma resposta imune mais balanceada e

abrangente, pois os tipos e quantidades de anticorpos neutralizantes produzidos por vacinas de diferentes fabricantes variam bastante, podendo aumentar a imunização em um patamar em que uma única vacina não consegue (Meng *et al.*, 2022).

A vantagem da proteção oferecida pelo ciclo de vacinação primária é maior do que os riscos que podem ser apresentados por reforços aplicados muito cedo ou com frequência, podendo levar a efeitos colaterais (EC) (Quadro 2) como a miocardite em vacinas de mRNA ou síndrome de Guillain-Barré observadas em vacinas contra SARS-CoV-2 que utilizam adenovírus. Portanto, o reforço vacinal só deve ser realizado quando houver evidências concretas de sua necessidade (Gargano *et al.*, 2021; Krause, Philip *et al.*, 2021; World Health Organization, 2021).

Quadro 2: Efeitos colaterais provocados por vacinas contra SARS-CoV-2

VACINAS:	Ocorrências	Manifestações				
		Neurológicas	Cardiovasculares	Hematológicas	Dermatológicas	Gastrointestinal
Vacina Pfizer-BioNTech	Comum	Dor de cabeça Confusão Convulsões Parestesia	Palpitações	Trombocitopenia	Erupções cutâneas	Fezes soltas
	Incomum	Síndrome de Guillain Barré Mielite transversa Encefalomielite disseminada Paralisia de Bell Acidente vascular cerebral	Trombose venosa profunda Arritmias ventriculares			Anorexia
Vacina da Moderna	Comum	Confusão de dor de cabeça	Palpitações	Trombocitopenia	Erupções herpetiformes	Fezes soltas
	Incomum	Paralisia de Bell Acidente vascular cerebral Dor de cabeça	Alterações da pressão arterial Síncope			
Vacina Oxford-AstraZeneca/ChAdOx1 nCoV-19 (Covishield)	Comum	Dor de cabeça			Urticária	Fezes soltas Dor abdominal
	Incomum	Mielite transversa	Trombose do seio venoso central Hipotensão ortostática Síncope Anemia hemolítica	Distúrbios da coagulação Embolia pulmonar Trombocitopenia		
Vacina Janssen	Comum	Parestesia de cefaleia		Distúrbios de coagulação	Erupções cutâneas	NA
	Incomum	Síndrome de Guillain Barré	Hipotensão Síncope		Pustulose exantemática generalizada aguda - reação medicamentosa com eosinofilia e sintomas sistêmicos	

Vacina Gamaleya-Sputnik V	Comum	Dor de cabeça	NA	NA	NA	NA
Vacina Sinopharm-Verocell	Comum	Dor de cabeça	NA	NA	Prurite	Fezes soltas
Vacina Sinovac-CoronaVac	Comum	Dor de cabeça	NA	NA		NA
	Incomum				Erupção cutânea petequial Lesões semelhantes a frieiras	
Vacina Covaxin	Comum	Dor de cabeça	NA	NA		Vómito
	Incomum				Lesões cheias de líquido (herpes zoster)	

Fonte: Tabela modificada de Bhandari *et al.*, 2022.

Estes EC da vacina podem surgir em até seis semanas depois de vacinar e, geralmente, são passageiros, tanto em crianças como em adultos. Por isso, aconselha-se a acompanhar a vacina contra a COVID-19 por até oito semanas após a última dose. As instituições de saúde devem vigiar e reportar os EC relacionados às vacinas e aos medicamentos às autoridades competentes por meio dos profissionais de saúde. Embora a segurança e a eficácia adequadas das vacinas sejam os fatores-chave para a sua aprovação, os processos rápidos de desenvolvimento de vacinas podem aumentar o risco de mais EC, pois alguns dados podem faltar ou não ser notados devido à rapidez do processo de vacinação (Amer *et al.*, 2024).

Uma forma de avaliar a imunidade contra o vírus é medir os anticorpos que bloqueiam a sua entrada nas células, mas ainda não se sabe ao certo quais aspectos da resposta imune são mais importantes para prevenir a infecção por SARS-CoV-2. Em um estudo que acompanhou os níveis de IgG sérica que reconhecem a proteína spike (RBD) e a proteína do nucleocapsídio (NP) do vírus em pessoas vacinadas com a Pfizer BNT162b2, observou os títulos desta imunoglobulina tendem a cair abaixo do nível de proteção cerca de seis meses depois da vacinação. A partir de dados sorológicos da infecção, a ocorrência de infecções que escapam da vacina e, portanto, o grau de imunidade específica do SARS-CoV-2 na população pode ser maior do que o estimado pelos casos confirmados de infecção (Bates *et al.*, 2024).

Os linfócitos T de memória desempenham um papel relevante na imunidade contra o SARS-CoV-2, pois são capazes de reconhecer e eliminar as células infectadas pelo vírus. Estudos recentes mostraram que essas células podem persistir por meses após a infecção pelo SARS-CoV-2 e podem conferir uma proteção contra a reinfecção. Além disso, elas podem reconhecer variantes do vírus que escapam dos anticorpos neutralizantes. Portanto, as vacinas de mRNA e de vetores virais podem ser eficazes não apenas para prevenir a COVID-19, mas também para reduzir a transmissão e a evolução do vírus (Murugesan *et al.*, 2021).

As células T auxiliares foliculares (T_{FH}) é uma subpopulação de células T CD4+ que se diferenciam nos centros germinativos (CG) dos folículos linfoides secundários e desempenham um papel crucial na regulação da resposta humoral. As T_{FH} interagem com as células B nos CG e fornecem sinais que promovem a mudança de classe de isotipo, a maturação de afinidade, a diferenciação em células plasmáticas e a formação de células B de memória. As T_{FH} são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição Bcl-6 e dos receptores CXCR5, CD40L, PD-1 e ICOS (Liu *et al.*, 2018; Morita *et al.*, 2011).

1.1.5 Infecção por HIV (PVH) e a COVID-19

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o responsável pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), uma doença que foi descoberta e reconhecida na década de 1980. Apesar dos avanços científicos, o HIV continua sendo um grave problema de saúde mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2022, mais de um milhão de pessoas contraíram o HIV e mais de 600.000 morreram em decorrência do vírus. Existem dois tipos de HIV: o HIV-1 e o HIV-2. Os dois tipos provocam uma infecção crônica que afeta o sistema imunológico e pode evoluir para AIDS. Porém, o HIV-1 é mais agressivo e é o principal causador da AIDS no mundo. A principal forma de transmissão do HIV-1 é o contato sexual sem proteção, sendo a África subsaariana a região com maior número de casos de HIV-1 (Krause, Carolyn; Bergmann; Schmidt, 2024).

O tratamento com vários medicamentos antirretrovirais tem sido efetivo para controlar a reprodução do vírus e aumentar o número de células T CD4 em pessoas vivendo com HIV (PVHIV) tipo 1 (HIV-1), ajudando a diminuir os casos graves e as mortes por AIDS. Porém, a recuperação do sistema imunológico é muito complexa. Fatores como idade, outras infecções, quantidade inicial de células CD4, ativação imune anormal e alteração de citocinas podem interferir na recuperação do sistema imunológico. No entanto, 10-40% das PVHIV tipo 1 não conseguem recuperar o nível e a função normal das células T CD4. Elas são chamadas de não respondedores imunológicos (INRs) que não conseguem atingir a recuperação completa do sistema imunológico e têm mais chances de morrer e de desenvolver outras doenças não relacionadas à AIDS do que aquelas que conseguem a recuperação completa do sistema imunológico (Zhang; Ruan, 2023).

Portanto, a infecção pelo HIV, afeta tanto a quantidade quanto a qualidade dos linfócitos T folicular helper, resultando em uma menor capacidade de auxiliar as células B na produção de anticorpos neutralizantes de longa duração. Além disso, a infecção pelo HIV+ aumenta o risco de coinfecções e comorbidades, como é o caso da infecção pelo COVID-19 (SARS-CoV-2). Estudos recentes sugerem que os PVHIV podem ter uma resposta vacinal anti-SARS-CoV-2 menos eficaz e duradoura do que os indivíduos não infectados, possivelmente devido à disfunção das células T folicular helper (Cele *et al.*, 2022; Höft; Burgers; Riou, 2024).

Em um estudo publicado por Chittrakarn *et al.*, 2024, os pesquisadores fizeram uma avaliação de coorte prospetivo para comparar a resposta imunitária a vacinas heterólogas (CoronaVac da

Sinovac e Vaxzevria da AstraZeneca) em PVHIV. O estudo revelou que, independentemente da contagem de células T CD4+ e da carga viral do HIV, as PVHIV apresentaram respostas de anticorpos, atividade neutralizante e respostas imunitárias específicas de células T inferiores às dos participantes soro negativos. É interessante notar que os participantes com células T CD4+ > 500 células/µl e carga viral do HIV indetectável tiveram um efeito neutralizante semelhante ao do grupo de controlo, e que cada aumento de 100 células T CD4 + foi associado a melhores respostas de anticorpos e atividade neutralizante.

1.1.6 Citocinas na COVID-19

Vários estudos relatam o aumento de citocinas, como causador de lesões inflamatórias, em primeiro momento nos pulmões, podendo evoluir para múltiplos órgãos, piorando o quadro de saúde e podendo levar a óbito (Karki *et al.*, 2021).

Sendo a hiperinflação sistêmica, uma característica dos pacientes com COVID-19 que desenvolvem insuficiência respiratória por hipóxia, que leva a condição envolvendo a liberação de citocinas, como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF, e o aumento dos níveis de marcadores inflamatórios. Os valores destas citocinas são preditores independentes e robustos da sobrevida do paciente na admissão hospitalar. A origem do desequilíbrio na coagulação na COVID-19 ainda não é bem esclarecida, mas pode estar relacionada à vários fatores, como hipóxia, citocinas, quimiocinas e padrões moleculares associados a danos, que podem provocar um estado de permeabilidade tanto no endotélio quanto no epitélio alveolar, causando lesões, comprometendo as junções intercelulares (Lamers; Haagmans, 2022).

Uma célula infectada através do mecanismo receptor-ligante, recruta uma grande quantidade de células, como as células dendríticas, monócitos, macrófagos, linfócitos B, linfócitos T e células natural killer (NK). Na linhagem das células T CD4 auxiliares (helper), excretam citocinas, através da diferenciação das células Th, em células Th1 (tipo 1) agindo na defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares, nas células Th2 (tipo 2) sendo consideradas críticas para a eliminação dos parasitas helmínticos e as células Th17 (tipo17) desempenhando a eliminação de patógenos e a manutenção das barreiras formadas pôr superfícies de mucosas (Aleebrahim-Dehkordi *et al.*, 2022).

As células T CD4 das vias aéreas são responsáveis por uma parte citotóxica da resposta contra covid-19, podendo estimular a produção de quimiocinas CXCR3 que atraem células dendríticas migratórias e potencializam a resposta de células T CD8 para eliminar as células infectadas. As células dendríticas são as principais células apresentadoras de antígeno, tendo um papel crucial

na primeira linha de defesa (resposta imune inata) contra um agente invasor. Elas podem ser divididas em quatro tipos: Células dendríticas mieloides do tipo 1 associadas a CD141+, que atuam nas paredes vasculares e nas mucosas e são capazes de induzir a ativação das células Th1. As células dendríticas mieloides do tipo 2, relacionadas a CD1C +, que são a principal fonte de quimiocinas pró-inflamatórias, recrutando vários tipos de células inflamatórias e podendo falhar em estimular a proliferação de células T, gerando tolerância, como já observado em humanos com SARS-CoV-2. Células dendríticas com aspecto de células plasmáticas, que estão distribuídas pelo pulmão, sendo essenciais para a resposta a vírus, produzindo IFN-α e IL-1β. Por fim, temos as células dendríticas que derivam dos monócitos circulantes durante a infecção (Campana *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2024; Zhou *et al.*, 2020).

As citocinas e quimiocinas atraem as células imunológicas, que têm papel na coagulação, como é o caso dos monócitos e as microvesículas que se originam deles e podem apresentar fator tecidual em suas superfícies, quando são ativados por receptores citoplasmáticos de reconhecimento de padrões. Além disso, os granulócitos, em conjunto com os monócitos, modulam a secreção de citocinas e a expressão gênica, mantendo as funções normais dos tecidos. Os monócitos infectados pelo SARS-CoV-2 no sangue periférico aumentam a expressão de receptores de ECA-2 e de citocinas (IFN-ɣ, TNF-α, IL-1β e IL-6). No pulmão, diante de uma infecção viral, os monócitos podem estimular os linfócitos T CD8 específicos para o vírus a se diferenciarem em células de memória e efetoras para eliminar o patógeno (Codo *et al.*, 2020; Dunbar *et al.*, 2020; Groeneweg; Hidalgo; A-Gonzalez, 2020; LAMERS; Haagmans, 2022).

Os monócitos, que se transformam em macrófagos, têm um papel importante na resposta imune e na fibrose pulmonar em casos de covid-19, atuando como macrófagos reguladores. Essas células são responsáveis pela defesa e pelo reparo dos tecidos afetados pela síndrome do desconforto respiratório agudo, enquanto os macrófagos inflamatórios causam mais dano ao pulmão. O material genético do SARS-CoV-2, incluindo uma forma intermediária de replicação, foi encontrado em monócitos e macrófagos inflamatórios, o que sugere que eles podem ser infectados. Mesmo que essa infecção não se complete, ela pode aumentar a liberação de citocinas pró-inflamatórias, provocando a piroptose (Lamers; Haagmans, 2022; Wendisch *et al.*, 2021).

Na ativação dos linfócitos B pelas células Th, podem ocorrer três tipos de diferenciações, sendo elas as células secretoras de anticorpos (plasmablastos e plasmócitos), células B do centro germinativo (GC) ou células B de memória. Apesar que uma pequena quantidade de

plasmablastos e plasmócitos sendo encontrados no início dos sintomas, na fase aguda do SARS-CoV-2, a produção de anticorpos neutralizantes, são consideradas rápidas, isto ocorre por serem produzidas normalmente por linfócitos B imaturos e não pelos linfócitos B de memória ativadas novamente. Estas células secretoras de anticorpos apresentam um aumento expressivo até o nono dia depois do início dos sintomas, estando associadas com a quantidade elevada de IgA (imunoglobulina A) específica, atingindo seu platô três semanas depois do aparecimento dos sintomas, sendo maior que IgM e IgG no soro, saliva e fluido de lavagem broncoalveolar (Kato *et al.*, 2013; Laing *et al.*, 2020; Sette; Crotty, 2021; Sterlin *et al.*, 2021).

Segundo Petrone *et al.*, 2021, no grupo das células T CD4 encontra-se a principal resposta para a infecção provocada pelo vírus SASR-CoV-2, através das células Th1, sendo atribuída o principal fator de resolução da doença, seguida pelas células Th17. Estas células são importantes para o dano tecidual através da convocação dos neutrófilos, ativando principalmente no pulmão, onde este sistema é complementado após algumas citocinas geradas pelas células Th2.

Com uma função imprescindível, as células NK são linfócitos, com habilidades de agir na resposta imunológica inicial, dominar da infecção viral e realizar morte celular imediata, principalmente quando não á contato anterior deste agente agressor. Além disso, possui atividades de regulação na imunidade inata e adaptativa, secretando citocinas e agindo de maneira simultânea com monócitos/macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (Di Vito *et al.*, 2022).

Os neutrófilos liberam armadilhas extracelulares, que podem ativar diretamente o fator XII em pacientes com COVID-19 grave, apresentam altos níveis de fator tecidual e favorecendo ainda mais a coagulação e recrutando plaquetas, que por sua vez podem liberar citocinas pró-inflamatórias em vesículas extracelulares derivadas de plaquetas após a ativação (Lamers; Haagmans, 2022).

Todas estas ativações, tem como resultado a liberação de citocinas inflamatórias (polipeptídeos), que realiza um feedback positivo, ativando ainda mais células de defesa (glóbulos brancos). Este aumento de citocinas começa no local onde ocorreu a infecção primária, envolvendo todo o mecanismo de proteção para eliminar o patógeno inicial e logo após é distribuída pelo corpo através do aumento da circulação sanguínea, tendo como objetivo facilitar o acesso de leucócitos e proteínas plasmáticas nos locais das lesões (Fara *et al.*, 2020).

Com as ocorrências dos eventos citados acima, temos o aparecimento de vários sinais e sintomas, como é o caso da febre, inflamação sistêmica, falência de múltiplos órgãos e altas

concentrações de citocinas circulantes. Esclarecer o aumento de citocinas é importante tanto para o prognóstico, sintomas e tratamentos, quanto para observar a grandeza das respostas imunes para controlar e atuar nas causas que a acarretam e as demais que são excedentes causando danos ao corpo (Hafezi *et al.*, 2021).

Trabalhos científicos demonstram que em formas leve e grave da covid-19 resultam em alterações em leucócitos circulantes e nas citocinas IL-6, IL-1β, IL-10, TNF-α, GM-CSF, IP-10 (IFN-induced protein 10), IL-17, MCP-3 e IL-1ra, onde o TNF-α e IL-1β promovem a vasodilatação e permeabilidade, facilitando a locomoção das células imunes para os locais de lesão, e as citocinas IL-1β e IL-6 promovem o complemento e facilitando a fagocitose (Shaath *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020).

1.1.6.1 TNF-α (Fator de necrose tumoral alfa)

O fator de necrose tumoral alfa, sendo secretado pelas células Th1, é um dos primeiros fatores de sinalização ao sistema de imunidade mediante a um quadro de contaminação por vírus, sendo a sua produção realizada pelas células sanguíneas de macrófagos e monócitos. No acoplamento do TNF-α ao seu receptor, temos como resultado a modulação do sistema imune inata na tentativa de diminuir a replicação dos vírus, ativa a apoptose celular e promover a infiltração de macrófagos. Pacientes infectados por SARS-CoV-2 tiveram uma produção elevada de TNF-α por células T CD8 e NK maiores que em pacientes saudáveis (Karki *et al.*, 2021; Mohd Zawawi *et al.*, 2023).

Tendo o TNF-α, alta influência como mediador na resposta inflamatória sistêmica aguda e crônica, atua na proliferação e morte celular, motivando a produção de outras citocinas. Ele também atua em vários outros mecanismos fisiológicos como a homeostase imunológica, respostas antitumorais e controle da inflamação. Mas quando sua sinalização está desregulada, pode acarretar uma síndrome da liberação de citocinas (Guo *et al.*, 2022).

1.1.6.2 IFN-γ (Interferón-gama)

O Interferon-gama (IFN-γ), também conhecido como interferon tipo II (IFN-II), se origina nos linfócitos T (Th1) e nas células NK, tendo uma atuação importante na resposta imune celulares contra os organismos capazes de causar doenças, pela via do MHC de classe I e II, que por sua vez aumenta a resposta imunes das células Th1 e estimula a diferenciação dos macrófagos. Mesmo que suprime células progenitoras hematopoiéticas, o IFN-γ juntamente com IL-3 ou IL-6, estimulam o aumento das células-tronco hematopoiéticas, levando a proliferação e

diferenciação celulares. Esta citocina inibe inespecificamente a multiplicação viral no interior das células infectadas, aumenta a ação citotóxica de linfócitos T CD8+, induz a ativação e maturação de células apresentadoras de antígenos, linfócitos T e pode conduzir a resposta inflamatória de monócitos em pulmões infectados. Em vários estudos demonstram que na infecção provocada pela doença COVID-19, em pessoas com capacidade reduzida do sistema imunológico produz menos IFN-γ em comparação a pessoas mais saudáveis com níveis mais adequados de linfócitos T e NK (Hasanvand, 2022; Schmit *et al.*, 2022; Smadja *et al.*, 2021).

1.1.6.3 IL-17A (interleucina-17A)

Já as células Th17, responsáveis pela produção das citocinas pró-inflamatórias da família IL-17, composta por IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (conhecida por IL-25), IL-17F, e seu membro mais atuante a IL-17A conhecida por IL-17 responsável por convocar os monócitos e neutrófilos para o local da infecção, podendo também intensificar as respostas da inflamação ativando citocinas como é o caso das IL-1, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α e também induzindo a quimiocina IP-10 (Montazersaheb *et al.*, 2022).

1.1.6.4 IL-1β (interleucina-1β)

O grupo de citocinas IL-1 possui um complexo de receptor formado por IL-1RI e proteína acessória IL-1R (IL-1RAP0), apresentando uma atuação crítica logo no começo da resposta pró-inflamatória da infecção levando à expressão de integrinas pelas células endoteliais e leucócitos. Na fase aguda para lutar contra a infecção, a família de citocinas IL-1 atua na diferenciação de células-tronco hematopoiéticas, inclinando-se para a linhagem mieloide. Já na infecção crônica, elas atuam promovendo a divisão sem controle das células-tronco hematopoiéticas e perdendo a possibilidade de autorrenovação (Smadja *et al.*, 2021).

As células Th1 e Th2 estão relacionadas com a secreção da citocina pró-inflamatória IL-1β que compõe a família de citocinas IL-1, tendo a atividade regulatória em muitas doenças inflamatórias crônicas, sendo o caso da síndrome do desconforto respiratório agudo, onde a lesão pulmonar está ligada a citocina IL-1β, onde sua inibição pode diminuir o sinal de inflamação reduzindo a lesão pulmonar pela COVID-19 crônica (Le Bert *et al.*, 2021; Shaath *et al.*, 2020).

A produção de IL-1β por linfócitos T, potencializa a estimulação de monócitos através da ligação com o receptor IL-1R, que está sendo considerado um regulador da resposta inflamatório frente ao aumento de citocinas (Wang *et al.*, 2020).

1.1.6.5 IP-10 / CXCL10 (Interferon Gamma Induced Protein 10kDa)

O papel fundamental da quimiocina IP-10 (CXCL10) é de convocar células T CD8+ e células Th1 CD4+ efetoras para os tecidos afetados pela inflamação. A produção do IP-10 é estimulada pelo Interferon-gama (IFN-γ), sendo liberadas por células, através da resposta imunológica, sendo elas os linfócitos T, neutrófilos, monócitos e células endoteliais. O receptor seletivo de IP-10 é o CXCR3, estando presentes em macrófagos, linfócitos T, células dendríticas, células NK e células B. Esta ligação tem atividades essenciais na regulação, diferenciação, ativando e orientando o deslocamento de células do sistema imunológico para as áreas de inflamação, aumentando a inflamação, gerando dano tecidual (Gudowska-Sawczuk; Mroczko, 2022; Rizzi *et al.*, 2022).

1.2 Imunoglobulinas

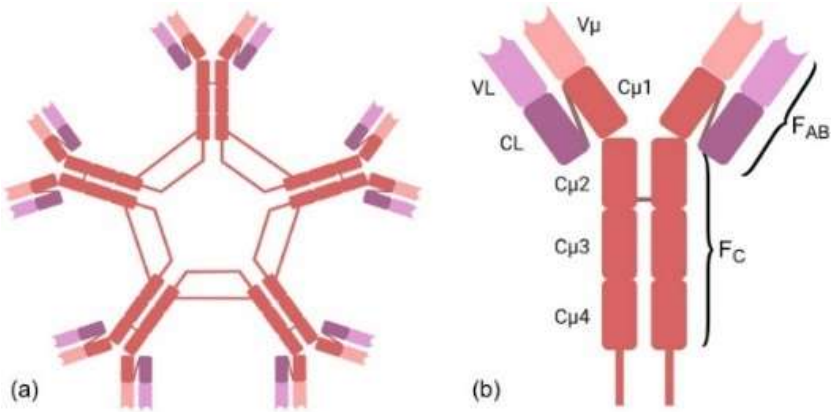
1.2.1 Imunoglobulinas IgM e IgG totais

Os linfócitos B desempenham funções essenciais no sistema imunológico, atuando como reguladoras da resposta imune ao produzir e liberar proteínas imunológicas (anticorpos), tais como as IgG e IgM (Mauri; Bosma, 2012).

Estes anticorpos, também chamadas de imunoglobulinas, responsáveis pela defesa e homeostase do corpo, tem duas atuações, sendo o reconhecimento de estruturas específicas com alta afinidade e conjuntamente se conectando com células do sistema imune inato (fagócitos, células dendríticas e células NK) (Vattepu *et al.*, 2022).

As estruturas da imunoglobulina IgG é constituída por um monômero e a IgM é pentamérica, mas também há pequenas quantidades de hexâmetros e monômeros, ambas tendo duas cadeias leves e duas cadeias pesadas idênticas, onde a imunoglobulina IgG corresponde a classe "γ" (gama) tendo seus níveis aumentados em uma infecção aguda e persistindo a longo prazo e a IgM a classe "μ" (mu) fornecendo a primeira linha de defesa contra patógenos sendo ligadas por pontes de dissulfeto. Nos domínios N-terminais, da cadeia leve e pesada, possuem regiões variáveis, formando dois sítios de ligação a antígenos, com os domínios CH1 e CL (luz), formando os fragmentos de ligação ao antígeno (Fab). Já na outra ponta dos anticorpos, temos os domínios CH2 e CH3 em IgG e CH2-4 em IgM formando a região conhecida como fragmento cristalizável ou constante (Fc), conforme Figura 4 (Maibom-Thomsen *et al.*, 2019; Pan; Manabe; Yamaguchi, 2021).

Figura 4: Representação da estrutura básica de um anticorpo IgG e IgM.
Estrutura de imunoglobulinas. (a) A estrutura da IgM é composta por cinco monômeros com dez sítios de ligação. (b) A estrutura da IgG é composta por um monômero com dois sítios de ligação. Os sítios de ligação estão localizados no final da região Fab do monômero, na região variável.



Fonte: Soler *et al.*, 2020

1.2.2 Anticorpos Neutralizantes para SARS-CoV-2 (COVID-19)

Através da resposta imune adaptativa, a partir do momento em que células apresentadoras de antígenos (APC), exibem fragmentos destes patógenos as células B, se tornam ativadas e realizam uma série de troca aleatória de vários segmentos gênicos e a introdução de mutações somáticas, no propósito de alcançar um número maior de agentes específicos causadores desta doença, transformando-se em plasmócitos e plasmablastos, que são células imunes especializadas responsáveis por fabricar anticorpos específicos que neutralizam o patógeno em questão (Gruell *et al.*, 2022).

O desenvolvimento de diversos testes para verificar anticorpos anti-SARS-CoV-2, tanto em pessoas já vacinadas quanto em pacientes previamente infectados pelo vírus em questão, apresentam resultados e significado clínico incertos. O exame de anticorpos neutralizantes, é um dos parâmetros utilizados para avaliar a resposta do sistema imune contra a infecção do SARS-CoV-2 (COVID-19) e a eficiência das vacinas mundialmente aplicadas. No caso da vacinação efetiva, ocorre uma indução da resposta de linfócitos B, para a geração dos anticorpos neutralizantes específicos, atuando na competitividade pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) no domínio de ligação ao receptor (RBD), bloqueando a ligação do vírus nos receptores celulares, impossibilitando assim a infecção (Wang, Chang Yi *et al.*, 2022).

Este estudo visou criar uma ferramenta para avaliar a eficácia da vacina contra o SARS-CoV-2 em pessoas com HIV, examinando as reações das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de participantes, estimuladas com o vírus SARS-CoV-2 inativado e peptídeos

sintéticos, medindo a resposta imunológica através da liberação de citocinas como TNF-α e IFN-γ, contribuindo para um monitoramento mais completo da resposta imune à vacinação em pacientes com HIV.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

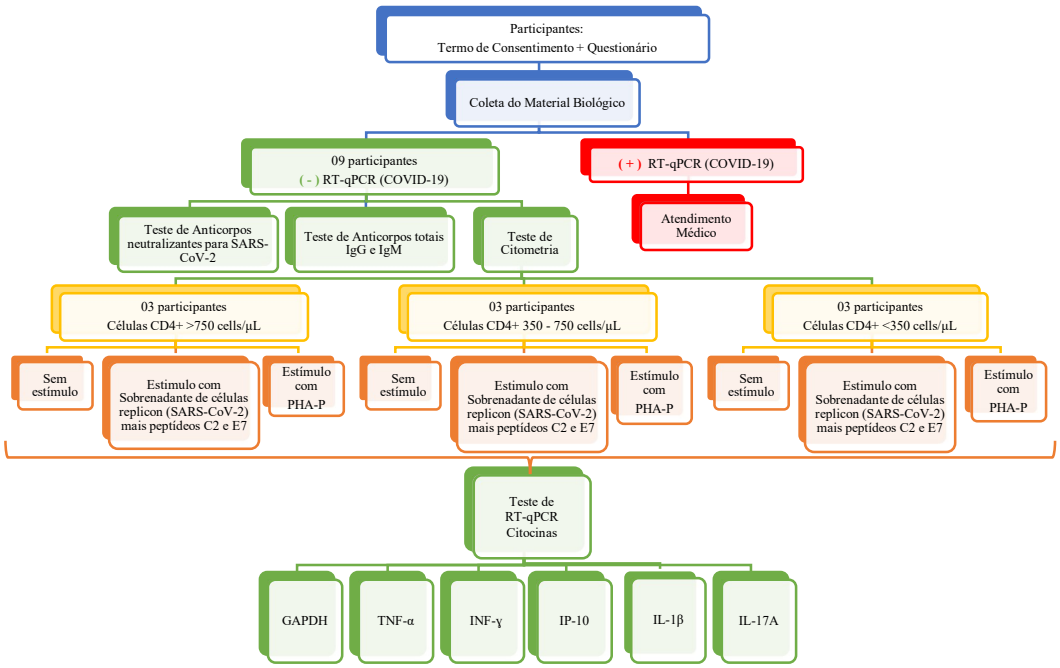
Propõe o desenvolvimento de uma plataforma para avaliar a resposta imunológica celular específica contra SARS-CoV-2 através da expressão relativa de citocinas em PVHIV e imunizados com diferentes vacinas contra SARS-CoV-2disponíveis atualmente no Brasil, aplicadas no município de São Carlos-SP.

2.2 Específicos

- Desenvolvimento de técnica de produção de replicon de SARS-COV-2 (ccSARS-COV-2) a partir da cultura de células BHK-21;
- Desenvolver o teste qPCR em tempo real para o ajuste da concentração de ccSARS-CoV-2 para ensaio de indução de citocinas;
- Avaliar o padrão imunofenotípico as células do sangue periférico de PVHIV vacinados contra SARS-CoV-2;
- Desenvolver o teste para quantificação de citocinas em sobrenadante pós-indução de PBMC: TNF- α, IFN-γ, IL-1β, IL-17A e IP10 com leitura por qPCR;

Figura 5: Fluxograma de trabalho.
As cores indicam as etapas do estudo: azul para a abordagem com os participantes, vermelho para os participantes que receberam cuidados médicos, verde para os testes realizados, amarelo para a separação dos participantes em

grupos e laranja para os estímulos aplicados nas amostras. Os símbolos de “+” e “-” representam os resultados dos testes para SARS-CoV-2, sendo “+” para detectado e “-” para não detectado.



Fonte: o autor.

3. PARTICIPANTES DA PESQUISA

O projeto foi aprovado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (5504), registrado na Plataforma Brasil sob o número CAAE: 74769223.1.0000.5504, os participantes desta pesquisa, foram indivíduos de ambos os gêneros com 18 a 60 anos de idade, atendidos pelo Centro de Atendimento de Infecções Crônicas Ana Cláudia Lucato Cianflone da secretaria municipal de saúde da prefeitura de São Carlos-SP, em parceria com o departamento de Medicina da UFSCar. Foram selecionados três grupos de 3 participantes portadores de HIV^{+}(Figura 5). Esta condição é justificada por apresentar um comprometimento da resposta de anticorpos devido a um desequilíbrio de células T CD3+ CD4+ CD8-, tendo assim uma imunidade atenuada a outras comorbidades, ampliando assim a variabilidade de amostras para testar esta plataforma. Os grupos foram separados conforme a contagem de células CD3+ CD4+ CD8- Abs Count (cells/µL) obtidas através do teste de Citometria de fluxo conforme o item 3.10:

- Contagem de células CD4+ (CD3+ CD4+ CD8-) menores que 350 cells/µL.
- Contagem de células CD4+ (CD3+ CD4+ CD8-) entre 350 até 750 cells/µL.

- Contagem de células CD4+ (CD3+ CD4+ CD8-) maiores que 750 cells/µL.

3.1.1 Critérios de inclusão

Para esta pesquisa, os participantes devem atender aos seguintes critérios de inclusão: Idade entre 18 e 60 anos, ser portadores de HIV^+ (Vírus da imunodeficiência humana), possuir o primeiro ciclo vacinal completo, e ter de dois a doze meses da última aplicação da vacina, sendo do ciclo vacinal ou de reforço (não importando qual o tipo de vacina), estar não detectado para SARS-COV-2 no teste de RT-qPCR. Além disso, os participantes devem assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em duas vias, após receberem todas as informações sobre o protocolo do estudo e esclarecerem suas eventuais dúvidas.

3.1.2 Critério de exclusão

Os participantes não participarão da pesquisa se eles estiverem com as idades menores de 18 anos ou maiores que 60 anos, não possuir o primeiro ciclo vacinal completo e ter menos que dois meses e mais que doze meses da última dose da vacina, estar infectado pelo SARS-COV-2 no teste de RT-qPCR, imunodepressão (pessoa transplantada, com câncer ativo, em quimioterapia ou terapia com imunobiológicos), insuficiência orgânica grave (insuficiência renal dialítica, insuficiência pancreática, insuficiência cardíaca CF-IV, DPOC em uso de oxigênio domiciliar, diabetes mellitus, fazer uso crônico de corticoterapia (20 mg de prednisona por dia por mais de duas semanas), imunossupressores ou imunobiológicos.

3.1.3 Coleta de material

3.1.3.1 Coleta de Sangue

A coleta de sangue ocorreu por via venoso em quatro tubos:

- 01 tubo contendo ativador de coágulo, que acelera o processo de coagulação, e gel separador para obtenção de soro com capacidade para 3,5mL de sangue;
- 02 tubos contendo anticoagulante de Heparina de Sódio ou Lítio com capacidade para 4,0mL de sangue;
- 01 tubo contendo anticoagulante EDTA com capacidade para 4,0mL de sangue.

Os tubos totalizam 15,5 mL de sangue por participante e devem ser mantidos de 2 a 8 ºC.

3.1.3.2 Coleta de secreção nasal

A coleta de secreção nasal, ocorrerá utilizando dois Swab (cotonete longo e estéril), introduzidos um a cada cavidade nasal (no fundo do nariz). Após a coleta os Swabs devem ser

mantidos dentro de tubo estéril, contendo de 2 a 3 ml de meio de transporte viral ou soro fisiológico, mantidos de 2 a 8 ºC.

3.1.4 Riscos e Benefícios

3.1.4.1 Riscos

Na coleta de Sangue, os riscos foram aqueles relacionados à punção venosa que podem ser caracterizados como o desconforto da puntura, como a dor local, e a possibilidade de ocorrência de hematoma no local da punção venosa.

A coleta de secreção nasal, os riscos foram aqueles relacionados com a utilização do Swab nasal que podem ser caracterizados como o desconforto e ou dor local.

3.1.4.2 Benefícios

Contribuição cientifica para o desenvolvimento de um novo método que possibilita melhorar o entendimento da proteção vacinal contra a COVID-19 (SARS-Cov-2) em relação ao esquema vacinal utilizado atualmente.

Os participantes também foram beneficiados com o recebimento dos resultados referentes ao teste de neutralização viral e o resultado da pesquisa viral na amostra de secreção nasal pelo método molecular de RT-qPCR para COVID-19 (SARS-Cov-2).

4. METODOLOGIA

4.1 Cultura de células BHK-21 contendo o replicon SARS-COV-2

Neste trabalho, utilizamos a linhagem celular BHK-21 que contém o replicon SARS-CoV-2 (BHK-21-repSARS-CoV-2-GLucNeo), um sistema replicon repórter do novo coronavírus, gentilmente fornecido pela Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil, do Departamento de Virologia do Centro de Pesquisas Ageu Magalhaes, FIOCRUZ, Recife-PE. Esse replicon consiste em um plasmídeo que contém o genoma do SARS-CoV-2, exceto as regiões codificadoras das proteínas estruturais, e que expressa a luciferase como um marcador de replicação.

As células BHK-21 replicon foram cultivadas em meio de cultura Opti-MEM – Gibco (Minimum Essential Medium), suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de penicilina e estreptomicina e 0,05 % de antibiótico seletivo a geneticina (G418, Gibco, código 11811031). As células foram cultivadas em estufas de CO_2 a 37°C. A contagem foi feita por coloração com

azul de Trypan 0,2% (m/v) em PBS, no Countess II FL Automated Cell Count (Thermo Fischer Scientific).

A produção viral foi coletada do sobrenadante da cultura e a quantificação feita pela reação de RT-qPCR, conforme descrito nos itens 4.3 e 4.4, e o vírus obtido foi tratada termicamente a 56°C, 30 minutos para inativação. O vírus ccSARS-CoV-2 inativado foi liofilizado (item 4.5).

4.2 Extração e purificação do RNA viral utilizando partículas magnéticas

Para a extração e purificação do RNA viral usamos a metodologia padronizada no laboratório, onde 300µL da amostra (o sobrenadante de cultura celular ou as amostras de nasofaringe dos participantes da pesquisa para a realização do teste de RT-qPCR para SARS-CoV-2), foram adicionados à 100µL do tampão de lise (6 molar de isotiocianato de guanidina, 50mM Tris HCL pH 7.6, 2% Sarkosyl e 20 mM EDTA), previamente liofilizado. Este procedimento foi realizado em placas do tipo Deep Well de 96 poços. A essa preparação foram adicionados 50µL de partículas magnéticas de Oxido de Ferro carboxiladas (GE) a 1% em tampão TE (Tris-HCl e de EDTA). A reação foi incubada a 50°C, 20 minutos, as partículas capturadas em sistema magnético e lavadas três vezes com etanol 70%, ressuspensas em 100µL de solução fosfatada 5mM, livre de RNAse e incubadas a 75°C durante 20 minutos. Após captura em sistema magnético, o RNA eluido, sendo utilizado ou armazenado a -80°C até o momento de uso.

4.3 Ensaio de RT-qPCR para quantificação viral no sobrenadante de cultura celular

Este ensaio quantitativo foi utilizado para avaliar a produção do ccSARS-CoV-2 no sobrenadante celular, como também para determinar a concentração a ser usada nos ensaios das citocinas.

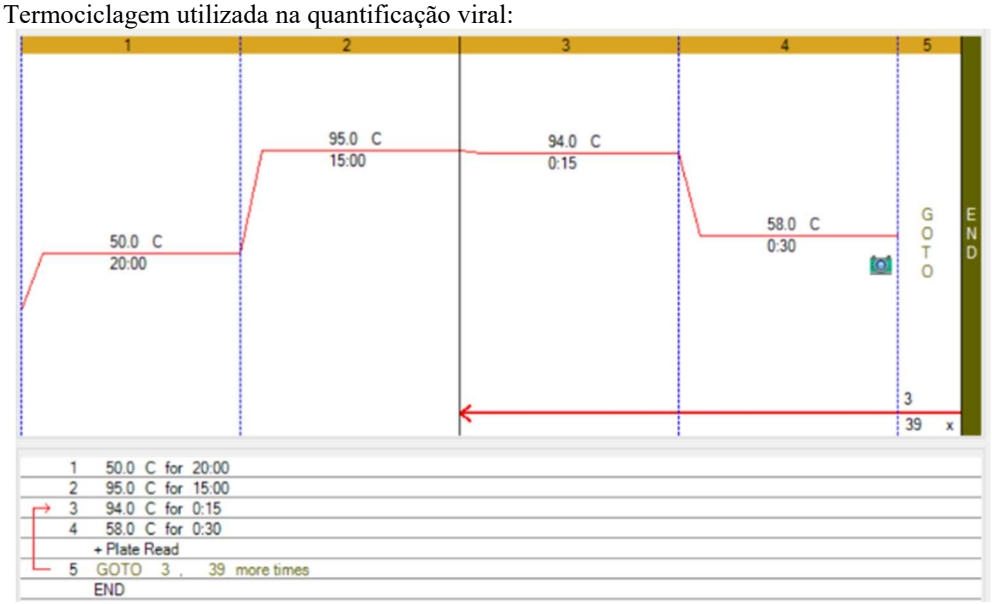
Para isso, uma curva de calibração foi realizada, utilizando um controle conhecido, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. José Luiz Proença Módena, Coordenador do Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes (LEVE), do Departamento de Genética e Evolução, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na concentração de Log 10^8 (100.000.000 cópias/mL) de RNA-SARS-CoV-2, efetuando três diluições diferentes (log: 10^2, 10^4 e 10^6) e realizando o teste de RT-qPCR, em triplicata e obtendo os Ct(s) (ciclo térmico) de cada teste.

Nesta quantificação utilizamos o Kit Allplex™ SARS-CoV-2 Assay, utilizando três (3) genes alvos específicos: RdRP, S e N. Para cada reação foi utilizado 5µL SARS2 MOM, 5µL EM8 e 5µL RNase-free Water, totalizando 15µL do Mastermix total. Em cada poço da placa PCR (96

poços) foi colocado 15µL da mistura de reação e adicionado 5µL do RNA eluido do sobrenadante, das diluições previamente realizadas e dos controles positivo e negativo do próprio kit Allplex™ aos poços correspondentes, obtendo 20µL de volume na reação final.

A reação de transcrição reversa e polimerização foi realizado no equipamento CF96X BioRad, seguindo o ciclo: transcrição reversa por 50^0C for 20 min, ativação da polimerase por 95^0C por 15 min e 39 ciclos de PCR de 94°C por 0.15 segundos com anelamento dos primer e sondas e sinal de aquisição por 58^0C a 30 segundos (Figura 9). A excitação do fluorocromo (Texas Red) ocorreu em 610 nm.

Figura 6: Termociclagem utilizada na quantificação viral:



Fonte: o autor.

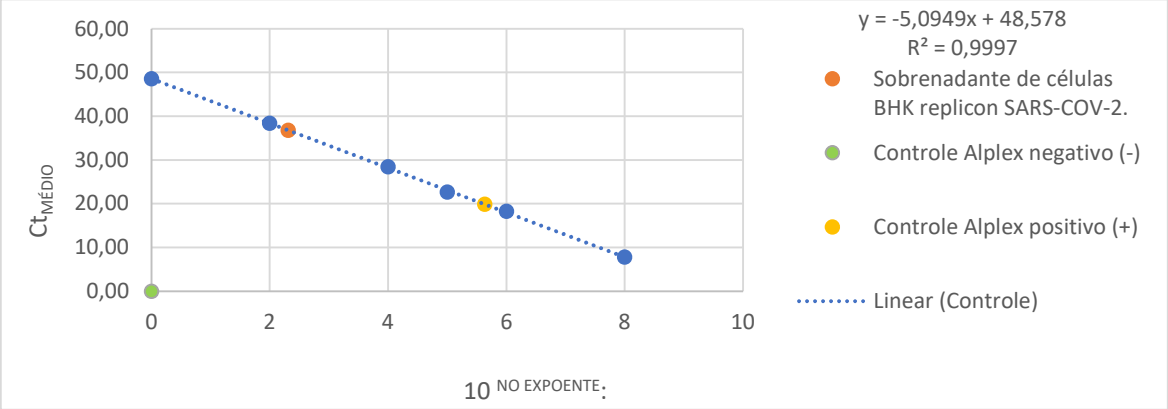
4.4 Quantificação viral do sobrenadante de células BHK-21 contendo replicon ccSARS-COV-2

A quantificação da carga viral no sobrenadante de células BHK-21 contendo replicon do vírus SARS-CoV-2, inativadas pelo calor, foi identificada através de realização de uma curva padrão, utilizando dosagens em triplicata de Ct (ciclo térmico) da técnica de RT-qPCR em quatro concentrações diferentes (10^2, 10^4, 10^6 e 10^8 cópias/mL) de uma amostra conhecida, conforme citada no item 4.3.

Na Figura 7, foram observados que valores mais altos de Ct se correlaciona com cargas virais logarítmica mais baixas. Constatamos assim, que o sobrenadante utilizado nesta pesquisa apresentava uma carga viral 2,31 $\log_{10}$, correspondendo a 28.896.544 cópias virais/mL. Identificamos também que o controle utilizado como um padrão positivo da maca Allplex

(referência do kit é valor de Ct≤ 40) correspondiam a 70.416.822 cópias virais/mL e o controle negativo não foi detectado.

Figura 7: Curva padrão da concentração de cópias de RNA:
Curva-padrão de amostras conhecidas em quatro níveis diferentes (10^2, 10^4, 10^6 e 10^8 cópias/mL) e da quantidade de replicons do SARS-CoV-2 no líquido da cultura de células BHK-21, incluindo controle negativo e no controle positivo em triplicata co kit Allplex.



Fonte: o autor

Segundo uma ação da FDA (Food and Drug Administration) para criar um limite de detecção, realizado por meio de uma cepa de SARS-CoV-2 2019-nCoV/USA-WA1/2020, que passou por processo de inativação por calor, sendo fornecida a 200 produtores de testes para detecção da COVID-19. Destes, 117 produtores, demonstraram resultados com um limite de detecção entre 180 a 600.000 Unidades Detectáveis NAAT/mL (NDU/mL). A "NDU" é uma única unidade capaz de resultar em teste detectável por qPCR (Lee, 2021).

Em um estudo relacionado carga viral do SARS-CoV-2 com transmissibilidade, relatou que em 212 participantes, detectou uma média de 5,6 (1,8 a 10,4) $\log_{10}$ cópias de RNA/mL de saliva. Em outra pesquisa científica, relatou também, uma média de cargas virais estimadas para as amostras detectadas, que ficaram entre 286 a 510.000 cópias/µL (Bhavnani *et al.*, 2022; Dadras *et al.*, 2022).

Observando estes resultados, adotamos como uma padronização desta plataforma, a utilização de 28.897 cópias virais para cada um ml de células PBMC.

4.5 Processo de liofilização

Para o processo de liofilização foram transferidos em tubos separados 100µL do sobrenadante da cultura celular pós inativação viral, 100 µL do tampão de lise e 100µL de meio de cultura

Opti-MEM e congeladas a -80°C, por 24 horas. Após esse período, foram liofilizadas na temperatura de -50°C, 50 mmHg de pressão do vácuo, com a temperatura nas plataformas de 34ºC por 20 horas. Para o processo de liofilização foi utilizado o equipamento LJJ02 freeze-dryer (JJ Científica, São Carlos, Brasil) acoplado à bomba de vácuo com palhetas rotativas banhadas a óleo, direct-drive, duplo estágio, válvula de isolamento do sistema de sucção, válvula gas-ballast para eliminação de impurezas do óleo, válvula de retenção de fluxo reverso, evitando o retorno do fluído em casos de quedas da energia elétrica. (Pitombo *et al.*, 1994).

Utilizamos para detectar a eficiência do processo de liofilização, o ensaio de umidade de uma das amostras de tampão de lise liofilizados, através do analisador de umidade de halogênio da METTLER TOLEDO HE53. Encontramos como resultado 1,17% MC (Teor de umidade normalizado, sendo o valor calculado levando em consideração temperatura e umidade) (Figura 8).

Segundo (Yadav; Kumar, 2014), as características do material liofilizado devem ter controle de umidade restante, sendo aceitáveis os valores de 1% a 3% para a grande parte dos produtos farmacêuticos liofilizados.

Figura 8: Resultado do controle de umidade:



Fonte: o autor.

4.6 Peptídeos da região Spike (S) do vírus SARS-CoV-2

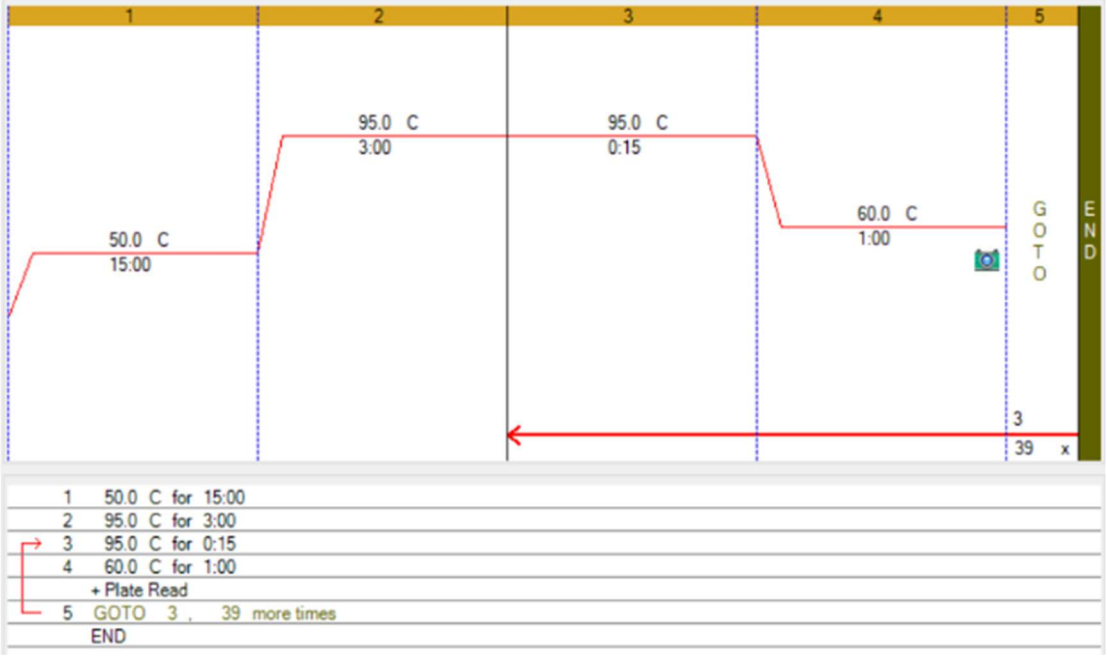
Foram sintetizados em nosso laboratório os peptídeos E7 e C2 a partir da região Spike (S) do vírus SARS-CoV-2 das subunidades S1 e S2 respectivamente, que foram utilizados para os ensaios de expressão de citocinas (Melo, 2022; Pinheiro, 2022).

4.7 Ensaio de RT-qPCR para detecção do vírus SARS-CoV-2 nos participantes

Este ensaio foi utilizado para avaliar se os participantes estavam com COVID-19 no momento da coleta. Se detectado, este participante não realizou as demais etapas do projeto e foi encaminhado para a consulta médica, com o objetivo de receber tratamento adequado. Lembrando que o nosso foco é avaliar o desenvolvimento da plataforma frente a resposta imune do participante referente a vacinação.

O desenvolvimento da reação de RT-qPCR, composta pela transcrição reversa do RNA viral sob condição isotérmica, seguida pela reação em ciclos de desnaturação, anelamento de primers, sonda e polimerização pela enzima DNA polimerase presente na mistura (MasterMix-MM) da reação. Brevemente, a mistura de reação foi composta por 15µL do KiCqStart One-Step Probe RT-qPCR ReadyMix (Sigma/Aldrich), 0,3µL primer E (Forward) e E (Reverse), 0,15µL da sonda E, e 0.3µL primers RD-RP (Forward) e RD_RP (Reverse) e 0,15µL sonda RD-RP. Um volume de 10µL da mistura de reação foram distribuídos placa de PCR de 96 poços, e adicionado 10µL do RNA eluido da amostra do participante (item 4.2), dos controles positivo e negativo do kit Allplex™ (utilizado no item 4.3) aos poços correspondentes, obtendo 20µL de volume na reação final. A reação de transcrição reversa e polimerização foi realizado no equipamento CF96X BioRad, com o seguinte ciclo: transcrição reversa por 50°C for 15 min, ativação da polimerase por 95°C for 3 min e 39 ciclos de PCR de 95°C por 0.15 seg. com anelamento dos primer e sondas e sinal de aquisição por 60°C por 1 min (Figura 9). A excitação do fluorocromo (FAM) ocorreu a 465nm e emissão a 510 nm.

Figura 9: Ciclos da reação de transcrição reversa:



Fonte: o autor.

4.8 Detecção de anticorpos neutralizantes de SARS-CoV-2

Após 60 minutos da coleta do sangue venoso realizado no tubo contendo ativador de coágulo e gel separador, ocorreu a retração do coágulo e foi centrifugado a 1.650g por 10 minutos para

obtenção de soro. Após a centrifugação, a amostra foi mantida a -20°C até o momento da análise.

O kit utilizado para este teste foi o cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit da Gen Script USA, Inc., e conforme sua bula, foi diluindo 10µL do conjugado RBD (fragmento recombinante de Receptor Binding) com HRP (conjugado com peroxidase do rábano silvestre), com 10mL do tampão de diluição HRP, formando a solução HRP-RBD. A solução de lavagem 1x, foi preparada diluindo 40mL da solução de lavagem 20x com 760mL de água destilada.

Para a preparação das amostras e dos controles positivo e negativo, agitou-se estes tubos (vortex) e diluiu cada componente na proporção 1/10, ou seja, transferiu 10µL destas amostras e dos controles respectivamente em eppendorf de 2mL, adicionando em cada, 90µL do tampão de diluição da amostra.

A placa de Elisa foi retirada da embalagem, separando as tiras que foram utilizadas, contando cada amostra e controles em duplicata e encaixando estas tiras na estrutura da placa.

Em tubos separados, diluímos novamente as amostras e os controles, utilizando 100µL deles com 100µL da solução já preparada de HRP-RBD. Estes tubos foram incubando a 37°C por 30 minutos. Transferiu-se 100µL de cada controle e amostras para os poços correspondentes na placa de Elisa, que já contém uma proteína receptora ACE2 humana (hACE2) em cada poço. Todas as amostras e os controles foram feitos em duplicata. A placa foi coberta com um selador e incubada a 37°C por mais 15 minutos. Após este período, a placa foi lavada utilizando 300µL da solução de lavagem previamente prepara, em um lavador de placas Elx50 (BioTek), por quatro vezes. O líquido residual foi removido, batendo a placa em uma toalha de papel.

Acrescentou-se 100µL da solução TMB e a placa foi incubada no escuro por mais 15 minutos a 25°C. Após este período, adicionou-se 50µL da solução de parada e utilizando um leitor de placas accuSkan GO (Fisher Scientific), a leitura foi feita a 450nm imediatamente.

O controle de qualidade do teste aplicado indica que a leitura do controle negativo tem que ser >1,0 e que a leitura do controle positivo tem que estar <0,3.

Com as leituras em 450 nm, o cálculo da média nas duplicatas foi realizado, conforme indicado pelo kit, utilizando os cálculos do Quadro 3, obtendo as porcentagens dos anticorpos neutralizantes das amostras e dos controles.

Quadro 3: Cálculos utilizados para detecção de anticorpos neutralizantes SARS-CoV-2.

$$\text{Média} = (1° \text{ leitura} + 2° \text{ leitura}) \div 2$$

$$\text{Inibição} = \left[1 - \frac{\text{Média da leitura da amostra}}{\text{Média da leitura do Controle Negativo}}\right] \times 100\%$$

Fonte: Bula do Kit cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit da Gen Script USA, Inc.

A interpretação do resultado segundo o kit utilizado deve ser conforme o Tabela 1.

Tabela 1: Interpretação dos resultados dos anticorpos neutralizantes:

Cutoff	Resultado	Interpretação
≥ 20%	Positivo	Detectado anticorpo neutralizante de SARS-CoV-2
< 20%	Negativo	Não detectado anticorpo neutralizante de SARS-CoV-2

Fonte: Bula do Kit cPass™ SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit da Gen Script USA, Inc.

4.9 Detecção de anticorpos IgG e IgM

Foi firmada uma parceria entre o Laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular (LICBM) – UNESP Araraquara-SP com o Laboratório Araraquarense de Análises Clínicas, Patologia e Microbiologia S/C Ltda (Laboratório São Lucas de Araraquara-SP), que realizou os exames de turbidimetria para a detecção de imunoglobulinas IgG e IgM totais, utilizando 1mL da amostra de soro do participante (item 3.1.3), enviadas ao laboratório na temperatura de 2 a 8°C. Esta técnica tem como base a medida da transmissão da intensidade de luz. Um anticorpo específico reage com a anticorpo pesquisada, que se encontra na amostra obtendo a formação de agregados insolúveis. A quantidade de aglutinação, medida em absorbância, é comparável com a quantidade de anticorpo pesquisada, onde a concentração é calculada através de uma curva de referência padrão, armazenada na memória do equipamento utilizado (Asch, 2021).

Os valores de referência indicados pelo Laboratório São Lucas de Araraquara-SP, para a Imunoglobulina IgG são entre 16 a 19 anos: de 549 a 1584 mg/dL e em adulto: de 650 a 1600 mg/dL. Nas imunoglobulinas IgM estes valores estão entre 16 a 19 anos: de 23 a 259 mg/dL e em adulto: de 50 a 230 mg/dL.

4.10 Ensaio imunofenotipagem por Citometria de Fluxo

A imunofenotipagem por citometria de fluxo foi realizada em amostras de sangue total contendo anticoagulante EDTA, seguindo protocolo já estabelecido em nosso laboratório, conforme preconizado na Rede Nacional de Laboratórios de Citometria de fluxo do Ministério

da Saúde, onde a quantificação de linfócitos no sangue periférico é obtida pela ligação específica de anticorpos monoclonais acoplados aos fluorocromos (anti- CD45 mais peridinin chlorophyll protein - PerCP, anti-CD3 associado a fluorescein isothiocyanate - FITC, anti-CD4 com a allophycocyanin - APC, e no anti-CD8 marcado com a phycoerythrin - PE), sendo um único reagente da BD Multitest de imunofluorescência direta de quatro cores para identificar e determinar as porcentagens e contagens absolutas de linfócitos T humanos maduros (CD3), subgrupos de linfócitos T supressores e citotóxicos (CD3 CD8) e subgrupos de linfócitos T auxiliares e indutores (CD3 CD4) em sangue total lisado por eritrócitos. Quando usado com tubos de contagem absoluta BD Trucount™, essas populações podem ser enumeradas a partir de um único tubo, que possibilitam as determinações relativas e absolutas desses fenótipos celulares no Citômetro de Fluxo FACSVia (BD).

Os valores de referência preconizado para este teste conforme a faixa etária adotado para esta pesquisa está demonstrada no Tabela 2.

Tabela 2: Valores de referência da citometria de fluxo:

Valores de Referência	Faixa Etária >18 anos
Linfócitos TCD4	540 – 1731 cells/µL
Linfócitos TCD8	263 - 1189 cells/µL

Fonte: Valores de referência conforme SISCEL (Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4+/CD8+ e Carga Viral).

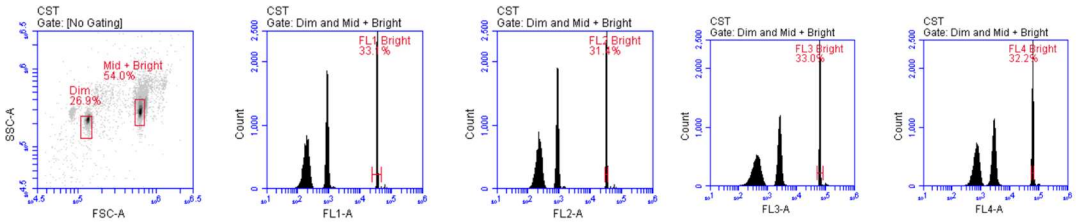
Os valores de referência adotados para a razão entre CD4/CD8 (valor obtido dividindo células CD4 por células CD8 em células/µL) é de 1,0 a 2,5, onde resultados alterados são tidos como clinicamente relevante, podendo ser por aumento ou diminuição, indicando o mau desempenho imunológico (Pascual-Dapena *et al.*, 2022).

De uma maneira mais ampla, a melhora na razão entre CD4/CD8 é atribuído a recuperação dos valores de linfócitos T CD4 e regularização das contagens de linfócitos T CD8 após controle da replicação viral do HIV^{+}. Mas os valores das células CD8 permanecem em níveis mais altos mesmo com os tratamentos de longo período com terapia anti-retroviral. Algumas pesquisas relatam que este aumento está interligado a vários desequilíbrios imunológicos não correlacionados com a AIDS, mas as circunstâncias deste aumento das células CD8 ainda não estão totalmente lucidadas (Li *et al.*, 2022; Sato *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020).

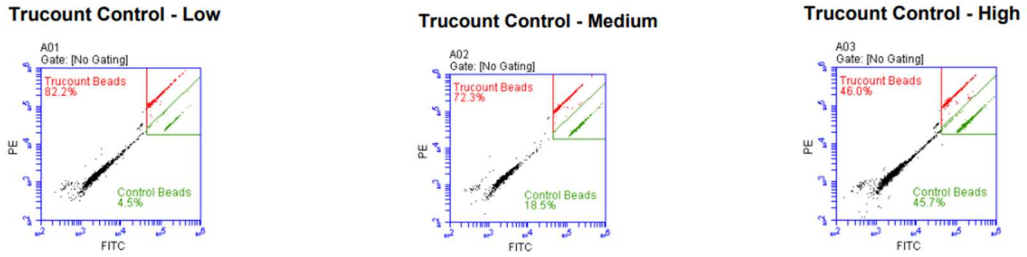
Foram utilizados controles no equipamento FACSVia (BD) de citometria de fluxo, onde a bula destes relata que o controle BD CS&T Bead, atua no monitoramento da qualidade óptico, eletrônica e fluídica do instrumento, para ajustar a compensação de fluorescência, e o controle

BD Trucount™ (Low, Medium e High), sendo utilizados para verificar o processo de contagem absoluta (Figura 10) (BD Biosciences, 2023a, 2023b).

Figura 10: Representação dos controles de qualidade utilizados na citometria de fluxo.
FSC: parâmetro de tamanho, conhecido como *forward scatter*, SSC: complexidade interna, conhecida como *side scatter, que* é avaliada pela dispersão lateral de luz após interceptação da célula pelo laser, FL1: CD45, FL2: CD4, FL3: CD3 e FL4: CD8.



Parameter	Bright Bead Median	MFI Range		% Bright Bead rCV	Instrument Sensitivity	Sensitivity Spec.	Parameter Pass/Fail
FSC	633420	411665	764521	3.2%	99	30	Pass
SSC	291018	216927	402864	10.6%	59	50	Pass
FL1	35216	22687	42133	3.2%	269	80	Pass
FL2	32822	22230	41284	3.0%	809	200	Pass
FL3	63542	45996	85421	4.0%	91	40	Pass
FL4	61883	41928	77866	5.8%	117	70	Pass



Parameter	Trucount Beads	Trucount Control Beads	Abs Count	Expected Count
Control Beads – Low	10000	547	53	52
Control Beads – Medium	10000	2555	248	242
Control Beads - High	10000	9929	964	958

Fonte: o autor

4.11 Ensaio de citocinas pós-indução ex vivo de PBMC

O ensaio a ser desenvolvido pela plataforma foi denominado de Vacimuni-nCoV-2, possibilitou a avalição das condições da imunidade celular em indivíduos vacinados e apresentando ausência de resposta imunológica ou com diferentes graus de respostas humoral aos agentes vacinais disponíveis em São Carlos-SP.

4.11.1 Obtenção de PBMC da amostra dos participantes

Para a avaliação da influência das células mononucleares-PBMC sobre o teste Vacimuni-nCoV-2, obtivemos estas células através da coleta de sangue heparinizado, conforme item 3.1.3.

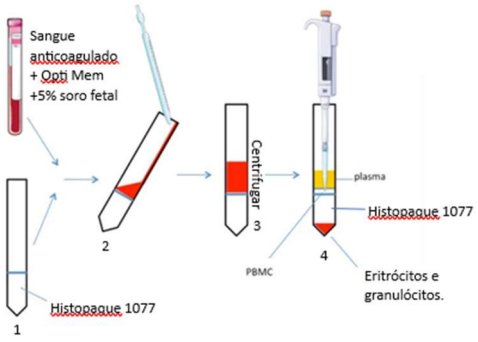
No tubo primário da amostra do participante, após ter retirado o plasma, foi adicionado 2mL de meio para cultura Opti-MEM com 5% de soro fetal e homogeneizado.

Em um tubo Falcon de 15mL, livre de DNAse e RNAse, colocamos 3mL do gradiente de densidade com Histopaque®-1.077 g/mL (SIGMA), e sobre ele adicionamos cuidadosamente a amostra de um tubo do participante previamente preparada e completamos com meio para cultura Opti-MEM com 5% de soro fetal até o volume final de 10mL (Figura 11 item 2).

O tubo Falcon foi centrifugado em 2.100 rpm por 30 minutos com a aceleração e a frenagem configurados na centrífuga o mais suave possível. Conforme relatado na bula do Histopaque®-1.077 g/mL (Merck - Sigma, 2023), durante esta centrifugação, os eritrócitos são agregados por polissacarose e sedimentam rapidamente. Os granulócitos tornam-se levemente hipertônico, o que aumenta sua taxa de sedimentação, resultando em peletização no fundo do tubo centrifugado. Os linfócitos e outras células mononucleares permanecer acima do Histopaque-1077 (Figura 11 item 4).

Após a centrifugação, utilizando uma pipeta, aspiramos cuidadosamente a camada que está acima do Histopaque-1077, nos primeiros 0,5 cm da superfície opaca contendo células mononucleares para um eppendorf de 2mL livre de DNAse e RNAse.

Figura 11: Separação celular para obtenção de PBMC:



Fonte: o autor.

Este procedimento foi realizado separadamente para cada um dos dois tubos de 5mL de sangue heparinizado de cada participante e no final do procedimento, unimos em um único eppendorf de 2mL livre de DNAse e RNAse.

4.11.2 Padronização das quantidades de células PBMC

Em um eppendorf de 2mL livre de DNAse e RNAse, adicionou-se 30µL das células PBMC, mais 30µL do corante Azul de Trypan (w/v) a 4%. A solução foi homogeneizada e ficou descansando de 2 a 3 minutos. A contagem celular foi realizada no equipamento Countess II (invitrogen by Thermo Fisher Scientific).

Este corante tem a finalidade de distinguir as células viáveis (sem coloração), das células não viáveis que são coradas em azul (Lopes *et al.*, 2020).

Com a concentração das células obtidas, ajustamos as células PBMC em $1X10^6$ células/mL, através do cálculo de concentração e realizamos a diluição com meio de cultura Opti-MEM contendo 5% soro fetal.

C1 x V1 = C2 x V2
C1 e V1 são a concentração e o volume da solução inicial,
C2 e V2 são a concentração e o volume da solução final.

4.11.3 Desenvolvimento do Teste Imunoenzimático para Citocinas Secretadas

O conjunto de reação que contempla três tubos. No primeiro tubo foi adicionado 100µL do meio de cultura Opti-MEM (1x) + GlutaMax TM-1 previamente liofilizado (item 3.4), utilizado como controle negativo, no segundo tubo continha 100µL do sobrenadante de células de ccSARS-CoV-2 inativado na concentração de 28.897 cópias virais previamente liofilizado (item 3.4) e 1µL de peptídeos C2 e E7 na concentração de 1mg/mL, utilizado como teste e no terceiro tubo e 1µL de mitógeno PHA-P (Phytohemagglutinin P) na concentração de 5mg/mL como controle positivo. Nestes três tubos, foram adicionados 1mL de células PBMC na concentração de $1x10^6$ células (item 4.11.1).

Para cada participante, foram montados dois conjuntos de reação, sendo incubados à 37°C, onde um conjunto ficou incubado por 12 horas e o segundo conjunto permaneceu incubado por 24hs. Após este passo, foi realizado a extração do RNA (item 4.12.1).

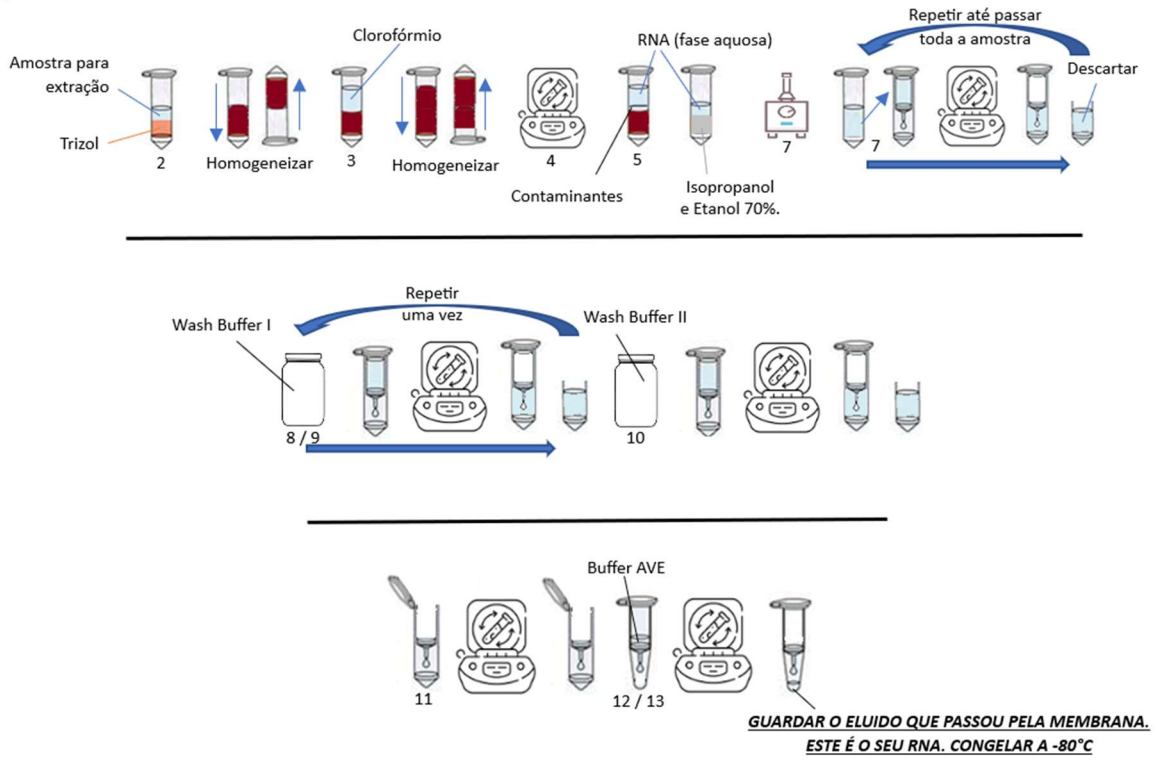
4.12 Desenvolvimento do Teste qPCR para citocinas expressas

4.12.1 Extração de RNA

Os dois conjuntos de reação (testes, controle positivo e negativo), foram submetidos a extração de RNA total (Figura 12), através do procedimento padronizado no laboratório, onde foi adicionado em cada tubo 300µL do reagente Trizol (TRI Reagent, for DNA, RNA and

proteinisolation – Sigma- Aldrich©) e 200 µL de clorofórmio. Com o tubo fechado, foi homogeneizado e centrifugado em 4°C por 15 minutos a 12.000 rpm, para a separação das fases. Com bastante cuidado o RNA (fase aquosa) foi transferido para um novo micro tubo livre de DNAse e RNAse, acrescentando 450µL de isopropanol e 450µL de etanol 70%. Este tubo foi homogeneizado por 15 segundos e transferido para uma coluna associada a um micro tubo próprio do Kit (Kit PureLink Micro-to-Midi, Invitrogen). Esta transferência ocorreu em um volume de 450µL de cada vez, e centrifugado por 15 segundos a 12.000 rpm. O líquido que ficou no micro tubo abaixo da coluna foi descartado e a operação foi repetida até filtrar toda a amostra. Foi realizado duas etapas de lavagem acrescentando na membrana, 450µL de Wash Buffer I e centrifugando por 15 segundos a 12.000 rpm. Descartou o líquido que ficou no micro tubo abaixo da coluna. Uma terceira etapa de lavagem foi realizada acrescentando na membrana 500µL de Wash Buffer II e centrifugado por 15 segundos a 12.000 rpm. O líquido que ficou no micro tubo abaixo da coluna foi descartado. Centrifugado novamente o micro tubo, sem acrescentar nada na membrana, por 15 segundos a 12.000 rpm, com a tampa do tubo aberta (para retirar qualquer etanol que contenha na membrana). A tampa do tubo que fica junto a coluna foi cortada e o micro tubo que fica abaixo da coluna foi trocado por um micro tubo de 1,5 ml côncavo e livre de RNAse e DNAse. Adicionado 60 µL de Buffer AVE na coluna e deixando por 1 minuto incubando a temperatura ambiente e centrifugado por 15 segundos a 12.000 rpm. Por fim o RNA total ficou no micro tubo abaixo da membrana. Manter este micro tubo do RNA extraído no gelo durante a utilização e armazenar a -80°C.

Figura 12: Extração de RNA utilizando trizol:



Fonte: o autor.

4.12.1.1 Padronização das quantidades de RNA totais

Após a extração de RNA, utilizando o equipamento Nanodrop (Espectrofotômetro GE NanoVue), quantificamos o RNA total que continha em cada amostras.

A concentração média de RNA total foi de 20,1 ng/µL. Com os resultados da concentração de RNA total de cada extração, aplicamos a fórmula de concentração (item 4.11.2) onde foi ajustado cada amostra utilizando água livre de RNAse e DNAse par a concentração final de 5ng/µL.

4.12.1.2 Montagem da reação de RT-qPCR para as diversas citocinas analisadas

O ensaio de RT-qPCR desenvolvido com primers e sondas específicas de cada citocinas que foram adquiridas pela Invitogen by Thermo Fisher Scientific. (Quadro 4):

Quadro 4: Sequencias dos primers utilizadas no ensaio do RT- qPCR:

Citocinas:	Primers:	Sequência de 5´ para 3`:
GAPDH	GAPDH: Forward	CTC CTC CAC CTT TGA CGC TG
	GAPDH Reverse	AGG GGA GAT TCA GTG TGG TG
TNF- α	TNF- α: Forward	CTC TTC TGC CTG CTG CAC TTT G
	TNF- α: Reverse	ATG GGC TAC AGG CTT GTC ACT C
IFN-γ	IFN-γ: Forward	GAG TGT GGA GAC CAT CAA GGA AG
	IFN-γ: Reverse	TGC TTT GCG TTG GAC ATT CAA GTC

IL-1β	IL-1β: Forward	CCA CAG ACC TTC CAG GAG AAT G
	IL-1β: Reverse	GTG CAG TTC AGT GAT CGT ACA GG
IL-17[a]	IL-17A: Forward	CGG ACT GTG ATG GTC AAC CTG A
	IL-17A: Reverse	GCA CTT TGC CTC CCA GAT CAC A
IP-10 (CXCL10)	CXCL10: Forward	GGT GAG AAG AGA TGT CTG AAT CC
	CXCL10: Reverse	GTC CAT CCT TGG AAG CAC TGC A

Fonte: Certificado de Análises da INVITROGEN CUSTOM PRIMERS.

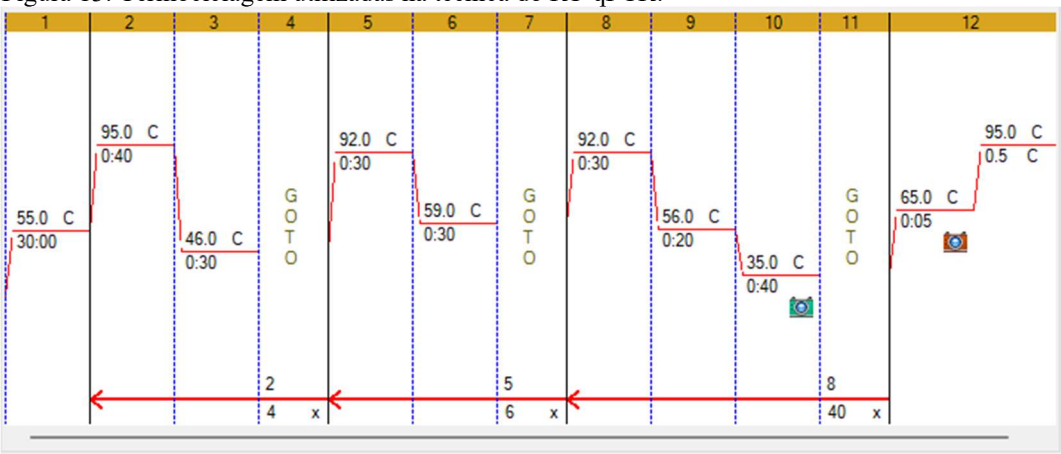
Para estes procedimentos, utilizamos o GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) como controle de expressão relativa e seguimos com a padronização das reações de amplificação em diferentes ciclos térmicos que foram devidamente caracterizados para estas citocinas, resultando em ciclos térmicos (Ct) (Figura 14).

Para o GAPDH foi realizado utilizado 7,5µL do KiCqStart One-Step Probe RT-qPCR ReadyMix (Sigma/Aldrich), 0,5 µL primer forward e reverse e 2,0µL de água livre de RNAse e DNAse, totalizando 10µL para cada reação. Então, em cada poço da placa de PCR (96 poços), continha 10µL dos reagentes e 10µL do RNA total, na concentração final de 5 ng/µL, da amostra do participante (item 4.12.1.1), correspondendo a 20µL de volume final da reação.

Para realizar um teste para as demais citocinas, foram utilizados 7,5µL do KiCqStart One-Step Probe RT-qPCR ReadyMix (Sigma/Aldrich), primers específico de cada citocina conforme, sendo 0,3µL do primer forward e 0,3µL do primer reverse, 1,9µL de SYBR Green, totalizando 10µL para cada reação. Então, em cada poço da placa de PCR (96 poços), continha 10µL dos reagentes e 10µL do RNA total na concentração final de 5ng/µL da amostra do participante (item4.12.1.1), correspondendo a 20µL de volume final da reação.

A reação de transcrição reversa e polimerização foi realizado no equipamento CF96X BioRad, com o seguinte ciclo (Figura 13): 55°C por 30 minutos para a produção de cDNA, e dois pré ciclos com o objetivo de aumentar a sensibilidade, aumentando os moldes iniciais do teste, onde o primeiro pré ciclo formado por 95°C por 40 segundos e 46°C por 30 segundos, repetidos por 4 vezes e um segundo pré ciclo, formado por 92°C por 30 segundos e 59°C por 30 segundos repetidos por 6 vezes, e logo após, um ciclo de ciclagem composta por 40 ciclos: 30 segundos a 92°C para a etapa de desnaturação do RNA, seguida de 20 segundos a 56°C para a etapa de extensão e finalizando com a detecção do sinal de fluorescência a 40 segundos a 35°C. A excitação do fluorocromo (FAM) ocorreu a 465nm e emissão a 510 nm. No final de todas as análises, realizamos a curva de Melt (Figura 15), para detectar a especificidade deste teste, que iniciou em 65 °C indo até 95 °C, tendo a taxa de transição de 0,5 °C/seg. Todas as amostras (teste, controle positivo e negativo) foram testadas em duplicatas para cada uma das citocinas.

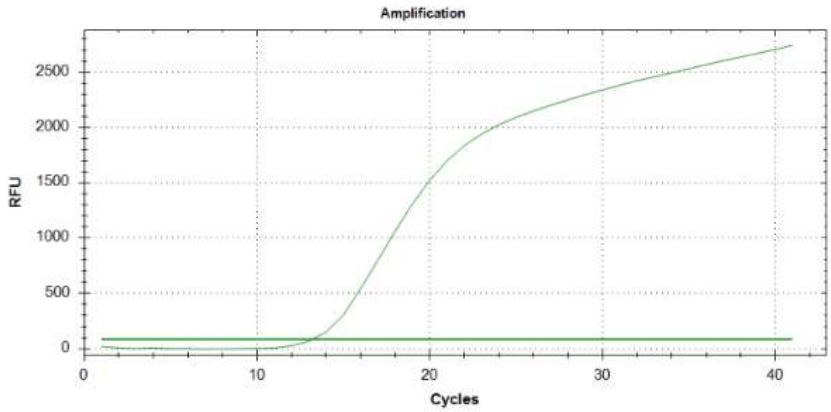
Figura 13: Termociclagem utilizadas na técnica do RT-qPCR:



1	55.0 C for 30:00	
2	95.0 C for 0:40	
3	46.0 C for 0:30	
4	GOTO 2 , 4 more times	
5	92.0 C for 0:30	
6	59.0 C for 0:30	
7	GOTO 5 , 6 more times	
8	92.0 C for 0:30	
9	56.0 C for 0:20	
10	35.0 C for 0:40	
	+ Plate Read	
11	GOTO 8 , 40 more times	
12	Melt Curve 65.0 to 95.0 C, increment 0.5 C,	
	for 0:05 + Plate Read	
	END	

Fonte: o autor.

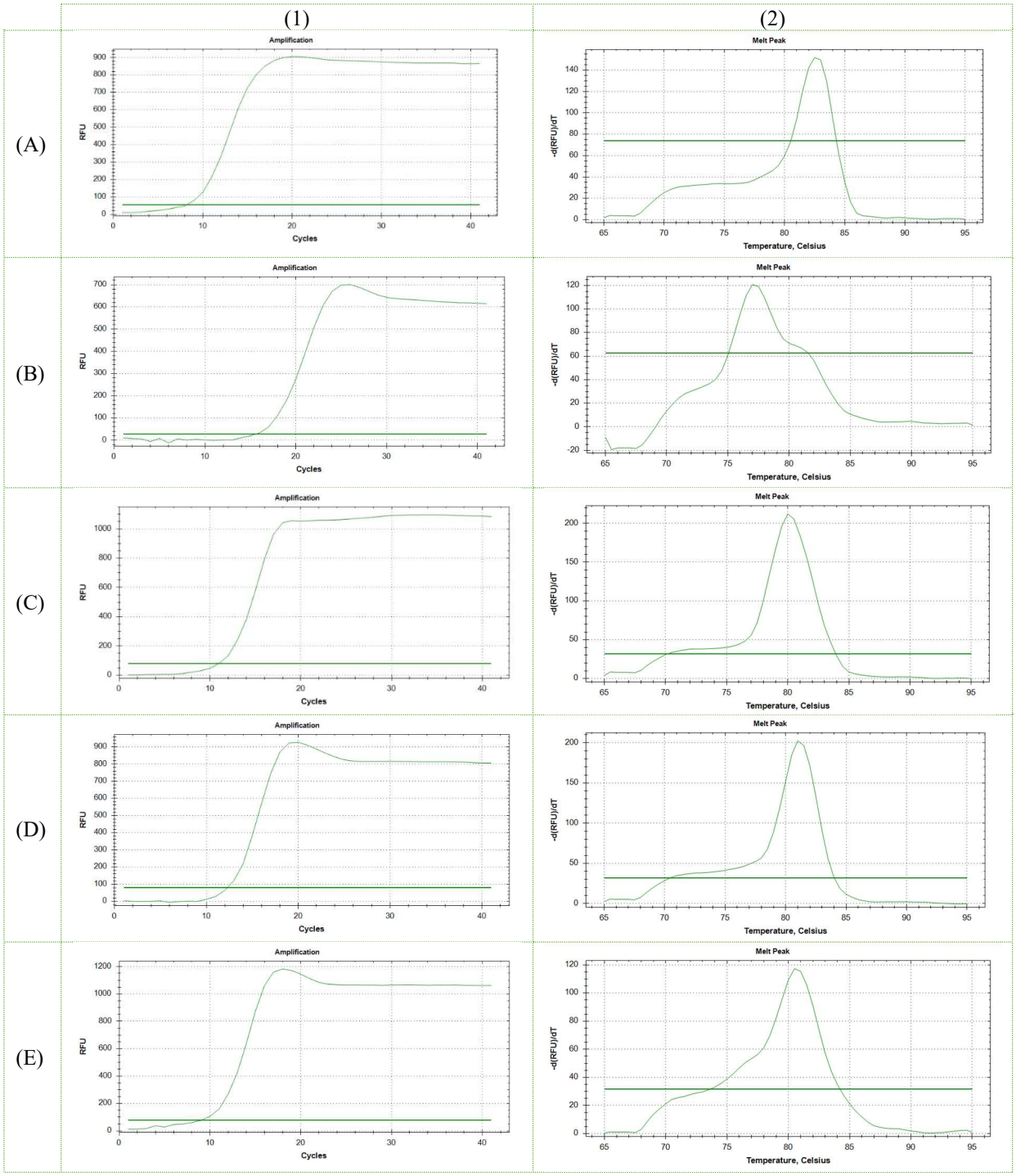
Figura 14: Representação das amplificações de GAPDH.
Curva da reação de GAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), pelo método de RT-qPCR, demonstrando número de ciclos (cycle threshold ou Ct).



Fonte: o autor

Figura 15: Representação das amplificações de mRNA pela metodologia de RT-qPCR:
Coluna 1: Curva da reação de RT-qPCR, demonstrando número de ciclos (cycle threshold ou Ct). Coluna 2: Curva RT-qPCRA Melt: temperatura na qual a metade do produto de PCR está dissociado e a outra metade está hibridado. A: IL-1β (Interleucina-1 beta), Melt entre 82,50 e 83,00°C. B: IL-17A (Interleucina-17 A), Melt entre 76,50 e 77,00 °C. C: IFN-ɣ (Interferon Gamma), Melt entre 79,50 e 80,00 °C. D: IP-10 (Interferon Gamma Induced Protein 10kDa), Melt entre 80,50 e 81,00°C. E: TNF-α (Fator de necrose tumoral alfa), Melt entre 80,50 e 81,00 °C.

Induced Protein 10kDa), Melt entre 80,50 e 81,00°C. E: TNF-α (Fator de necrose tumoral alfa), Melt entre 80,50 e 81,00 °C.



Fonte: o autor.

4.13 Análise estatística

Uma forma comum de estimar os níveis relativos de expressão relativa entre diferentes amostras é usar o método de $2^{-\Delta\Delta Ct(*)}$, onde os resultados obtidos na média da duplicata de cada ciclos

térmicos (Ct), de cada tubo do conjunto de reação (item 4.12.1), através ensaio de RT-qPCR, gerado para cada citocina, foi utilizado para comparar a expressão relativa (interleucinas pesquisadas) nas amostras alvo sem estímulo (meio de cultura) ou com estímulo (sobrenadante de células replicon mais peptídeos da proteína S de SARS-CoV-2) e de referência (PHA-P), usando um gene de referência (GAPDH) como normalizador. Esse método serve para ajustar as diferenças na quantidade do RNA colocado em cada amostra e diminuir a variação gerada pelo preparo da PCR e pelo processo de ciclagem (Livak; Schmittgen, 2001).

(*) $2^{-[(Ct\ citocinas\ tratado - Ct\ gene\ de\ referência\ tratado)-(\ Ct\ citocinas\ não\ tratado - Ct\ gene\ de\ referência\ não\ tratado)]}$

Foram realizadas as médias dos resultados de RT-qPCR em expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), quantidades de linfócitos T (CD45+, CD3+, CD8+, CD4+ em células por microlitro (cells/µL), anticorpos totais (IgG e IgM) obtidos em miligrama por decilitro (mg/dL) e anticorpos neutralizantes para SARS-CoV-2 em porcentagem (%), respeitando os três grupos estabelecidos conforme a quantidade de células T CD4+ respectivamente. Estas médias foram inseridas no programa GraphPad Prism (versão 8.0.2), sendo analisadas por Ordinary one-way ANOVA (Multiple comparisons) e pelo desvio padrão, obtendo os gráficos. Na hipótese nula (H0), onde os Valores de p unicaudal menores que 0,05, foram considerados estatisticamente significantes, na hipótese alternativa (H1) onde os valores de p unicaudal são maiores ou igual a 0,05, foram considerados não estatisticamente significantes.

A Correlação de Person (r), foram calculadas no programa GraphPad Prism (versão 8.0.2) e as matrizes geradas pelo programa Excel Microsoft 365 (versão 2023).

5. RESULTADOS

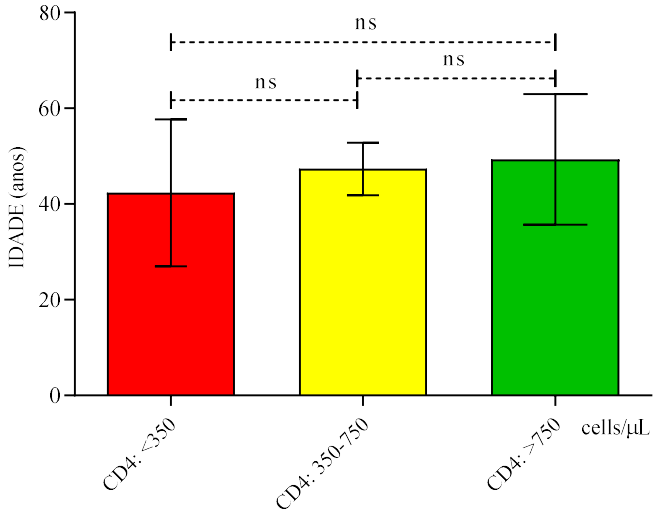
5.1 Caracterização dos participantes

Os participantes portadores do vírus HIV+, em acompanhamento no Centro de Atendimento de Infecções Crônicas de São Carlos, totalizaram 09 participantes divididos em 03 grupos com distinção na quantidade de células T CD4+ (CD4: < 350 cells/µL, CD4: 350-750 cells/µL e CD4: < 750 cells/µL) como demonstrado na Tabela 3.

5.1.1 Faixa Etária dos Participantes da Pesquisa

A faixa etária dos participantes variou de 32 a 60 anos. A média geral das idades foi de 41 anos, com um desvio padrão de 11,44 pontos entre os três grupos, conforme mostra a Figura 16.

Figura 16 Faixa Etária dos Participantes da Pesquisa:
Cada grupo contem um n=3. As ns (não significante estatisticamente) encontradas nas barras superiores horizontais. Desvio padrão dispostas nas barras verticais.



Fonte: o autor

5.1.2 Carga viral para HIV

Dentre os participantes voluntários da presente dissertação, um total de três participantes (um de cada grupo de CD4+) apresentaram resultados positivos para a carga viral de HIV nos últimos 6 meses, sendo duas mulheres e um homem, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3: Informação da população:
N=Número de participantes; CV= carga viral HIV+; F= Feminino, M= masculino; $\bar{x}$ =Média de idade, DP= Desvio padrão da idade, LDL= Menor que o limite de detecção (<10 CÓPIAS POR Ml), DET= Detectado.

Grupos:	N	CV: Cps/mL(log)	Gênero:	Idade $\bar{x}$ e DP

				F	M	
CD4: < 350 cells/µL	3	LDL	2	0	2	$\bar{x}$: 44,33
		DET	1	1	0	DP: 15,36
CD4: 350-750 cells/µL	3	LDL	2	1	1	$\bar{x}$: 47,33
		DET	1	1	0	DP: 4,49
CD4: < 750 cells/µL	3	LDL	2	1	1	$\bar{x}$: 49,33
		DET	1	0	1	DP: 11,11

Fonte: o autor

5.1.3 Ciclo vacinal

Os participantes incluídos no estudo haviam completado o esquema primário de vacinação contra o SARS-CoV-2 e encontravam-se em um período de dois a doze meses após receberem a dose de reforço.

5.1.4 Condições gerais dos participantes

Os participantes eram portadores do vírus HIV+, não apresentavam quaisquer outras condições clínicas que suprimissem o sistema imunológico como transplantes, câncer ativo ou tratamentos de quimioterapia. Também não apresentavam insuficiência orgânica grave (insuficiência renal dialítica, insuficiência pancreática, insuficiência cardíaca CF-IV, DPOC em uso de oxigênio domiciliar, diabetes mellitus), e não fazia uso crônico de corticoterapia (20 mg de prednisona por dia por mais de duas semanas), imunossupressores ou imunobiológicos.

5.1.5 RT-qPCR para SARS-CoV-2

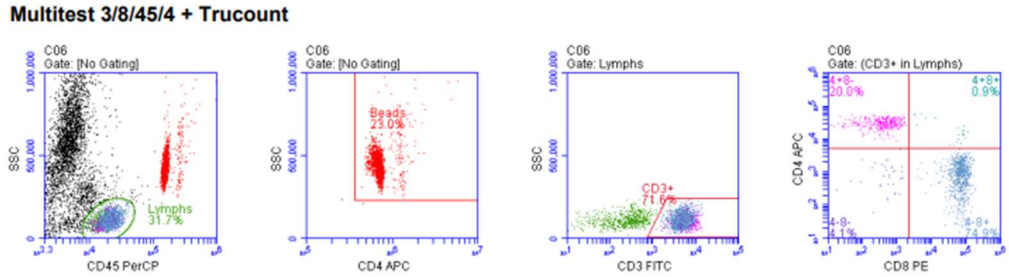
Durante a análise das amostras nasais, foi observado que nenhum dos participantes desta pesquisa teve detecção do vírus SARS-CoV-2 através do método RT-qPCR.

5.1.6 Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo

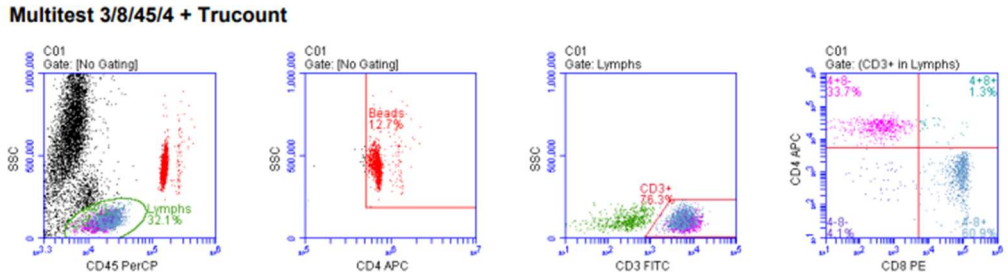
Para avaliar as subpopulações de linfócitos T, dividimos os participantes com HIV+ em três grupos, de acordo com o número de células T CD4+ (CD4: < 350 cells/µL, CD4: 350-750 cells/µL e CD4: < 750 cells/µL) que medimos por citometria de fluxo (Figura 17 e Figura 18 D).

Figura 17: Representação da separação dos grupos conforme os resultados de linfócitos CD4+ com os gates obtidos pela citometria de fluxo.
As fluoresceínas utilizadas: CD3 isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD8 ficoeritrina (PE), CD45 peridinina clorofila proteína (PerCP), CD4 aloficocianina (APC). SSC (GRANULOSIDADE). **A:** Um participante do grupo CD4: <350 cells/µL. **B:** Um participante do grupo CD4: 350-750 cells/ µL. **C:** Um participante do grupo CD4: >750 cells/µL.

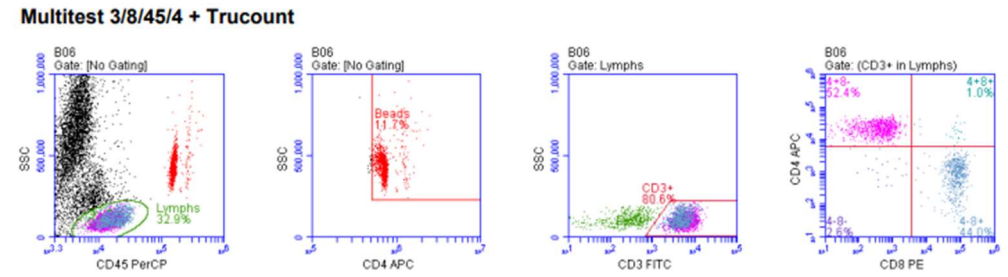
(A)



(B)



(C)



Fonte: o autor

No grupo correspondente às células CD4+ >750, os 03 participantes estavam dentro do valor de referência para células CD4+ e dois terços dos participantes estavam com células CD8+ acima do valor de referência (Item 4.10, Tabela 2).

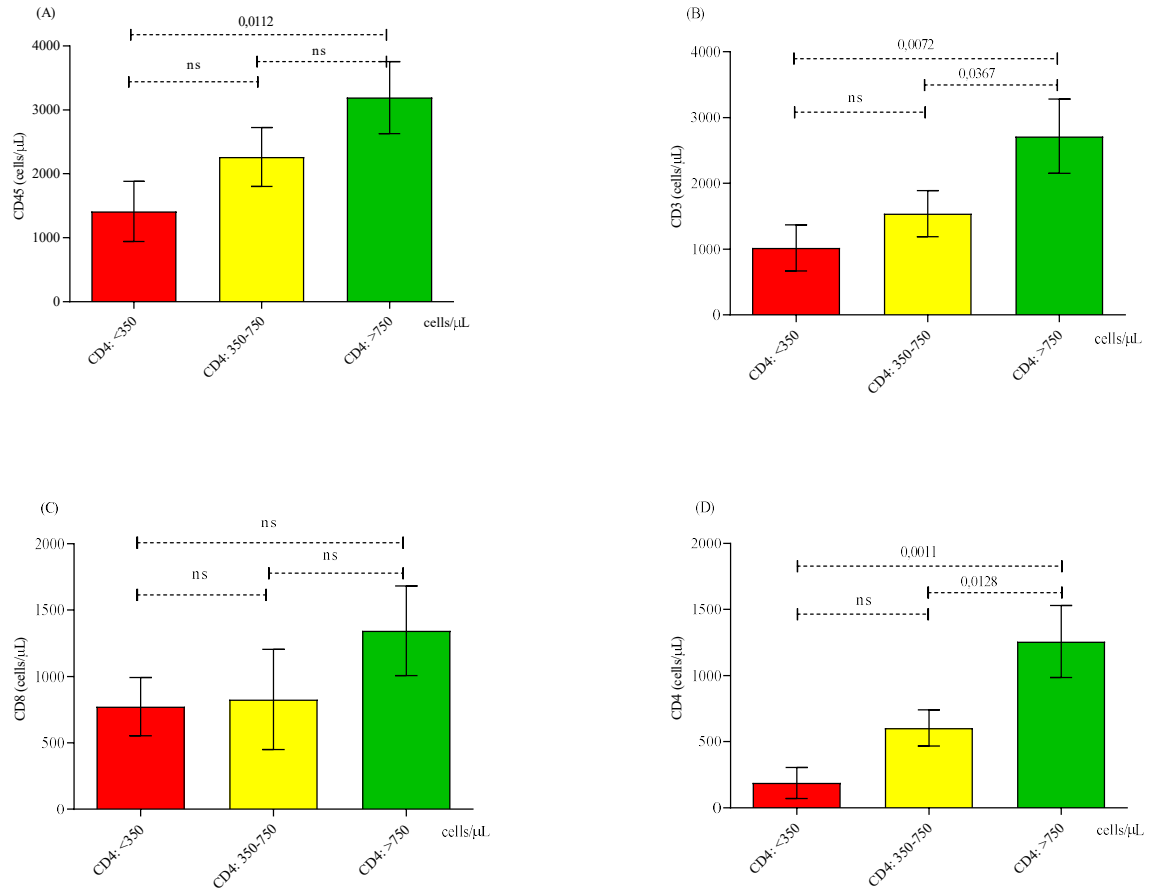
Na comparação entre os diferentes grupos formados, realizando uma média das células CD45, CD3 e CD4 em células/µL respectivamente de cada grupo (Tabela 4), encontramos diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) nas células CD45 entre os grupos CD4: <350 e CD4:>750, nas células CD3 entre os grupos CD4: 350-750 e CD4: >750 e CD4: <350 e CD4>750. (Figura 18 A, B e D). Nas médias obtidas com as células T CD8+ não encontramos diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todos os grupos analisados (Figura 18 C)

Tabela 4: Média das células T em relação aos três grupos de participantes:

Linfócitos T	Grupos		
	CD4<350	CD4 350-750	CD4>750
CD45+ Lymphs Abs Count (cells/µL)	1412,33	2264	3194,67
CD3+ Abs Count (cells/µL)	1017,33	1539	2716
CD3+ CD4- CD8+ Abs Count (cells/µL)	773,33	826,33	1343,67
CD3+ CD4+ CD8- Abs Count (cells/µL)	11,67	16,33	28

Fonte: o autor.

Figura 18: Imuno fenotipagem linfocitária dos grupos analisados.
Cada grupo contendo contém n=3. Desvio padrão dispostas nas barras verticais. **A:** Células T CD45+. **B:** Células T CD3+. **C:** Células T CD3+ CD4- CD8+. **D:** Células T CD3+ CD4+ CD8-. As ns (não significante estatisticamente) encontradas nas demais barras superiores horizontais.



Fonte: o autor.

5.2 Anticorpos

Dentro do grupo de PVHIV divididos em três categorias baseadas no número de células CD4+ foi realizado a quantificação dos níveis de IgM e IgG totais, e 22,22% dos indivíduos apresentaram níveis plasmáticos de IgG superiores aos valores de referência. Além disso,

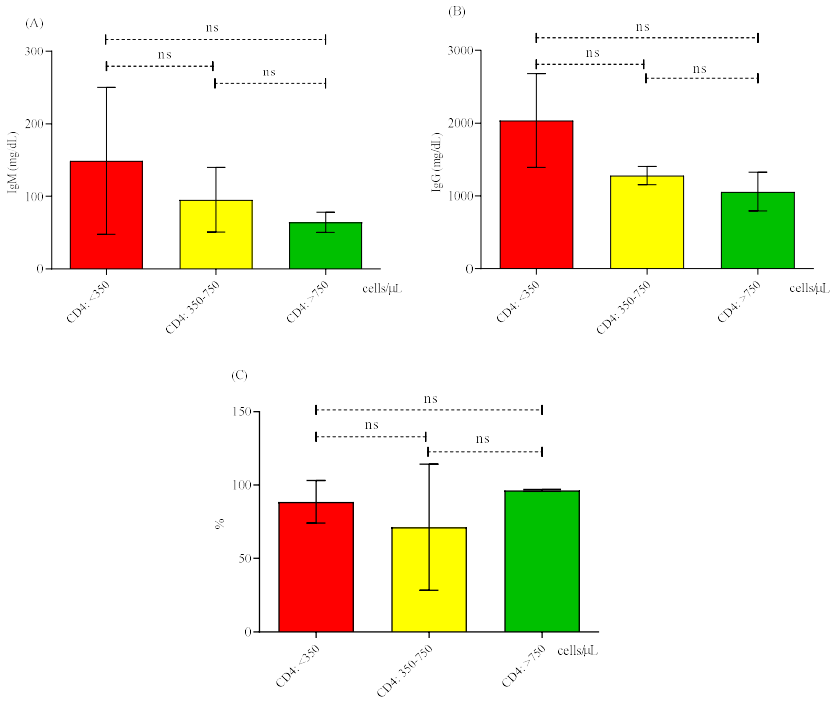
11,11% dos participantes voluntários apresentaram níveis de IgM superiores ou inferiores ao padrão de referência (Item 4.9).

Em relação aos níveis totais de IgM no plasma, conforme ilustrado na Figura 19 A, observou-se uma correlação inversa com a contagem de células T CD4+. Os dados revelaram que o grupo com a menor contagem de células T CD4+ teve uma média de IgM de 149 mg/dL. Por outro lado, o grupo com uma contagem intermediária de células T CD4+ apresentou uma média de 95 mg/dL, enquanto o grupo com a maior contagem dessas células registrou uma média mais baixa de IgM, com 64 mg/dL.

Os níveis médios de IgG total (Figura 19 B) também se apresentaram antagônicos em relação a contagem de células T CD4+. O grupo de CD4<350 apresentou resultado médio de IgG de 2038 mg/dL, enquanto os grupos com contagens médias e altas de CD4+ apresentaram médias de 1281 mg/dL e 1059 mg/dL, respectivamente.

Nas dosagens dos anticorpos neutralizantes de SARS-CoV-2, os três grupos analisados não apresentaram alterações significativas (Figura 19 C). Todos os resultados estão dentro dos valores de referências preconizados pelo teste aplicado (Item 4.8, Tabela 1), sendo que 77,7% dos participantes apresentaram níveis acima de 90% de anticorpos neutralizantes para SARS-CoV-2.

Figura 19: Concentração das Imunoglobulinas totais IgG e IgM e neutralizantes contra SARS-CoV-2 em ralação a quantidades de células T CD4+.
Cada grupo contém n=3. Desvio padrão dispostas nas barras verticais. **A:** Imunoglobulinas M totais (IgM), **B:** Imunoglobulinas G totais (IgG), **C:** Anticorpos neutralizantes para SARS-CoV-2, As ns (não significante estatisticamente) nas barras superiores horizontais.



Fonte: o autor.

5.3 RT-qPCR para identificação das citocinas

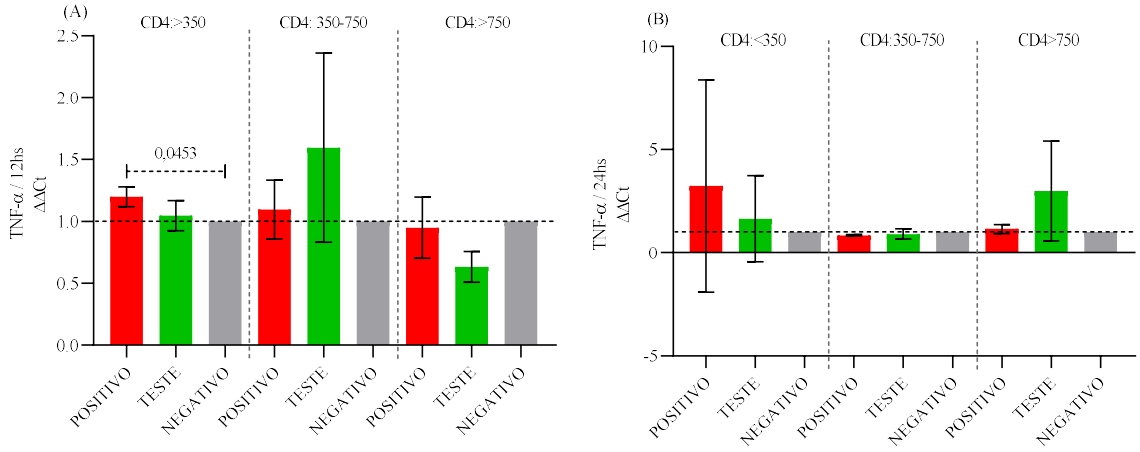
A purificação de células PBMC, conforme descrito no item 3.1.3.1, foi ajustada para $1x10^6$ células/mL e incubadas em três condições: (I) um tubo teste com estimulação de ccSARS-CoV-2 mais peptídeos da proteína S; (II) um tubo controle positivo com estimulação de PHA-P (mitógeno); (III) um tubo controle negativo contendo somente o meio de cultura. Após o período de 12 hs e 24 hs de incubação a 37°C, realizou-se a extração e quantificação do RNA total, sendo cada amostra ajustada para 5ng/µL, e dosadas as citocinas pela técnica de RT-qPCR, obtendo os resultados em Ct e curva de Melt mostrando a especificidade do teste (Figura 15). Obtido os resultados de $Ct_{(s)}$ em duplicata, realizamos a média para cada citocina e cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (item 4.13). Utilizamos o GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) como referência de expressão gênica relativa.

Os achados relacionados a expressão relativa de TNF-α (Figura 20) indicam uma possível tendência à supressão relativa após 12 horas de incubação, tanto no estímulo de controle positivo, ativado com PHA-P, quanto no estímulo teste, que foi estimulado com o vírus replicon

ccSARS-CoV-2 e dois peptídeos da proteína Spike. Este padrão de inibição foi observado especificamente no grupo com contagem de CD4: > 750, em contraste com os outros grupos, que mostraram uma propensão ao aumento da expressão relativa em ambas as condições de controle positivo e teste.

Durante um ciclo de incubação de 24 horas, observou-se que o TNF-α provocou um aumento na expressão relativa nos grupos com contagens de CD4:< 350 e CD4:>750 na exposição ao controle positivo (PHA-P) e ao estímulo teste. Por outro lado, o grupo CD4:350-750 não mostrou diferença significativa entre os estímulos de controle positivo e teste em relação ao controle negativo (sem estímulo).

Figura 20: Expressão de TNF-α nos devidos grupos analisados.
Expressões relativas em ΔΔCt, onde cada grupo contendo contém n=3. Desvio padrão dispostas nas barras verticais. Traço pontilhado na horizontal demonstra a amostra negativa (sem estímulo). Acima dos graficos temos os grupos de CD4+ referendados e divididos por traços verticais **A:** Expressão com estímulo de PHA-P com duração de 12hs. **B:** Expressão com estímulo de PHA-P com duração de 24hs. Quando ouver significante estatistica, aparecerá nas barras superiores horizontais.



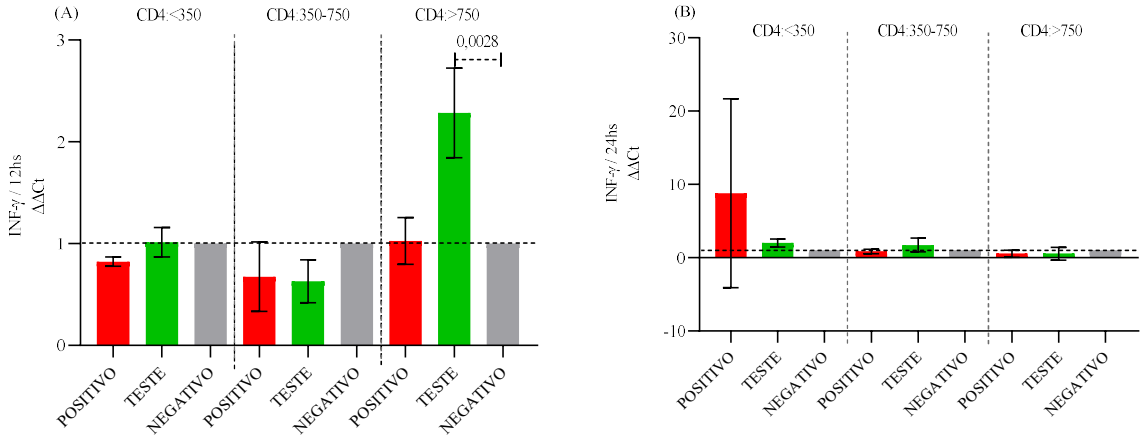
Fonte: o autor.

Tanto a citocina IFN-ɣ quanto IP-10 (Figura 21 e Figura 22), apresentam tendencias de expressão relativa parecidas, tanto no estímulo de 12hs, quando no período de 24hs.

Ao decorrer do período de 12hs, tanto o IFN-ɣ quanto IP-10, apresentaram uma propensão a ativação da expressão relativa no grupo CD4:>750 e inibição nos demais grupos, tanto no controle positivo (PHA-P) e pelo estímulo teste (vírus replicon ccSARS-CoV-2 mais dois peptídeos da Spike). Durante o período de 24hs de incubação, a tendencia a ativação relativa ocorreu nos grupos de CD4:<350 (tanto no controle positivo quanto no teste) e no grupo

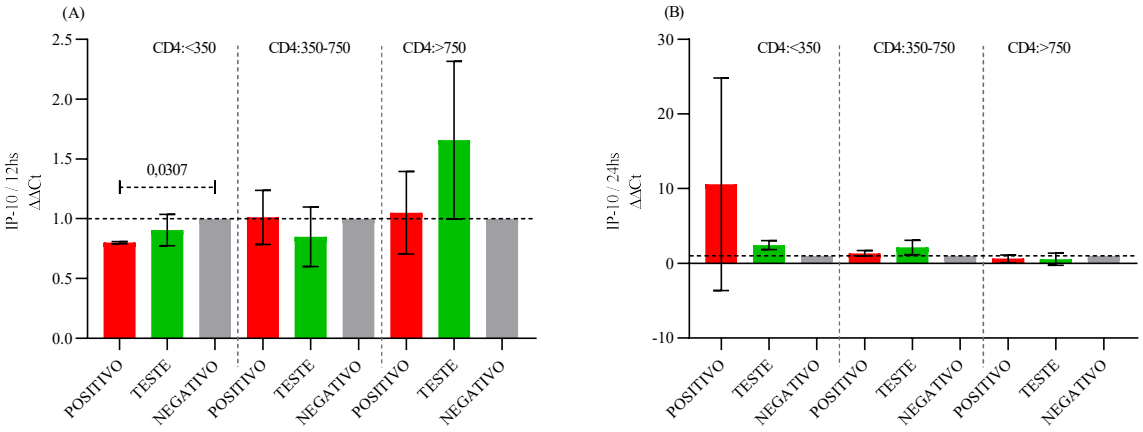
CD4:350-750 (mais proeminente no teste), os demais tratamentos e o grupo CD4:>750 apresentaram uma inclinação para inibição relativa.

Figura 21: Expressão de IFN-ɣ nos devidos grupos analisados.
Expressões em ΔΔCt, onde cada grupo contendo contém n=3. Desvio padrão dispostas nas barras verticais. Traço pontilhado na horizontal demonstra a amostra negativa (sem estímulo). Acima dos graficos temos os grupos de CD4+ referendados e divididos por traços verticais A: Expressão com estímulo de PHA-P com duração de 12hs. B: Expressão com estímulo de PHA-P com duração de 24hs. Quando ouver significante estatistica, aparecerá nas barras superiores horizontais.



Fonte: o autor.

Figura 22: Expressão de IP-10 nos devidos grupos analisados.
Expressões em ΔΔCt, onde cada grupo contendo contém n=3. Desvio padrão dispostas nas barras verticais. Traço pontilhado na horizontal demonstra a amostra negativa (sem estímulo). Acima dos graficos temos os grupos de CD4+ referendados e divididos por traços verticais A: Expressão com estímulo de PHA-P com duração de 12hs. B: Expressão com estímulo de PHA-P com duração de 24hs. Quando ouver significante estatistica, aparecerá nas barras superiores horizontais.

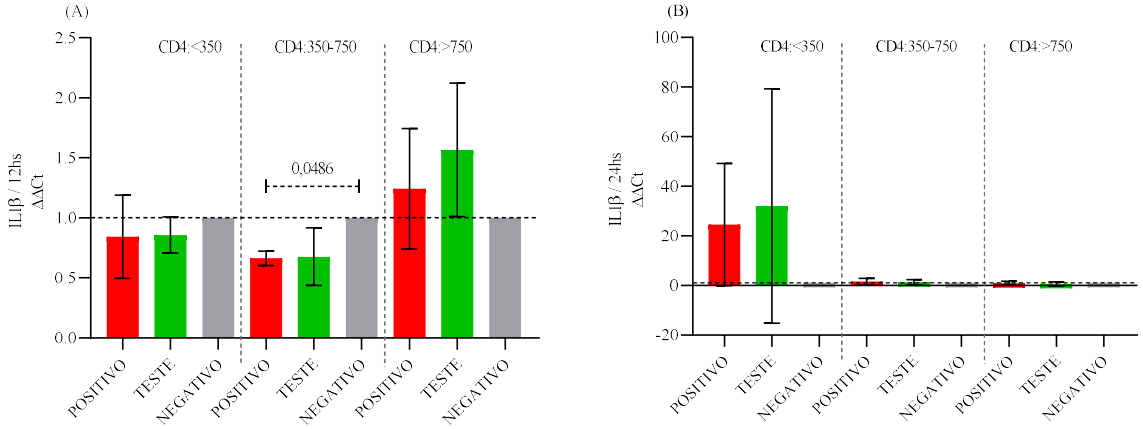


Fonte: o autor.

Ainda há tendencia parecidas nos resultados entre as citocinas IL-1β e IL-17A, tanto no período de incubação de 12hs quanto em 24hs (Figura 23 e Figura 24). Em 12hs, a tendencia de

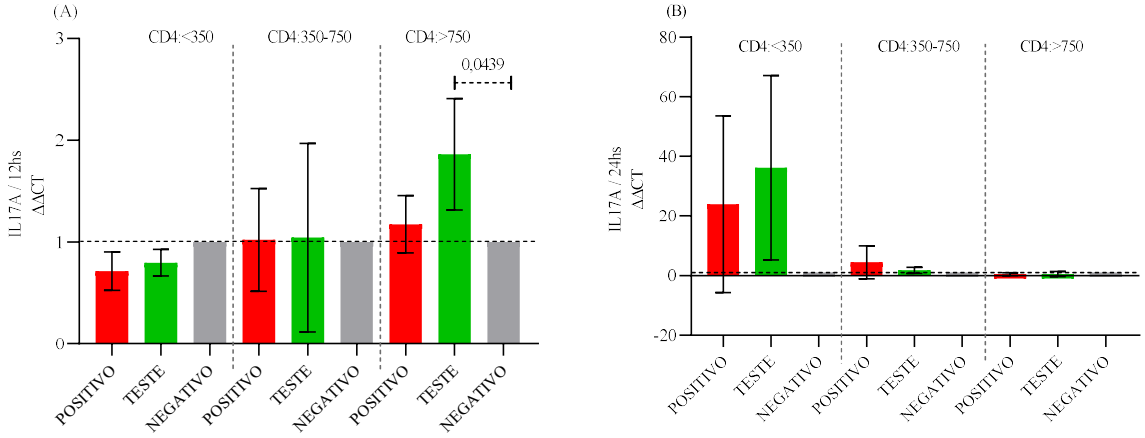
expressão relativa está sendo mais proeminente no grupo de CD4:>750. A disposição para expressão relativa foi encontrada no grupo CD4:<350 e no grupo CD4: 350-750 da citocina IL-1β, ao contrário do grupo CD4: 350-750 da citocina IL-17A mostrando-se próximo ao controle negativo. As tendencias de 24hs pós estimulação, destas citocinas, apresentou nos grupos CD4:<350 uma expressão relativa significativa em relação aos demais grupos. Nos grupos CD4: >750 e CD4:350-750, a inclinação dos resultados estavam próximos com os controles negativos.

Figura 23: Expressão de IL-1β nos devidos grupos analisados.
Expressões em ΔΔCt, onde cada grupo contendo contém n=3. Desvio padrão dispostas nas barras verticais. Traço pontilhado na horizontal demonstra a amostra negativa (sem estímulo). Acima dos graficos temos os grupos de CD4+ referendados e divididos por traços verticais A: Expressão com estímulo de PHA-P com duração de 12hs. B: Expressão com estímulo de PHA-P com duração de 24hs. Quando ouver significante estatistica, aparecerá nas barras superiores horizontais.



Fonte: o autor.

Figura 24: Expressão de IL-17A nos devidos grupos analisados.
Expressões em ΔΔCt, onde cada grupo contendo contém n=3. Desvio padrão dispostas nas barras verticais. Traço pontilhado na horizontal demonstra a amostra negativa (sem estímulo). Acima dos graficos temos os grupos de CD4+ referendados e divididos por traços verticais A: Expressão com estímulo de PHA-P com duração de 12hs. B: Expressão com estímulo de PHA-P com duração de 24hs. Quando ouver significante estatistica, aparecerá nas barras superiores horizontais.



Fonte: o autor.

6. DISCUSSÃO

Trabalhos prévios demonstraram que os linfócitos T são atuantes no desenvolvimento de uma resposta imunitária específica para SARS-CoV-2 decorrente da imunização, e a redução do número de células T CD4+ específicas para SARS-CoV-2 compromete drasticamente uma resposta imune efetora contra SARS-CoV-2 (Wang *et al.*, 2020). O primeiro ciclo vacinal contra SARS-CoV-2 é crítico nesse contexto de imunização e apresenta grande importância para a criação de critérios que apontem para a necessidade de reforços vacinais, fato que garante uma continuidade da imunização de forma segura com riscos amenizados à saúde. Esse alerta decorre de casos prévios que apresentaram quadros de miocardite, síndrome de Guillain-Barré entre outros, associado a estratégias de vacinação e, com isso, um desestímulo da população na procura por vacinas é factível (Gargano *et al.*, 2021; World Health Organization, 2021). Diante disso, a finalidade dessa dissertação foi elaborar e iniciar a avaliação de uma plataforma direcionada para identificar na população HIV positivo e imunizada contra SARS-CoV-2 a exigência da dose de reforço vacinal no momento adequado. Os dados obtidos revelam uma inclinação da resposta imunológica de PVHIV que receberam o imunizante contra SARS-CoV-2. Os critérios utilizados foram análises laboratoriais e a produção de citocinas após estímulo ex vivo de SARS-CoV-2 associados a dois peptídeos da proteína S, em três grupos de participantes, definidos de acordo com o número de linfócitos T CD4+.

Esta classificação baseada nas quantidades das células T CD4 (Figura 18 D), foi adotada e é justificada pela atuação desta célula na produção de citocinas diferenciadas, atuando diretamente na defesa do organismo, desempenhando diversas ações, como a ativação de

células B, células T CD8+, e demais células, ajudando a modular a resposta imunológica. Uma parte desta modulação ocorre pela diferenciação das células CD4+ maduras e virgens, através da atuação de citocinas específicas e fatores de transcrição, gerando células T-helper 1 (Th1), T-helper 2 (Th2) e T-helper 17 (Th17) entre outras (Luckheeram *et al.*, 2012).

Durante a análise dos conjuntos de células T CD4+, notou-se uma tendência nos dados relativos às células T CD8+ (conforme ilustrado na Figura 17 C), sendo que um aumento no contingente de células T CD8+ registrado nos três grupos estudados. Tanto a célula T CD8+ de memória quanto a efetora, se encontram em maior número, provavelmente por estar presente na corrente sanguínea e nos órgãos periféricos, estando prontas para se multiplicarem, tendo ações de citotoxicidade e produzindo citocinas efetoras ao encontrar novamente o agente agressor (Martin; Badovinac, 2018).

No trabalho desenvolvido por Jin *et al.*, 2020, demonstrou que as contagens das células CD3+ e CD45+ estavam diminuídas na comparação entre participantes sem gravidade em relação a participantes com pneumonia graves de SARS-CoV-2. A diminuição das células CD3+, resulta em uma redução geral de linfócitos T, onde a diferença foi de 69,2%. Níveis de CD45+ diminuíram 57,7%, mostrando uma deficiência da ativação de células T levando a uma alteração das células B nas formas mais graves da doença, sendo observado o mesmo padrão de células CD3+ e CD45+ na caracterização entre as quantidades de células CD4+ dos grupos que foram classificados.

Prosseguindo com essa meta, nos grupos selecionados a análise de anticorpos neutralizantes contra o SARS-CoV-2, indicaram resultados sem variações entre os grupos, com todos os indivíduos exibindo níveis dentro dos padrões de referência estabelecidos para o teste utilizado. Em relação as Imunoglobulinas totais IgG e IgM, os resultados mostraram uma tendência nos dados indicando uma correlação inversa. Isso significa que, quanto maior o número de células T CD4+ presentes no sangue, menor foi a concentração de Imunoglobulinas IgM e IgG totais, as quais foram medidas utilizando o soro dos indivíduos participantes do estudo (Figura 19 A e B).

Resultados obtidos em vários estudos mostram que é de grande importância a atuação das células B na memória imunológica, atuando na produção de anticorpos através das vacinas aprovadas pelos órgãos competentes. Em alguns participantes que possuem falhas na produção de anticorpos neutralizantes, por problemas inatos ou medicamentoso que dificultam a produção pelas células B, conseguiram se reabilitar pós infecção do SARS-CoV-2. Neste contexto, em que o participante apresenta dificuldades hematológicas, encontraram um

contrabalanceamento pelos linfócitos T CD8, levando a recuperação dos participantes (Painter MM *et al.*, 2021). Em nosso trabalho, observamos uma tendencia semelhante quando comparamos as células T CD4 e CD8 (Figura 18 C e D) com os anticorpos totais IgM e IgG (Figura 19 A e B). Não encontramos relação estatisticamente significativa em comparação com as quantidades obtidas dos anticorpos neutralizantes. (Figura 19 C).

A análise das citocinas induzidas em resposta ao estímulo do SARS-CoV-2 é crucial para entender a dinâmica imunológica frente ao vírus. A utilização das matrizes de correlação de Pearson (r) (Tabela 5) para os tempos de 12 e 24 horas de incubação a 37°C, indicou uma associação positiva, variando de moderada a alta (r>0,62), entre as citocinas IFN-ɣ, IP-10, IL-1β e IL-17A, enquanto não se observou associação (r<0,00) com o TNF-α após 12 horas de incubação. Os resultados com 24 horas de incubação, foram identificadas associações muito fortes (r=0,97) entre IFN-ɣ e IP-10, assim como entre IL-1β e IL-17A (r=0,95). Observou-se também associações moderadas entre esses dois conjuntos de citocinas, e mais uma vez, o TNF-α não mostrou associação com os outros indicadores.

Tabela 5: Correlação de Person (r) entre as citocinas testadas com estímulo de SARS-CoV-2:
As citocinas IFN-ɣ, IP-10, IL-1β e IL-17A apresentaram uma associação positiva, com grau variando de moderado a muito alto (r>0,62), entre si no tempo de 12hs. Por outro lado, o TNF-α não se relacionou com nenhuma delas (r<0,00) nesse período. No tempo de 24hs, observamos duas associações muito altas entre as citocinas IFN-ɣ e IP-10 e entre a IL-1β e IL-17A. Entre esses dois grupos de citocinas associadas, houve relações moderadas e, mais uma vez, o TNF-α não mostrou associação com as demais citocinas.

12hs de estímulo:

	TNF-α	INF-γ	IP-10	IL-1β	IL-17A
TNF-α	1,00	-0,79	-0,73	-0,86	-0,61
INF γ	0,79	1,00	0,67	0,83	0,62
IP-10	-0,73	0,67	1,00	0,93	0,93
IL-1β	-0,86	0,83	0,93	1,00	0,80
IL-17A	-0,61	0,62	0,93	0,80	1,00

24hs de estímulo:

	TNF-α	INF-γ	IP-10	IL-1β	IL-17A
TNF-α	1,00	-0,82	-0,85	-0,19	-0,20
INF-γ	-0,82	1,00	0,97	0,60	0,54
IP-10	-0,85	0,97	1,00	0,59	0,54
IL-1β	-0,19	0,60	0,59	1,00	0,95
IL-17A	-0,20	0,54	0,54	0,95	1,00

Person r	Correlação
-1,00 a 0,00	Nula
0,01 a 0,19	Bem fraca
0,20 a 0,39	Fraca
0,40 a 0,69	Moderada
0,70 a 0,89	Forte
0,90 a 1,00	Muito forte

Fonte: o autor.

As respostas dos linfócitos T CD4+ e CD8+ após a aplicação das vacinas contra SARS-CoV-2, apresentaram respostas detectáveis para a proteína S (spike-específicas) e passaram a expressar várias citocinas, como é o caso da TNF-α (Storti *et al.*, 2022). A citocina TNF-α, considerada uma das mais notáveis no organismo, secretada por vários tipos de células imunológicas, incluindo monócitos, linfócitos, fibroblastos etc., tendo diferentes receptores e funções, como o favorecimento a morte celular e até grande ação pró-inflamatórios e protetores na pele e nos nervos (Hasanvand, 2022). Ainda tendo uma correlação nula de Person (r) com as demais citocinas, a tendencia dos resultados obtidos em TNF-α, pós estímulo de 24hs, nos grupos CD4:<350 e CD4:>750, observa-se uma tendencia no aumento após o estímulo teste, que vem em encontro com alguns trabalhos científicos que relatam a ativação vacinal do sistema imune, os linfócitos T CD8+ (citotóxicos), interrompendo a replicação viral, secretando citocinas TNF-α e matando diretamente as células infectadas, impedindo a progressão da doença. Nos linfócitos T CD4+, se tornam específicas de IL-2 e de TNF-α, se apresentam aumentadas em pacientes recuperados da COVID-19. Isto ocorre, por que na fase aguda da doença, ocorre uma multiplicação de células Th1 secretora de IL-12, IL-15, IL-2 e TNF e foi apontado que este fenótipo de Th1 está relacionada com a forma menos grave da COVID- 9. Este aumento do TNF-α também atua na resposta imune humoral, estimulando os linfócitos B na produção de anticorpos (Liang *et al.*, 2022; Moga *et al.*, 2022).

Nos resultados das citocinas IFN-ɣ e IP-10, tiveram uma correlação muito forte de Person (r) no tempo de 24hs pós estímulo, onde dois grupos de CD4 (CD4:<350 e CD4:350-750) demonstraram uma tendencia em expressão destas citocinas em ΔΔCT (Figura 21 B e Figura 22 B), coincidem com o estudo desenvolvido com a vacina de mRNA da Pfizer/BioNtech, que identificou após a primeira dose em participantes previamente contaminados e não contaminados por SARS-CoV-2, onde ocorreu um acréscimo das citocinas IL-15, IFN-ɣ e IP-10, seguido de um estímulo nos níveis de anticorpos contra a proteína S (Spike) e sendo aumentados por citocinas IL-6 e TNF-α após a utilização da segunda dose vacinal (Bergamaschi *et al.*, 2021).

A expressão de IFN-ɣ é observada em várias imunizações, mas com a vacina da COVID-19, ela está relacionada com a resposta imune das células Th1, sendo muito parecida com o que ocorre na infecção pelo coronavírus-2. Esta resposta imune celular, foi identificada na maioria dos ensaios clínicos, aplicados pós estímulo vacinal, onde a expressão de IFN-ɣ está

aparentemente relacionada com uma ação protetora contra os casos graves, ocorridas pelas principais mutações virais do SARS-CoV-2 (Hajjo *et al.*, 2021; Moga; Lynton-Pons; Domingo, 2022). Por ser uma citocina que combate as infecções, além da secreção por células T CD4+ e CD8+, o IFN-ɣ também são produzidas por células natural killer e pelos linfócitos B para a defesa do organismo, onde seu aumento foi notado nos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, anterior a produção de anticorpos, indicando ser uma das primeiras citocinas reguladoras das respostas imunes inatas e adaptativas (Alnefaie; Albogami, 2020; Murdocca *et al.*, 2023; Rydyznski Moderbacher *et al.*, 2022). No país asiático Bangladesh, realizou-se um estudo populacional que demonstrou uma maior produção de IFN-γ, secretadas pelas células linfocitárias, entre as vacinas da Pfizer e da Moderna em comparação com o imunizante da AstraZeneca (Sarker *et al.*, 2022). Outro estudo utilizando o imunizante CoronaVac, em dois esquemas vacinais distintos, aplicadas no Chile com participantes ≥ 18 anos, estimulando células PBMC com megapools de peptídeos, observaram a produção de interferon (IFN)-γ e uma ativação de marcadores de células T CD4, nos dois esquemas aplicados e demonstrou ainda, uma correlação forte entre anticorpos neutralizantes e a secreção de IFN-γ (Gálvez *et al.*, 2022).

A quimiocina IP-10 (CXLC10/ interferon gama-proteína induzida 10) apresenta propriedade inflamatórias, recrutando e ativando os leucócitos, eosinófilos, monócitos e células natural killer (NK) (Karimabad *et al.*, 2021). Em uma pesquisa de células mononucleares de sangue periférico e de lavados brônquicos, com pacientes infectados por SARS-CoV-2, apresentou elevados valores de IP-10, que possivelmente despertaram os macrófagos para o a região afetada, coerente com os resultados obtidos em autópsia (Wang *et al.*, 2020).

Conforme observado nos resultados que mostraram uma tendencia no aumento de citocinas IL-1 β e IL17A no grupo CD4:<350, coincide com as principais causas da piora clínica dos pacientes com COVID-19, que é o aumento excessivo de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL17A, acompanhado por IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, IP10, MCP1 e TNFα. Essas citocinas provocam a síndrome de liberação de citocinas, que pode levar à inflamação pulmonar e à síndrome do desconforto respiratório agudo. Nesse contexto, a IL-17A e possivelmente a IL-17F, que são produzidas pelas células Th17, têm um papel importante na imunopatologia da COVID-19 (Shibabaw, 2020). Quando observamos pacientes com COVID-19, evoluindo para óbito, encontraram a IL-17, como sendo um sinalizador da tempestade de citocinas, originando-se de avarias teciduais e da síndrome do desconforto respiratório agudo (Geng *et al.*, 2021). Pela grande atuação pró-inflamatória, o IL-17 provoca uma propagação de eosinófilos, em

direção aos órgãos contaminados, principalmente nos pulmões, atraindo e apoiando os neutrófilos e monócitos, para região da infecção, impulsionando a produção de citocinas (Pasrija; Naime, 2021).

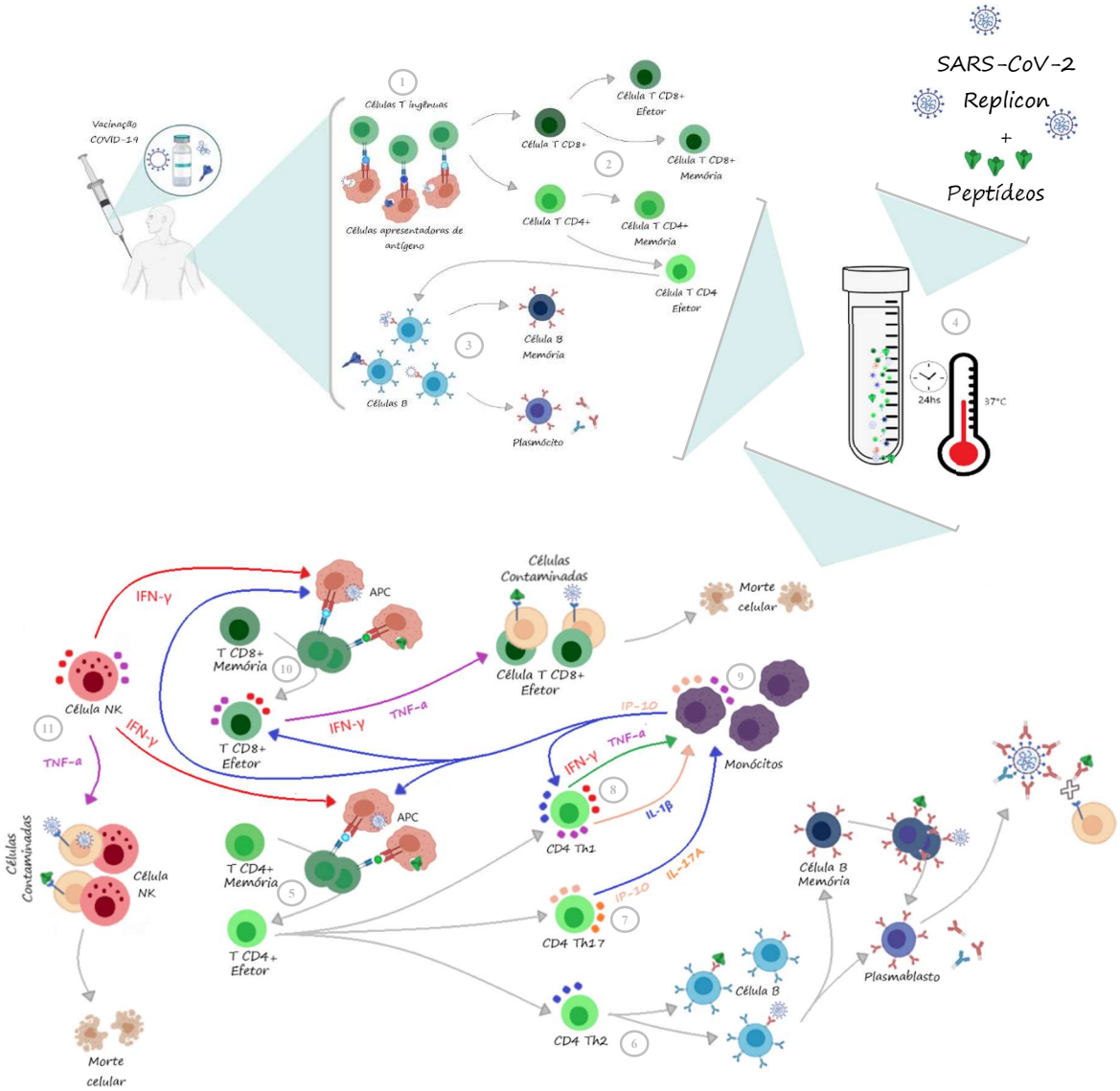
Em relação a variante do Omicron BA.1, do vírus SARS-CoV-2, observou-se uma relação entre a gravidade da patologia confrontando com as citocinas envolvidas. No caso a IL-1β apresenta-se elevada em pessoas que desenvolveram o grau leve, sendo associado a sintomas sem gravidade, enquanto no grau moderado foi encontrado a quimiocina IP10, tendo como origem a via de IFN. Além disso, se ocorrer uma elevação de IFN mais atrasada em relação ao ápice dos sintomas e da replicação viral, pode indicar um grau rigoroso na fase aguda. Este estudo não teve êxito na detecção da a citocina IL-17 em nenhum dos grupos de células mononucleares do sangue periférico pesquisados (Li *et al.*, 2022).

Os pacientes com SARS-CoV-2 apresentaram citocinas elevadas (IL-6, IL-8, IL-18 e IFN-γ) em comparação com pessoas saudáveis. Com uma infecção fatal por SARS-CoV-2, foi encontrado uma queda expressiva de IL-1β, IL-2, IL-4, IL-12, TNF-α e uma elevação de IFN-ɣ (Horspool *et al.*, 2021).

A partir dos dados preliminares e das informações coletadas, foi possível elaborar uma representação do processo que ocorre nesta plataforma indicando a resposta imunológica celular por meio da expressão de citocinas em indivíduos vacinados, portadores de HIV^{+} (Figura 25).

Figura 25: Repersentação baseada nos resultados preliminares do processo de estimulação do teste realizado:
1: A vacina contra SARS-CoV-2 é injetada no músculo, sendo captada por células apresentadoras de antígenos, que são estimuladas e levadas para o linfonodo mais próximo, onde os fragmentos do imunizante são expostos por via de MHC na célula apresentadora de antígeno, ativamdo as células T por meio de seu receptor (TCR). **2:** As células T se diferenciam em dois tipos principais após a apresentação: as células T CD8+ efetor, que atacam as células infectadas, e as células T CD8+ de memória, que guardam a informação do antígeno. Além disso, há a diferenciação para as células T CD4+ de memória e efetora, que auxiliam na resposta imune. **3:** As células T CD4 efetora ativam as células B, juntamente com o estímulo vacinal, para desenvolver a resposta de anticorpos com maior afinidade e diversidade de isotipos. As células B geram plasmócitos de curta duração, que secretam rapidamente anticorpos específicos contra o imunizante, elevando os níveis de anticorpos no soro em duas semanas. As células B também formam células de memória, que conferem a memória imunológica. Também são gerados os plasmócitos de longa duração que persistem produzindo anticorpos por décadas nos nichos na medula óssea. **4:** As células foram coletadas e preparadas para a ativação ex vivo. Em seguida, foram expostas ao vírus replicon ccSARS-CoV-2 e aos peptídeos da proteína Spike. Este preparo ficou incubado por 24 horas a 37°C. **5:** As células que capturam e apresentam os antígenos dos vírus replicon ccSARS-CoV-2 ou dos fragmentos da proteína Spike estimulam as células T CD4+ de memória, que se transformam em células T CD4+ efetoras do tipo Th1, Th17 ou Th2. **6:** As células B recebem estímulos das células T CD4+ Th2 e dos vírus replicon ccSARS-CoV-2 ou seus fragmentos da proteína Spike. Assim, elas se diferenciam em plasmócitos, que produzem anticorpos, ou em células de memória, que conferem imunidade. Os anticorpos bloqueiam a entrada dos vírus replicon ccSARS-CoV-2 ou seus fragmentos da proteína Spike nas células, evitando a contaminação. **7:** As células Th17 CD4+ diferenciadas produzem IP-10 e IL-17ª, que recrutam monócitos para o sítio de infecção e intensificam a resposta inflamatória. **8:** As células CD4+ Th1 estimulam os monócitos por meio da liberação de IL-1β, que

aumenta a ativação e de IFN-ɣ e TNF-α que modula a sua reação inflamatória. **9:** Os monócitos respondem à infecção produzindo TNF-α, que modula a sua própria resposta inflamatória, e IP-10, que recruta células CD4+ Th1, células apresentadoras de antígeno e células T CD8+ efetoras para o foco da infecção, intensificando a inflamação. **10:** As células apresentadoras de antígenos, como os vírus replicon ccSARS-CoV-2 ou partes da sua proteína Spike, ativam as células T CD8+ de memória, que se transformam em células T CD8+ efetoras. Essas células liberam IFN-ɣ e TNF-α, potencializando a sua ação contra as células infectadas, induzindo a sua morte. **11:** As células NK (natural killer) são capazes de detectar os vírus replicon ccSARS-CoV-2 e seus fragmentos da proteína Spike, liberando IFN-ɣ, que estimula a diferenciação e a ativação de células apresentadoras de antígenos, e também liberando TNF-α, que potencializa o seu efeito sobre as células infectadas, levando à morte celular.



- Regulação da resposta inflamatória,
- Induz a maturação e a ativação,
- Aumenta a resposta,
- Ação celular,
- Estimulação potencializada,
- Atração para o local da infecção aumentando a inflamação.

- Célula próxima produtora de IL-1β,
- Célula próxima produtora de IFN-γ,
- Célula próxima produtora de IP-10,
- Célula próxima produtora de IL-17A,
- Célula próxima produtora de TNF-α.

Fonte: Imagem modificada de Pollet *et al.*, 2021.

7. CONCLUSÃO

A construção de uma plataforma para avaliação da resposta imunológica à vacinação contra SARS-CoV-2 em pessoas vivendo com HIV (PVHIV) é um tema atual, relevante e inovador.

7.1 Resposta Imunológica em PVHIV e SARS-CoV-2

- A redução no número de células T CD4+ específicas para o SARS-CoV-2 compromete significativamente a resposta imune efetora contra o vírus.
- O primeiro ciclo de vacinação contra o SARS-CoV-2 é crítico para a imunização e a criação de critérios para reforços vacinais.

7.2 Classificação Baseada nas Células T CD4+

- Os dados obtidos revelam uma inclinação da resposta imunológica em PVHIV que receberam a vacina contra o SARS-CoV-2.
- A classificação dos grupos foi baseada nas quantidades de células T CD4+ presentes no sangue.

7.3 Células T CD8+ e Resposta Imune

- Observou-se um aumento no contingente de células T CD8+ nos três grupos estudados.

7.4 Deficiência da Ativação de Células T em Casos Graves de SARS-CoV-2

- A diminuição das células CD3+ resulta em uma redução geral de linfócitos T.
- Níveis reduzidos de CD45+ indicam deficiência na ativação das células T, afetando também as células B.

7.5 Anticorpos Neutralizantes e Imunoglobulinas

- A análise de anticorpos neutralizantes contra o SARS-CoV-2 não mostrou variações significativas entre os grupos.
- No entanto, observou-se uma correlação inversa entre o número de células T CD4+ e a concentração de Imunoglobulinas IgM e IgG.

7.6 Correlações entre Citocinas e Resposta Imune

- A análise das citocinas induzidas em resposta ao estímulo do SARS-CoV-2 é essencial para entender a dinâmica imunológica.
- As matrizes de correlação de Pearson mostraram associações positivas entre as citocinas IFN-ɣ, IP-10, IL-1β e IL-17A.
- O TNF-α não apresentou associação significativa com as outras citocinas após 12 horas de incubação, mas houve associações fortes após 24 horas.

7.6.1 Papel da Citocina TNF-α

- Após o estímulo de 24 horas, observou-se um aumento da TNF-α nos grupos de linfócitos T CD4+ com contagens abaixo de 350 e acima de 750.
- Essa tendência está alinhada com a ativação vacinal do sistema imunológico, especialmente nos linfócitos T CD8+ (citotóxicos), que interrompem a replicação viral e estimulam a produção de anticorpos pelas células B.

7.6.2 Citocinas IFN-ɣ e IP-10

- As citocinas IFN-ɣ e IP-10 demonstraram uma correlação muito forte após 24 horas de estímulo.
- Essa tendência é consistente com um estudo realizado com a vacina de mRNA da Pfizer/BioNTech, que observou um aumento dessas citocinas após a primeira dose em participantes previamente contaminados e não contaminados pelo SARS-CoV-2.
- O aumento dessas citocinas foi seguido por um estímulo nos níveis de anticorpos contra a proteína S (Spike) e por citocinas como IL-6 e TNF-α após a segunda dose vacinal.

7.6.3 Citocinas IL-1β e IL-17A

- No grupo CD4:<350, houve uma tendência de aumento nas citocinas IL-1β e IL-17A.
- A IL-17A, produzida pelas células Th17, desempenha um papel importante na imunopatologia da COVID-19.

7.7 Conclusão geral

A resposta imunológica em PVHIV após a imunização contra o SARS-CoV-2 é um campo complexo e multifacetado. A classificação baseada nas células T CD4+, a análise de anticorpos e citocinas são ferramentas importantes para avaliar a eficácia da vacinação. O desenvolvimento desta plataforma possibilitará a continuidade das pesquisas e monitorando de PVHIV sob

condições vacinais ou infecção pelo SARS-CoV-2, além de ser uma importante ferramenta para avaliar respostas imunológicas a outras vacinas ou infecções.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEEBRAHIM-DEHKORDI, E. *et al.* T helper type (Th1/Th2) responses to SARS-CoV-2 and influenza A (H1N1) virus: From cytokines produced to immune responses. **Transplant Immunology**, v. 70, 1 Feb. 2022. https://doi.org/10.1016/j.trim.2021.101495.

ALNEFAIE, A.; ALBOGAMI, S. Current approaches used in treating COVID-19 from a molecular mechanisms and immune response perspective. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 11, p. 1333–1352, 1 Nov. 2020. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.08.024.

AMER, S. A. *et al.* Exploring the reported adverse effects of COVID-19 vaccines among vaccinated Arab populations: a multi-national survey study. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 4785, 27 Feb. 2024. DOI 10.1038/s41598-024-54886-0. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41598-024-54886-0.

BARREIRO, P. *et al.* A pilot study for the evaluation of an interferon gamma release assay (IGRA) to measure T-cell immune responses after SARS-CoV-2 infection or vaccination in a unique cloistered cohort. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 60, n. 3, p. e02199-21, 2022.

BATES, J. T. *et al.* Serological assessment of the durability of vaccine-mediated protection against SARS-CoV-2 infection. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 20, n. 1, p. 2308375, 31 Dec. 2024. https://doi.org/10.1080/21645515.2024.2308375.

BD BIOSCIENCES. **BD TrucountTM Controls**. 2023. Disponível em: https://www.bdbiosciences.com/en-au/products/reagents/flow-cytometry-reagents/clinical-diagnostics/multicolor-cocktails-and-kits-ivd-ce-ivds/controls.340335. Acessado em: 1 out. 2023.

BD BIOSCIENCES. **BD® CS&T Contas**. 2023. Disponível em: https://www.bdbiosciences.com/en-de/products/reagents/flow-cytometry-reagents/clinical-diagnostics/process-and-quality-controls/cs-t-beads.656504. Acessado em: 1 out. 2023.

BERGAMASCHI, C. *et al.* Systemic IL-15, IFN-γ, and IP-10/CXCL10 signature associated with effective immune response to SARS-CoV-2 in BNT162b2 mRNA vaccine recipients. **Cell Reports**, v. 36, n. 6, 10 Aug. 2021. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109504.

BHANDARI, B. *et al.* Adverse Events following Immunization with COVID-19 Vaccines: A Narrative Review. **BioMed Research International**, v. 2022, 2022. https://doi.org/10.1155/2022/2911333.

BHAVNANI, D. *et al.* SARS-CoV-2 viral load is associated with risk of transmission to household and community contacts. **BMC Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, 1 Dec. 2022. https://doi.org/10.1186/s12879-022-07663-1.

CAMPANA, P. *et al.* Dendritic Cells and SARS-CoV-2 Infection: Still an Unclarified Connection. **Cells**, v. 9, n. 9, 8 Sep. 2020. https://doi.org/10.3390/cells9092046.

CANALTECH. **Vacinas de mRNA contra COVID: o que são e por que vão revolucionar a ciência?**. 2023. Disponível em: https://canaltech.com.br/saude/vacinas-de-mrna-contra-covid-o-que-sao-e-por-que-vao-revolucionar-a-ciencia-174922/. Acesso em: 2 maio 2023.

CELE, S. *et al.* SARS-CoV-2 prolonged infection during advanced HIV disease evolves extensive immune escape. **Cell Host and Microbe**, v. 30, n. 2, p. 154-162.e5, 9 Feb. 2022. https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.01.005.

CHEN, N. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, 15 Feb. 2020. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7.

CHRISTENSEN, B. B.; AZAR, M. M.; TURBETT, S. E. Laboratory Diagnosis for SARS-CoV-2 Infection. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 36, n. 2, p. 327–347, 1 Jun. 2022. https://doi.org/10.1016/j.idc.2022.02.002.

CODO, A. C. *et al.* Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1α/Glycolysis-Dependent Axis. **Cell Metabolism**, . 32, n. 3, p. 437-446.e5, 1 Sep. 2020. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.007.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, 1 Mar. 2019. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9.

DADRAS, O. *et al.* The relationship between COVID-19 viral load and disease severity: A systematic review. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 10, n. 3, 1 Mar. 2022. https://doi.org/10.1002/iid3.580.

DI VITO, C. *et al.* Natural Killer Cells in SARS-CoV-2 Infection: Pathophysiology and Therapeutic Implications. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 30 Jun. 2022. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.888248.

DUNBAR, P. R. *et al.* Pulmonary monocytes interact with effector T cells in the lung tissue to drive TRM differentiation following viral infection. **Mucosal Immunology**, v. 13, n. 1, p. 161–171, 1 Jan. 2020. https://doi.org/10.1038/s41385-019-0224-7.

FARA, A. *et al.* Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines: Cytokine storm: The elements of rage! **Open Biology**, v. 10, n. 9, 1 Sep. 2020. https://doi.org/10.1098/rsob.200160.

FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ. **Grossário Rede Genomica - Esquema simplificado da estrutura genômica do SARS-CoV-2**. 28 jul. 2023. Disponível em: https://www.genomahcov.fiocruz.br/glossario/. Acesso em: 27 jul. 2023.

FIOLET, T. *et al.* Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 28, n. 2, p. 202–221, 1 Feb. 2022. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.10.005.

FORNI, D. *et al.* Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 35–48, 1 Jan. 2017. https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.001.

GÁLVEZ, N. M. S. *et al.* Differences in the immune response elicited by two immunization schedules with an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in a randomized phase 3 clinical trial. **Elife**, v. 11, 2022. https://doi.org/10.7554/eLife.81477.

GARGANO, J. W. Use of mRNA COVID-19 vaccine after reports of myocarditis among vaccine recipients: update from the Advisory Committee on Immunization Practices—United States, June 2021. MMWR. **Morbidity and mortality weekly report**, v. 70, 2021. https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7027e2.

GENG, J. *et al.* CD147 antibody specifically and effectively inhibits infection and cytokine storm of SARS-CoV-2 and its variants delta, alpha, beta, and gamma. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, 1 Dec. 2021. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00760-8.

GONÇALVES, J. C. R.; SOBRAL, M. V. Cultivo de células: da teoria à bancada. **Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. EDITORA UFPB**, 2020.
GROENEWEG, L.; HIDALGO, A.; A-GONZALEZ, N. Emerging roles of infiltrating granulocytes and monocytes in homeostasis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 19, p. 3823–3830, 1 Oct. 2020. https://doi.org/10.1007/s00018-020-03509-8.

GRUELL, H. *et al.* Antibody-mediated neutralization of SARS-CoV-2. **Immunity**, v. 55, n. 6, p. 925–944, 14 Jun. 2022. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.05.005.

GUDOWSKA-SAWCZUK, M.; MROCZKO, B. What Is Currently Known about the Role of CXCL10 in SARS-CoV-2 Infection? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, 1 Apr. 2022. https://doi.org/10.3390/ijms23073673.

GUO, Y. *et al.* Targeting TNF-α for COVID-19: Recent Advanced and Controversies. **Frontiers in Public Health**, v. 10, 11 Feb. 2022. https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.833967.

HAFEZI, B. *et al.* Cytokine storm syndrome in sars-cov-2 infections: A functional role of mast cells. **Cells**, v. 10, n. 7, 1 Jul. 2021. https://doi.org/10.3390/cells10071761.

HAJJO, R. *et al.* Shedding the light on post-vaccine myocarditis and pericarditis in covid-19 and non-covid-19 vaccine recipients. **Vaccines**, v. 9, n. 10, 1 Oct. 2021. https://doi.org/10.3390/VACCINES9101186.

HASANVAND, A. COVID-19 and the role of cytokines in this disease. **Inflammopharmacology**, v. 30, n. 3, p. 789–798, 1 Jun. 2022. https://doi.org/10.1007/s10787-022-00992-2.

HÖFT, M. A.; BURGERS, W. A.; RIOU, C. The immune response to SARS-CoV-2 in people with HIV. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 21, n. 2, p. 184–196, 1 Feb. 2024. https://doi.org/10.1038/s41423-023-01087-w.

HORSPOOL, A. M. *et al.* Interplay of Antibody and Cytokine Production Reveals CXCL13 as a Potential Novel Biomarker of Lethal SARS-CoV-2 Infection. 2021. DOI 10.1128/mSphere. Disponível em: https://doi.org/10.1128/mSphere.

HU, B. *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141–154, 1 Mar. 2021. https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7.

HUI, D. S. *et al.* The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health — The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 91, p. 264–266, 1 Feb. 2020. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.01.009.

INSTITUTO BUTANTAN. **Variante XAG, primeira recombinante brasileira da ômicron, é detectada em estados do sul e sudeste e em 6 países**. 2023. Disponível em: https://butantan.gov.br/noticias/variante-xag-primeira-recombinante-brasileira-da-omicron-e-detectada-em-estados-do-sul-e-sudeste-e-em-6-paises. Acesso em: 10 Apr. 2023.

JIN, M. *et al.* CD45: a critical regulator in immune cells to predict severe and non-severe COVID-19 patients. **Aging**, v. 12, n. 20, p. 19867–19879, 16 Oct. 2020. https://doi.org/10.18632/aging.103941.

KAMAR, N. *et al.* Three Doses of an mRNA Covid-19 Vaccine in Solid-Organ Transplant Recipients. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 7, p. 661–662, 12 Aug. 2021. https://doi.org/10.1056/nejmc2108861.

KARIMABAD, M. N. *et al.* The involvement of cxc motif chemokine ligand 10 (Cxcl10) and its related chemokines in the pathogenesis of coronary artery disease and in the covid-19 vaccination: A narrative review. **Vaccines**, v. 9, n. 11, 1 Nov. 2021. https://doi.org/10.3390/vaccines9111224.

KARKI, R. *et al.* Synergism of TNF-α and IFN-γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. **Cell**, v. 184, n. 1, p. 149-168.e17, 7 Jan. 2021. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.025.

KATO, A. *et al.* B-lymphocyte lineage cells and the respiratory system. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 4, p. 933–957, Apr. 2013. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.02.023.

KHALID, K.; POH, C. L. The development of DNA vaccines against SARS-CoV-2. **Advances in Medical Sciences**, v. 68, n. 2, p. 213–226, 1 Sep. 2023. https://doi.org/10.1016/j.advms.2023.05.003.

KRAUSE, C.; BERGMANN, E.; SCHMIDT, S. V. Epigenetic modulation of myeloid cell functions in HIV and SARS-CoV-2 infection. **Molecular biology reports**, v. 51, n. 1, p. 342, 1 Dec. 2024. https://doi.org/10.1007/s11033-024-09266-2.

KRAUSE, P. R. *et al.* Considerations in boosting COVID-19 vaccine immune responses. **The Lancet**, v. 398, n. 10308, p. 1377–1380, 9 Oct. 2021. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02046-8.

LAING, A. G. *et al.* A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. **Nature Medicine**, v. 26, n. 10, p. 1623–1635, 1 Oct. 2020. https://doi.org/10.1038/s41591-020-1038-6.

LAMERS, M. M.; HAAGMANS, B. L. SARS-CoV-2 pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 270–284, 1 May 2022. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0.

LE BERT, N. *et al.* Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 5, 3 May 2021. https://doi.org/10.1084/JEM.20202617.

LEE, M. J. Quantifying SARS-CoV-2 viral load: current status and future prospects. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 21, n. 10, p. 1017–1023, 2021. https://doi.org/10.1080/14737159.2021.1962709.

LI, B. *et al.* A novel prediction model to evaluate the probability of CD4+/CD8+cell ratio restoration in HIV-infected individuals. **AIDS**, v. 36, n. 6, p. 795–804, 1 May 2022. https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000003167.

LI, Z. *et al.* Innate immune imprints in SARS-CoV-2 Omicron variant infection convalescents. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, 1 Dec. 2022. https://doi.org/10.1038/s41392-022-01237-y.

LIANG, B. *et al.* Robust humoral and cellular immune responses in long-term convalescent COVID-19 individuals following one-dose SARS-CoV-2 inactivated vaccination. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 1 Aug. 2022. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.966098.

LIU, T. *et al.* PD-1 deficiency promotes TFH cells expansion in ITV-immunized mice by upregulating cytokines secretion. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, 6 Jul. 2018. https://doi.org/10.1186/s13071-018-2984-4.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262.

LUCKHEERAM, R. V.; ZHOU, R.; VERMA, A. D.; XIA, B. CD4 +T cells: Differentiation and functions. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012. https://doi.org/10.1155/2012/925135.

MAIBOM-THOMSEN, S. L. *et al.* Immunoglobulin G structure and rheumatoid factor epitopes. **PLoS ONE**, v. 14, n. 6, 1 Jun. 2019. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217624.

MARTIN, M. D.; BADOVINAC, V. P. Defining memory CD8 T cell. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. NOV, 20 Nov. 2018. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02692.

MAURI, C.; BOSMA, A. Immune regulatory function of B cells. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 221–241, Apr. 2012. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074934.

MELO N. S. **Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2**. Monografia (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2022.

MENG, H.; MAO, J.; YE, Q. Strategies and safety considerations of booster vaccination in COVID-19. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 366–373, 1 Jun. 2022. https://doi.org/10.17305/bjbms.2021.7082.

MERCK - SIGMA. **Bula do reagente Histopaque®-1077 SIGMA** . 2023. Disponívem em: https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/10771#product-documentation. Acesso em: 28 Set. 2023.

MOGA, E.; LYNTON-PONS, E.; DOMINGO, P. The Robustness of Cellular Immunity Determines the Fate of SARS-CoV-2 Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 27 Jun. 2022. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.904686.

MOHD ZAWAWI, Z. *et al.* Prospective Roles of Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-α) in COVID-19: Prognosis, Therapeutic and Management. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, 1 Apr. 2023. https://doi.org/10.3390/ijms24076142.

MONTAZERSAHEB, S. *et al.* COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. **Virology Journal**, v. 19, n. 1, 1 Dec. 2022. https://doi.org/10.1186/s12985-022-01814-1.

MORITA, R. *et al.* Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. **Immunity**, v. 34, n. 1, p. 108–121, 28 Jan. 2011. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.012.

MURDOCCA, M. *et al.* COVID-19: S-Peptide RBD 484–508 Induces IFN-γ T-Cell Response in Naïve-to-Infection and Unvaccinated Subjects with Close Contact with SARS-CoV-2-Positive Patients. **Viruses**, v. 15, n. 7, 1 Jul. 2023. https://doi.org/10.3390/v15071417.

MURUGESAN, K. *et al.* Interferon-γRelease Assay for Accurate Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 T-Cell Response. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 9, p. E3130–E3132, 1 Nov. 2021. https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1537.

NEALON, J. *et al.* Reported effectiveness of COVID-19 monovalent booster vaccines and hybrid immunity against mild and severe Omicron disease in adults: A systematic review and meta-regression analysis. **Vaccine: X**, v. 17, 1 Mar. 2024. https://doi.org/10.1016/j.jvacx.2024.100451.

PAN, S.; MANABE, N.; YAMAGUCHI, Y. 3d structures of iga, igm, and components. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, 1 Dec. 2021. https://doi.org/10.3390/ijms222312776.

PASCUAL-DAPENA, A. *et al.* Individuals With Higher CD4/CD8 Ratio Exhibit Increased Risk of Acute Respiratory Distress Syndrome and In-Hospital Mortality During Acute SARS-CoV-2 Infection. **Frontiers in Medicine**, v. 9, 23 Jun. 2022. https://doi.org/10.3389/fmed.2022.924267.

PASRIJA, R.; NAIME, M. The deregulated immune reaction and cytokines release storm (CRS) in COVID-19 disease. **International Immunopharmacology**, v. 90, 1 Jan. 2021. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107225.

PEIRIS, J. S. M. Coronaviruses. **Clinical Virology**. [*S. l.*]: wiley, 2016. p. 1243–1265. https://doi.org/10.1128/9781555819439.ch52.

PETRONE, L. *et al.* A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 2, p. 286.e7-286.e13, 1 Feb. 2021. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.051.

PINHEIRO, A. A. **Determinação, síntese e aplicação de peptídeos imunogênicos da proteína estrutural s do vírus SARS-CoV-2**. Tese (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2022.

PITOMBO, R. N. M. *et al.* Effect of Moisture Content on the Invertase Activity of Freeze-Dried S. cerevisiae. **Cryobiology**, v. 31, n. 4, p. 383–392, Aug. 1994. https://doi.org/10.1006/cryo.1994.1046.

PLANCHAIS, C. *et al.* Potent human broadly SARS-CoV-2–neutralizing IgA and IgG antibodies effective against Omicron BA.1 and BA.2. **Journal of Experimental Medicine**, v. 219, n. 7, 4 Jul. 2022. https://doi.org/10.1084/jem.20220638.

POLLARD, A. J.; BIJKER, E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 2, p. 83–100, 1 Feb. 2021. https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7.

POLLET, J.; CHEN, W. H.; STRYCH, U. Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 170, p. 71–82, 1 Mar. 2021. https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.001.

RIZZI, M. *et al.* Prognostic Markers in Hospitalized COVID-19 Patients: The Role of IP-10 and C-Reactive Protein. **Disease Markers**, v. 2022, 2022. https://doi.org/10.1155/2022/3528312.

ROSA, S. S.; PRAZERES, D. M. F.; AZEVEDO, A. M.; MARQUES, M. P. C. mRNA vaccines manufacturing: Challenges and bottlenecks. **Vaccine**, v. 39, n. 16, p. 2190–2200, 15 Apr. 2021. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.038.

RYDYZNSKI MODERBACHER, C. *et al.* NVX-CoV2373 vaccination induces functional SARS-CoV-2-specific CD4+ and CD8+ T cell responses. **The Journal of clinical investigation**, v. 132, n. 19, 3 Oct. 2022. https://doi.org/10.1172/JCI160898.

SANTOS, R. da S. *et al.* In silico analysis of mismatches in RT-QPCR assays of 177 SARS-CoV-2 sequences from Bsrazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 1–5, 2020. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0657-2020.

SARKER, P. *et al.* Comparison of the Immune Responses to COVID-19 Vaccines in Bangladeshi Population. **Vaccines**, v. 10, n. 9, 1 Sep. 2022. https://doi.org/10.3390/vaccines10091498.

SATO, H. *et al.* CD4/CD8 ratio predicts the cellular immune response to acute hepatitis C in HIV-coinfected adults. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 25, n. 8, p. 646–648, 1 Aug. 2019. https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.04.001.

SCHMIT, T. *et al.* Interferon-γ promotes monocyte-mediated lung injury during influenza infection. **Cell Reports**, v. 38, n. 9, 1 Mar. 2022. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110456.

SETTE, A.; CROTTY, S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. **Cell**, v. 184, n. 4, p. 861–880, 18 Feb. 2021. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007.

SHAATH, H.; VISHNUBALAJI, R.; ELKORD, E.; ALAJEZ, N. M. Single-Cell Transcriptome Analysis Highlights a Role for Neutrophils and Inflammatory Macrophages in the Pathogenesis of Severe COVID-19. **Cells**, v. 9, n. 11, 29 Oct. 2020. https://doi.org/10.3390/cells9112374.

SHIBABAW, T. Inflammatory cytokine: Il-17a signaling pathway in patients present with covid-19 and current treatment strategy. **Journal of Inflammation Research**, v. 13, p. 673–680, 2020. https://doi.org/10.2147/JIR.S278335.

SILVA, T. M. R. *et al.* Vacinas contra a COVID-19: principais plataformas e bases imunológicas. **Estratégias de vacinação contra a COVID-19 no Brasil: capacitação de profissionais e discentes de enfermagem**. [*S. l.*]: Editora ABEn, 2021. p. 41–51. https://doi.org/10.51234/aben.21.e08.c05.

SINGH, H.; JAKHAR, R.; SEHRAWAT, N. Designing spike protein (S-Protein) based multi-epitope peptide vaccine against SARS COVID-19 by immunoinformatics. **Heliyon**, v. 6, n. 11, 1 Nov. 2020. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05528.

SMADJA, D. M. *et al.* COVID-19 is a systemic vascular hemopathy: insight for mechanistic and clinical aspects. **Angiogenesis**, v. 24, n. 4, p. 755–788, 1 Nov. 2021. https://doi.org/10.1007/s10456-021-09805-6.

SOLER, M.; SCHOLTZ, A.; ZETO, R.; ARMANI, A. M. Engineering photonics solutions for COVID-19. **APL Photonics**, v. 5, n. 9, 1 Sep. 2020. https://doi.org/10.1063/5.0021270.

STERLIN, D. *et al.* IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. **Science translational medicine**, v. 13, n. 577, p. eabd2223, 2021.

STORTI, P. *et al.* Immune response to SARS-CoV-2 mRNA vaccination and booster dose in patients with multiple myeloma and monoclonal gammopathies: impact of Omicron variant on the humoral response. **OncoImmunology**, v. 11, n. 1, 2022. https://doi.org/10.1080/2162402X.2022.2120275.

SUN, P. *et al.* Understanding of COVID-19 based on current evidence. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 6, p. 548–551, 1 Jun. 2020. https://doi.org/10.1002/jmv.25722.

URA, T. *et al.* Current Vaccine Platforms in Enhancing T-Cell Response. **Vaccines**, v. 10, n. 8, 1 Aug. 2022. https://doi.org/10.3390/vaccines10081367.

VATTEPU, R.; SNEED, S. L.; ANTHONY, R. M. Sialylation as an Important Regulator of Antibody Function. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 7 Apr. 2022. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.818736.

WANG, C. Y. *et al.* A multitope SARS-CoV-2 vaccine provides long-lasting B cell and T cell immunity against Delta and Omicron variants. **Journal of Clinical Investigation**, v. 132, n. 10, 16 May 2022. https://doi.org/10.1172/JCI157707.

WANG, J.; JIANG, M.; CHEN, X.; MONTANER, L. J. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 108, n. 1, p. 17–41, 1 Jul. 2020. https://doi.org/10.1002/JLB.3COVR0520-272R.

WANG, Q. *et al.* Alarming antibody evasion properties of rising SARS-CoV-2 BQ and XBB subvariants. **Cell**, v. 186, n. 2, p. 279-286.e8, 19 Jan. 2023. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.12.018.

WEISS, S. R.; LEIBOWITZ, J. L. Coronavirus pathogenesis. **Advances in Virus Research**. v. 81, p. 85-164, 2011. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2.

WENDISCH, D. *et al.* SARS-CoV-2 infection triggers profibrotic macrophage responses and lung fibrosis. **Cell**, v. 184, n. 26, p. 6243-6261.e27, 22 Dec. 2021. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.11.033.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Declaração do Subcomitê COVID-19 do Comitê Consultivo Global da OMS sobre Segurança de Vacinas (GACVS) sobre relatos de Síndrome de Guillain-Barré (GBS) após vacinas COVID-19 de vetor de adenovírus**. 26 Jul. 2021. Disponível em: https://www.who.int/news/item/26-07-2021-statement-of-the-who-gacvs-covid-19-subcommittee-on-gbs. Acesso em: 19 Apr. 2023.

YADAV, D.; KUMAR, N. Nanonization of curcumin by antisolvent precipitation: Process development, characterization, freeze drying and stability performance. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1–2, p. 564–577, 30 Dec. 2014. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.070.

YANG, Y. *et al.* The characterization of CD8+ T-cell responses in COVID-19. **Emerging Microbes and Infections**, v. 13, n. 1, 2024. https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2287118.

ZHANG, L. X. *et al.* HIV Reservoir Decay and CD4 Recovery Associated With High CD8 Counts in Immune Restored Patients on Long-Term ART. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 23 Jul. 2020. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01541.

ZHANG, W.; RUAN, L. Recent advances in poor HIV immune reconstitution: what will the future look like? **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1236460.

ZHOU, R. *et al.* Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses. **Immunity**, v. 53, n. 4, p. 864-877.e5, 13 Oct. 2020. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.026.