

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia**

Helena Perez Coelho

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR MULTIFUNCIONAL INDUZIDA  
PELA SpiN-Tec MCTI/UFMG COMO REFORÇO NA VACINAÇÃO HETERÓLOGA  
CONTRA COVID-19**

Belo Horizonte

2024

Helena Perez Coelho

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR MULTIFUNCIONAL INDUZIDA  
PELA SpiN-Tec MCTI/UFMG COMO REFORÇO NA VACINAÇÃO HETERÓLOGA  
CONTRA COVID-19**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre(a) em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Helton da Costa Santiago

Coorientador: Dr. Gregório Guilherme Almeida

Belo Horizonte

2024

043

Coelho, Helena Perez.

Avaliação da resposta imune celular multifuncional induzida pela SpiN-Tec MCTI/UFMG como reforço na vacinação heteróloga contra COVID-19 [manuscrito] / Helena Perez Coelho. – 2024.

120 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Helton da Costa Santiago. Coorientador: Dr. Gregório Guilherme Almeida.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Vacinas Sintéticas. 3. Imunidade Celular. 4. Memória Imunológica. 5. Imunofenotipagem. 6. Citometria de Fluxo. I. Santiago, Helton da Costa. II. Almeida, Gregório Guilherme. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE HELENA PEREZ COELHO.**  
 Aos dezesseis dias do mês de setembro de 2024 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Avaliação da Resposta Imune Celular Multifuncional Induzida pela SpiN-Tec MCTI UFMG como Reforço na Vacinação Heteróloga Contra Covid-19", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Helton da Costa Santiago, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli (Instituto René Rachou - Fiocruz/MG), aprovada; Dra. Walderez O. Dutra (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Gregório Guilherme Almeida - Coorientador (Instituto René Rachou - Fiocruz/MG), aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA  
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de setembro de 2024.

  
 Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli (Fiocruz/MG)

  
 Dra. Walderez O. Dutra (UFMG)

  
 Dr. Gregório Guilherme Almeida - Coorientador (Fiocruz/MG)

  
 Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (UFMG)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, agradeço por terem verdadeiramente orientado minha trajetória, em todos os momentos. Agradeço ao professor Dr. Helton da Costa Santiago, por me ensinar a fazer as perguntas que devem ser feitas e buscar a resposta, independentemente dos obstáculos que se entrelaçam. Ao Dr. Gregório Guilherme Almeida, agradeço pelas lições tão suavemente passadas entre risadas e encorajamentos, caminhando ao meu lado por trilhas que antes não tive coragem de iniciar.

Agradeço a todos os professores que fizeram parte da minha formação acadêmica, indissociável da vida pessoal, e sempre cativaram meu desejo pelo conhecimento. Nesse âmbito, agradeço a meus primeiros e eternos professores, meus pais Léa e Francisco. Agradeço à minha irmã, Catarina, que dividiu comigo essa fase de formação e concluiu seu Mestrado no ano passado – me junto a você agora na conclusão de uma etapa vivida em conjunto.

Aos amigos e amigas que fizeram parte da jornada, não faria jus de enumerá-los no risco de me esquecer de algum, mas estão todos presentes, em algum pedacinho, na transformação que vivi durante estes dois anos.

Agradeço a todos pesquisadores do CT Vacinas e Instituto de Ciências Biológicas da UFMG que contribuíram diretamente ou indiretamente com insights valiosos e trocas de experiências ao longo deste estudo.

Às instituições de fomento, Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), agradeço pelo suporte financeiro que viabilizou a realização deste trabalho.

## RESUMO

O presente estudo avalia a resposta imune celular multifuncional induzida pela vacina SpiN-Tec MCTI UFMG, uma vacina inovadora de proteína recombinante cujo antígeno combina o domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína Spike do SARS-CoV-2 com a sequência completa da proteína do nucleocapsídeo (N). A vacina foi administrada a voluntários sem histórico de COVID-19, previamente imunizados com duas doses de CoronaVac e uma dose de reforço de CoronaVac. Amostras de sangue periférico foram coletadas dos participantes antes da administração da vacina (tempo V0), 14 dias depois (V14) e 28 dias depois (V28). As células mononucleares foram isoladas e cultivadas em meio contendo a proteína N ou a proteína S do SARS-CoV-2 e a própria proteína SpiN. A frequência e o fenótipo das células imunes específicas induzidas pela vacinação foram avaliados por citometria de fluxo. Foi verificada a ativação de células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$ , cuja resposta foi mediada pela produção robusta das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2. A indução da resposta de perfil Th1 levou à expansão de células T de memória central e efetora. Além disso, a proteína SpiN demonstrou ser um estímulo celular mais potente na indução da produção de citocinas por células T  $CD4^+$  que as proteínas N ou S separadamente. Por fim, foi detectada uma numerosa população de células T duplamente negativas ( $CD3^+CD4^-CD8^-$ ), responsivas aos antígenos virais e também produtoras de citocinas, apontando para uma possível função efetora. O fenótipo dessas células deve ser explorado mais a fundo em estudos futuros, uma vez que elas se apresentam como potencial mecanismo adicional de proteção da vacina. Dada a necessidade de administração anual de doses de reforço para estimular novamente a memória imunológica contra o SARS-CoV-2, especialmente em regime heterólogo de vacinação, o desenvolvimento de uma vacina produzida inteiramente com recursos nacionais, capaz de induzir resposta imune humoral e celular robusta, é uma grande vantagem para a saúde pública brasileira. Este estudo demonstrou que a vacina SpiN-Tec MCTI UFMG é imunogênica e estimula resposta imune eficaz, demonstrando potencial como candidata na vacinação contra a COVID-19.

**Palavras-chave:** Vacina Recombinante; Imunidade Celular; Memória Imunológica; Imunofenotipagem; Citometria de fluxo.

## ABSTRACT

The present study evaluates the multifunctional cellular immune response induced by SpiN-Tec MCTI UFMG, an innovative recombinant protein vaccine against SARS-CoV-2. Its antigen combines the virus' Spike protein receptor-binding domain (RBD) to the complete sequence of the nucleocapsid protein (N). The vaccine was administered to volunteers with no history of COVID-19 and who had been previously immunized with two doses of CoronaVac and a booster dose of CoronaVac. Peripheral blood samples were collected on the day of vaccine administration, before the shot was given (time V0), and then after 14 (V14) and 28 days (V28). Mononuclear cells were isolated and cultivated in cell culture medium containing either the N or the S protein from SARS-CoV-2 and the SpiN antigenic protein itself. The frequency and phenotype of antigen-specific immune cells were assessed by flow cytometry. A robust functional response, mediated by the production of the cytokines IFN- $\gamma$ , TNF and IL-2, confirmed the activation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. The induction of such Th1 profile response led to the expansion of central and effector memory T cells. Furthermore, the SpiN protein demonstrated to be a more potent cellular stimulus to cytokine production by CD4<sup>+</sup> T cells than the N and S protein by themselves. Finally, a large population of double-negative T cells (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) was induced. These cells responded to the viral antigens and also secreted cytokines, indicating a possible effector function. The phenotype of these cells should be explored further in future studies, since they appear as a potentially additional mechanism of protection provided by the vaccine. Given the need for annual administration of booster shots to recurrently stimulate the immune memory against SARS-CoV-2, especially effective through heterologous immunization, the development of a vaccine fully produced with national resources and capable of inducing a robust humoral and cellular immune response is a great advantage for the Brazilian public health. This study demonstrated that the SpiN-Tec MCTI UFMG is an immunogenic vaccine and it is capable of stimulating an effective immune response, with potential to be a candidate for vaccination against COVID-19.

**Keywords:** Recombinant vaccine; Cellular immunity; Immunological memory; Immunophenotyping; Flow cytometry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo de vida do SARS-CoV-2.	18
Figura 2 – Acúmulo de mutações do vírus SARS-CoV-2.	24
Figura 3 – Filogenia das VOCs do SARS-CoV-2 ao longo do tempo.	25
Figura 4 – Dinâmica epidemiológica das VOCs do SARS-CoV-2 ao longo do tempo.	26
Figura 5 – A estrutura do SARS-CoV-2 e da proteína SpiN.	35
Figura 6 – Desenho do Ensaio Clínico.	41
Figura 7 – Esquema representativo da estratégia de <i>gating</i> utilizada.	46
Figura 8 – Expressão de marcadores de ativação de superfície em células CD4 <sup>+</sup> .	50
Figura 9 – Expressão de marcadores de ativação de superfície em células CD8 <sup>+</sup> .	52
Figura 10 – Expressão de marcadores de ativação de superfície em células DN.	53
Figura 11 – Produção de citocinas em células CD4 <sup>+</sup> .	55
Figura 12 – Produção de citocinas em células CD8 <sup>+</sup> .	56
Figura 13 – Produção de citocinas em células DN.	58
Figura 14 – Produção de citocinas em células CD4 <sup>+</sup> por grupo experimental em V14.	60
Figura 15 – Produção de citocinas em células CD4 <sup>+</sup> por grupo experimental em V28.	62
Figura 16 – Imagem representativa das células CD4 <sup>+</sup> multifuncionais.	64
Figura 17 – Produção de citocinas em células CD8 <sup>+</sup> por grupo experimental em V14.	65
Figura 18 – Produção de citocinas em células CD8 <sup>+</sup> por grupo experimental em V28.	67
Figura 19 – Imagem representativa das células CD8 <sup>+</sup> multifuncionais.	68
Figura 20 – Produção de citocinas em células DN por grupo experimental em V14.	69
Figura 21 – Produção de citocinas em células DN por grupo experimental em V28.	71
Figura 22 – Imagem representativa das células DN multifuncionais.	72
Figura 23 – Proporção de citocinas produzidas por células CD4 <sup>+</sup> ao longo do tempo	74
Figura 24 – Proporção de citocinas produzidas por células CD8 <sup>+</sup> ao longo do tempo.	765
Figura 25 – Proporção de citocinas produzidas por células DN ao longo do tempo.	77
Figura 26 – Expressão de CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF <sup>+</sup> por grupo, ao longo do período observacional.	79
Figura 27 – Expressão de CD8 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF <sup>+</sup> por grupo, ao longo do período observacional.	80
Figura 28 – Expressão de DN <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF <sup>+</sup> por grupo, ao longo do período observacional.	81
Figura 29 – Comparação entre as proteínas N, S e SpiN como estímulo antigênico para células CD4 <sup>+</sup> em V14.	83
Figura 30 – Comparação entre as proteínas N, S e SpiN como estímulo antigênico para células CD4 <sup>+</sup> em V28.	84

Figura 31 – Comparação entre as proteínas N, S e SpiN como estímulo antigênico para células CD8 <sup>+</sup> em V14.	85
Figura 32 – Comparação entre as proteínas N, S e SpiN como estímulo antigênico para células CD8 <sup>+</sup> em V28.	866
Figura 33 – Comparação entre as proteínas N, S e SpiN como estímulo antigênico para células DN em V14.	87
Figura 34 – Comparação de N, S e SpiN como estímulo antigênico para células DN em V28.	88
Figura 35 – Localização das células CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF <sup>+</sup> nas subpopulações de memória em V28.	90
Figura 36 – Localização das células CD8 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF <sup>+</sup> nas subpopulações de memória em V28.	91
Figura 37 – Comparação entre a resposta de células T restritas ao MHC e células T não convencionais.	101

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência absoluta e relativa das características demográficas de linha de base dos participantes por grupo de tratamento.	49
--	----

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Linhagens de importância do SARS-CoV-2 ao longo do tempo.	25
Quadro 2 – Efeito da administração de dose de reforço nos esquemas de vacinação homólogo e heterólogo contra o vírus SARS-CoV-2	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Quadro 3 – Painel de citometria de fluxo empregado no estudo.	44

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ACE2	<i>Angiotensin-converting enzyme 2</i>
BPL	Boas Práticas de Laboratório
BV	Brilhante Violeta
CCR	Receptores de Quimiocina com Motivo C-C
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CM	<i>Central Memory</i>
EM	<i>Efector Memory</i>
Eff	<i>Terminal Effector</i>
CN	Controle Negativo
CO <sub>2</sub>	Monóxido de Carbono
COVID-19	Coronavirus disease 2019
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DN	Duplo-Negativo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EA	Efeitos Adversos
ECA-2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ER	Retículo Endoplasmático
ERGIC	<i>Endoplasmic-Reticulum-Golgi Intermediate Compartment</i>
FSC-A	<i>Forward Scatter (Area)</i>
FSC-H	<i>Forward Scatter (Height)</i>
gRNA	RNA genômico
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IFA	Ingrediente Farmacêutico Ativo
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
KDa	Quilodalton
LLOQ	<i>Lower Limit of Quantification</i>
MCTI	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	Mililitro
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro

NOD-like	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Solução Salina tamponada com fosfato
PD1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
TIM3	<i>T-cell Immunoglobulin and Mucin domain 3</i>
LAG	<i>Lymphocyte Activation Gene 3</i>
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
pH	Potencial hidrogeniônico
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
RBD	Domínio de Ligação ao Receptor
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTC	Complexo replicase-transcriptase
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
sgRNA	RNA subgenômico
SSC-A	<i>Side Scatter (Area)</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tfh	Células T auxiliares foliculares
T <sub>h</sub> 1/T <sub>h</sub> 2	Células T auxiliares do tipo 1/2
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TMPRSS2	Serinoprotease transmembrana tipo II
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRPS	Time de Revisão de Protocolo e Segurança
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VOC	<i>Variant of Concern</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro
xg	Força Centrífuga Relativa
Δ	Delta
°C	Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1 A pandemia da COVID-19	15
1.2 O vírus SARS-CoV-2	15
1.2.1 Estrutura	15
1.2.2 Ciclo de vida	16
1.3 Imunidade do hospedeiro	19
1.3.1 Os antígenos virais	19
1.3.2 Resposta imune	20
1.4 Epidemiologia	23
1.5 As vacinas	27
1.5.1 Vacinas de mRNA	27
1.5.2 Vacinas de vetor adenoviral	29
1.5.3 Vacinas de vírus inativados	31
1.5.4 Doses de reforço após o regime de vacinação primária	32
1.6 A vacina SpiN-Tec MCTI UFMG	34
1.6.1 A proteína SpiN	34
1.6.2 Dados Pré-Clínicos	35
1.6.3 CTVad1	36
1.6.4 Justificativa	37
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
2.1 Objetivo geral	39
2.2 Objetivos específicos	39
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>40</b>
3.1 Aprovação pelo Comitê de Ética	40
3.2 Participantes da pesquisa	40
3.3 Desenho do estudo	40

3.4 Obtenção das amostras de PBMC	42
3.4.1 Descongelamento de PMBC	43
3.5 Padronização do painel de Citometria de Fluxo	43
3.6 Imunofenotipagem por citometria de fluxo	44
3.6.1 Análise estatística	47
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>49</b>
4.1 Características da população de estudo e do desenho experimental	49
4.2 Contextualização do perfil imunológico anterior ao ensaio clínico	50
4.2.1 Expressão dos marcadores de ativação de superfície celular CD69, CD134, CD137 e CD154	50
4.2.2 Produção das citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e co-produção de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF <sup>+</sup>	55
4.3 Comparação do perfil de produção de citocinas entre os grupos experimentais	59
4.4 Evolução da produção de citocinas ao longo do tempo de observação	73
4.4.1 Comparação da proporção de citocinas produzidas por grupo ao longo do tempo	73
4.4.2 Evolução da produção de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF <sup>+</sup> ao longo do tempo, por grupo experimental	78
4.5 Avaliação das proteínas N, S e SpiN como estímulos imunes	82
4.6 Avaliação das subpopulações de memória celular	89
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>92</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>108</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO A</b> – Localização das células CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF <sup>+</sup> nas subpopulações de memória em V28 incluindo análise estatística.	<b>116</b>
<b>ANEXO B</b> – Localização das células CD8 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF <sup>+</sup> nas subpopulações de memória em V28 incluindo análise estatística.	<b>117</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A pandemia da COVID-19

No final de 2019, um aumento alarmante de casos atípicos de uma “pneumonia viral” de rápida evolução, cujo agente etiológico era desconhecido, foi detectado em Wuhan, China (MERAD *et al.*, 2022; ZHU *et al.*, 2020). Estes casos se espalharam rapidamente pelo mundo, alertando autoridades públicas de saúde. Em março de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) decretou estado de pandemia (OMS, 2020a), cujo fim só seria anunciado em maio de 2023 (OMS, 2023a). Essa doença foi nomeada de *Coronavirus Disease 2019*, a COVID-19 (OMS, 2020b), fazendo alusão a seu causador, o SARS-CoV-2 (CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES *et al.*, 2020).

## 1.2 O vírus SARS-CoV-2

### 1.2.1 Estrutura

O vírus SARS-CoV-2 faz parte da família *Coronaviridae*, que inclui outros vírus causadores de infecções leves a moderadas nos sistemas respiratório e gastrointestinal humanos. Os coronavírus são caracterizados por sua morfologia, vista ao microscópio eletrônico, que lembra uma coroa solar (FEHR & PERLMAN, 2015; HU *et al.*, 2021; MERAD *et al.*, 2022; PIZZATO *et al.*, 2022; SORACI *et al.*, 2022). Os vírions do SARS-CoV-2 são partículas circulares, formadas por um envelope glicoproteico que envolve seu material genético (PIZZATO *et al.*, 2022). Seus principais componentes são a proteína do Nucleocapsídeo (N), associada ao material genético no interior da partícula, e as proteínas Spike (S), do envelope (E) e de membrana (M), embebidas no envelope viral (FEHR; PERLMAN, 2015; PIZZATO *et al.*, 2022; SORACI *et al.*, 2022).

Seu genoma consiste em uma molécula de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples e polaridade positiva. A fosfoproteína N se associa ao RNA e forma o Nucleocapsídeo, longo e helicoidal (FEHR; PERLMAN, 2015; PIZZATO *et al.*, 2022). A proteína Spike é um trímero em formato de espícula, com estrutura de bulbo na porção final (FEHR; PERLMAN, 2015; PIZZATO *et al.*, 2022). Nela, estão contidos os domínios de ligação ao receptor (RBD), porções responsáveis pelo reconhecimento e ligação do vírus à enzima conversora de angiotensina-2

(ECA-2 ou ACE2), seu receptor na célula alvo (FEHR; PERLMAN, 2015; PIZZATO *et al.*, 2022; SORACI *et al.*, 2022).

### 1.2.2 Ciclo de vida

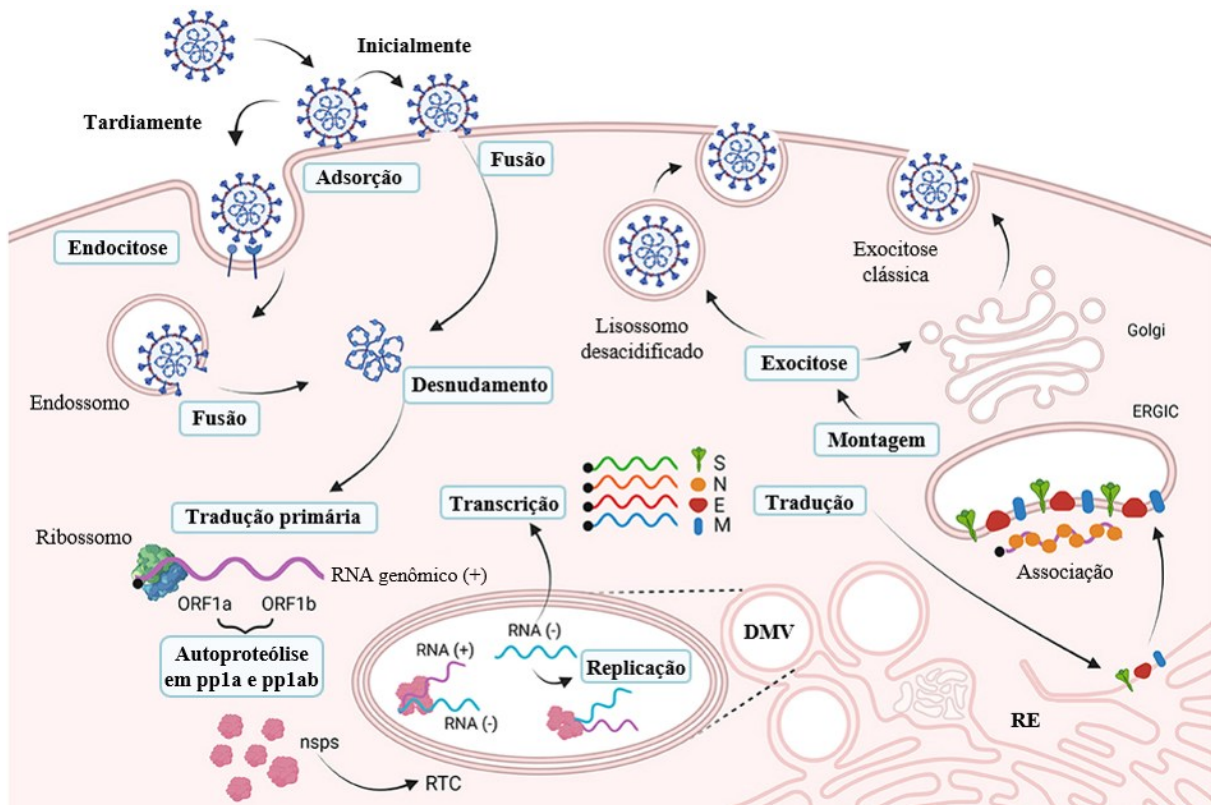
O ciclo de vida do SARS-CoV-2, ilustrado na **Figura 1**, se inicia quando a proteína Spike reconhece os receptores na célula alvo, fator que determina o tropismo do vírus. Os coronavírus precisam passar por clivagem da proteína S para que ocorra sua entrada na célula, atividade realizada por proteases do hospedeiro, como a serinoprotease transmembrana tipo II (TMPRSS2) ou as catepsinas. Então, ocorre fusão do envelope viral e com a membrana citoplasmática ou com membranas endossomais de vesículas endocíticas da célula alvo. O envelope é rompido e o desnudamento do vírus permite que o seu material genético chegue ao citosol. O genoma viral serve como molde para os ribossomos da célula hospedeira e é traduzido imediatamente após sua liberação (HU *et al.*, 2021; MALONE *et al.*, 2021; PIZZATO *et al.*, 2022).

O primeiro gene a ser traduzido pela maquinaria celular sequestrada é o gene da replicase, que dá origem às poliproteínas precursoras pp1a e pp1ab. Na sequência destas poliproteínas, estão incluídas proteases com capacidade autoproteolítica, que realizam a clivagem dos demais polipeptídeos embebidos nas poliproteínas precursoras (FEHR; PERLMAN, 2015; MALONE *et al.*, 2021; PIZZATO *et al.*, 2022). Estes polipeptídeos se organizam em uma estrutura chamada de complexo de replicação e transcrição viral (RTC), composto por vários domínios com diferentes funções, a exemplo de um domínio helicase e um domínio exoribonuclease. O principal domínio do RTC é a RdRp (*RNA-dependent RNA polymerase*), uma polimerase viral especial que usa RNA molde para sintetizar outra molécula de RNA de sequência complementar (FEHR; PERLMAN, 2015). A tradução do genoma viral induz a remodelação do retículo endoplasmático (RE) da célula hospedeira, permitindo o brotamento das chamadas “organelas reprodutivas”, vesículas de membrana dupla (DMVs), dentro das quais ocorre a replicação do vírus (MALONE *et al.*, 2021; PIZZATO *et al.*, 2022).

Os coronavírus possuem dois processos de multiplicação de seu material genético pelo RTC. A replicação é a etapa que gera cópias completas do genoma viral, chamadas de RNA genômico (gRNA). A RdRp usa o gRNA(+) como molde (genoma original, de polaridade positiva) e transcreve o gRNA(-) ou anti-genoma (de polaridade negativa). Em seguida, a RdRp transcreve o gRNA(-) em uma nova cópia de gRNA(+), que pode ser três finalidades: ser organizada em um nucleocapsídeo recém-formado, passar por tradução ou sofrer

autoproteólise para formar novas unidades de RTC ou servir de molde para outras RdRp. A segunda etapa é a síntese de RNAs subgenômicos (sgRNA), fragmentos originados pela transcrição incompleta do gRNA através de um processo de transcrição descontínua. Nestes casos, a RdRp usa o gRNA(+) como molde para sintetizar o sgRNA(-), que contém uma sequência parcial do anti-genoma. Mais uma vez, a RdRp transcreve o sgRNA(-) em sgRNA(+), que é exportado para o citosol e se comporta como RNA mensageiro (mRNA) para os ribossomos (MALONE *et al.*, 2021; PIZZATO *et al.*, 2022).

No citoplasma, cada sg-mRNA é traduzido e gera uma das proteínas estruturais do coronavírus. Uma vez traduzidas, as proteínas E, M e S são inseridas no RE e avançam para o próximo passo da via de secreção (FEHR; PERLMAN, 2015; PIZZATO *et al.*, 2022). Antes de alcançarem o compartimento de Golgi, forma-se o compartimento intermediário RE-Golgi (ERGIC). A proteína N também é traduzida no citoplasma e se associa ao gRNA(+), formando um novo nucleocapsídeo. Este nucleocapsídeo é inserido no ERGIC, interagem com as demais proteínas estruturais e ocorre a montagem do vírion maduro (GHOSH *et al.*, 2020; MALONE *et al.*, 2021; PIZZATO *et al.*, 2022). Uma vez montados, os vírions são liberados da célula por exocitose através de processos ainda não totalmente esclarecidos: via transporte pelo complexo de Golgi e inclusão em vesículas secretórias, como ocorre tradicionalmente com outros vírus envelopados (FEHR; PERLMAN, 2015) ou via incorporação a lisossomos desacidificados, que se fundem à membrana plasmática, expelindo o vírus (GHOSH *et al.*, 2020; PIZZATO *et al.*, 2022).



**Figura 1 – Ciclo de vida do SARS-CoV-2.** A adsorção do vírus ocorre através da interação entre a proteína Spike e o receptor da célula alvo (enzima ECA-2), seguida de clivagem da proteína viral pelas proteases do hospedeiro (não representadas). A entrada no citoplasma da célula pode ocorrer por endocitose, antes da fusão entre vírus e membrana endossomal (via tardia), ou pela fusão do capsídeo e a membrana citoplasmática (via inicial). Duas grandes janelas de leitura abertas, ORF1a e ORF1b, são imediatamente traduzidas nas poliproteínas pp1a e pp1ab, que sofrem autoproteólise e formam as proteínas não estruturais individuais (nsps), que se associam no RTC. A transcrição do gRNA ocorre dentro de vesículas protetoras de membrana dupla (DMVs), gerando uma cópia de gRNA(+) e fragmentos de sgRNA(-). A tradução do sgRNA(-) ocorre no citosol e resulta na formação das proteínas estruturais, que são inseridas na membrana do retículo endoplasmático (RE) e transitam pelo compartimento intermediário ER-Golgi (ERGIC). Ainda no citosol, ocorre a associação do gRNA(+) recém-produzido e proteína N, formando o nucleocapsídeo, que é inserido no do ERGIC. O nucleocapsídeo e proteínas E, S e M, são montados na forma partículas virais maduras, que brotam em vesículas emergentes do RE. Os vírions são secretados da célula infectada através da via clássica de exocitose, passando pelo compartimento de Golgi, ou através da incorporação em lisossomos desacidificados que se fundem com a superfície da membrana celular. Fonte: adaptado de Pizzato et al. (2022).

Durante o processo de replicação, a instabilidade da molécula de RNA e a fidelidade limitada da RdRp (fator intrínseco ao vírus) resultam em mudanças na sequência do genoma (FEHR; PERLMAN, 2015). A maior parte dessas mudanças é deletéria e impede que o vírion finalize sua replicação (KONINGS *et al.*, 2021; MARKOV *et al.*, 2023). As mutações genéticas ocorrem quando essas mudanças de sequência são carregadas em vírions que chegam ao final da replicação com sucesso. A taxa de mutação (medida do surgimento de mudanças genéticas a cada ciclo de replicação) do SARS-CoV-2 é estimada entre  $1,0 \times 10^{-6}$  e  $2,0 \times 10^{-6}$  por nucleotídeo por ciclo, o que gera alta diversidade genética (MARKOV *et al.*, 2023).

Mediante exposição ao vírus, a infecção geralmente é estabelecida por apenas um ou dois vírions, implicando na perda da maioria das mutações durante a transmissão ou fixação daquelas que atingem a replicação no novo hospedeiro – esta perda de diversidade é chamada de gargalo de transmissão (MARKOV *et al.*, 2023). O gargalo de transmissão faz com que apenas um ou alguns vírions sejam ancestrais genéticos de todas novas partículas geradas na nova cadeia de transmissão, introduzindo a influência de efeito fundador na população viral (MARKOV *et al.*, 2023). Infecções que adquirem caráter crônico permitem um período prolongado de replicação e acúmulo de mudanças genéticas nas mesmas partículas virais.

O acúmulo progressivo de mutações em um número afunilado de ancestrais capazes de ultrapassar o gargalo de transmissão gera um perfil genotípico comum dentro da população viral que circula em determinada região geográfica (KONINGS *et al.*, 2021; MARKOV *et al.*, 2023). Este perfil se torna detectável na população (KONINGS *et al.*, 2021) e pode se tornar predominante nas cadeias de transmissão. Seu genoma é diferente da sequência consenso do vírus que causou o surto inicial (MARKOV *et al.*, 2023). O surgimento destes perfis genotípicos em diferentes regiões geográficas culmina na divergência de linhagens, dando origem às chamadas variantes virais. Diferentes conjuntos de mutações associadas se manifestam em características fenotípicas distintas de severidade, transmissibilidade e escape imune (KONINGS *et al.*, 2021; MARKOV *et al.*, 2023).

### **1.3 Imunidade do hospedeiro**

#### ***1.3.1 Os antígenos virais***

A prevalência e magnitude das respostas das células T contra o SARS-CoV-2 se correlacionam com o nível de expressão de cada proteína (SETTE; CROTTY, 2021). A proteína E, presente em pequenas quantidades nos coronavírus, está envolvida na formação do envelope e brotamento do vírion. Apesar de pouco imunogênica, é detectada por receptores da imunidade inata como o TLR2 (*Toll-like Receptor 2*), induzindo citocinas inflamatórias (FEHR; PERLMAN, 2015; SORACI *et al.*, 2022). Análises *in silico* apontam que as proteínas N e S são as mais imunogênicas, tornando-se alvos ideais para o sistema imune do hospedeiro. (CASTRO *et al.*, 2022; NELDE *et al.*, 2020; SORACI *et al.*, 2022).

A proteína S é apresentada na forma de protuberâncias na superfície do vírion e tem expressão numerosa. Por isso, é muito exposta ao sistema imune do hospedeiro e está especialmente sujeita à pressão seletiva (MARKOV *et al.*, 2023; SORACI *et al.*, 2022). Sua

região RBD carrega a maior parte dos epítomos para células T, sobrepostos por vários dos sítios de substituições de aminoácidos que resultam em mutações importantes na formação das variantes (CASTRO *et al.*, 2022). Essas mutações podem afetar a capacidade dos anticorpos do hospedeiro de reconhecerem o vírus, atuando como mecanismo de escape imune, ou podem até aumentar sua transmissibilidade (HU *et al.*, 2021; MARVOK *et al.*, 2023).

A proteína N, por sua vez, é ainda mais enriquecida por epítomos de alta afinidade para células T, que apresentam pouquíssima sobreposição com sítios relevantes de ocorrência de mutações (CASTRO *et al.*, 2022). Além disso, essa proteína apresenta maior grau de conservação que a Spike – não só no SARS-CoV-2 e em suas variantes, mas entre todos os Orthopoxvirus (SORACI *et al.*, 2022). Sua expressão no citoplasma da célula hospedeira é alta, aumentando a probabilidade de que seja processada e apresentada via MHC de classe I (FEHR; PERLMAN, 2015; SETTE; CROTTY, 2021). Os títulos de anticorpos direcionados contra a proteína N aumentam com a gravidade e duração dos sintomas e permanecem estáveis por pelo menos 3 meses (SORACI *et al.*, 2022).

### **1.3.2 Resposta imune**

Uma vez que o vírus entra no corpo, os PAMPs (padrões moleculares associados ao patógeno) são reconhecidos pelos PRR (receptores de reconhecimento de padrões) do sistema imune inato do hospedeiro, incluindo TLRs (*Toll-Like Receptors*), receptores NLRs (*nucleotide-binding oligomerization domain Like Receptor*) e os domínios de ligação de nucleotídeo (KAMIŃSKA *et al.*, 2022; MERAD *et al.*, 2022; PIZZATO *et al.*, 2022; SORACI *et al.*, 2022). A resposta inata inicial visa restringir a replicação viral nas células infectadas, estabelecer um estado antiviral no tecido local e recrutar células efetoras da imunidade adaptativa, ativando-as (ORUMAA; DUNNE, 2021; PIZZATO *et al.*, 2022; SETTE; CROTTY, 2021). A cascata de liberação de citocinas pró-inflamatórias começa a partir da liberação de interferon (IFN) do tipo I que possui atividades antivirais inatas (MERAD *et al.*, 2022; ORUMAA; DUNNE, 2021; SETTE; CROTTY, 2021; SORACI *et al.*, 2022).

As citocinas estimulam o recrutamento de células efetoras da imunidade, que são ativadas e fazem a ponte entre resposta inata e adaptativa. As células B ativadas produzem imunoglobulinas (Ig) – anticorpos – dos tipos IgM, IgG e IgA, com especificidade pelos antígenos virais, responsáveis pela neutralização do vírus (KAMINSKA *et al.*, 2022; SETTE; CROTTY, 2021). As células T efetoras (citotóxicas e auxiliares) ativadas liberam citocinas na região de início da infecção, o que pode gerar hiperinflamação sistêmica, e promovem a

destruição de células infectadas (KAMINSKA *et al.*, 2022; SETTE; CROTTY, 2021; SORACI *et al.*, 2022). Desde o início da pandemia, pesquisadores começaram a propor modelos que auxiliassem a compreensão da dinâmica de resposta imune contra o SARS-CoV-2 e sua relação com a gravidade do quadro de COVID-19. A produção de anticorpos é geralmente considerada o mecanismo chave de proteção contra o estabelecimento de infecções virais e, por isso, o desenvolvimento da resposta humoral é o foco da maioria das vacinas (MOSS *et al.*, 2022). Entretanto, a observação de inúmeros casos de sensibilização da imunidade celular sem soroconversão (MOSS *et al.*, 2022; SETTE; CROTTY, 2021) foi uma das primeiras evidências de que anticorpos não fornecem proteção o suficiente contra a infecção pelo SARS-CoV-2. Além disso, múltiplos estudos demonstraram que indivíduos em terapia de depleção de células B foram capazes de se recuperar da infecção sem cuidados intensivos (MOSS *et al.*, 2022; SETTE; CROTTY, 2021). A queda nos títulos de anticorpos ao longo do tempo, em associação com o surgimento progressivo de variantes capazes de evadir a resposta imune, especialmente a neutralização por anticorpos induzidos por linhagens anteriores (tópico discutido mais profundamente nas próximas seções), reforçou o papel essencial da resposta de células T no controle da infecção pelo SARS-CoV-2 e na resolução da COVID-19 (KIM; TAPPA *et al.*, 2023; KURHADE *et al.*, 2022; SETTE; CROTTY, 2021).

Uma particularidade do novo coronavírus é sua capacidade de evitar ou retardar o início da resposta inata mediada por IFNs do tipo I e III, tanto *in vitro* quanto em humanos (MERAD *et al.*, 2022; PIZZATO *et al.*, 2022). Este escape oferece uma vantagem inicial ao vírus, que pode se replicar desimpedido por tempo suficiente para o estabelecimento da infecção (SETTE; CROTTY, 2021). Evidências apontam que, quando ocorre atraso ou ausência da ativação da imunidade adaptativa, o sistema imune tenta compensar a vulnerabilidade expandindo demais a resposta inata (BERTOLETTI *et al.*, 2021; MOSS, 2022; SETTE; CROTTY, 2021). Com o estado de hiperinflamação sistêmica, ocorre dano tecidual e morte de células, que servem como estímulo adicional para a liberação de citocinas inflamatórias, culminando na “tempestade de citocinas”, com títulos elevados de liberação de interleucina 6 (IL-6), IL-10 e TNF ou fator de necrose tumoral (KAMINSKA *et al.*, 2022). A ativação balanceada do sistema imune é essencial no controle da infecção pelo SARS-CoV-2, como demonstrado pela maior severidade da doença observada em pacientes com sistemas imunes comprometidos (KAMINSKA *et al.*, 2022; SETTE; CROTTY, 2021; SORACI *et al.*, 2022).

Quando um indivíduo é infectado pelo SARS-CoV-2, a resposta específica de células T é multifuncional, com produção robusta de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF. Células T CD4<sup>+</sup> específicas são geralmente mais numerosas e mais multifuncionais do que as células T CD8<sup>+</sup> (BERTOLETTI

*et al.*, 2021; MOSS, 2022; NELDE *et al.*, 2020; SETTE; CROTTY, 2021). Células T CD4<sup>+</sup> tendem a se diferenciar nos perfis Th1, podendo realizar função efetora antiviral direta mediada pela secreção de IFN- $\gamma$ , e no perfil Tfh, essencial na montagem da resposta humoral e citotóxica. (BERTOLETTI *et al.*, 2021; MOSS, 2022; SETTE; CROTTY, 2021). Células T CD8<sup>+</sup> produzem e liberam citocinas, como IFN- $\gamma$ , e moléculas com funções efetoras citotóxicas, como granzima B e perforina (BERTOLETTI *et al.*, 2021; SETTE; CROTTY, 2021). Na avaliação do perfil de células específicas para o SARS-CoV-2 com o passar do tempo, a maioria das células T CD4<sup>+</sup> de longa duração apresenta fenótipo de memória central (CM). Para as células T CD8<sup>+</sup> de longa duração, o fenótipo de memória efetora (EM) é predominante durante os primeiros 2 a 3 meses, sendo superado pelo fenótipo de células efetoras terminantemente diferenciadas (Eff) após este período (COHEN *et al.*, 2021). Linfócitos T específicos podem ser detectados em pacientes convalescentes por até 9 meses após a infecção pelo SARS-CoV-2. Células B de memória parecem durar mais que células T de memória, em contraste com os títulos de anticorpos, que começam a cair após 6 meses (BERTOLETTI *et al.*, 2021).

Durante uma infecção grave, um equilíbrio entre respostas pró-inflamatórias e regulatórias é muito importante para um resultado favorável (GONÇALVES-PEREIRA *et al.*, 2023). A resposta efetiva de células T está associada a menor severidade dos quadros de COVID-19 (BERTOLETTI *et al.*, 2021; KAMINSKA *et al.*, 2022; SETTE; CROTTY, 2021), enquanto respostas celulares insuficientes ou desreguladas – por exemplo, maior expansão de células T CD4<sup>+</sup> de perfil Th2 ao invés do perfil Th1 (MOSS *et al.*, 2022) – estão associadas à doença severa (KAMINSKA *et al.*, 2022; SETTE; CROTTY, 2021; SORACI *et al.*, 2022). A resposta de anticorpos totais (KAMINSKA *et al.*, 2022; SETTE; CROTTY, 2021, SORACI *et al.*, 2022) e os títulos de anticorpos neutralizantes foi correlacionada a uma maior gravidade da COVID-19 (KAMINSKA *et al.*, 2022; NELDE *et al.*, 2021; SETTE; CROTTY, 2021). Reforçando a importância da regulação da resposta celular, Gonçalves-Pereira et al. (2023) investigaram os níveis e fenótipos de células T reguladoras (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>low</sup>FOX P3<sup>+</sup>) em pacientes com COVID-19 que foram internados com casos graves e precisaram ser intubados. Foi observado, nos pulmões de indivíduos que vieram a óbito, que células T reguladoras expressando PD1 apresentaram níveis aumentados de co-expressão de IL-17A (uma citocina pró-inflamatória que mostrou estar positivamente associada desfechos clínicos ruins neste estudo) e menor expressão de IL-10 (uma citocina reguladora crucial para estas células), TNF e IL-2 (fatores de sobrevivência para as células T reguladoras). Estas evidências sugerem que a expressão de PD1 por células T reguladoras está associada a um fenótipo e função efetora disfuncional nessa população celular, além de estar associada a piores resultados

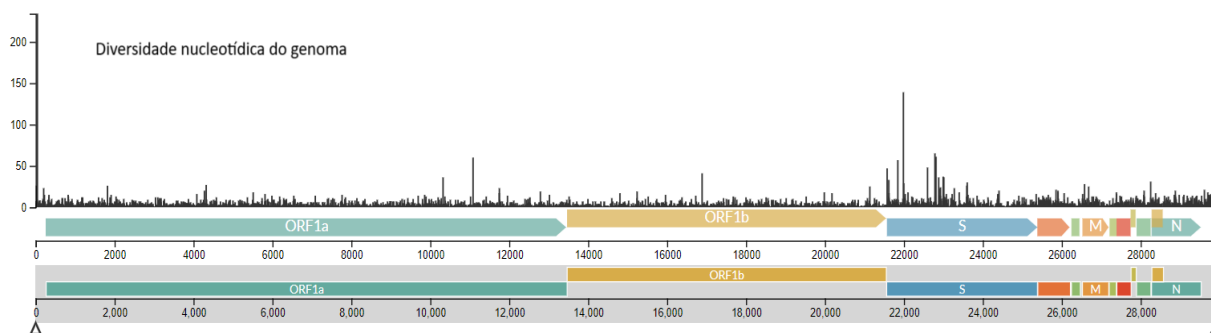
clínicos em não sobreviventes (GONÇALVES–PEREIRA *et al.*, 2023). A disfunção de células T reguladoras, caracterizada pela incapacidade de controlar a inflamação, contribuiu para a imunopatologia de casos graves e fatais de COVID–19 (GONÇALVES–PEREIRA *et al.*, 2023).

A literatura aponta que a infecção por SARS-CoV-2 causa linfopenia, outro fator associado a quadros severos de COVID–19. Ao contrário da linfopenia transitória comumente observada em várias infecções respiratórias virais (com duração de 2 a 4 dias após o início dos sintomas), a linfopenia associada ao novo coronavírus aparenta ser mais persistente, severa e seletiva para determinadas linhagens de células T CD8<sup>+</sup> periféricas (possivelmente causada por recrutamento destas para as vias aéreas e exaustão da população). Marcadores como PD1, TIM3 e LAG se encontram elevados em pacientes com quadros graves, indicando um estado de exaustão das células T, enquanto as células T remanescentes exibem altos níveis de marcadores de ativação como HLA–DR e CD38 (BERTOLETTI *et al.*, 2021; MOSS, 2022).

#### 1.4 Epidemiologia

O SARS-CoV-2 é transmitido durante o contato próximo entre hospedeiros, através de gotículas emitidas por espirros e tosse ou pelo contato com superfícies contaminadas (SORACI *et al.*, 2022). A infecção pode ser totalmente assintomática ou manifestar sintomas que variam de leves (tosse, dor de cabeça, mialgia, fadiga e fraqueza) a moderados (febre, falta de ar, diarreia e vômitos) e podem evoluir para pneumonia, Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo, eventos trombóticos, sepse e até morte (HU *et al.*, 2021; MERAD *et al.*, 2022). Os primeiros sintomas da síndrome respiratória aguda grave que se instala tendem a se manifestar após 5 a 6 dias do início da infecção. Entretanto, o período de infectividade se inicia entre 2 a 5 dias após a exposição, criando uma janela de transmissibilidade clinicamente indetectável, extremamente vantajosa para o espalhamento do vírus (HU *et al.*, 2021; MARKOV *et al.*, 2023, SETTE; CROTTY, 2021). Dinâmicas ecológicas como a alta concentração de pessoas em espaços fechados e a mobilidade humana, constante e acelerada, foram fatores importantes na epidemiologia da COVID–19 (MARKOV *et al.*, 2023; SORACI *et al.*, 2022).

A evolução de um vírus é determinada pelo surgimento de mutações em seu genoma (**Figura 2**) e a propagação destas pela população viral ao longo do tempo (KONINGS *et al.*, 2021; MARKOV *et al.*, 2023).



**Figura 2 – Acúmulo de mutações do vírus SARS-CoV-2.** Representação esquemática da diversidade nucleotídica por produto de cada gene do SARS-CoV-2 desde o início da pandemia. Fonte: adaptado de Nextstrain.org/ncov (HADFIELD *et al.*, 2018).

A evolução do SARS-CoV-2 foi detectada em um intervalo de apenas alguns meses, em que se observou o surgimento de linhagens que acumulam tantas mutações a ponto de serem consideradas variantes, com predominância independente em diferentes regiões do mundo (MARKOV *et al.*, 2023). Estas variantes de importância epidemiológica no contexto global passaram a ser acompanhadas pelas autoridades de saúde.

A OMS definiu um esquema de nomenclatura, atualizado após 3 anos para adequar-se às novas dinâmicas epidemiológicas, baseado nas seguintes definições (2023b):

- a) variante de interesse (VOI) são intituladas de acordo com sistemas de nomenclatura científica bem estabelecidos como Nextstrain (HADFIELD *et al.*, 2018) e Pango (RAMBAUT *et al.*, 2020).
  - Linhagem cujas mudanças genéticas afetam transmissibilidade, virulência, evasão de anticorpos, susceptibilidade a terapias e capacidade de detecção; e
  - apresentam vantagens de crescimento sobre as demais linhagens circulantes em determinada região, com aumento relativo de prevalência e número de casos ao longo do tempo variantes de preocupação ou outros impactos epidemiológicos aparentes sugestivos de risco emergente para a saúde pública global.
- b) variante de preocupação (VOCs) são intituladas por uma letra grega de acordo com sua ordem de detecção no tempo (KONINGS *et al.*, 2021; OMS, 2023b). Estas são linhagens que se encaixam nos critérios determinados para as VOIs e, em comparação com outras variantes, atende a pelo menos um dos seguintes critérios:
  - Mudança na gravidade da doença clínica, prejudicial à saúde pública; OU
  - Mudança na epidemiologia que causa impacto substancial na capacidade dos sistemas de saúde de fornecer cuidados a pacientes com COVID-19 ou outras doenças e, portanto, exigem grandes intervenções de saúde pública; OU

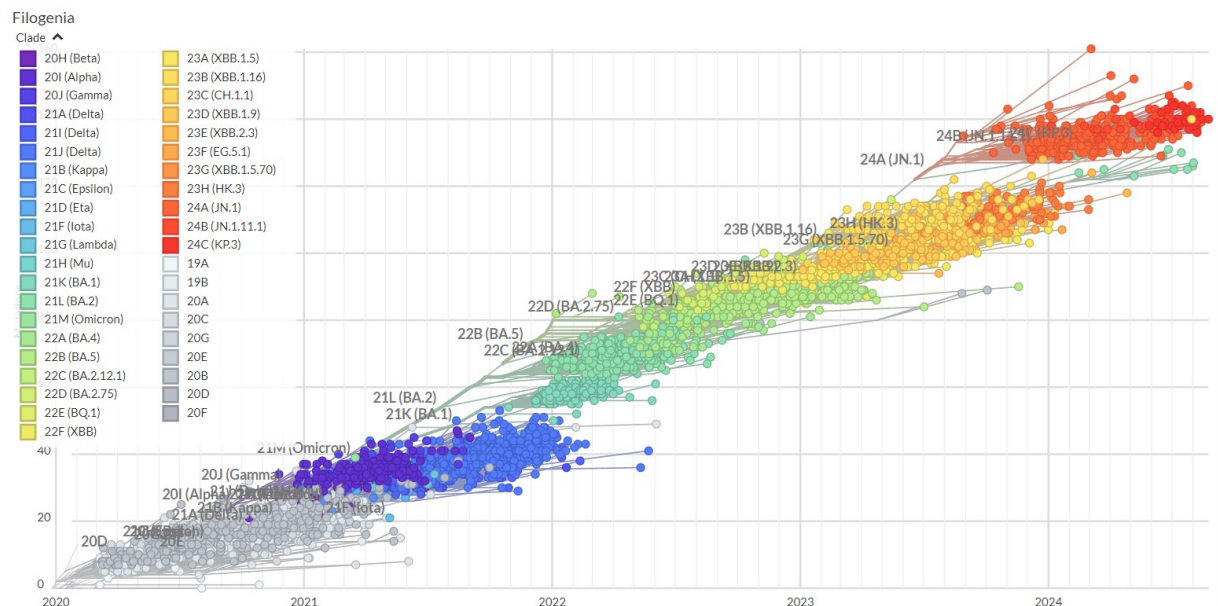
- Redução significativa na eficácia das vacinas disponíveis contra doenças graves.

O período estimado de circulação das linhagens de destaque durante a pandemia do SARS-CoV-2 – a linhagem original de Wuhan e das linhagens designadas como VOCs – estão apresentadas a seguir no **Quadro 1**, relacionando suas identificações segundo os sistemas de nomenclatura Nextstrain e Pango, o período estimado de circulação de cada linhagem e o país em que foi inicialmente detectada.

Nomenclatura da OMS	País de detecção inicial	Data de designação como VOC	Período de circulação estimado	Linhagem (Nextstrain)	Linhagem (Pango)
Wuhan-Hu-1	China	–	01/2020 – 04/2020	–	–
Alpha	Reino Unido	12/2020	09/2020 – 09/2021	20I	B.1.1.7
Beta	África do Sul	12/2020	09/2020 – 10/2021	20H	B.1.351
Gamma	Brasil	01/2021	01/2021 – 11/2021	20J	P.1
Delta	Índia	05/2021	04/2021 – 02/2022	21A	B.1.617.2
Omicron	África do Sul e Botswana	11/2021	11/2021 – hoje	21M	B.1.1.529

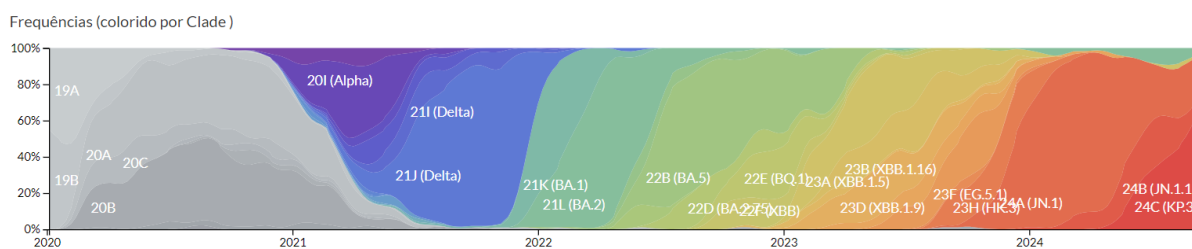
**Quadro 1 – Linhagens de importância do SARS-CoV-2 ao longo do tempo.** Designação e nomenclatura das linhagens segundo a OMS, país de detecção inicial, e linhagem segundo os sistemas Nextstrain e Pango. Fonte: baseada nos dados de Konings et al. (2021) e Rambaut et al. (2020).

A **Figura 3** demonstra a filogenia das variantes do SARS-CoV-2, apontando sua relação evolutiva e a contextualizando ao longo do tempo.



**Figura 3 – Filogenia das VOCs do SARS-CoV-2 ao longo do tempo.** Representação da filogenia das Variantes de Preocupação do SARS-CoV-2 que emergiram desde o início da pandemia, destacando a Omicron como origem comum de todas as variantes que circulam no presente (até setembro de 2024). Fonte: adaptado de Nextstrain.org/ncov (HADFIELD *et al.*, 2018).

A variante Omicron, detectada inicialmente em novembro de 2021, marcou uma mudança na dinâmica epidemiológica da COVID-19 (KARIM; KARIM, 2021; MARKOV *et al.*, 2023). A partir de seu surgimento, não foi mais observada a substituição da variante predominante por novas linhagens ainda mais divergentes, mas sim a substituição por suas sublinhagens (MARKOV *et al.*, 2023, VIANA *et al.*, 2022), que permanecem em circulação até o momento (vide **Figura 4**).



**Figura 4 – Dinâmica epidemiológica das VOCs do SARS-CoV-2 ao longo do tempo.** Representação da frequência cumulativa das variantes predominantes no mundo ao longo da evolução do SARS-CoV-2, ilustrando a substituição de antigas linhagens por novas variantes mais bem adaptadas. Destaca-se a Omicron como a última linhagem designada como VOC, sendo substituída apenas por suas subvariantes, identificadas de acordo com sua clade. Fonte: adaptado de Nextstrain.org/ncov (HADFIELD *et al.*, 2018).

A transmissão de um vírus envolve algumas etapas: sua liberação do hospedeiro infeccioso, a sobrevivência e transporte no ambiente externo e seu estabelecimento no (novo) hospedeiro receptor (MARKOV *et al.*, 2023; MERAD *et al.*, 2022). A variante Omicron e suas sublinhagens acumulam mais de 30 mutações que aumentam sua transmissibilidade em diferentes pontos desta cadeia de transmissão. Exemplos incluem as mutações D614G e N501Y, que melhoram e estabilizam a ligação entre a Spike e seu receptor ECA-2, e a mutação P681H, que facilita a clivagem da Spike e, conseqüentemente, sua entrada na célula alvo (KEETON *et al.*, 2022; MARKOV *et al.*, 2023; MERAD *et al.*, 2022; VIANA *et al.*, 2022)

Enquanto outras VOCs se espalharam em períodos com altas taxas de transmissão do SARS-CoV-2 e, conseqüentemente, imunidade convalescente ainda presente, a variante Omicron ganhou predominância no mundo após o início da vacinação em massa (KARIM; KARIM, 2021; VIANA *et al.*, 2022). Neste cenário, a habilidade do vírus de superar a resistência do hospedeiro à infecção – essencialmente, causar reinfecções – se tornou tão importante quanto ter uma alta transmissibilidade (MARKOV *et al.*, 2023; VIANA *et al.*, 2022). A maioria das novas mutações que surgiram com a variante Omicron e sub-linhagens se concentra na região RBD da proteína S (**Figura 2**), afetando principalmente a capacidade do sistema imune de neutralizar o vírus circulante (MARKOV *et al.*, 2023; NARANBHAI *et al.*, 2022; VIANA *et al.*, 2022). Entretanto, este efeito não é significativo em relação à imunidade

celular. Inúmeros estudos já demonstraram que linfócitos específicos induzidos por linhagens anteriores do SARS-CoV-2, seja via infecção ou vacinação, apresentam reconhecimento cruzado com a Omicron (GAO *et al.*, 2022; KEETON *et al.*, 2022; LIU, Jinyan. *et al.*, 2022; NARANBHAI *et al.*, 2022).

## 1.5 As vacinas

Um conjunto de fatores, como a alta taxa de transmissibilidade do SARS-CoV-2, a sobrecarga dos sistemas de saúde por pacientes em estado grave, a duração prolongada e a morbidade de muitos casos, o surgimento rápido de variantes que escapam ao sistema imune, a queda progressiva na imunidade após a infecção e a impossibilidade de se alcançar imunidade de rebanho, tornou evidente a necessidade de contenção da pandemia através da proteção oferecida pelas vacinas (KIM; THAPA, 2023; SORACI *et al.*, 2022).

Impulsionadas pela necessidade de uso em caráter emergencial e pela concentração de investimentos em uma única doença em escala global, várias plataformas vacinais foram desenvolvidas e testadas em velocidade sem precedentes na história da medicina: vacinas de vírus inativados, vírus recombinante e vacinas de mRNA (SORACI *et al.*, 2022; WANG, 2023). A maioria das vacinas contra a COVID-19 amplamente aplicadas atualmente se baseiam na formação anticorpos contra a proteína Spike (ZHANG *et al.*, 2021; CASTRO *et al.*, 2022).

### 1.5.1 Vacinas de mRNA

Também conhecidas como vacinas de terceira geração, as vacinas baseadas em RNA mensageiro representam um avanço muito promissor na pesquisa e desenvolvimento de tecnologias para a vacinologia (WANG, 2023). Seu princípio de ação reside na transcrição *in vitro* de uma molécula de ácido ribonucleico que codifica uma proteína antigênica de determinado agente etiológico. Esta molécula é transportada em nanopartículas lipídicas, que fazem fusão com a membrana plasmática ou endossomal das células alvo. O mRNA é então reconhecido imediatamente pelo maquinário de tradução da célula hospedeira, que sintetiza a proteína alvo (KIM; THAPA, 2023; WANG, 2023; XU, 2023).

Este processo de tradução apresenta alta eficiência e perfil de segurança satisfatório, uma vez que o mRNA não entra no núcleo da célula e não é integrada ao genoma do hospedeiro. Além disso, alterar a sequência da molécula e manter o restante da formulação vacinal permite adaptação simples e rápida da plataforma. Contudo, o custo de produção destas vacinas é alto

e o armazenamento que garante a estabilidade do produto (refrigeração a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) limita seu transporte e é também custoso (KIM; THAPA, 2023; WANG, 2023; XU, 2023).

As duas principais vacinas baseadas em RNA mensageiro disponíveis no mercado são a mRNA-1273, produzida pela Moderna, e a BNT162b2, produzida pela parceria entre Pfizer e BioNTech.

#### 1.1.1.1 BNT162b2 (Pfizer Comirnaty)

Anunciada em novembro de 2020, a vacina BNT162b2 mostrou perfil favorável de segurança e foi autorizada para uso emergencial em vários países. Um grande estudo clínico multinacional de fases I–II–III, randomizado, mono-cego para o observador e com controle por administração de placebo foi realizado para determinar a segurança, eficácia e imunogenicidade da vacina em adolescentes e adultos. Os resultados apontaram eficácia de 95% na prevenção da COVID-19 após administração do regime primário de vacinação com 2 doses (POLACK *et al.*, 2020).

A proteção humoral induzida pela vacina diminuiu com o passar do tempo e, após 6 meses, a efetividade da vacina caiu para 91% (THOMAS *et al.*, 2021). Entre o pico de produção de anticorpos e a marca de 6 meses após a vacinação, os títulos de anticorpos neutralizantes caem (KAMINSKA *et al.*, 2022) em até 6 vezes (ZHANG. *et al.*, 2022).

Pacientes considerados naïve para a infecção por SARS-CoV-2 e pacientes com relatos de infecção prévia apresentaram resposta humoral robusta após o regime primário de imunização, com queda de anticorpos a partir de 6 meses, mas mantendo títulos acima dos valores detectados antes da vacinação. Este último grupo apresentou queda menor na resposta humoral, apontando para um melhor desempenho da chamada “imunidade híbrida”, adquirida pelo indivíduo previamente infectado que recebe um reforço na imunidade com o esquema primário de vacinação (GOEL *et al.*, 2022; RODDA *et al.*, 2022).

A Comirnaty demonstrou induzir resposta de células T  $\text{CD4}^+$  e  $\text{CD8}^+$  após a sua administração. No pico da resposta celular, as células  $\text{CD4}^+$  apresentaram perfil predominante de células de memória central (CM) e células de memória efetora (EM) (GOEL *et al.*, 2022; PAINTER *et al.*, 2021; RODDA *et al.*, 2022). Pacientes naïve para a infecção por SARS-CoV-2 produziram níveis detectáveis de células T  $\text{CD8}^+$  (GOEL *et al.*, 2022; OBERHARDT *et al.*, 2021; PAINTER *et al.*, 2021), enquanto pacientes previamente infectados não apresentaram diferença na frequência destas células depois da segunda dose (GOEL *et al.*, 2022; RODDA *et al.*, 2022).

Foi observada uma fase de contração da resposta de células T após 3 meses, consistente com o fim da fase efetora da resposta imune induzida. Células T CD4<sup>+</sup> mantiveram frequência estável após a contração, houve perda de células CM circulantes e não houve alteração de frequência média de células EM após 3 a 6 meses da imunização. As células T CD8<sup>+</sup> continuaram a demonstrar queda progressiva de frequência depois a fase de contração (GOEL *et al.*, 2022; OBERHARDT *et al.*, 2021). Guerrero *et al.* (2022) detectaram um perfil de células T CD8<sup>+</sup> com predominância dos compartimentos EM e Eff.

Em relação à produção de citocinas, foi observada resposta de células T CD4<sup>+</sup> mono e multifuncionais, produtoras de IFN- $\gamma$  (principalmente), TNF e IL-2, características do perfil Th1, favorável à formação de memória imune (SAHIN *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2022). Guerrero *et al.* (2022) detectaram que, antes do regime primário de vacinação, culturas celulares estimuladas por antígenos do SARS-CoV-2 apresentavam positividade para células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> específicas, produtoras de IFN- $\gamma$ , em 45 e 46% dos participantes, respectivamente. Após 2 semanas da segunda dose, 81 e 68% passaram a apresentar positividade, com manutenção da resposta por 6 meses. Após a segunda dose do regime primário, células T CD4<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> tiveram salto na frequência média de 53% para 84% e a produção de TNF alcançou o pico após 2 semanas. A co-expressão de IFN- $\gamma$  e TNF em células CD8<sup>+</sup> começou a cair depois de 2 semanas e retornou aos níveis pré-vacinação depois de 6 meses (GUERRERA *et al.*, 2022).

A efetividade da proteção oferecida por 2 doses de BNT162b2 contra a variante Omicron foi estimada em 65,5% entre 2 a 4 semanas após a imunização, caindo para 15,4% após 15 a 19 semanas e 8,8% após 25 semanas ou mais (ANDREWS *et al.*, 2022). Em estudo com indivíduos vacinados na África do Sul, foi observada uma redução de 22 vezes na neutralização da variante Omicron em comparação com a neutralização da linhagem original de Wuhan (CELE *et al.*, 2022).

A resposta celular induzida pela vacina que carrega mRNA codificante para a proteína S da linhagem de Wuhan apresenta reatividade cruzada acima de 80% com a variante Omicron. Este padrão foi observado para células produtoras de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2. A proporção de populações de células CM e EM não foi afetada na resposta contra Omicron (LIU, Jinyan *et al.*, 2022).

### ***1.5.2 Vacinas de vetor adenoviral***

As vacinas de vetor adenoviral são baseadas na integração da sequência codificante para proteína S do SARS-CoV-2 ao genoma de um adenovírus não replicativo ou de replicação

deficiente. Os adenovírus são vírus lineares de DNA fita dupla, com alta infectividade e baixa patogenicidade em humanos, capazes de estimular a imunidade celular e humoral (WANG, 2023).

O adenovírus enfraquecido permite que o sistema imune monte uma forte resposta imunológica sem desenvolver a doença – uma vantagem desta plataforma vacinal, especialmente para pessoas com sistema imune enfraquecido. Além disso, o vetor pode ser administrado sem adição de adjuvantes e pode carregar vários epítomos de uma vez, tornando as vacinas seguras e eficientes (KIM; THAPA, 2023; WANG, 2023).

Entretanto, indivíduos previamente expostos ao vetor viral e que desenvolveram resposta específica contra ele (anticorpos “pré armazenados” ou *pre storage immunity*), podem apresentar resposta vacinal direcionada ao adenovírus e não à informação que ele carrega, reduzindo a eficácia do imunizante. Outra desvantagem da plataforma é a necessidade de administração de mais de uma dose para induzir resposta robusta e duradoura, o que pode reforçar o mecanismo de resposta ao vetor e não ao alvo vacinal (KIM; THAPA, 2023; WANG, 2023).

As duas principais vacinas amplamente distribuídas contra a COVID-19 são a Ad26COV2s, produzida pela farmacêutica Janssen, e a ChAdOx1 nCoV-19, produzida pela farmacêutica AstraZeneca.

#### 1.1.1.2 ChAdOx1 nCoV-19 (AZD 1222)

A vacina produzida pela AstraZeneca em parceria com a Universidade de Oxford (Inglaterra) utiliza um vetor viral de chimpanzé para entregar material o genético codificante para a proteína Spike. Estudos de fase I/II conduzidos no Reino Unido detectaram soroconversão de todos os participantes após aplicação da segunda dose do regime de imunização, com perfil favorável de segurança (FOLEGATTI *et al.*, 2020). Estudos clínicos de fase III foram conduzidos paralelamente no Reino Unido e no Brasil, encontrando estimativas de 70,4% de eficácia para a ChAdOx1 (VOYSEY *et al.*, 2020). Estudos conduzidos paralelamente nos Estados Unidos, Chile e Peru, encontraram eficácia de 74% (FALSEY *et al.*, 2021).

O imunizante foi capaz de induzir aumento de aproximadamente 6 vezes na frequência total de células T específicas para a proteína S do SARS-CoV-2 após 4 semanas da administração da segunda dose (SWANSON *et al.*, 2021). A resposta específica apresentou perfil Th1 e seguiu um padrão hierárquico de produção de citocinas: na população CD4<sup>+</sup>, a

maioria das células produziu TNF, seguidas por IL-2 e IFN- $\gamma$ , enquanto a maioria das células CD8<sup>+</sup> produziu predominantemente IFN- $\gamma$ , seguida por TNF e IL-2 (SWANSON *et al.*, 2021). A avaliação da resposta de células T CD4<sup>+</sup> multifuncionais, mostrou predomínio da combinação IL-2<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>. Entre 23 e 32% das células estavam produzindo as 3 citocinas simultaneamente até 4 semanas depois da imunização completa. Na população de células T CD8<sup>+</sup>, a combinação predominante foi IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TFN<sup>+</sup> e a produção simultânea de 3 citocinas foi equivalente à de células CD4<sup>+</sup> (SWANSON *et al.*, 2021).

Quase nenhum efeito de proteção contra infecção assintomática (4% de eficácia) causada pela variante Omicron foi detectada 20 a 24 semanas após o regime primário de imunização com 2 doses da vacina (ANDREWS *et al.*, 2022).

### 1.5.3 Vacinas de vírus inativados

As vacinas inativadas são produzidas com base em amostras de vírus vivos de pacientes infectados. Este vírus perde sua infectividade pela aplicação de radiação, calor ou compostos específicos químicos, mas a forte imunogenicidade da proteína Spike é mantida (SORACI *et al.*, 2022; WANG, 2023). A tecnologia de vacinas de vírus inativados já é muito bem estabelecida, apresenta baixo custo e é simples de transportar e administrar (XU, 2023). Entretanto, requerem administração de doses de reforço para manter níveis adequados de anticorpos neutralizantes ao longo do tempo (SORACI *et al.*, 2022; WANG, 2023).

#### 1.1.1.3 CoronaVac

Produzida pela Sinovac Biotech e envasada, no Brasil, pelo Instituto Butantan, a CoronaVac é a vacina de vírus inativado mais amplamente aplicada no nosso país segundo o “Vacinômetro COVID-19”, publicado pelo Ministério da Saúde (2024). Ensaios clínicos de fase de fase I/II demonstraram bom perfil de segurança e eficácia contra infecções sintomáticas por SARS-CoV-2, com soroconversão acima de 90% após 2 doses. Foi observada redução na severidade da doença e proteção contra COVID-19 moderada e grave nos pacientes imunizados (WU *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021).

A vacina já passou por estudos clínicos de fase III em diversos países e populações antes da circulação da variante Omicron:

- a) Brasil: eficácia de 50,7% na prevenção de COVID-19 sintomática e de 100% contra casos moderados a graves da doença (PALACIOS *et al.*, 2021).

- b) Chile: dados da vacinação em massa demonstraram eficácia próxima de 65% na prevenção de COVID–19 sintomática, de 87,5% contra hospitalizações e de mais de 80% contra casos de óbito (JARA *et al.*, 2021).
- c) Turquia: eficácia de 83,5% na prevenção de infecções sintomáticas e 100% contra casos graves (TANRIOVER *et al.*, 2021).
- d) Indonésia: eficácia de 65,3% na prevenção de infecções sintomáticas (FADLYANA *et al.*, 2021).

A resposta humoral oferecida pela imunização começa a se enfraquecer com o passar do tempo. Após de 6 meses da administração do regime primário de imunização de 2 doses, XIN *et al.* (2022) detectaram uma queda de 4 vezes nos títulos de anticorpos neutralizantes e ZENG *et al.* (2021) observaram que todos os participantes em seu estudo estavam abaixo do limite de detecção de anticorpos neutralizantes. COSTA *et al.* (2022) observaram queda gradual de anticorpos neutralizantes em participantes após 6 meses e até 1 ano após a imunização. Avaliando à resposta celular, foi detectada reação de células T CD4<sup>+</sup> específicas para SARS-CoV-2, produtoras de IFN- $\gamma$ , principalmente dos perfis CM e EM, com pico de aumento frequência entre 28 e 44 dias (COSTA *et al.*, 2022).

Contudo, Lu *et al.* (2021) apontam que, após aproximadamente 2 meses da administração da primeira dose da vacina, nenhum dos participantes apresentou soroconversão contra a variante Omicron. Ranzani *et al.* (2022) demonstraram que a eficácia da CoronaVac foi de 34% na prevenção contra infeções sintomáticas pela variante Delta e de apenas 8.3% na prevenção contra a Omicron.

#### ***1.5.4 Doses de reforço após o regime de vacinação primária***

A literatura já mostrou, em diversos estudos, os efeitos da administração de doses de reforço homólogas ou heterólogas na proteção de cada regime vacinal contra a COVID–19. Em geral, as evidências apontam superioridade da vacinação heteróloga em aprimorar a resposta imune, apesar da queda de robustez ao longo do tempo ainda ser detectada. O **Quadro 2** a seguir compila alguns dos resultados acerca dos regimes de reforço homólogo *versus* heterólogo:

Reforço Regime Primário	<b>CoronaVac</b>	<b>BNT162b2</b>	<b>ChAdOx1</b>
----------------------------	------------------	-----------------	----------------

CoronaVac	<p>*Aumento de 12x nos títulos de anticorpos IgG anti-Spike após 28 dias da administração do reforço (COSTA CLEMENS <i>et al.</i>, 2022)</p> <p>*Eficácia de 78,8% contra infecção sintomática pelo SARS-CoV-2 e de 86,3% contra hospitalização por COVID-19 (JARA <i>et al.</i>, 2022).</p> <p>Eficácia de 8,6% contra infecção sintomática pelo SARS-CoV-2 e de 73,6% contra COVID grave por até 2 meses após reforço, com queda depois este período (RANZANI <i>et al.</i>, 2022).</p>	<p>*Aumento de 152x nos títulos de anticorpos IgG anti-Spike após 28 dias da administração do reforço (COSTA CLEMENS <i>et al.</i>, 2022).</p> <p>*Eficácia de 96,5% contra infecção sintomática pelo SARS-CoV-2 e de 96,1% contra hospitalização por COVID-19 (JARA <i>et al.</i>, 2022).</p> <p>Eficácia de 56,8% contra infecção sintomática pelo SARS-CoV-2 e de 86% contra COVID grave no período de até 2 meses após reforço (RANZANI <i>et al.</i>, 2022).</p>	<p>*Aumento de 90x nos títulos de anticorpos IgG anti-Spike após 28 dias da administração do reforço (COSTA CLEMENS <i>et al.</i>, 2022)</p> <p>*Eficácia de 93,2% contra infecção sintomática pelo SARS-CoV-2 e de 97,7% contra hospitalização por COVID-19 (JARA <i>et al.</i>, 2022).</p>
BNT162b2	N/A	<p>Eficácia subiu para 67,2% após 2 a 4 semanas e diminuiu para 45,7% depois de 10 semanas (ANDREWS <i>et al.</i>, 2022).</p> <p>Anticorpos são de 3,6 a 6 vezes menos eficientes em neutralizar as subvariantes Omicron BA.1, BA.2 e BA.3, respectivamente, em comparação com a linhagem original de Wuhan (KURHADE <i>et al.</i>, 2022).</p> <p>Eficácia cai mensalmente: 53,4% após 4 semanas a 16,5% após 16 semanas do reforço (PATALON <i>et al.</i>, 2022).</p> <p>Aumento da resposta transitória de anticorpos e de células Efetoras, sem grandes efeitos na resposta de células de memória (REINSCHIEDL <i>et al.</i>, 2022; RODDA <i>et al.</i>, 2022).</p>	<p>*Títulos de anticorpos anti-Spike foram de 2 a 3 vezes menores no regime heterólogo (BNT/AZD) em comparação com regime homólogo (BNT/BNT) após 5 semanas da aplicação do reforço (LIU, Yihao. <i>et al.</i>, 2022).</p>
ChAdOx1	N/A	<p>Eficácia subiu para 62,4% após 2 a 4 semana e diminuiu para 39,6% após 10 semanas ou mais (ANDREWS <i>et al.</i>, 2022).</p> <p>*Títulos de IgM e IgG aumentaram 134 vezes após 2 semanas após o reforço. Não houve aumento na reatividade de células T (GROß <i>et al.</i>, 2022).</p> <p>*Maior proporção de células CD4+ produzindo 3 citocinas, seguida da combinação IFN-<math>\gamma</math>+TNF+ e apenas TNF. Para células CD8+, a predominância</p>	<p>Eficácia subiu para 55,6% após 2 a 4 semanas e diminuiu para 46,7% após 5 a 9 semanas (ANDREWS <i>et al.</i>, 2022).</p> <p>*Maior proporção de células CD4+ produzindo IL-2+IFN-<math>\gamma</math>+TNF+, seguida da combinação IL-2+TNF+ e pela combinação de IFN-<math>\gamma</math>+TNF+. Para células CD8+, a predominância foi de produção de IFN-<math>\gamma</math>+TNF+, seguida por</p>

		foi de produção de IFN- $\gamma$ +TNF+, seguida por apenas IFN- $\gamma$ . (SCHMIDT <i>et al.</i> , 2021).	apenas IFN- $\gamma$ . (SCHMIDT <i>et al.</i> , 2021).
--	--	--	--

**Quadro 2 – Efeito da administração de dose de reforço nos esquemas de vacinação homólogo e heterólogo contra o vírus SARS-CoV-2.** O reflexo de cada dose de reforço vacinal aplicada após o esquema primário de vacinação de duas doses de cada vacina amplamente distribuída no Brasil. Fonte: elaborado pela autora, 2024. Nota: \* Estudos realizados antes da detecção prevalente da variante Omicron na região analisada.

## 1.6 A vacina SpiN-Tec MCTI UFMG

Considerando-se que:

- Variantes Omicron são atualmente dominantes no mundo inteiro;
- Dados genômicos mostram uma tendência de variação no alvo principal dos anticorpos neutralizantes;
- Futuras variantes escaparão ainda mais aos anticorpos neutralizantes induzidos pelas vacinas atuais (SORACI *et al.*, 2022);
- A imunidade induzida pelas vacinas atuais cai com o tempo e é recuperada pela administração de doses de reforço;

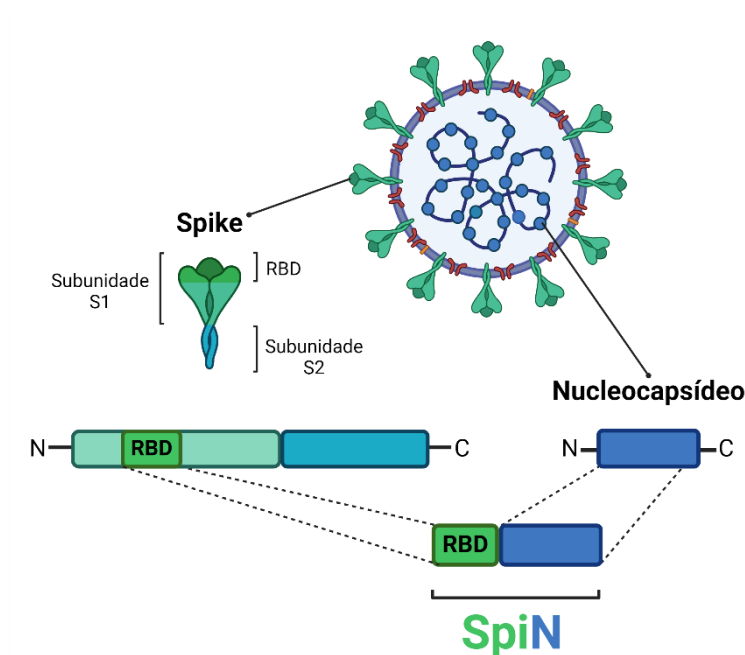
A tendência é que o alvo das novas vacinas seja a indução de resposta de linfócitos T, e não primariamente de anticorpos neutralizantes, e que a imunidade seja reforçada anualmente pela administração de doses de reforço, especialmente sob regime heterólogo;

Além disso, inúmeros pesquisadores sugerem que novas vacinas tragam alvos vacinais diferentes em suas formulações, associando a proteína N à proteína Spike para aumentar a diversidade de epítomos altamente imunogênicos apresentados pela imunização (SORACI *et al.*, 2022; KIM; THAPA, 2023). Costa *et al.* (2022), em estudo que avalia a imunidade humoral e celular gerada pela CoronaVac após um ano, ressalta que células T CD4<sup>+</sup> podem ter como alvo diferentes epítomos do SARS-CoV-2 e sugerem que a presença de antígenos adicionais permitiria imitar melhor a resposta observada em pacientes naturalmente infectados.

Dado este contexto, a equipe do CT Vacinas propôs o desenvolvimento de uma vacina produzida inteiramente com recursos nacionais, cujo antígeno é a proteína recombinante SpiN.

### 1.6.1 A proteína SpiN

A proteína SpiN, representada na **Figura 5**, é uma proteína quimérica recombinante, que associa a porção RBD da proteína Spike desenovelada e a sequência completa da proteína N. A proteína não possui aminoácidos adicionais aos da própria sequência quimérica, sendo purificada por cromatografia de troca iônica (Castro *et al.*, 2022).



**Figura 5 – A estrutura do SARS-CoV-2 e da proteína SpiN.** Esquema representativo do vírion do SARS-CoV-2 e a estrutura de suas proteínas – destaque para as proteínas do Nucleocapsídeo e Spike. Representação da formação da proteína quimera SpiN pela associação entre a região RBD da proteína Spike e a seqüência completa da proteína N. Fonte: elaborado pela autora em BioRender.com (2024).

O sistema de expressão utilizado foi otimizado para obtenção da proteína em lisados totais da bactéria *Escherichia coli*. Este é um sistema simples e de baixo custo, que apresenta alto nível de expressão e rendimento em curto espaço de tempo (Castro *et al.*, 2022).

### 1.6.2 Dados Pré-Clínicos

Castro *et al.* (2022) verificaram a imunogenicidade, segurança, estabilidade e eficácia da proteína SpiN como imunizante em roedores. Camundongos K180-ACE-2, que sevem como modelo de doença grave para a infecção por SARS-CoV-2, foram imunizados com 2 doses da proteína SpiN adjuvantada por Poly ICLC. Amostras de esplenócitos dos camundongos imunizados, mediante estímulo por RBD ou N, apresentaram resposta específica de linfócitos T de perfil Th1, com produção de IFN- $\gamma$ . Houve expansão, principalmente, de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> nos compartimentos de memória efetora e de memória central. A

resposta observada nos pulmões foi de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de memória residentes, com produção de IFN- $\gamma$  e TNF. Estes animais produziram altos títulos de anticorpos específicos contra a proteína N, contra a porção RBD da proteína S e contra o vírus inativado (linhagem de Wuhan), em contraste com as baixas quantidades destes anticorpos no soro de indivíduos convalescentes. Entretanto, não foram detectados anticorpos neutralizantes nos roedores imunizados

Mediante desafio com a linhagem de Wuhan do vírus, os títulos de RNA viral detectados por RT-PCR nos pulmões e cérebros de animais imunizados foram menores em comparação com animais não imunizados. O mesmo foi observado em análises histopatológicas dos pulmões, em que se observou preservação da arquitetura dos tecidos no primeiro grupo e pneumonia intersticial difusa no segundo. Os camundongos imunizados demonstraram proteção contra perda de peso e outros sinais clínicos característicos da doença em roedores. A proteção também foi observada mediante desafio com as variantes Delta e Omicron. O índice de sobrevivência dos animais imunizados desafiados tanto a variante com Delta quanto com Omicron foi de 100%, com redução de até 16x nos títulos de mRNA viral nos tecidos e arquitetura preservada nos pulmões quando comparada com animais não imunizados. Estes resultados confirmam que a proteção oferecida pela proteína SpiN, como imunizante, é mediada por resposta de linfócitos T e não por anticorpos neutralizantes.

### **1.6.3 CTVad1**

O adjuvante imunológico CTVad1 consiste em uma nanoemulsão óleo-água (o/a) à base de esqualeno, similar ao MF59® e ao AddaVax®, já utilizados em várias vacinas comerciais. Este adjuvante é produzido em condições BPL (boas práticas de laboratório), por homogeneização de alta pressão com filtração esterilizante (DIAS ASSIS *et al.*, 2023). A composição de CTVad1 é: 0.5% de trioleato de sorbitano 85 (agente estabilizante), 4.3% de esqualeno, 0.5% de polissorbato 80 e 94.7% de tampão citrato de sódio 10mM em pH 6,0. Sua estabilidade já foi confirmada por pelo menos 17 meses quando armazenada em ampola de vidro transparente de tipo I a  $5 \pm 3$  °C (DIAS ASSIS *et al.*, 2023).

A manutenção da integridade e antigenicidade da proteína SpiN quando associada ao CTVad1 foi avaliada em estudos *in vitro* e *in vivo*. A integridade foi verificada pela comparação das bandas observadas em eletroforese de gel originadas pela formulação SpiN-CTVad1 e uma solução de 20% da proteína SpiN isoladamente. O valor teórico para a massa molecular foi obtido a partir da sequência de aminoácidos da proteína quimérica (68,22kDa). A banda de

68kDa correspondente foi detectada na formulação contendo CTVad1 durante os 30 dias de avaliação a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$  (DIAS ASSIS *et al.*, 2023).

Para demonstrar a manutenção da antigenicidade da formulação SpiN-CTVad1, foram executados ensaios de ELISA utilizando anticorpos anti-S e anti-N. A proteína SpiN foi reconhecida por ambos os anticorpos durante intervalo de tempo avaliado de 30 dias, sem diferenças significativas no reconhecimento avaliado no dia 0 em comparação com o dia 30 ( $p > 0,05$ ) confirmando que a antigenicidade da proteína permaneceu semelhante (DIAS ASSIS *et al.*, 2023).

Os testes *in vivo* foram realizados em camundongos imunizados com duas doses de SpiN-CTVad1, SpiN-AddaVax (utilizado como controle) ou CTVad1 (utilizado como placebo) no intervalo de 21 dias. Amostras de sangue dos animais foram coletadas após 15 dias da administração da primeira dose e após 30 dias da administração da segunda dose. Os camundongos foram eutanasiados após a coleta da segunda amostra. Os anticorpos anti-N, anti-RBD e anti-SpiN foram quantificados por ELISA nas amostras de sangue e a produção de IFN- $\gamma$  foi dosada por ELISA em esplenócitos estimulados pela porção RBD da proteína S e pela proteína N do SARS-CoV-2 por 72h. A administração intramuscular de SpiN adjuvantada com CTVad1 levou à produção de altos títulos dos 3 anticorpos e IFN- $\gamma$ . As respostas celulares e humorais contra a proteína SpiN associada ao CTVad1 e associada ao AddaVax foram comparadas e não foi detectada diferença estatística entre os grupos (DIAS ASSIS *et al.*, 2023).

#### **1.6.4 Justificativa**

Considerando o número de epítomos potenciais de células T encontrados na proteína N, somados aos encontrados na região RBD da proteína S, espera-se que a imunização com SpiN provoque um repertório diverso de células T. Essa diversidade é central para a eficácia da imunidade celular e altamente relevante para contornar a plasticidade do SARS-CoV-2.

Para manter a imunidade da população em cenário de endemia, a dependência de compra e importação de vacinas para aplicação anual de dose de reforço oferece alguns obstáculos, como atrasos na entrega de insumos farmacêuticos ativos (IFA) pelos países fornecedores e o custo elevado das vacinas de mRNA em comparação com outras opções disponíveis. Além disso, existem desafios logísticos na aquisição e distribuição das vacinas estrangeiras.

A estratégia de desenvolver capacidades nacionais de produção se torna crucial para garantir acesso simplificado e a menor custo a vacinas que podem ser atualizadas conforme a evolução do agente etiológico. A capacidade nacional de produção traz benefícios não só para

a manutenção da resposta contra a COVID-19, mas permite que o Brasil reaja rápido e eficientemente em novos surtos que podem surgir a qualquer momento.

A vacina SpiN-Tec MCTI UFMG, desenvolvida para ser produzida localmente, apresenta vantagens como custo reduzido e simplicidade de produção, sendo uma alternativa viável para a manutenção de um programa nacional de vacinação. Além disso, utiliza tecnologias com maior viabilidade de implantação no país e busca melhorar a imunidade contra a COVID-19 por associar a sequência completa da proteína N à região RBD da proteína Spike do SARS-CoV-2. A estratégia de unir as sequências em uma única molécula otimiza, simplifica, reduz tempo e custo do processo, quando comparada a produção individual de cada sequência separadamente (Castro *et al.*, 2022).

A avaliação da resposta imune celular gerada pela imunização com SpiN-Tec MCTI UFMG essencial para verificar o sucesso da ativação de linfócitos T, o tipo de resposta induzida e, por tanto, apoiar (juntamente com outras análises avaliando a imunidade humoral) a caracterização do produto investigacional como uma alternativa eficaz e imunogênica na vacinação heteróloga contra a COVID-19.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a frequência e o fenótipo de linfócitos T CD3<sup>+</sup> em resposta a estímulos antigênicos específicos antes da vacinação e nos dias 14 e 28 após o reforço vacinal com a vacina SpiN-Tec MCTI UFMG em relação a uma dose do imunizante CoronaVac (empregado como comparador ativo).

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a expressão dos marcadores de ativação CD69, CD134, CD137, CD154 na superfície de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) estimulados com antígenos de SARS-CoV-2 (proteínas N e S) ou com a proteína SpiN;
- b) Avaliar a expressão das citocinas IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF em PBMC estimulados com antígenos de SARS-CoV-2 (proteínas N e S) ou com a proteína SpiN;
- c) Avaliar a produção das citocinas ao longo do período de observação (nos pontos V14 e V28) por grupo experimental;
- d) Avaliar o potencial da proteína SpiN como estímulo imune em comparação com as proteínas N e S individualmente;
- e) Investigar, dentro do conjunto de PMBC, quais subpopulações de células T estão produzindo as citocinas na resposta imune induzida por SpiN-Tec.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Aprovação pelo Comitê de Ética

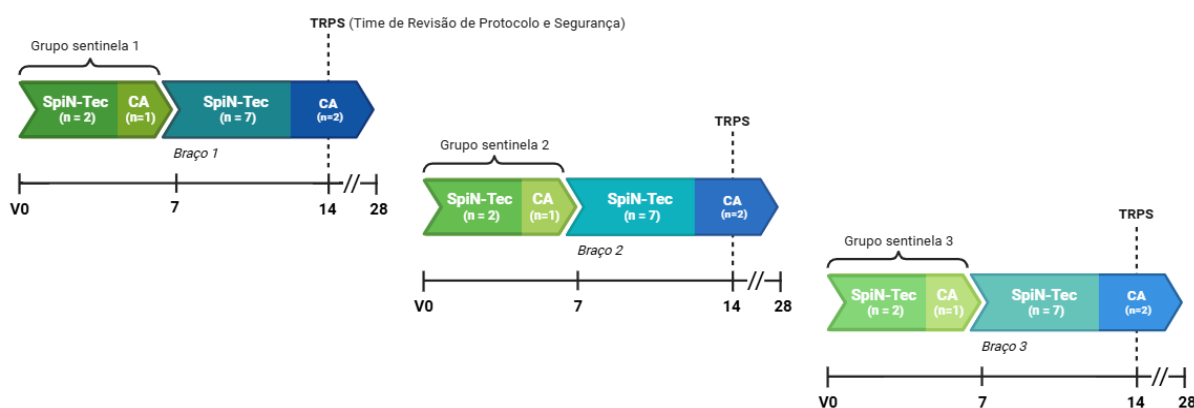
A solicitação para o desenvolvimento dos experimentos fazendo uso de amostras humanas foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e aprovadas sob o CAAE N.º 59871822.1.1001.5149 para as amostras dos participantes enrolados no ensaio clínico que avalia a vacina SpiN-Tec MCTI UFMG e sob o CAAE N.º 24832513.4.0000.5149 para as amostras empregadas como controle

#### 3.2 Participantes da pesquisa

No ensaio clínico, previamente ao recebimento das vacinas, foram arrolados participantes de ambos os sexos, na faixa etária de 18 a 54 anos, saudáveis e sem histórico de infecção natural pelo SARS-CoV-2, que tenham recebido esquema vacinal completo com CoronaVac e uma dose de reforço com a vacina Pfizer-BioNTech entre 9 e 15 meses da inclusão no estudo (estatísticas acerca dos pacientes incluídas na **Tabela 1**). Todos os participantes consentiram com o estudo e seus procedimentos, documentado pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

#### 3.3 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo de fase 1, duplo-cego, randomizado, com a vacina CoronaVac empregada como comparador ativo, de dose escalonada para verificar segurança e imunogenicidade de diferentes doses do produto investigacional, a SpiN-Tec MCTI UFMG. O estudo teve 3 braços, conforme esquema e descrição apresentados na **Figura 6** abaixo:



**Figura 6 – Desenho do Ensaio Clínico.** Esquema representativo do Ensaio Clínico que investiga a SpiN-Tec MCTI UFMG vs Comparador Ativo (CA). As vacinas foram administradas em três doses (braços) com 12 pacientes cada. Os três primeiros pacientes imunizados foram designados como o grupo sentinela (referente a cada braço), observados por um período de 7 dias para verificar a não ocorrência de critérios de suspensão do ensaio, antes de prosseguir-se com a vacinação dos demais participantes do respectivo braço. Ao final da execução do braço 1, o Time de Revisão de Protocolo e Segurança (TRPS) avaliou os efeitos adversos observados e autorizou o avanço para a próxima etapa do ensaio, procedimento repetido ao final do braço 2. Fonte: elaborado pela autora em BioRender.com (2024). Disponível em <<https://BioRender.com/r57z763>>.

a) Braço 1: 20 µg de SpiN-Tec MCTI UFMG (n = 9) ou comparador ativo (n = 3).

Os 3 primeiros indivíduos recrutados em cada braço constituíram o grupo sentinela: 2 receberam o produto investigacional e 1 recebeu o comparador ativo, randomizados de forma cega. Passados 7 dias, os eventos adversos (EAs) verificados na coorte sentinela foram avaliados por um Time de Revisão de Protocolo e Segurança (TRPS) e, mediante a não observação de nenhum critério de suspensão do estudo, a imunização dos demais participantes deste braço foi autorizada. Após 14 dias de acompanhamento de todos os indivíduos do braço, uma nova análise cega de segurança foi realizada pelo TRPS e foi tomada a decisão de escalonamento da dose.

b) Braço 2: 60 µg de SpiN-Tec MCTI UFMG (n = 9) ou comparador ativo (n = 3).

Foram tomados os mesmos protocolos de observação da coorte sentinela referente ao braço 2 e avaliações de segurança pelo TRPS para continuação do estudo, conforme descrito acima.

c) Braço 3: 100 µg de SpiN-Tec MCTI UFMG (n = 9) ou comparador ativo (n = 3).

A randomização do Ensaio Clínico foi feita com auxílio de um código aleatório, gerado pela Plataforma de Pesquisa Clínica e disponibilizado ao gerente de vacinação do estudo por meio de um *software* de alocação. A lista de randomização de participantes do centro foi armazenada em um armário trancado, com acesso restrito a funcionários fora do cegamento – o gerente de vacinação e seu assistente, que não tiveram acesso aos nomes dos participantes e não estavam envolvidos na administração das vacinas e avaliações adicionais dos participantes do estudo ou avaliações de eventos adversos.

Os pesquisadores e os participantes foram cegos para a atribuição aleatória do produto investigacional ou comparador ativo dentro de cada braço. Os procedimentos empregados para manter o estudo cego incluíram mascarar as injeções com fitas opacas e manter a alocação dos participantes em envelopes lacrados, contendo o código do participante como um identificador (ID). Dado que houve uma variação no volume do produto investigacional a ser administrado, a equipe não cega preparou as doses das vacinas a serem administradas e também administrou

as injeções em uma sala separada da equipe cega, para evitar possivelmente comprometer a natureza cega do estudo.

Em adição aos grupos experimentais já descritos, foram incluídas nove amostras de indivíduos saudáveis coletadas em 2018 (grupo pré-pandêmico ou PP), antes do início da pandemia de COVID-19. Dada a constituição dos participantes do grupo PP, as amostras para o grupo são únicas (cujo tempo foi denominado também de PP), diferentemente das amostras dos participantes do estudo, que apresentam triplicata de amostras, coletadas nos dias V0, V14 e V28 do período observacional:

### 3.4 Obtenção das amostras de PBMC

Foi realizada coleta de aproximadamente 27 mL de sangue total em heparina de cada participante em 3 momentos ao longo do período de observação: antes da administração das vacinas no dia da visita da vacinação (V0) e após 14 e 28 dias da aplicação da primeira dose (V14 e V28, respectivamente). As amostras de sangue total em heparina foram centrifugadas a 500 x g por 10 minutos a 20 °C. O plasma foi removido e armazenado para outros ensaios. As células foram vertidas em um tubo de fundo cônico de 50 mL onde adicionou-se solução salina tamponada com fosfato (PBS) para um volume final de 30 mL e o tubo foi homogeneizado por inversão.

A suspensão de sangue/PBS foi cuidadosamente vertida em 13 mL de Ficoll Paque plus (GE-Healthcare) e centrifugada a 400 x g por 40 min à 20 °C. O sobrenadante presente acima do anel de células foi aspirado e descartado. As PBMC foram transferidas para um novo tubo onde completou-se o volume final para 40 mL de PBS. A seguir, a amostra foi submetida a uma etapa de lavagem por centrifugação a 300 x g por 20 minutos à 20 °C. Uma vez formado o sedimento no fundo do tubo, o sobrenadante foi descartado por inversão e o *pellet* foi ressuspenso em 40 mL de PBS. Repetiu-se a etapa de lavagem, com centrifugação a 500 xg por 8 minutos a 20 °C. Ao final do processamento, o sobrenadante foi descartado por inversão e o *pellet* celular foi ressuspenso em 800 µL de meio RPMI completo contendo soro fetal bovino (SFB) a 10%, estreptomicina 100 mg/ mL, penicilina 100 U/ mL. As amostras, de volume final de aproximadamente 1 mL, foram mantidas no gelo. Uma alíquota de 10 µL foi utilizada para aferir a viabilidade celular, usando azul de tripan, e a contagem celular usando o contador de células automático Countess 3 (Thermo Fischer Scientific).

Após a contagem, as PBMC foram ressuspendidas em soro fetal bovino em volume suficiente para ajustar a concentração celular para 10 milhões de células por mL. A seguir, foi

adicionado um volume igual de meio de congelamento 2x (SFB, 20% de DMSO). As alíquotas contendo  $5 \times 10^6$  células foram transferidas para um recipiente de congelamento lento (Mr Frosty, Thermo Fischer Scientific) e mantidas em freezer  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  por pelo menos 24 horas antes de serem transferidas para o nitrogênio líquido.

### **3.4.1 Descongelamento de PMBC**

Os criotubos de PBMC, armazenados em nitrogênio líquido ou gelo até o início do manuseio, foram submergidos em banho-maria a  $37^\circ$ . Logo que começaram a descongelar, os tubos foram retirados e seu conteúdo foi vertido em tubos de fundo cônico identificados, contendo 10 mL de meio RPMI sem SFB e com 1  $\mu\text{L}$  de Benzonase nuclease. Foi realizada homogeneização dos tubos por inversão 5 vezes e centrifugação por  $860 \times g$  durante 5 minutos a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi desfeito com auxílio de uma pipeta. Seguiu-se uma etapa de lavagem, pela ressuspensão do conteúdo em 1000  $\mu\text{L}$  de RPMI incompleto e centrifugação. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 500  $\mu\text{L}$  de RPMI completo – volume calculado para 3 poços de estímulos e 1 Controle Negativo não estimulado (CN) por amostra. Algumas amostras foram ressuspensionadas em volume extra para servir como Controle Positivo ( $C^+$ ) do experimento. Após a distribuição das células em placas de 96 poços de fundo em “U”, as células foram incubadas por 5h a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  (período de descanso).

Após o período de descanso, cada amostra foi estimulada com 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína N, S ou SpiN. Nos controles negativos nada foi adicionado enquanto que o controle positivo consistiu da adição de anti-CD3 e anti-CD28, nas concentrações de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. As células foram incubadas a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$  por 12 horas quando foi então adicionado em todos os poços 10 $\mu\text{L}$  de uma solução contendo Brefeldina A (Golgi Plug, BD, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e Monensina (Golgi stop, BD, 3 $\mu\text{M}$ ). A placa foi mantida na estufa por mais 6 horas quando foi iniciado o protocolo de marcação para imunofenotipagem.

### **3.5 Padronização do painel de Citometria de Fluxo**

Para imunofenotipagem de linfócitos por citometria de fluxo, adaptamos e padronizamos uma versão adaptada do painel proposto por Liechti e Roederer (2019) contendo os anticorpos conjugados a fluoróforos representados no **Quadro 3**:

Reagente	Fluoróforos	Clone	Marcação	Função
CD69	BV421	FN50	Intracelular	Ativação de célula T
LIVE/DEAD	BV510	N/A	Extracelular	Viabilidade celular
CD4	BV605	RPA-T4	Extracelular	Sublinhagem de célula T
CD137/4-1BB	BV650	4B4-1	Extracelular	Ativação de célula T
CD45RO	BV786	UCHL1	Extracelular	Fenotipagem de célula T de memória
CD134/OX40	FITC	ACT35	Extracelular	Ativação de célula T
IL-2	PE	MQ1-17H12	Intracelular	Citocina pró-inflamatória
CD154/CD40L	PE-dazzle594	24-31	Intracelular	Ativação de célula T
CD3	PerCP	SP34-2	Intracelular	Marcador da linhagem linfocítica
IFN- $\gamma$	PE-Cy7	4SB3	Intracelular	Citocina pró-inflamatória
TNF	APC	MAb11	Intracelular	Citocina pró-inflamatória
CD8	AF700	SK1	Extracelular	Sublinhagem de célula T
CD197/CCR7	APC-Cy7	G043H7	Extracelular	Fenotipagem de célula T de memória

**Quadro 3 – Painel de citometria de fluxo empregado no estudo.** Fonte: elaborado pela autora (2024).

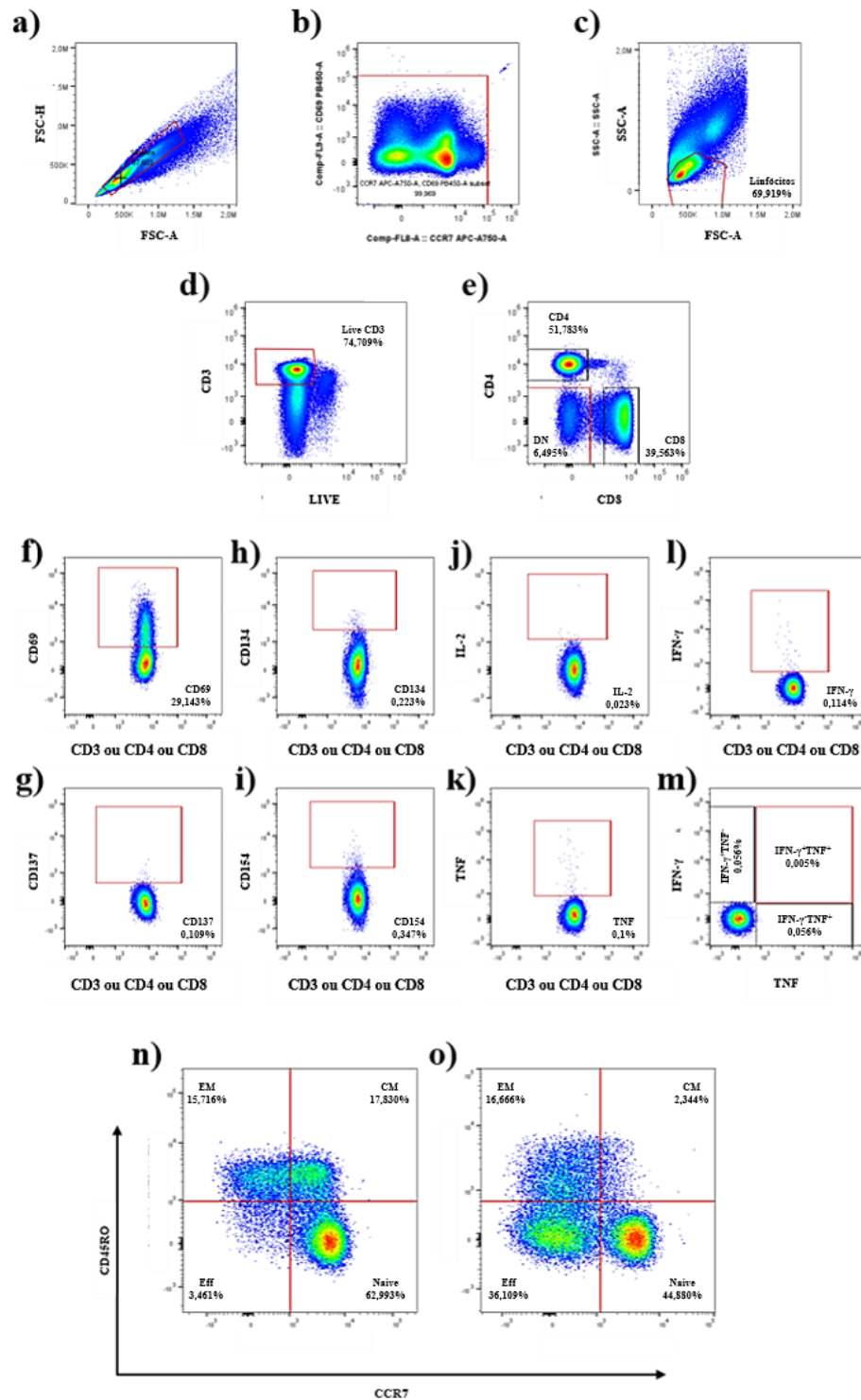
A concentração ótima de uso dos anticorpos foi definida por diluição seriada de cada marcador, bem como as condições de marcação (intra ou extracelular).

### 3.6 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

As placas foram centrifugadas a 860 x g por 5 minutos e as células foram lavadas com 250  $\mu$ L de PBS por duas vezes. As células foram ressuspensas em 100 $\mu$ L da solução contendo um marcador de viabilidade celular (LIVE/DEAD, Thermo Fischer Scientific) diluída 1:1000 em PBS e os poços foram homogeneizados. A placa foi envolvida em papel alumínio e foi incubada a temperatura ambiente (TA) durante 10 minutos. Após a incubação, foram adicionados 150 $\mu$ L de FACS a cada poço e a placa foi lavada novamente. A seguir foi adicionado ao sedimento celular 50  $\mu$ L do mix de marcação de superfície, contendo os anticorpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD197, anti-CD45RO, anti-CD134 e anti-CD137, diluídos em tampão FACS (PBS, 2% de SFB). A marcação extracelular foi feita por um período de 20 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz. A seguir foi adicionado 200 $\mu$ L de tampão FACS e as células foram centrifugadas a 860 x g por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos celulares foram ressuspensos em 100  $\mu$ L do tampão de fixação (Fix/Perm, eBioscience Fc $\gamma$ 3, Thermo Fischer Scientific) a cada poço, homogeneizado cuidadosamente com auxílio de pipeta. A placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz.

Ao final destes 30 minutos, foram adicionados 150  $\mu$ L do tampão de lavagem (*Perm/Wash*, eBioscience Foxp3, Thermo Fischer Scientific) a cada poço, e a placa foi lavada por centrifugação a 860 x g por 4 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 50  $\mu$ L do mix de anticorpos de marcação intracelular, contendo os anticorpos anti-CD3, anti-IFN- $\gamma$ , anti-TNF, anti-IL-2, anti-CD69 e anti-CD154 em cada poço. A placa passou por mais 30 minutos de incubação à TA. Se seguiram duas etapas de lavagem: foram adicionados 250 $\mu$ L de *Perm/Wash* na primeira e 200 $\mu$ L na segunda, na mesma configuração de centrífuga utilizada até aqui. Por fim, as células foram ressuspensas em 200 $\mu$ L de FACS *buffer*, os poços foram homogeneizados e a placa foi armazenada em geladeira, envolta em papel alumínio, até o momento da aquisição (idealmente, realizada no mesmo dia ou na manhã seguinte).

A aquisição do painel foi realizada em citômetro de fluxo DxFlex (Beckman Coulter) com aquisição mínima de 100.000 eventos no *gate* de linfócitos CD3<sup>+</sup>. Para o cálculo da compensação, foram utilizadas *beads* marcadas com os anticorpos de fluorescência usados no painel – exceto pelo marcador de viabilidade, cujo controle foi realizado com células mortas por aquecimento a 70 °C por 5 minutos.



**Figura 7 – Esquema representativo da estratégia de *gating* utilizada.** Os passos da estratégia de *gating* estão representados em ordem hierárquica: a) *singlets*; b) remoção de eventos super fluorescentes; c) linfócitos; d) células CD3<sup>+</sup>LIVE/DEAD<sup>-</sup>; e) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>; f) CD69<sup>+</sup>; g) CD137<sup>+</sup>; h) CD134<sup>+</sup>; i) CD154<sup>+</sup>; j) IL-2<sup>+</sup>; k) TNF<sup>+</sup>; l) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>; m) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>TNF<sup>-</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>TNF<sup>+</sup> (dentro de CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>); n) CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>, CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>, CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>, CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> dentro de CD4<sup>+</sup>; o) CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>, CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>, CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>, CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> dentro de CD8<sup>+</sup>. Fonte: elaborado pela autora, 2024.

A estratégia de *gating* (**Figura 7**) foi iniciada pela seleção de a) *singlets* (células que passaram individualmente pelo leitor) utilizando dos parâmetros FSC–H no eixo y e FSC–A no eixo x. A partir de *singlets*, b) foram removidos eventos super fluorescentes em cada um dos canais de interesse. A seguir, c) os linfócitos foram delimitados por tamanho e complexidade citoplasmática, utilizando os parâmetros SSC–A e FSC–A. Dentro da população de linfócitos, d) as células CD3<sup>+</sup>LIVE/DEAD<sup>-</sup> foram selecionadas e e) segregadas em três populações, definidas pela expressão de CD4 e CD8: CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (doravante chamadas de CD4<sup>+</sup>), CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (doravante chamadas de CD8<sup>+</sup>) e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (doravante chamadas de DN ou duplo–negativas).

A seleção dos eventos positivos para cada marcador foi realizada dentro de cada população. Ex: o *gate* de células positivas para f) CD69 foi delimitado no plano y = CD69 e x = CD4 ou CD8 ou CD3 (para as células DN).

As populações de memória em n) CD4<sup>+</sup> e o) CD8<sup>+</sup> foram definidas pela expressão de CD45RO e CCR7. Os linfócitos foram divididos em quadrantes de acordo com as seguintes combinações de marcadores, segundo modelo proposto por Mahnke et al. (2013):

- a) Células naïve (CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>), que não passaram por ativação cognata via TCR e são direcionadas aos órgãos linfóides secundários (linfonodos), onde podem encontrar células apresentadoras de antígeno, passando por ativação e por diferenciação.
- b) Células de memória central (CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), que podem se direcionar para os linfonodos, produzem títulos baixos de citocinas efetoras, como IFN- $\gamma$ .
- c) Células de memória efetora (CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>), que possuem rápida função efetora e podem se direcionar aos tecidos periféricos, produzem títulos altos de IFN- $\gamma$  e TNF.
- d) Células efetoras terminais ou efetoras (CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>), que já passaram por ativação, mas não possuem fenótipo de memória. Não são direcionadas aos linfonodos e possuem funções efetoras.

### 3.6.1 Análise estatística

A análise dos dados de intensidade de fluorescência dos marcadores e de frequência de populações celulares foi realizada pelo *software* FlowJov10.10.0 (BD Biosciences) e as análises estatísticas em RStudio (R v. 4.3.1). A frequência da população de células positivas para cada marcador (em relação ao total de células ou eventos capturados), sem adição de estímulo ao PBMC, foi definido como o background de expressão basal do marcador por amostra. Da mesma forma, sob as diferentes condições de estímulo, foi calculada a frequência da população

positiva, por marcador, em cada amostra. Com o objetivo de avaliar o efeito da adição de cada estímulo sobre expressão dos marcadores, o background da expressão basal de cada um deles, representado pela frequência de células positivas da amostra CN, foi subtraído do valor da frequência de células positivas da amostra estimulada. Assim, foi calculado um novo valor de frequência  $\Delta$  (delta) para cada marcador, por amostra, nas três condições experimentais.

Exemplo: amostra “export\_101-V14-1\_CD4.fcs” é a amostra do paciente 101, no tempo V14, sob a condição de estímulo 1 = CN e teve frequência de células CD69<sup>+</sup> de 11,588% (background da expressão basal); amostra “export\_101-V14-4\_CD4.fcs” é a amostra do paciente 101, no tempo V14, sob a condição de estímulo 4 = SpiN e teve frequência de células CD69<sup>+</sup> de 9,658%. Cálculo do valor de  $\Delta$ :

$\Delta(\text{CD69}_{\text{V14}})\text{SpiN} = (\text{CD69}_{\text{V14}})\text{SpiN} - (\text{CD69}_{\text{V14}})\text{CN}$  ou  $\Delta(\text{CD69}_{\text{V14}})\text{SpiN} = -1,93\%$  indicando que a adição de SpiN como estímulo a essa amostra causou uma diminuição na frequência de células positivas para CD69. Entretanto, não seria correto utilizar-se para cálculos uma frequência negativa de células CD69<sup>+</sup>. Por isso, para efeito de cálculo estatístico, valores de frequência  $\Delta \leq$  zero foram substituídos pelo valor de LLOQ (*lower limit of quantification*, a menor concentração do analito que pode ser quantificada com confiabilidade de precisão e exatidão) calculado para o ensaio segundo o cálculo apresentado por Cossarizza et al. (2021, p. 2742), equivalente à frequência de 0,0001% de células positivas para determinado marcador.

As comparações entre os grupos foram realizadas usando testes estatísticos de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunn com correção de Bonferroni para mais de 2 variáveis ou teste de Wilcoxon para 2 variáveis. A significância estatística foi definida como valores de p ou p ajustado  $\leq 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características da população de estudo e do desenho experimental

A análise realizada neste trabalho se baseia na determinação de 5 grupos experimentais: 3 grupos que receberam doses escalonadas de SpiN-Tec, 1 grupo que recebeu CoronaVac como comparador ativo e 1 grupo controle Pré-Pandêmico (PP). O grupo PP foi composto por amostras coletadas antes do início da pandemia e, portanto, sabidamente livres da exposição aos antígenos do vírus SARS-CoV-2. As características de idade e gênero da população de estudo, divididas por grupo, estão indicadas na **Tabela 1**:

Variáveis	Níveis	Tratamentos				
		Controle PP (n=9)	CoronaVac (n=9)	SpiN-Tec 20 µg (n=9)	SpiN-Tec 60 µg (n=9)	SpiN-Tec 100 µg (n=9)
Idade	18–26	3 (33,3%)	7 (77,8%)	2 (22,2%)	3 (33,3%)	6 (66,7%)
	27–55	5 (55,6%)	2 (22,2%)	7 (77,8%)	6 (66,7%)	3 (33,3%)
	Sem dados	1 (11,1%)	–	–	–	–
Gênero	Feminino	6 (66,7%)	3 (33,3%)	7 (77,8%)	6 (66,7%)	3 (33,3%)
	Masculino	2 (22,2%)	6 (66,7%)	2 (22,2%)	3 (33,3%)	6 (66,7%)
	Sem dados	1 (11,1%)	–	–	–	–

**Tabela 1 – Frequência absoluta e relativa das características demográficas de linha de base dos participantes por grupo de tratamento.** Fonte: relatório de análise interina do Ensaio Clínico da vacina SpiN-Tec MCTI UFMG (confidencial), elaborado pelo Time de Revisão de Protocolo e Segurança.

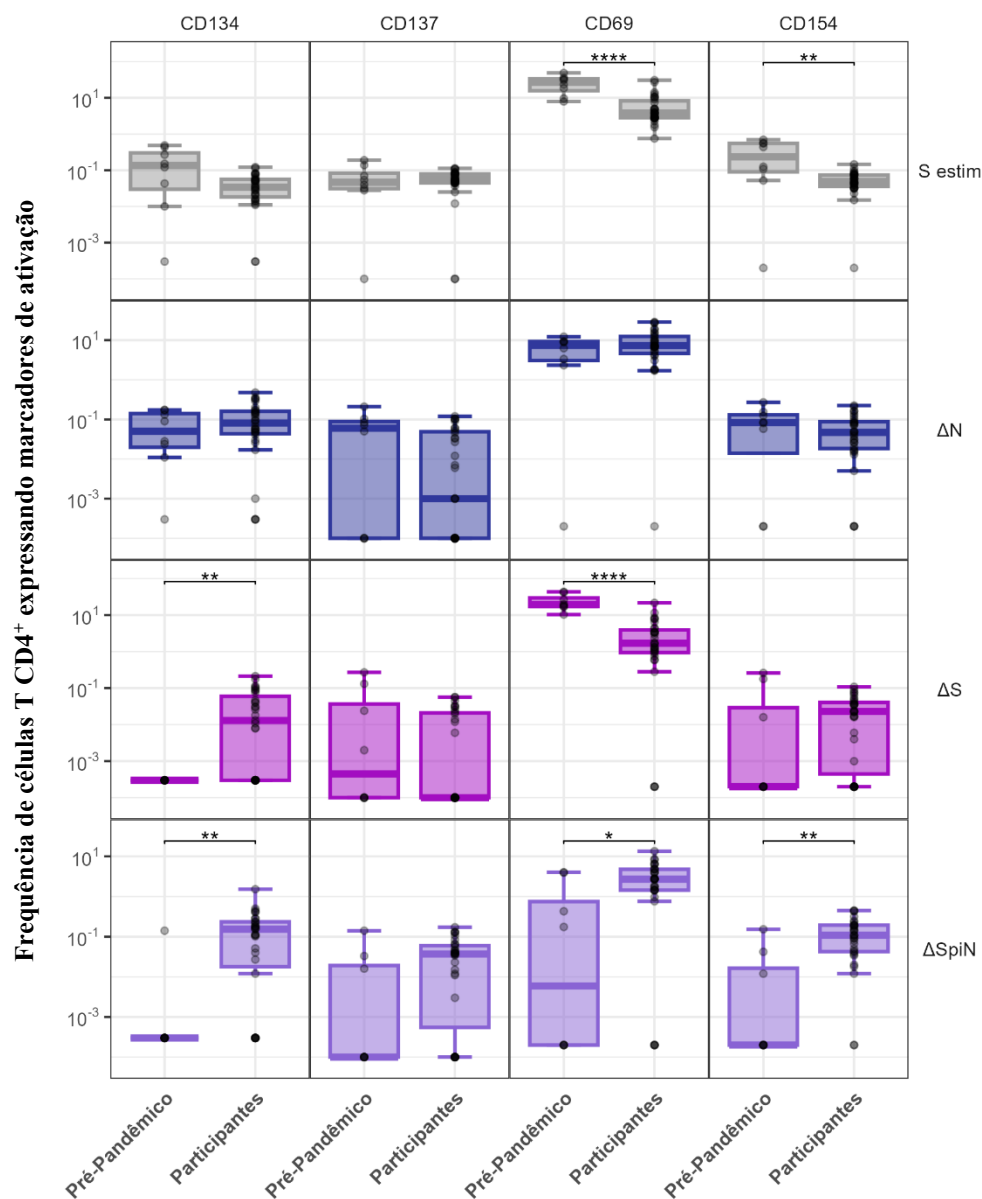
Alguns participantes não foram incluídos na análise estatística por entrarem nos critérios de exclusão: no grupo que recebeu SpiN-Tec 20 µg, tivemos 1 caso de Herpes Zóster no dia 5 após a vacinação e 2 casos de COVID entre V0 e V14; no grupo que recebeu SpiN-Tec 60µg, tivemos 1 caso de gravidez e 1 caso de COVID entre V14 e V28; no grupo que recebeu SpiN-Tec 100µg/ mL, tivemos 1 caso de Apendicite nos 17 dias após a vacinação e 1 caso de COVID entre V14 e V28.

De forma geral, os grupos não apresentaram diferenças entre si. Entretanto, como o estudo é de segurança e de fase I, não há poder estatístico para determinar possíveis vieses nos grupos.

## 4.2 Contextualização do perfil imunológico anterior ao ensaio clínico

Com o objetivo de avaliar o perfil imunológico da população de estudo no contexto que precede a administração dos tratamentos do ensaio clínico (nos tempos PP e V0), foi calculada a frequência de células T expressando CD69, CD134, CD137, CD154, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 nas amostras de PBMC ativadas sob estímulo das proteínas N, S e SpiN.

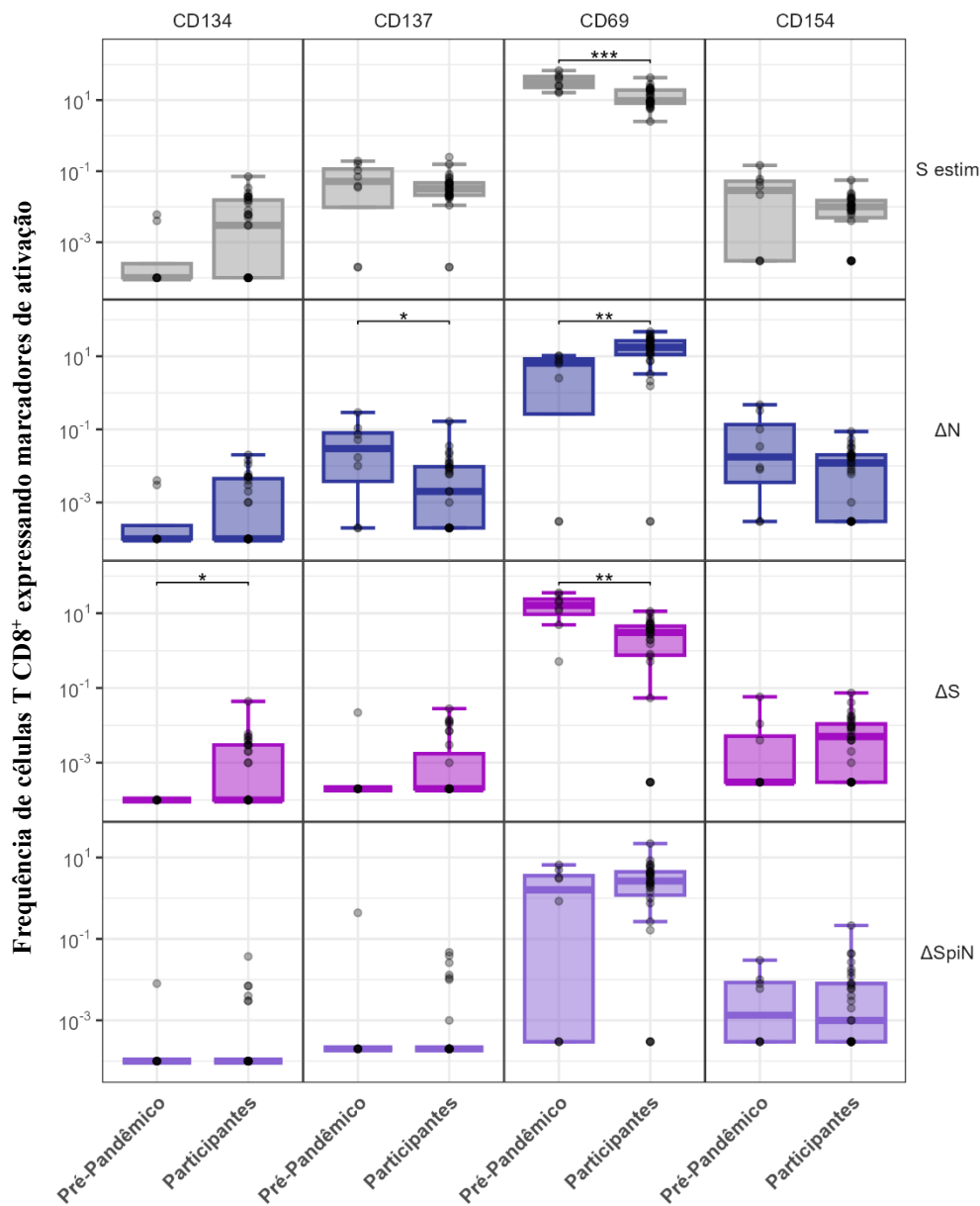
### 4.2.1 Expressão dos marcadores de ativação de superfície celular CD69, CD134, CD137 e CD154



**Figura 8 – Expressão de marcadores de ativação de superfície em células CD4<sup>+</sup>.** Frequências de células CD4<sup>+</sup> expressando os marcadores de ativação de superfície CD134, CD137, CD69 e CD154 sob diferentes condições de cultura celular: estímulo pelas proteínas N, S ou SpiN e sem estímulo. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background* de sua expressão basal) menos a

frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As caixas dos *boxplots* são delimitadas pelos percentis 25% (Q1) e 75% (Q3). As linhas dentro das caixas denotam as medianas. Cálculo para limite inferior:  $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Cálculo para limite superior:  $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Pré-Pandêmico: n = 8; Participantes: n = 31. Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon. Significância estatística foi determinada por \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ . Fonte: elaborado pela autora, 2024.

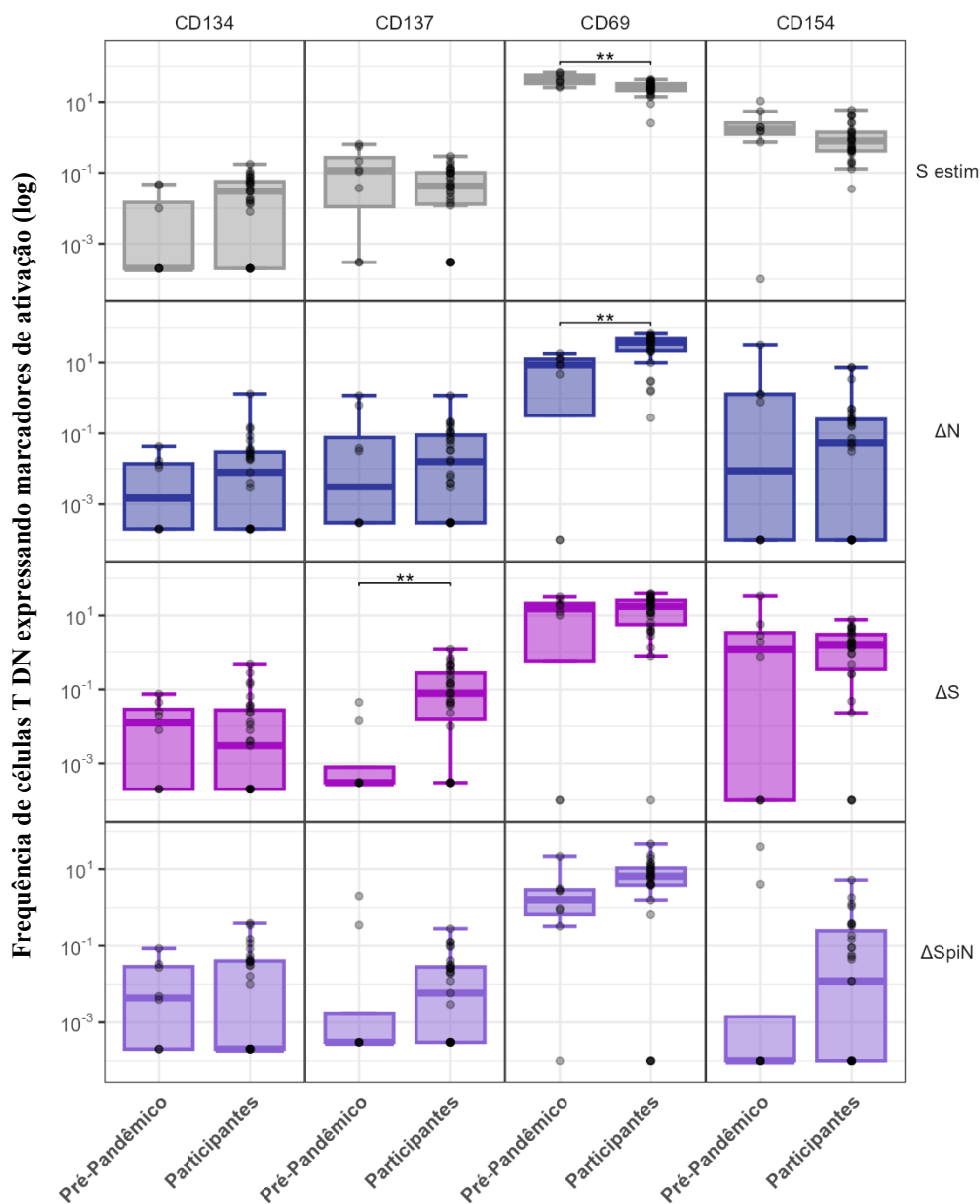
Foi observada uma frequência significativamente menor de células CD4<sup>+</sup> expressando CD69 ou CD154 nos participantes do ensaio clínico em comparação com o grupo PP quando não foi adicionado nenhum estímulo ao cultivo celular (**Figura 8**, primeira linha). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre PP e os participantes em relação às frequências de células expressando marcadores de ativação quando estimuladas com a proteína N (**Figura 8**, segunda linha). Ao serem estimuladas com a proteína S, o grupo de participantes apresentou um aumento significativo da frequência de células CD4<sup>+</sup> expressando CD134 e uma diminuição na frequência de células expressando CD69 quando comparado ao grupo PP (**Figura 8**, terceira linha). Por fim, participantes do estudo apresentaram frequências significativamente maiores de células CD4<sup>+</sup> expressando CD154, CD69 e CD134 quando estimuladas com SpiN em comparação com as amostras PP (**Figura 8**, quarta linha).



**Figura 9 – Expressão de marcadores de ativação de superfície em células CD8<sup>+</sup>.** Frequências de células CD8<sup>+</sup> expressando os marcadores de ativação de superfície CD134, CD137, CD69 e CD154 sob diferentes condições de cultura celular: estímulo pelas proteínas N, S ou SpiN e sem estímulo. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As caixas dos boxplots são delimitadas pelos percentis 25% (Q1) e 75% (Q3). As linhas dentro das caixas denotam as medianas. Cálculo para limite inferior:  $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Cálculo para limite superior:  $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Pré-Pandêmico: n = 8; Participantes: n = 31. Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon. Significância estatística foi determinada por \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . Fonte: elaborado pela autora, 2024.

Foi observada uma frequência significativamente menor de células CD8<sup>+</sup> expressando CD69 nos participantes do ensaio clínico em comparação com o grupo PP quando não foi adicionado nenhum estímulo ao cultivo celular (**Figura 9**, primeira linha). Participantes do estudo, em comparação com as amostras PP, apresentaram frequências significativamente menores de células CD8<sup>+</sup> expressando CD137 e maiores frequências de células expressando

CD69 quando estimuladas com a proteína N (**Figura 9**, segunda linha). Mediante estímulo com a proteína S, comparados ao grupo PP, o grupo de participantes apresentou um aumento significativo da frequência de células CD8<sup>+</sup> expressando CD134 e uma diminuição na frequência de células expressando CD69 (**Figura 9**, terceira linha). Por fim, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre PP e os participantes em relação às frequências de células expressando marcadores de ativação, quando estimuladas com a proteína SpiN (**Figura 9**, quarta linha).

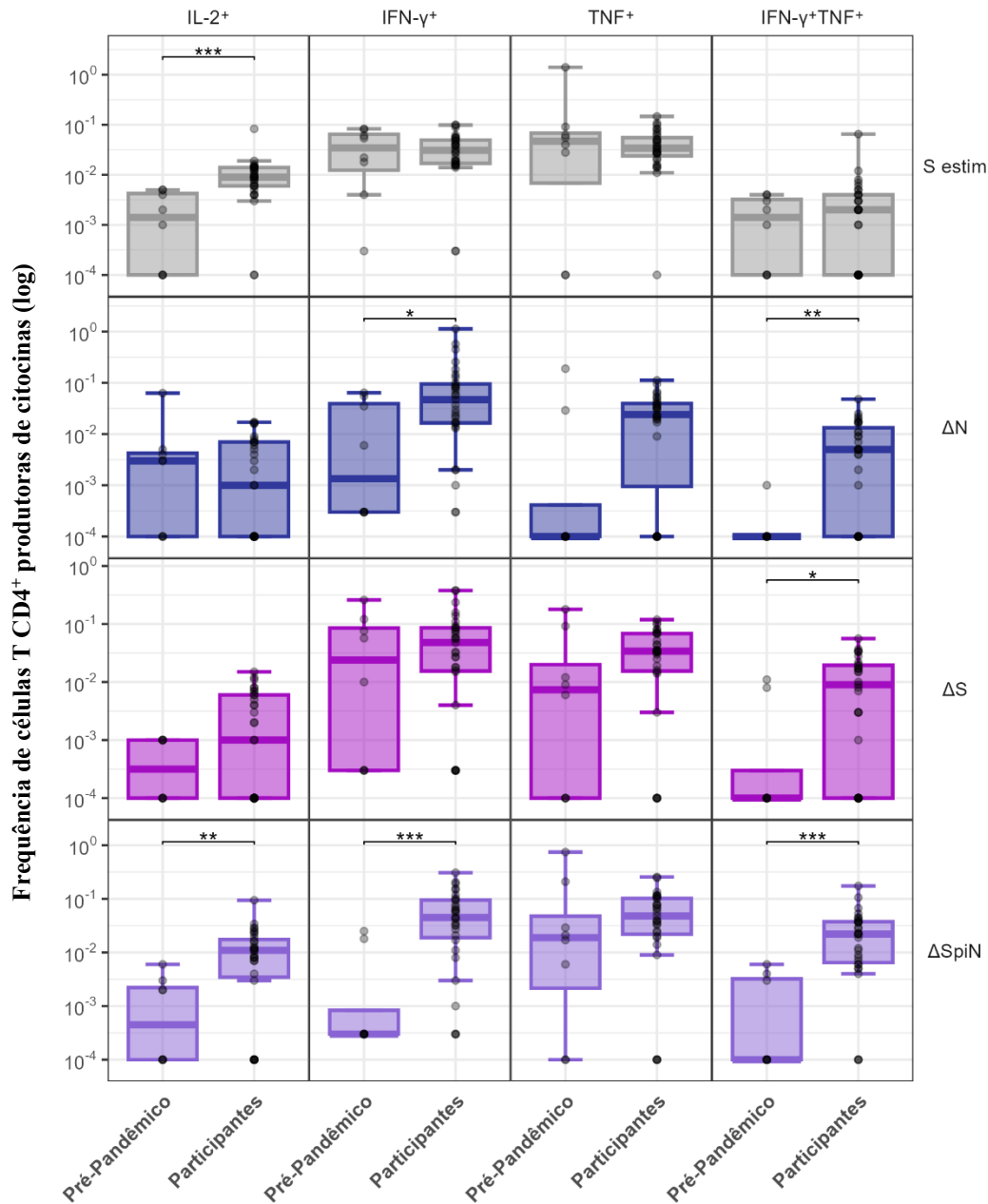


**Figura 10 – Expressão de marcadores de ativação de superfície em células DN.** Frequências de células DN expressando os marcadores de ativação de superfície CD134, CD137, CD69 e CD154 sob diferentes condições de cultura celular: estímulo pelas proteínas N, S ou SpiN e sem estímulo. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As caixas dos *boxplots* são

delimitadas pelos percentis 25% (Q1) e 75% (Q3). As linhas dentro das caixas denotam as medianas. Cálculo para limite inferior:  $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Cálculo para limite superior:  $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Pré-Pandêmico: n = 8; Participantes: n = 31. Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon. Significância estatística foi determinada por \*\*:  $p \leq 0,01$ . Fonte: elaborado pela autora, 2024.

Foi observada uma frequência significativamente menor de células DN expressando CD69 nos participantes do ensaio clínico em comparação com o grupo PP quando não foi adicionado nenhum estímulo ao cultivo celular (**Figura 10**, primeira linha). Em comparação com o grupo PP, os participantes do estudo apresentaram frequências significativamente maiores de células DN expressando CD69 quando estimuladas com a proteína N (**Figura 10**, segunda linha). Mediante estímulo com a proteína S, comparados ao grupo PP, o grupo de participantes apresentou um aumento significativo da frequência de células DN expressando CD137 (**Figura 10**, terceira linha). Por fim, quando estimuladas com a proteína SpiN, as células DN apresentaram aumento na expressão de todos os marcadores na comparação entre os participante e PP, apesar de não terem sido observadas diferenças estatisticamente significativas (**Figura 10**, quarta linha).

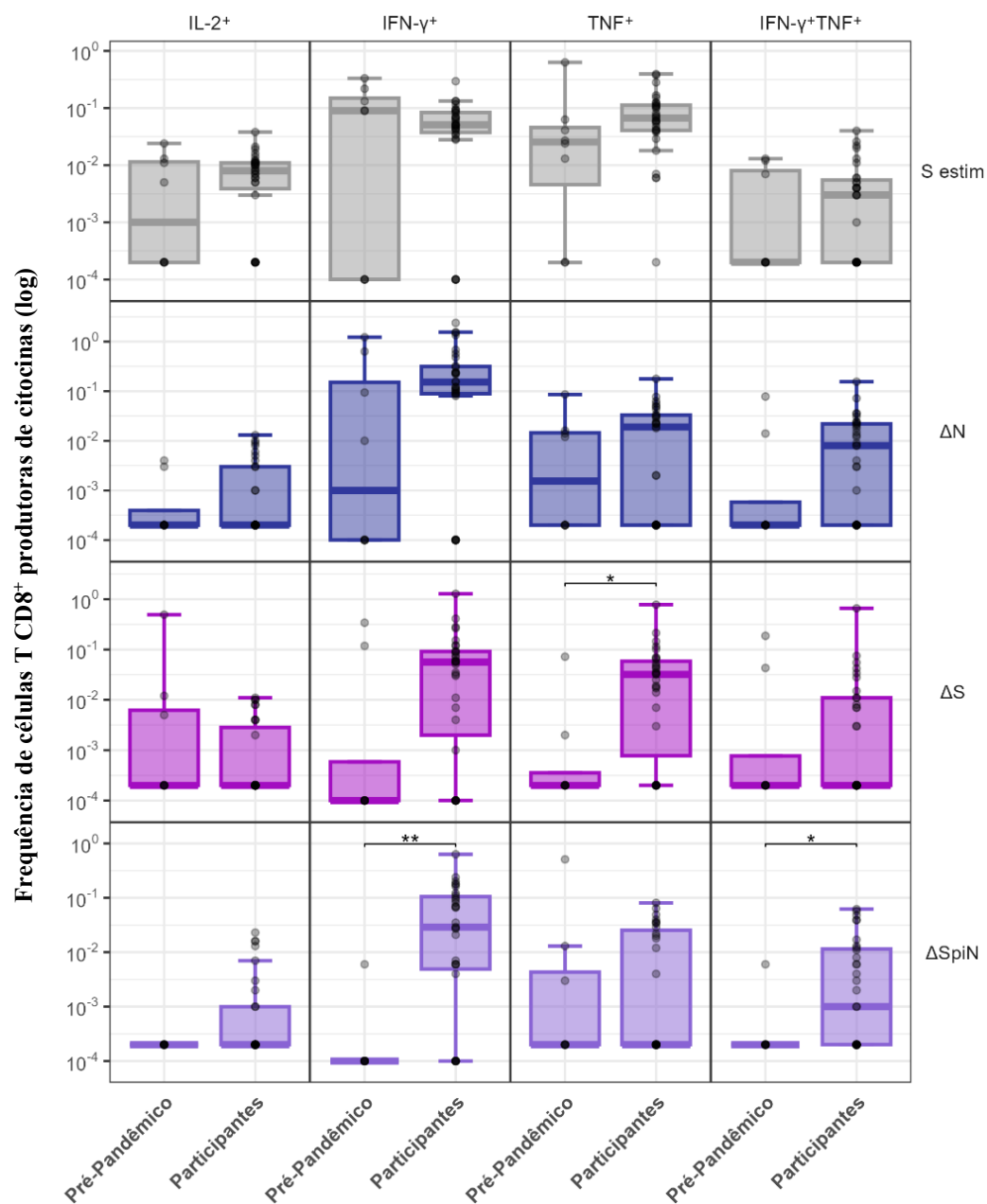
#### 4.2.2 Produção das citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e co-produção de IFN- $\gamma$ +TNF<sup>+</sup>



**Figura 11 – Produção de citocinas em células CD4<sup>+</sup>.** Frequências de células CD4<sup>+</sup> produzindo as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IFN- $\gamma$ +TNF<sup>+</sup> sob diferentes condições de cultura celular: estímulo pelas proteínas N, S ou SpiN e sem estímulo. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As caixas dos *boxplots* são delimitadas pelos percentis 25% (Q1) e 75% (Q3). As linhas dentro das caixas denotam as medianas. Cálculo para limite inferior:  $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Cálculo para limite superior:  $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Pré-Pandêmico: n = 8; Participantes: n = 31. Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon. Significância estatística foi determinada por \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ . Fonte: elaborado pela autora, 2024.

Foi observada uma frequência significativamente menor de células T CD4<sup>+</sup> produzindo IL-2 nos participantes do ensaio clínico em comparação com o grupo PP quando não foi adicionado nenhum estímulo ao cultivo celular (**Figura 11**, primeira linha). Em comparação

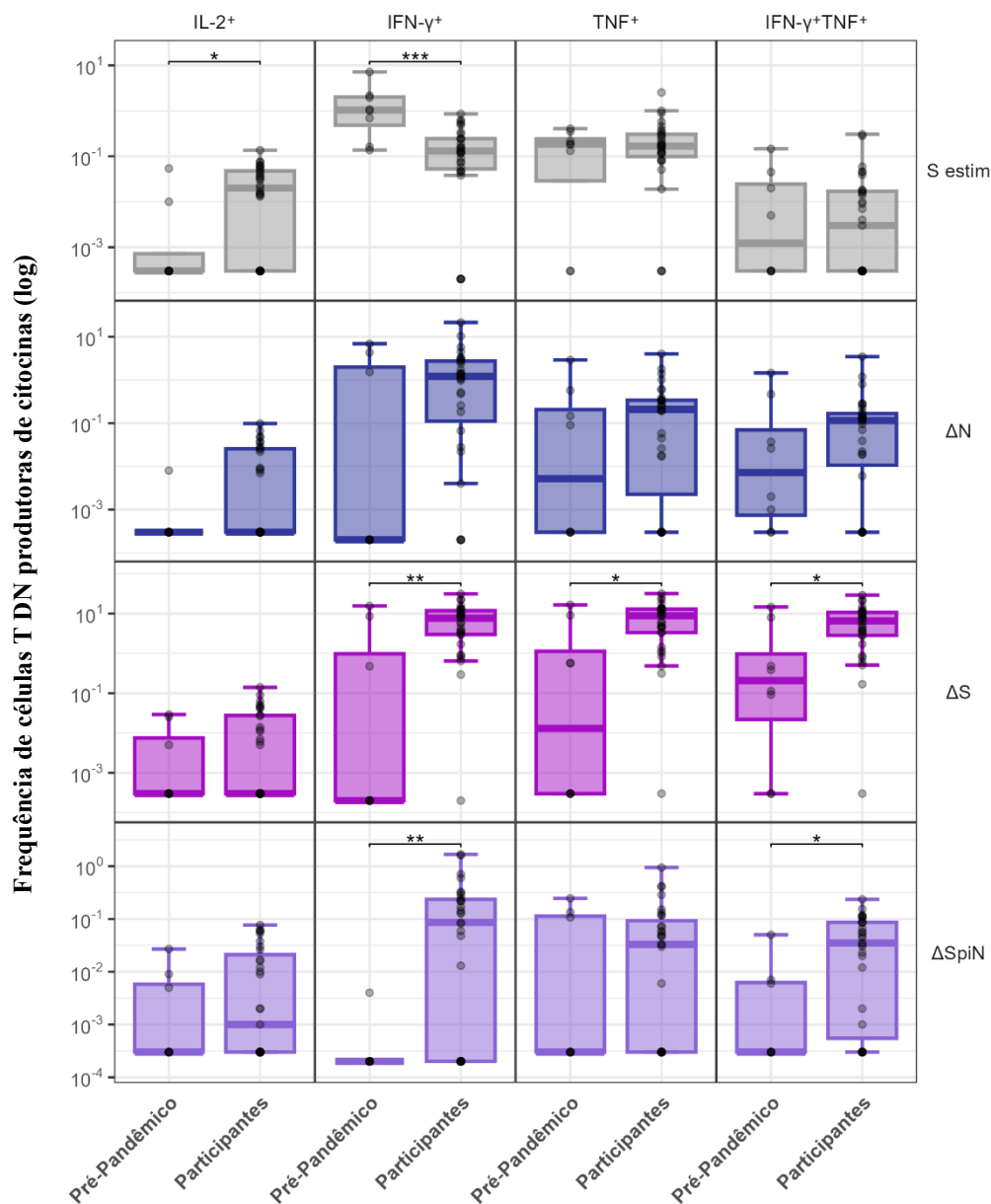
com o grupo PP, os participantes do estudo apresentaram frequências significativamente maiores de células T CD4<sup>+</sup> produzindo IFN- $\gamma$  e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> quando estimuladas com a proteína N (**Figura 11**, segunda linha). Mediante estímulo com a proteína S, comparados ao grupo PP, o grupo de participantes apresentou um aumento significativo na frequência de células co-produtoras de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> (**Figura 11**, terceira linha). Por fim, em cultura celular estimulada com a proteína SpiN, foi observado aumento significativo nas frequências de células T CD4<sup>+</sup> produzindo todas as citocinas, exceto por TNF, nos participantes do estudo em comparação com o grupo PP (**Figura 11**, quarta linha).



**Figura 12 – Produção de citocinas em células CD8<sup>+</sup>.** Frequências de células CD8<sup>+</sup> produzindo as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> sob diferentes condições de cultura celular: estímulo pelas proteínas N, S ou SpiN e

sem estímulo. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As caixas dos *boxplots* são delimitadas pelos percentis 25% (Q1) e 75% (Q3). As linhas dentro das caixas denotam as medianas. Cálculo para limite inferior:  $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Cálculo para limite superior:  $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Pré-Pandêmico: n = 8; Participantes: n = 31. Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon. Significância estatística foi determinada por \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ . Fonte: elaborado pela autora, 2024.

Nas culturas celulares não estimuladas ou nas culturas sob estímulo de N não foi observada diferença significativa na frequência de células T CD8<sup>+</sup> produzindo citocinas ao compararmos os participantes do estudo e o grupo PP (**Figura 12**, primeira e segunda linha, respectivamente). Mediante estímulo com a proteína S, comparados ao grupo PP, o grupo de participantes apresentou um aumento significativo na frequência de células T CD8<sup>+</sup> produzindo TNF (**Figura 12**, terceira linha). Por fim, em cultura celular estimulada com a proteína SpiN, foi observado aumento significativo nas frequências de células produtoras de IFN- $\gamma$  e de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> nos participantes do estudo em comparação com o grupo PP (**Figura 12**, quarta linha).



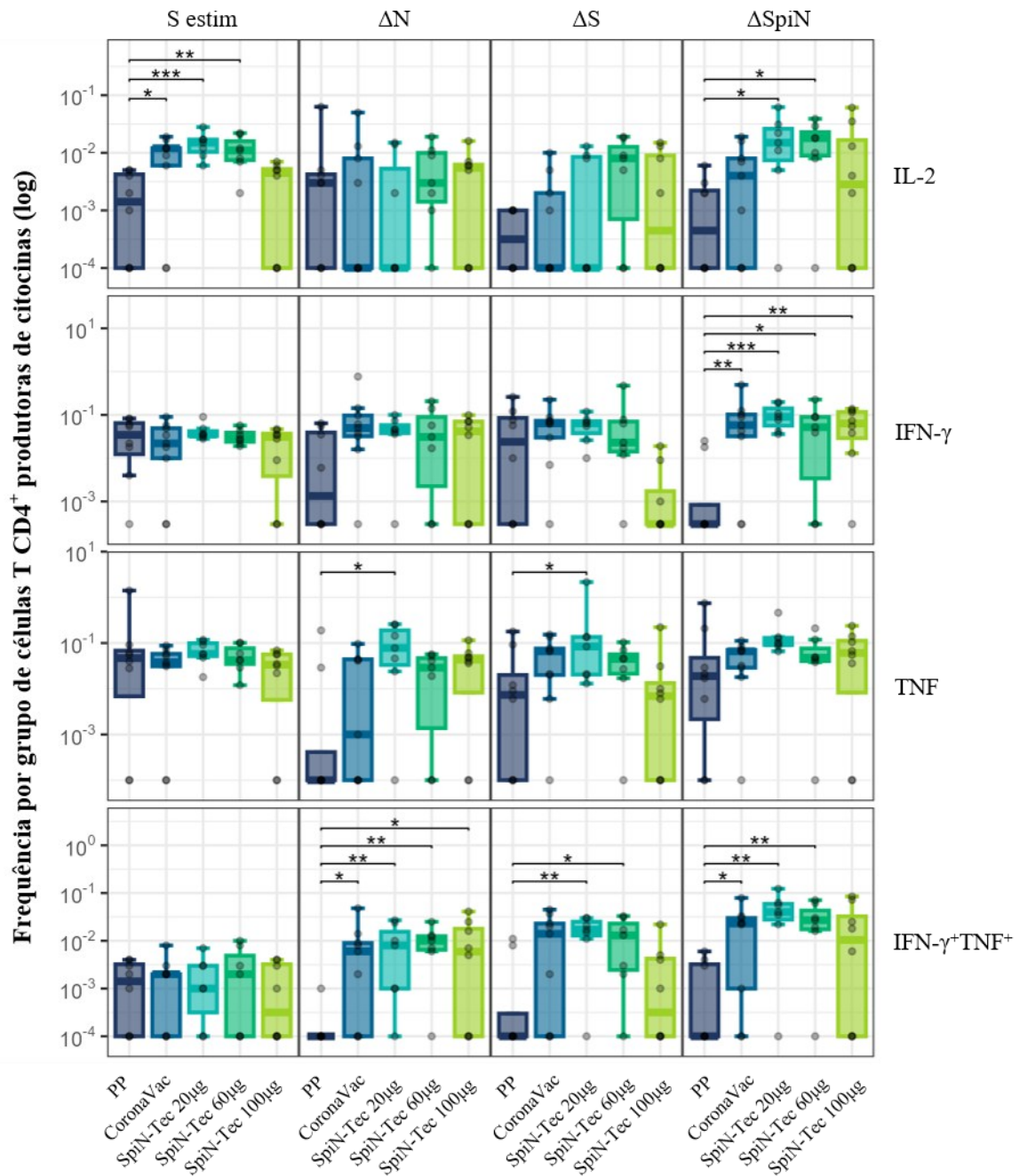
**Figura 13 – Produção de citocinas em células DN.** Frequências de células DN produzindo as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IFN- $\gamma$ +TNF $^{+}$  sob diferentes condições de cultura celular: estímulo pelas proteínas N, S ou SpiN e sem estímulo. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As caixas dos *boxplots* são delimitadas pelos percentis 25% (Q1) e 75% (Q3). As linhas dentro das caixas denotam as medianas. Cálculo para limite inferior:  $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Cálculo para limite superior:  $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Pré-Pandêmico:  $n = 8$ ; Participantes:  $n = 31$ . Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon. Significância estatística foi determinada por \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . Fonte: elaborado pela autora, 2024.

Foi observada uma frequência significativamente maior de células DN produzindo IL-2 e significativamente menor de células produzindo IFN- $\gamma$  nos participantes do ensaio clínico em comparação com o grupo PP quando não foi adicionado nenhum estímulo ao cultivo celular (**Figura 13**, primeira linha). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre PP e os participantes em relação às frequências de células DN produtoras de citocinas

quando estimuladas com a proteína N (**Figura 13**, segunda linha). Mediante estímulo com a proteína S, comparados ao grupo PP, o grupo de participantes apresentou um aumento significativo na frequência de células DN produtoras de todas as citocinas, exceto por IL-2 (**Figura 13**, terceira linha). Por fim, em cultura celular estimulada com a proteína SpiN, foi observado aumento significativo nas frequências de células DN produtoras de IFN- $\gamma$  e de células co-produtoras de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> nos participantes do estudo em comparação com o grupo PP (**Figura 13**, quarta linha).

#### **4.3 Comparação do perfil de produção de citocinas entre os grupos experimentais**

Uma vez determinado o contexto imunológico da população de estudo antes da administração dos tratamentos (vacina SpiN-Tec ou comparador ativo), para realização das análises nos tempos V14 e V28, os participantes foram separados em seus respectivos grupos experimentais. Assim, foi possível delinear a resposta imune induzida por cada regime vacinal e verificar a não inferioridade da SpiN-Tec como dose de reforço heteróloga. A frequência de células produtoras das citocinas pró-inflamatórias de cada grupo tratado foi comparada com a mesma população de células do grupo PP, sob os 3 estímulos proteicos e sem estímulo.



**Figura 14 – Produção de citocinas em células CD4<sup>+</sup> por grupo experimental em V14.** Frequências de células CD4<sup>+</sup> produzindo as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IFN- $\gamma$ +TNF<sup>+</sup>, por grupo (representados por cores diferentes), sob estímulo pelas proteínas N, S ou SpiN e sem estímulo. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As caixas dos *boxplots* são delimitadas pelos percentis 25% (Q1) e 75% (Q3). As linhas dentro das caixas denotam as medianas. Cálculo para limite inferior:  $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Cálculo para limite superior:  $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . PP: n = 8; CoronaVac: n = 9; SpiN-Tec 20  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 60  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 100  $\mu$ g: n = 8. Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon. Significância estatística foi determinada por \*: p  $\leq$  0,05; \*\*: p  $\leq$  0,01; \*\*\*: p  $\leq$  0,001. Fonte: elaborado pela autora, 2024.

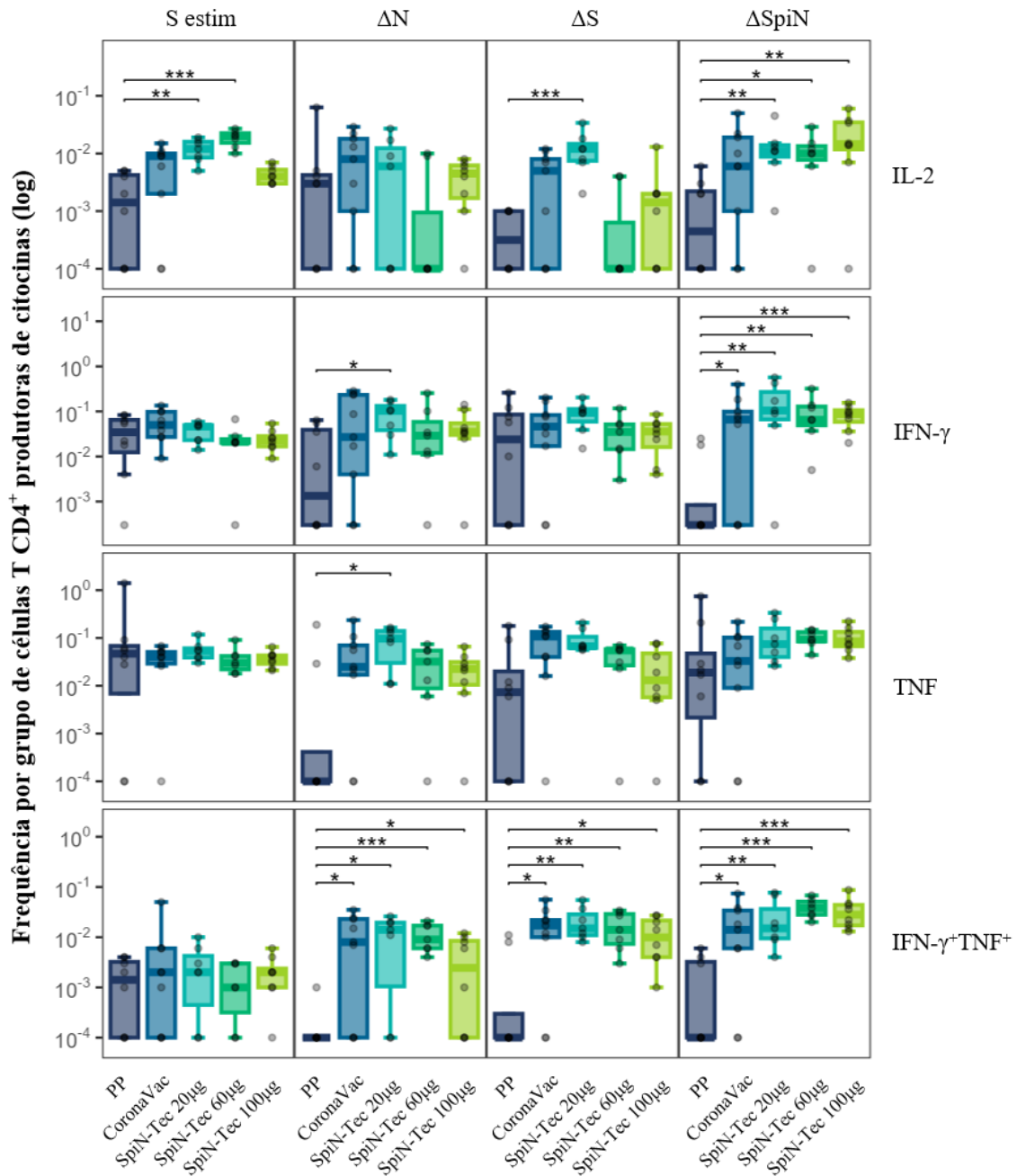
Passados 14 dias da vacinação, nas culturas não estimuladas, foi observada frequência semelhante de células CD4<sup>+</sup> produzindo IL-2 entre os grupos que receberam CoronaVac, SpiN-Tec 20  $\mu$ g e SpiN-Tec 60  $\mu$ g. Essas frequências similares são, ainda, significativamente maiores

que a frequência correspondente do grupo PP. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 14**, primeira coluna).

Sob estímulo da proteína N, a produção de TNF por células T CD4<sup>+</sup> do grupo SpiN-Tec 20 µg foi significativamente maior que a produção do grupo PP. Já a produção de células T CD4<sup>+</sup> co-produtoras de IFN-γ<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> apresentou aumento significativo em todos os grupos tratados em relação a PP. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 14**, segunda coluna).

Mediante estímulo com a proteína S, a produção de TNF seguiu o mesmo padrão descrito para a produção de TNF sob estímulo da proteína N. A produção de células CD4<sup>+</sup> co-produtoras de IFN-γ<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>, por sua vez, apresentou aumento significativo em relação a PP apenas nos grupos SpiN-Tec 20 µg e SpiN-Tec 60 µg. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 14**, terceira coluna).

Finalmente, o estímulo pela proteína SpiN induziu aumento significativo nas frequências de células CD4<sup>+</sup> produtoras de todas as citocinas, exceto por TNF. A produção de IL-2 foi significativamente maior nos grupos SpiN-Tec 20 µg e SpiN-Tec 60 µg em comparação com PP. A produção de IFN-γ foi significativamente maior em todos os grupos quando comparados com PP. As células co-produtoras de IFN-γ<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> tiveram incremento significativo nos grupos CoronaVac, SpiN-Tec 20 µg e SpiN-Tec 60 µg em comparação com o grupo PP (**Figura 14**, quarta coluna).



**Figura 15 – Produção de citocinas em células CD4<sup>+</sup> por grupo experimental em V28.** Frequências de células CD4<sup>+</sup> produzindo as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IFN- $\gamma$ +TNF<sup>+</sup>, por grupo (representados por cores diferentes), sob estímulo pelas proteínas N, S ou SpiN e sem estímulo. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As caixas dos *boxplots* são delimitadas pelos percentis 25% (Q1) e 75% (Q3). As linhas dentro das caixas denotam as medianas. Cálculo para limite inferior:  $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Cálculo para limite superior:  $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . PP: n = 8; CoronaVac: n = 9; SpiN-Tec 20  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 60  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 100  $\mu$ g: n = 8. Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon. Significância estatística foi determinada por \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . Fonte: elaborado pela autora, 2024.

Passados 28 dias da vacinação, nas culturas não estimuladas, foi observado aumento significativo na frequência de células CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-2 apenas nos grupos que receberam SpiN-Tec 20  $\mu$ g e SpiN-Tec 60  $\mu$ g em comparação com PP. Não foram detectadas

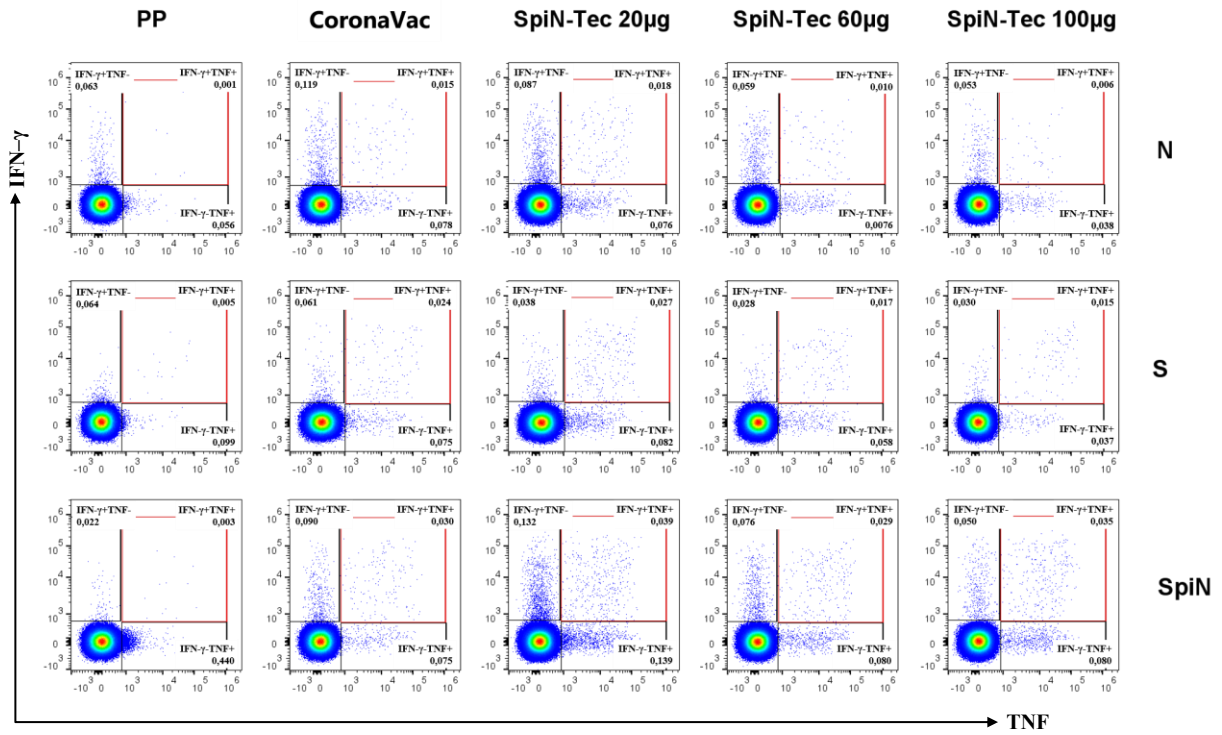
diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 15**, primeira coluna).

Sob estímulo da proteína N, a produção isolada de IFN- $\gamma$  ou de TNF por células CD4<sup>+</sup> do grupo SpiN-Tec 20  $\mu$ g foi significativamente maior que a produção do grupo PP. Já a indução de células CD4<sup>+</sup> co-produtoras de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> apresentou aumento significativo em todos os grupos tratados em relação a PP. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 15**, segunda coluna).

Mediante estímulo com a proteína S, a produção de IL-2 em células CD4<sup>+</sup> apresentou aumento significativo apenas no grupo SpiN-Tec 20  $\mu$ g em relação ao PP. As células CD4<sup>+</sup> co-produtoras de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>, entretanto, apresentaram aumento significativo de frequência em todos os grupos tratados em comparação a PP. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 15**, terceira coluna).

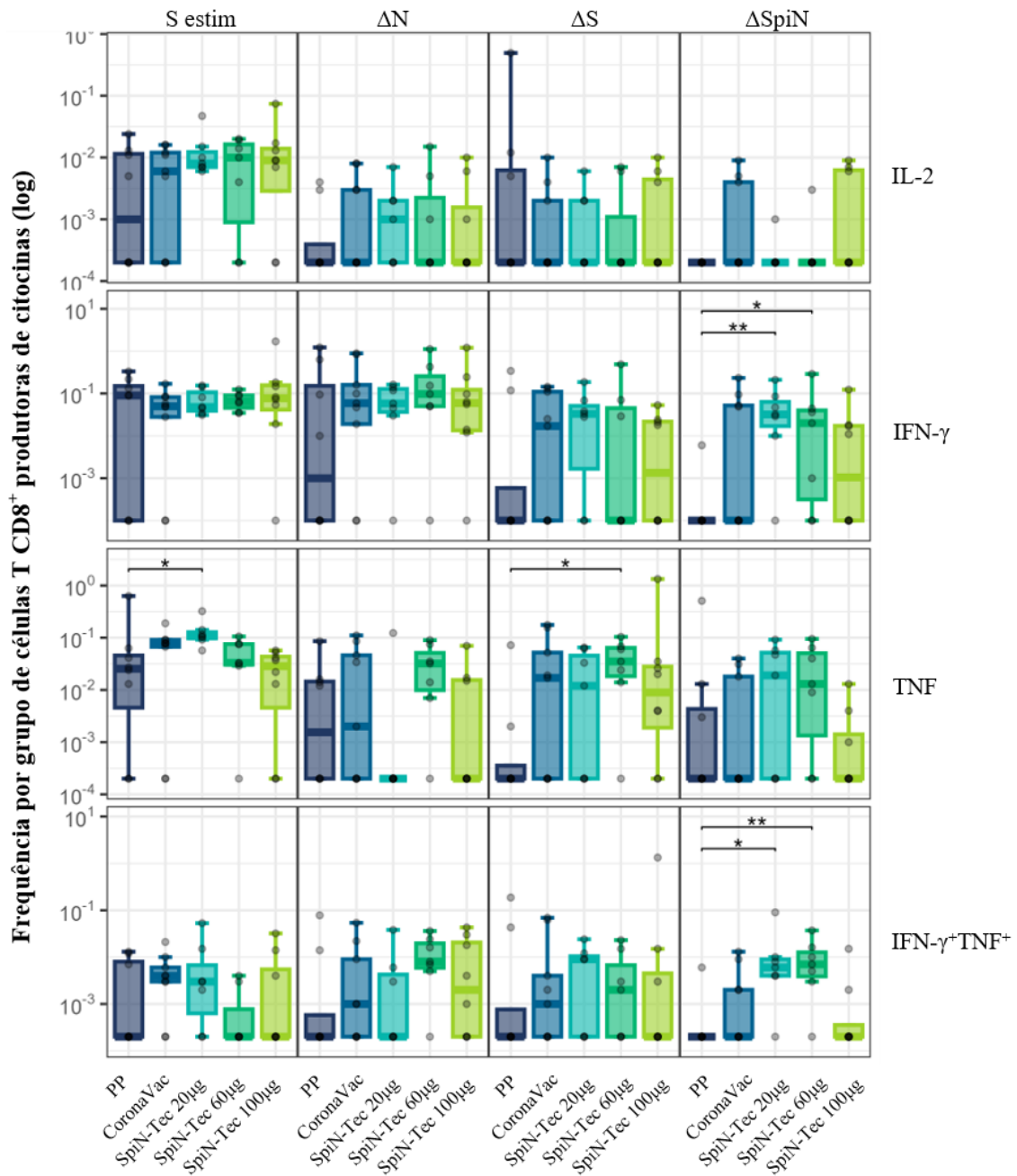
Finalmente, o estímulo pela proteína SpiN induziu aumento significativo nas frequências de células CD4<sup>+</sup> produtoras de todas as citocinas, exceto por TNF. A produção de IL-2 foi significativamente maior em todos os grupos que receberam SpiN-Tec em comparação com PP. A produção de IFN- $\gamma$  foi significativamente maior em todos os grupos quando comparados com PP. O mesmo foi observado na frequência de células co-produtoras de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> (**Figura 15**, quarta coluna).

Destaca-se que a co-expressão de IFN- $\gamma$  e TNF (representação na **Figura 16**, a seguir) parece ser um bom marcador do efeito da administração de doses de reforço neste estudo, independentemente das condições de estímulo.



**Figura 16 – Imagem representativa de uma amostra de células  $CD4^+$  multifuncionais.** Células  $CD4^+$  produtoras de  $IFN-\gamma^+TNF^+$ , organizadas por grupo e sob os 3 estímulos, em V28. Imagem representativa da co-expressão de  $IFN-\gamma^+TNF^+$  em células  $CD4^+$  no tempo V28. O quadrante superior esquerdo representa as células positivas para a produção de  $IFN-\gamma$ . O quadrante inferior direito representa as células positivas para a produção de TNF. O quadrante superior direito representa as células multifuncionais, produtoras simultâneas de  $IFN-\gamma$  e TNF. É possível perceber um aumento significativo de pontos representando células multifuncionais nos grupos que

receberam tratamento em comparação com o grupo PP, especialmente sob estímulo da proteína SpiN. Fonte: elaborado pela autora, 2024.

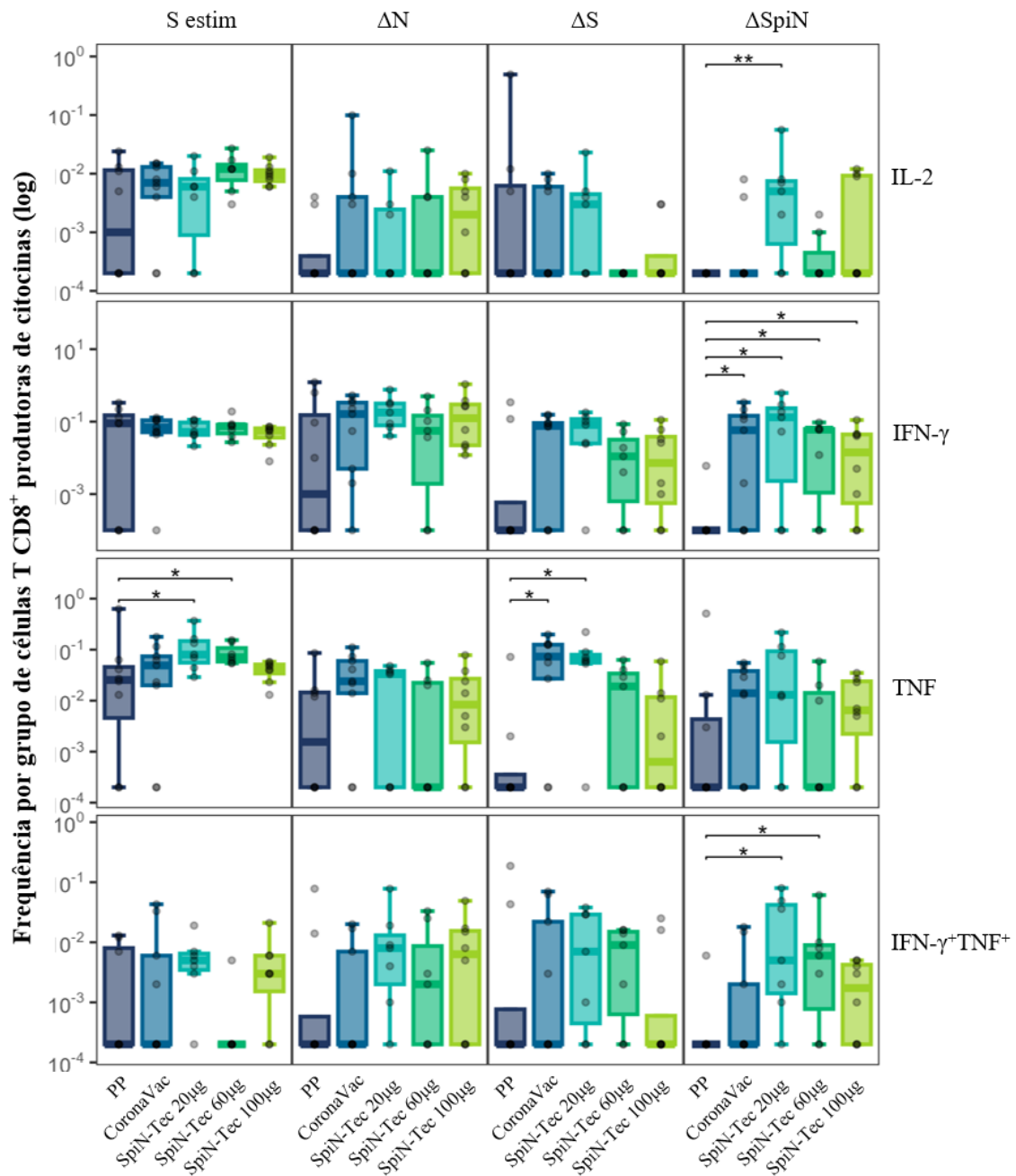


Passados 14 dias da vacinação, nas culturas não estimuladas, foi observado aumento significativo na frequência de células  $CD8^+$  produtoras de TNF apenas no grupo que recebeu SpiN-Tec 20  $\mu$ g em comparação com PP. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 17**, primeira coluna).

Sob estímulo da proteína N, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção de nenhuma citocina ao comparar cada um dos grupos tratados ao grupo PP (**Figura 17**, segunda coluna).

Mediante estímulo com a proteína S, a produção de TNF em células  $CD8^+$  apresentou aumento significativo apenas no grupo SpiN-Tec 20  $\mu$ g em relação ao PP. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 17**, terceira coluna).

Finalmente, o estímulo pela proteína SpiN induziu aumento significativo nas frequências de células  $CD8^+$  produtoras de  $IFN-\gamma$  e células co-produtoras de  $IFN-\gamma^+TNF^+$  nos grupos SpiN-Tec 20  $\mu$ g e SpiN-Tec 60  $\mu$ g em comparação com PP. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 17**, quarta coluna).



**Figura 18 – Produção de citocinas em células CD8<sup>+</sup> por grupo experimental em V28.** Frequências de células CD8<sup>+</sup> produzindo as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>, por grupo (representados por cores diferentes), sob estímulo pelas proteínas N, S ou SpiN e sem estímulo. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As caixas dos *boxplots* são delimitadas pelos percentis 25% (Q1) e 75% (Q3). As linhas dentro das caixas denotam as medianas. Cálculo para limite inferior:  $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Cálculo para limite superior:  $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . PP: n = 8; CoronaVac: n = 9; SpiN-Tec 20  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 60  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 100  $\mu$ g: n = 8. Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon. Significância estatística foi determinada por \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ . Fonte: elaborado pela autora, 2024.

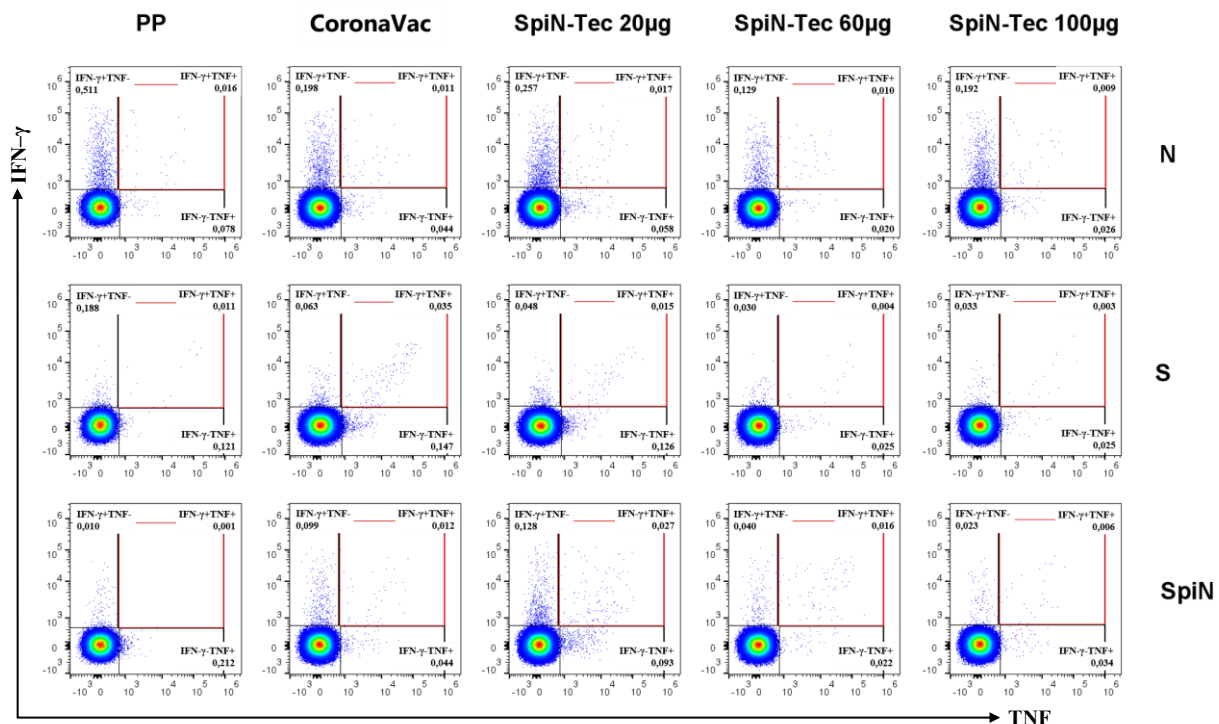
Passados 28 dias da vacinação, nas culturas não estimuladas, foi observado aumento significativo na frequência de células CD8<sup>+</sup> produtoras de TNF apenas nos grupos que receberam SpiN-Tec 20  $\mu$ g e SpiN-Tec 60  $\mu$ g em comparação com PP. Não foram detectadas

diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 18**, primeira coluna).

Sob estímulo da proteína N, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção de nenhuma citocina ao comparar cada um dos grupos tratados ao grupo PP (**Figura 18**, segunda coluna).

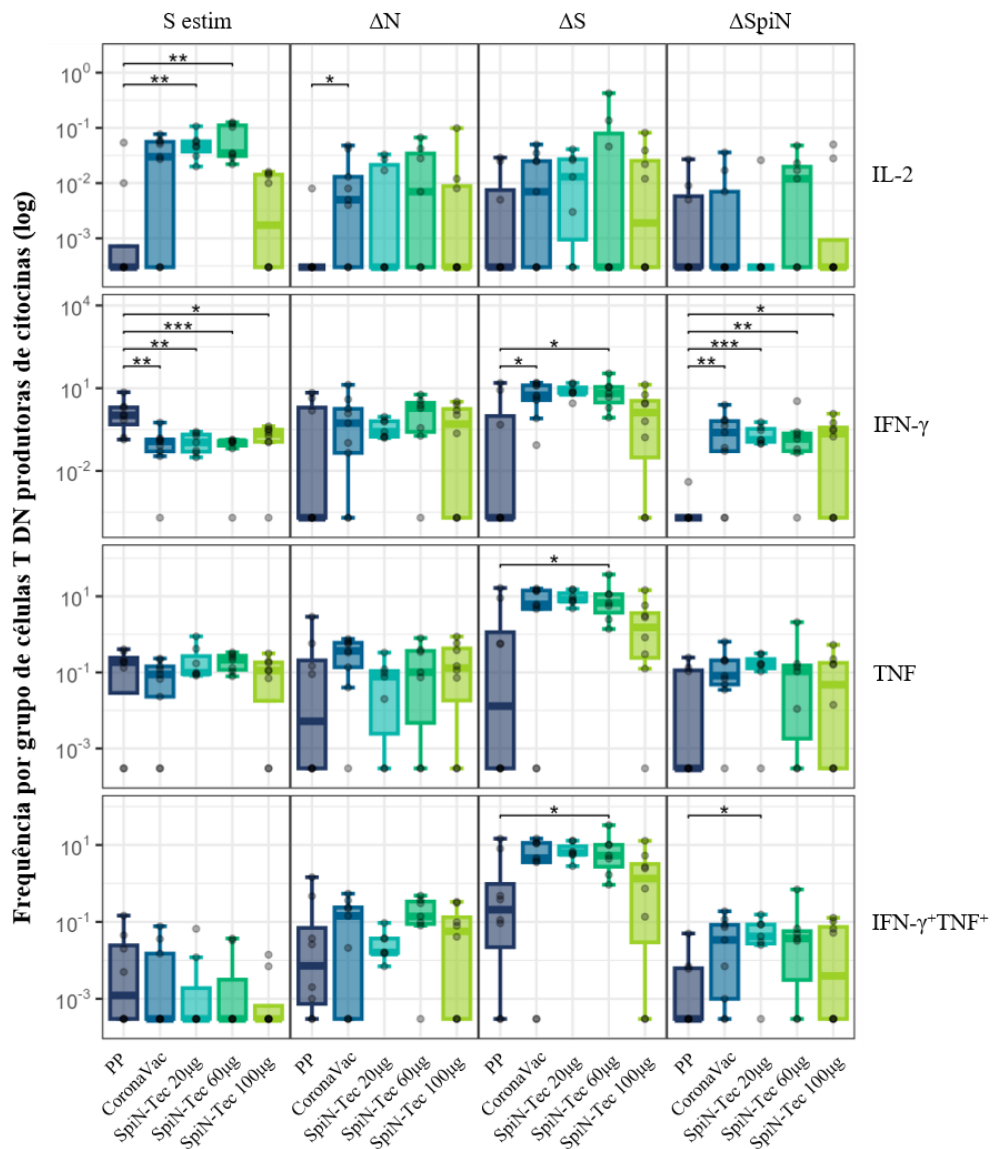
Mediante estímulo com a proteína S, a produção de TNF em células CD8<sup>+</sup> apresentou aumento significativo apenas nos grupos SpiN-Tec 20 µg e SpiN-Tec 60 µg em relação ao PP. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 18**, terceira coluna).

Finalmente, o estímulo pela proteína SpiN induziu aumento significativo nas frequências de células CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN-γ em todos os grupos tratados em comparação com PP. Já a produção de células multifuncionais (representação na **Figura 18**, a seguir) aumentou significativamente apenas nos grupos SpiN-Tec 20 µg e SpiN-Tec 60 µg em comparação com PP. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 18**, quarta coluna).



**Figura 19** – Imagem representativa de uma amostra de células CD8<sup>+</sup> multifuncionais. Células CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN-γ<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>, organizadas por grupo e sob os 3 estímulos, em V28. Imagem representativa da co-expressão de IFN-γ<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> em células CD8<sup>+</sup> no tempo = V28. O quadrante superior esquerdo representa as células positivas para a produção de IFN-γ. O quadrante inferior direito representa as células positivas para a produção de TNF. O quadrante superior direito representa as células multifuncionais, produtoras simultâneas de IFN-γ e TNF. É possível perceber um aumento significativo de pontos representando células multifuncionais nos grupos que

receberam tratamento em comparação com o grupo PP, especialmente sob estímulo da proteína SpiN. Fonte: elaborado pela autora, 2024.



**Figura 20 – Produção de citocinas em células DN por grupo experimental em V14.** Frequências de células DN produzindo as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IFN- $\gamma$ +TNF $^{+}$ , por grupo (representados por cores diferentes), sob estímulo pelas proteínas N, S ou SpiN e sem estímulo. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As caixas dos *boxplots* são delimitadas pelos percentis 25% (Q1) e 75% (Q3). As linhas dentro das caixas denotam as medianas. Cálculo para limite inferior:  $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Cálculo para limite superior:  $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . PP: n = 8; CoronaVac: n = 9; SpiN-Tec 20  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 60  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 100  $\mu$ g: n = 8. Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon. Significância estatística foi determinada por \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . Fonte: elaborado pela autora, 2024.

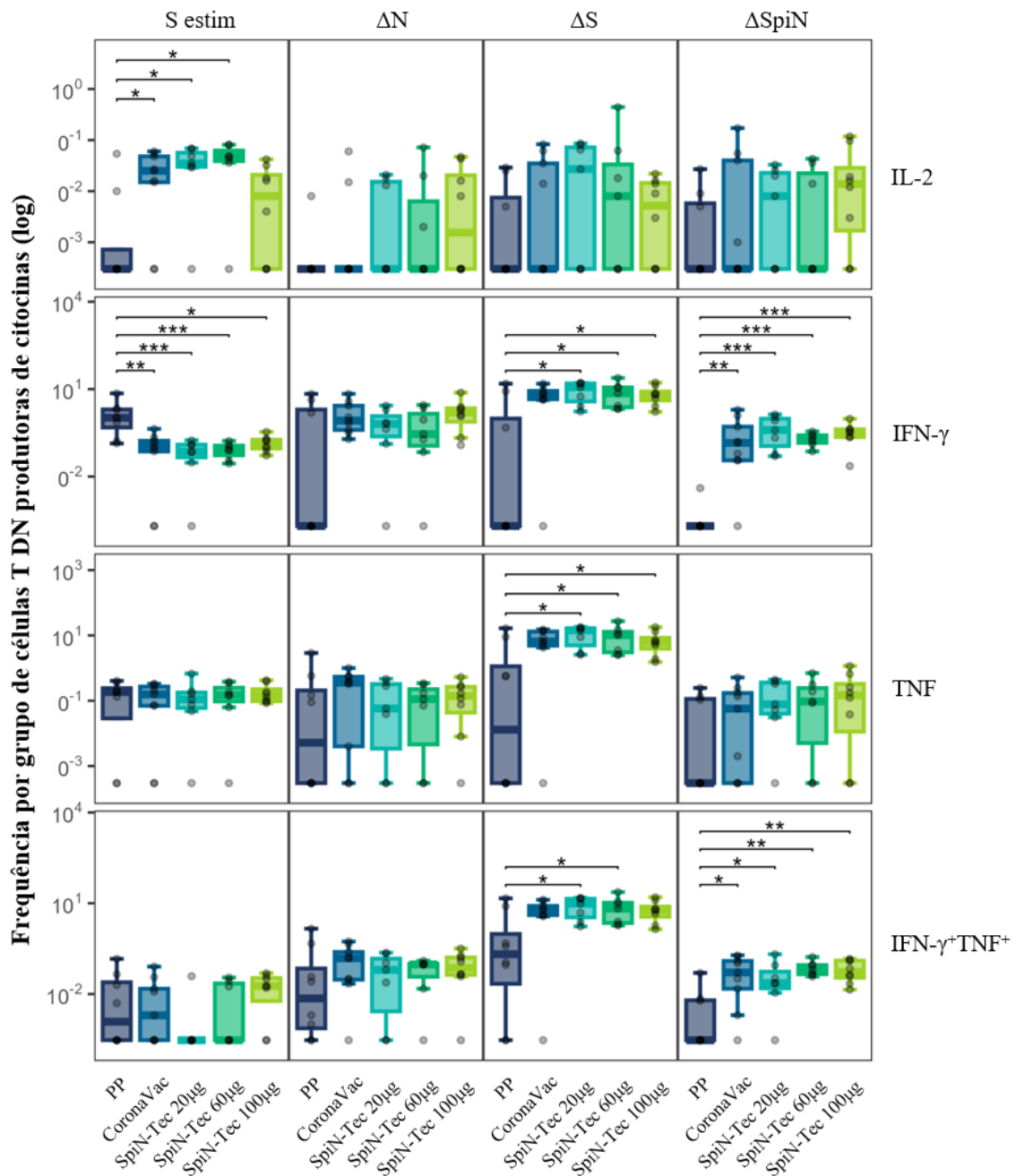
Passados 14 dias da vacinação, nas culturas não estimuladas, foi observado aumento significativo na frequência de células DN produtoras de IL-2 nos grupos que receberam SpiN-Tec 20  $\mu$ g e SpiN-Tec 60  $\mu$ g em comparação com PP. Com relação à produção de IFN- $\gamma$ , foi observada frequência significativamente menor de células DN em todos os grupos tratados em

comparação a PP. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 20**, primeira coluna).

Sob estímulo da proteína N, foi observado aumento significativo na frequência de células DN produtoras de IL-2 no grupo que recebeu CoronaVac em comparação com PP. Para as demais citocinas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na comparação dos grupos tratados com PP (**Figura 20**, segunda coluna).

Mediante estímulo com a proteína S, o grupo que recebeu SpiN-Tec 60 µg apresentou aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$ , TNF e na co-produção de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> em comparação com PP. O grupo que recebeu CoronaVac também apresentou aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$  em comparação com PP. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 20**, terceira coluna).

Finalmente, o estímulo pela proteína SpiN induziu aumento significativo nas frequências de células DN produtoras IFN- $\gamma$  em todos os grupos tratados quando comparados com PP. O grupo que recebeu SpiN-Tec 20 µg apresentou produção significativamente maior de células multifuncionais em comparação com PP. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 20**, quarta coluna).



**Figura 21 – Produção de citocinas em células DN por grupo experimental em V28.** Frequências de células DN produzindo as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IFN- $\gamma$ +TNF<sup>+</sup>, por grupo (representados por cores diferentes), sob estímulo pelas proteínas N, S ou SpiN e sem estímulo. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As caixas dos *boxplots* são delimitadas pelos percentis 25% (Q1) e 75% (Q3). As linhas dentro das caixas denotam as medianas. Cálculo para limite inferior:  $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Cálculo para limite superior:  $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . PP: n = 8; CoronaVac: n = 9; SpiN-Tec 20  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 60  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 100  $\mu$ g: n = 8. Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon. Significância estatística foi determinada por \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . Fonte: elaborado pela autora, 2024.

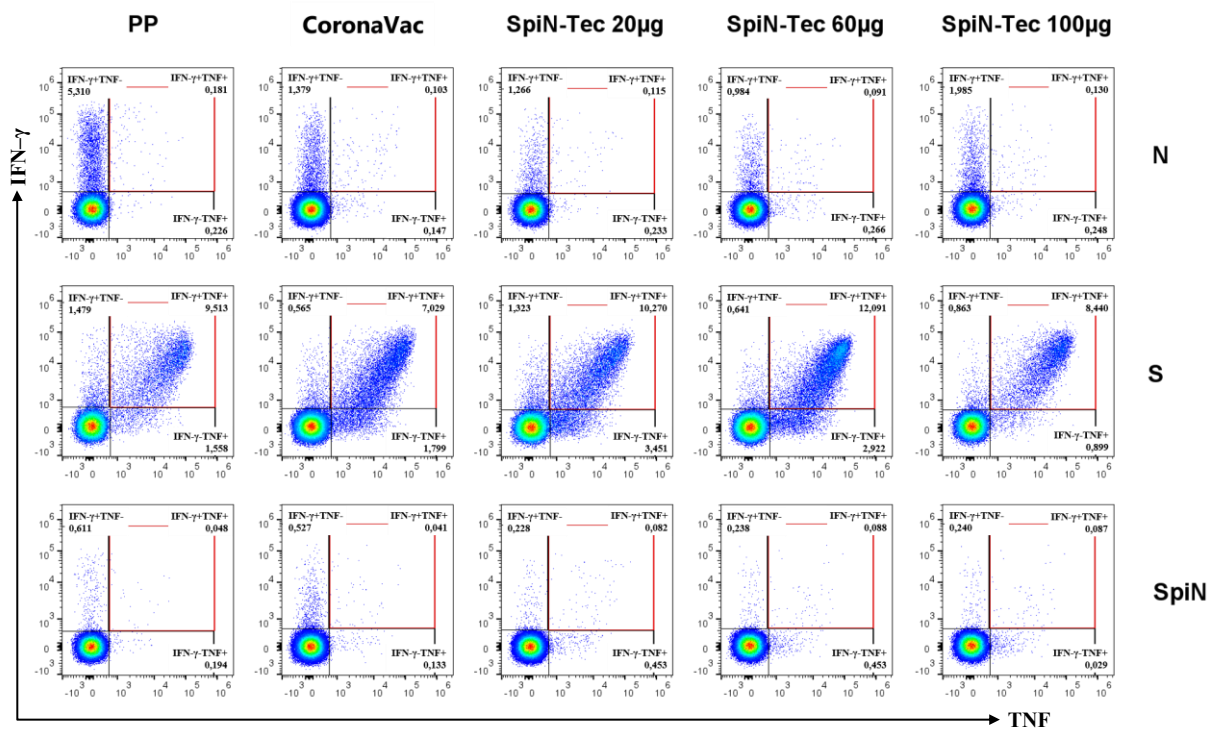
Passados 28 dias da vacinação, nas culturas não estimuladas, foi observado aumento significativo na frequência de células DN produtoras de IL-2 nos grupos que receberam CoronaVac, SpiN-Tec 20  $\mu$ g e SpiN-Tec 60  $\mu$ g em comparação com PP. Com relação à

produção de IFN- $\gamma$ , foi observada frequência significativamente menor de células DN em todos os grupos tratados em comparação com PP. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 21**, primeira coluna).

Sob estímulo da proteína N, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção de nenhuma citocina ao comparar cada um dos grupos tratados ao grupo PP (**Figura 21**, segunda coluna).

Mediante estímulo com a proteína S, os grupos que receberam SpiN-Tec 20  $\mu$ g e SpiN-Tec 60  $\mu$ g apresentaram aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$ , TNF e na co-produção de IFN- $\gamma^+$ TNF $^+$  em comparação a PP. O grupo que recebeu SpiN-Tec 100  $\mu$ g apresentou aumento significativo apenas na produção de IFN- $\gamma$  e TNF em comparação com PP. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 21**, terceira coluna).

Finalmente, o estímulo pela proteína SpiN induziu aumento significativo nas frequências de células DN produtoras de IFN- $\gamma$  e de IFN- $\gamma^+$ TNF $^+$  (representação na **Figura 22**, a seguir) em todos os grupos tratados em comparação com PP. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na produção das demais citocinas entre os grupos (**Figura 21**, quarta coluna).



**Figura 22 – Imagem representativa das células DN multifuncionais.** Células DN produtoras de IFN- $\gamma^+$ TNF $^+$ , organizadas por grupo e sob os 3 estímulos, em V28. Imagem representativa da co-expressão de IFN- $\gamma^+$ TNF $^+$  em células DN no tempo = V28. O quadrante superior esquerdo representa as células positivas para a produção de IFN- $\gamma$ . O quadrante inferior direito representa as células positivas para a produção de TNF. O quadrante superior direito representa as células multifuncionais, produtoras simultâneas de IFN- $\gamma$  e TNF. É possível perceber um

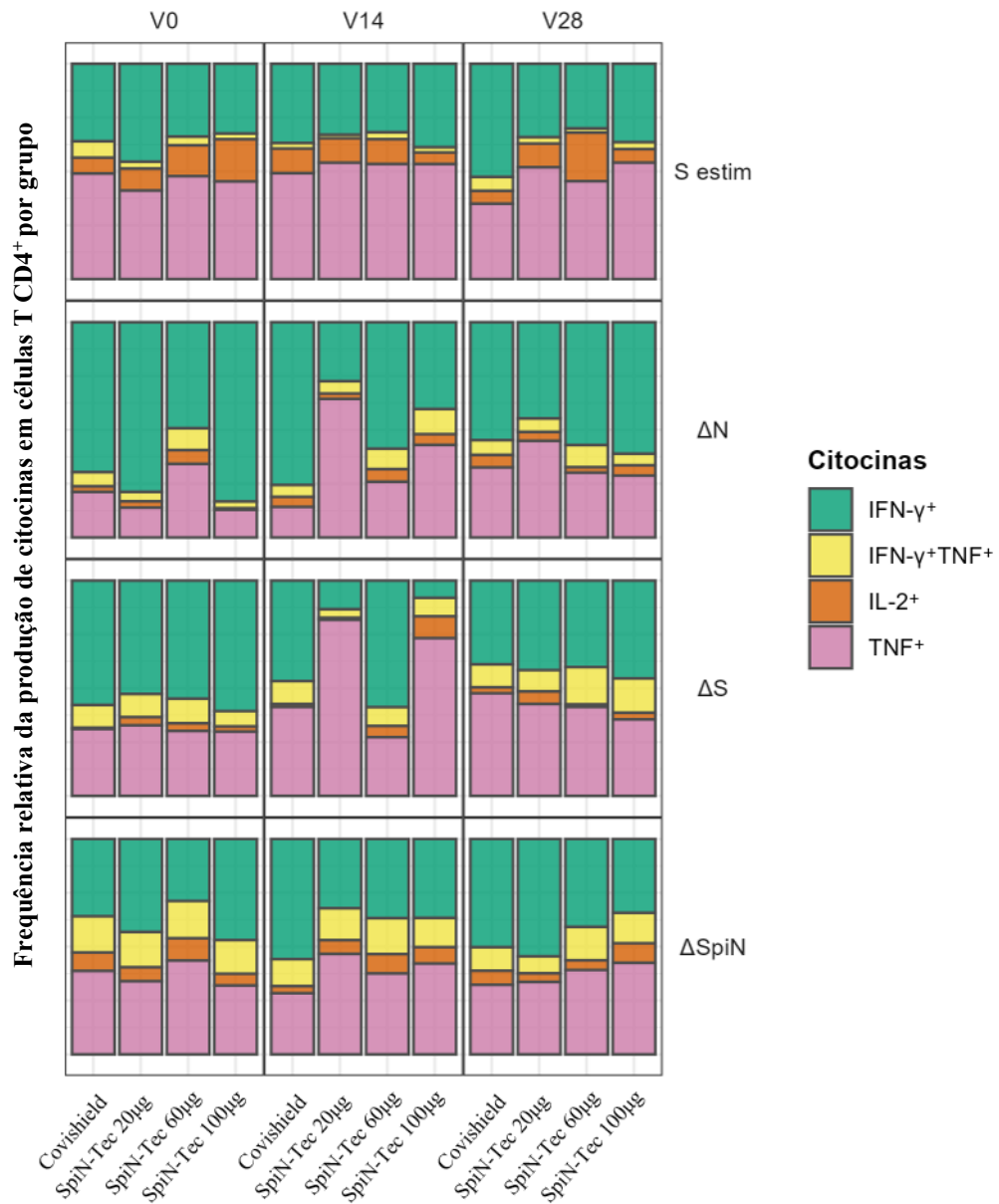
aumento significativo de pontos representando células multifuncionais nos grupos que receberam tratamento em comparação com o grupo PP, especialmente sob estímulo da proteína SpiN. Fonte: elaborado pela autora, 2024.

#### **4.4 Evolução da produção de citocinas ao longo do tempo de observação**

Em seguida, foi avaliada a variação das citocinas produzidas e a robustez da resposta específica induzida pela administração de vacina, ao longo do tempo, por grupo experimental. Essa análise tem o objetivo de identificar se houve alteração de perfil e se houve melhora (aumento da robustez) da resposta no tempo V14 em comparação ao tempo V0 (idem para V28) causada pela administração das doses de reforço.

##### ***4.4.1 Comparação da proporção de citocinas produzidas por grupo ao longo do tempo***

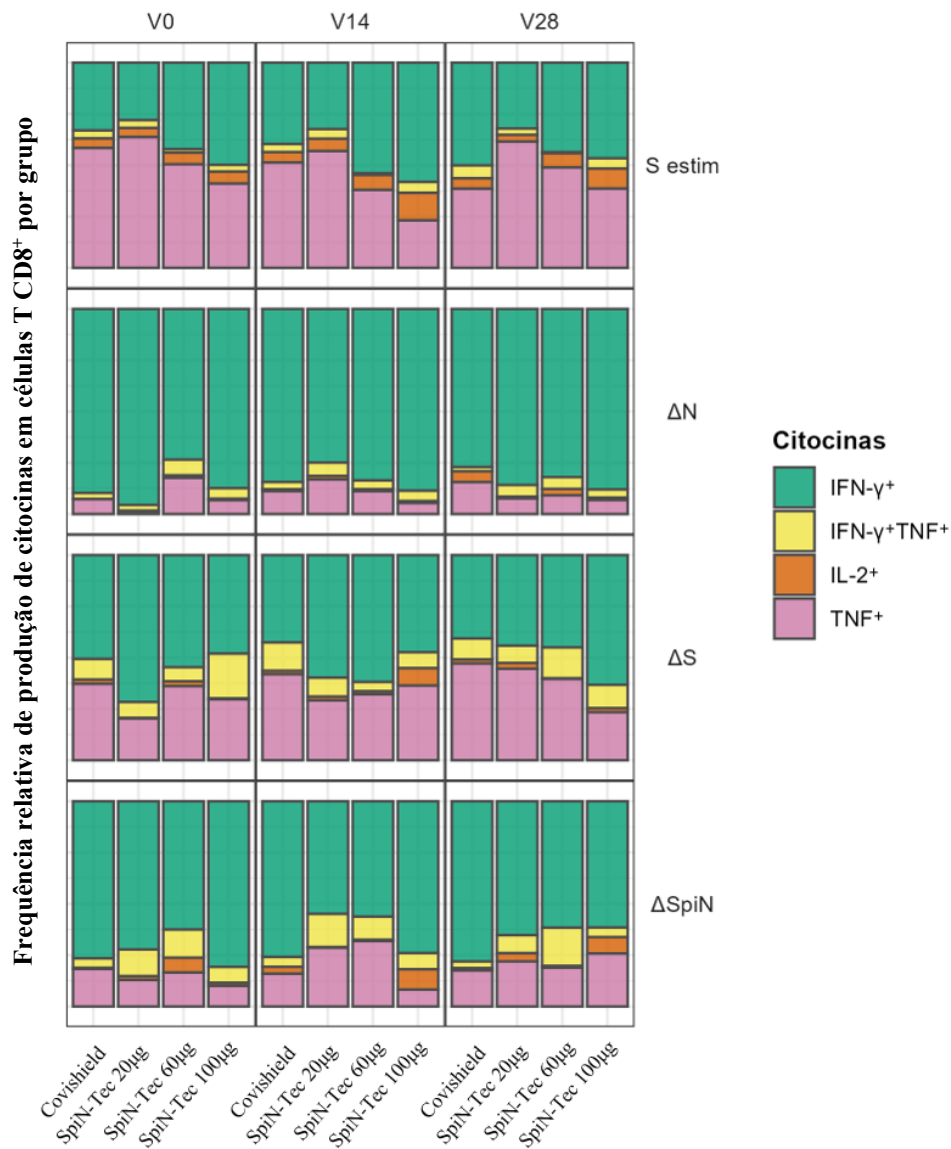
A frequência acumulada da produção de citocinas em cada grupo experimental foi calculada para determinar se houve mudança no perfil secretório ao longo dos 3 pontos do período de observação. Vale destacar-se que citocinas que foram produzidas em proporções muito menores que as demais podem ter a visualização nas figuras distorcida e aparentar não estarem presentes, uma vez que não há representação numérica da proporção de produção de cada citocina.



**Figura 23 – Proporção de citocinas produzidas por células CD4<sup>+</sup> ao longo do tempo.** Comparação da proporção de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-2, IFN-γ, TNF e IFN-γ<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>, por grupo, nos tempos V0, V14 e V28. Cada citocina é representada por uma cor. O valor delta (Δ) equivale à frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. PP: n = 8; CoronaVac: n = 9; SpiN-Tec 20 µg: n = 7; SpiN-Tec 60 µg: n = 7; SpiN-Tec 100 µg: n = 8. Fonte: elaborado pela autora, 2024.

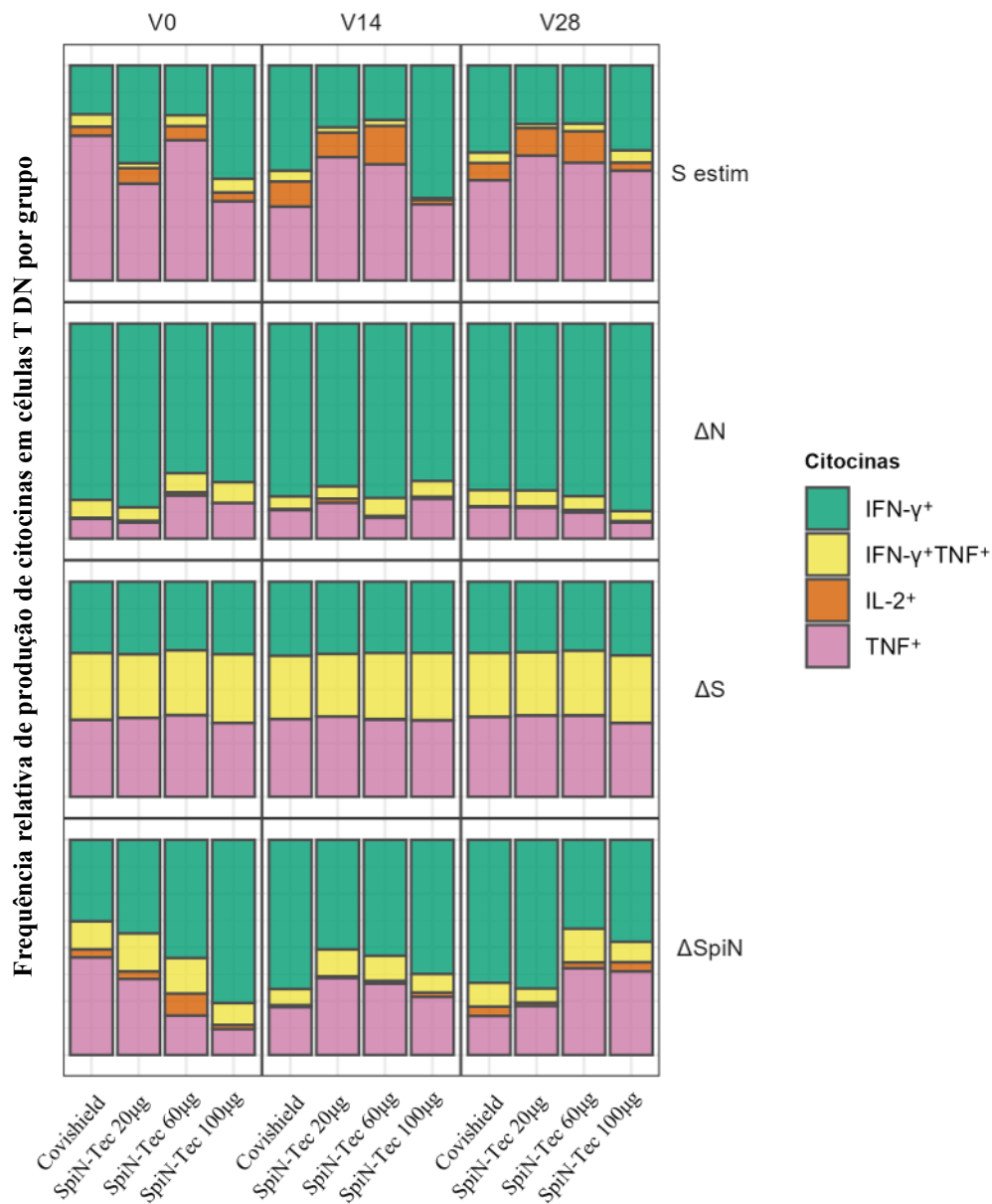
Foi possível observar produção predominante de TNF pelas células T CD4<sup>+</sup> em todos os grupos experimentais, nos três pontos do período de observação, quando não foi adicionado nenhum estímulo ao cultivo celular (**Figura 23**, primeira linha). Sob estímulo da proteína N, é possível observar predomínio de produção de IFN-γ por todos os grupos antes da administração dos tratamentos. Após a imunização com as doses de reforço, houve um aumento na produção de TNF em todos os grupos. Em V14, todos os grupos que receberam SpiN-Tec passaram a produzir mais TNF que o grupo que recebeu CoronaVac. Em V28, a produção de citocinas se

estabilizou em um perfil semelhante entre todos os grupos, com produção de IFN- $\gamma$  tendo aproximadamente o dobro de produção em comparação a TNF (**Figura 23**, segunda linha). Sob estímulo da proteína S, a produção predominante de IFN- $\gamma$  em V0 diminuiu consideravelmente em proporção em V14, especialmente para os grupos SpiN-Tec 20 e 100  $\mu\text{g}$ . Em V28, a produção de IFN- $\gamma$  e TNF se aproximou da equivalência em termos de proporção. Além disso, destaca-se o aumento da multifuncionalidade em relação aos dois tempos anteriores, especialmente nos grupos SpiN-Tec 60 e 100  $\mu\text{g}$  (**Figura 23**, terceira linha). Por fim, o estímulo da proteína SpiN induziu uma proporção maior de células IFN- $\gamma^+$ TNF $^+$  em todos os grupos e todos os tempos em comparação com os demais estímulos. Em V28, a proporção de produção de IFN- $\gamma$  diminuiu com o aumento da dose de SpiN-Tec associado ao aumento de células IFN- $\gamma^+$ TNF $^+$  e produtoras de TNF (**Figura 23**, quarta linha).



**Figura 24 – Proporção de citocinas produzidas por células CD8<sup>+</sup> ao longo do tempo.** Comparação da proporção de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>, por grupo, nos tempos V0, V14 e V28. Cada citocina é representada por uma cor. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. PP: n = 8; CoronaVac: n = 9; SpiN-Tec 20  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 60  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 100  $\mu$ g: n = 8. Fonte: elaborado pela autora, 2024.

Quando não foi adicionado nenhum estímulo ao cultivo celular, é possível observar um predomínio na produção de TNF pelas células T CD8<sup>+</sup> em V0, em todos os grupos. Em V14, detectou-se queda na produção de TNF, muito destacada para o grupo SpiN-Tec 100  $\mu$ g. Em V28, a frequência proporcional de produção das citocinas parece retornar ao perfil apresentado em V0, exceto pelo grupo CoronaVac, que passou a produzir predominantemente IFN- $\gamma$  (**Figura 24**, primeira linha). Sob estímulo da proteína N, é possível observar um predomínio evidente de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  durante todo o período de observação (**Figura 24**, segunda linha). Sob estímulo da Spike, é possível detectar predomínio da produção de IFN- $\gamma$  em V0. Em V14, parece haver diminuição na proporção de células CD8<sup>+</sup> produzindo esta citocina para todos os grupos. Em V28, os grupos CoronaVac e SpiN-Tec 20  $\mu$ g apresentam a mesma proporção de produção de IFN- $\gamma$  e TNF. Os grupos SpiN-Tec 60 e 100  $\mu$ g apresentam maior proporção de produção de IFN- $\gamma$ , de maneira dose dependente (**Figura 24**, terceira linha). Sob estímulo de SpiN, também foi observado predomínio evidente de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  durante todo o período de observação, com leve aumento na proporção de células produtoras de TNF em V28 em relação a V0 nos grupos que receberam SpiN-Tec (**Figura 24**, quarta linha).



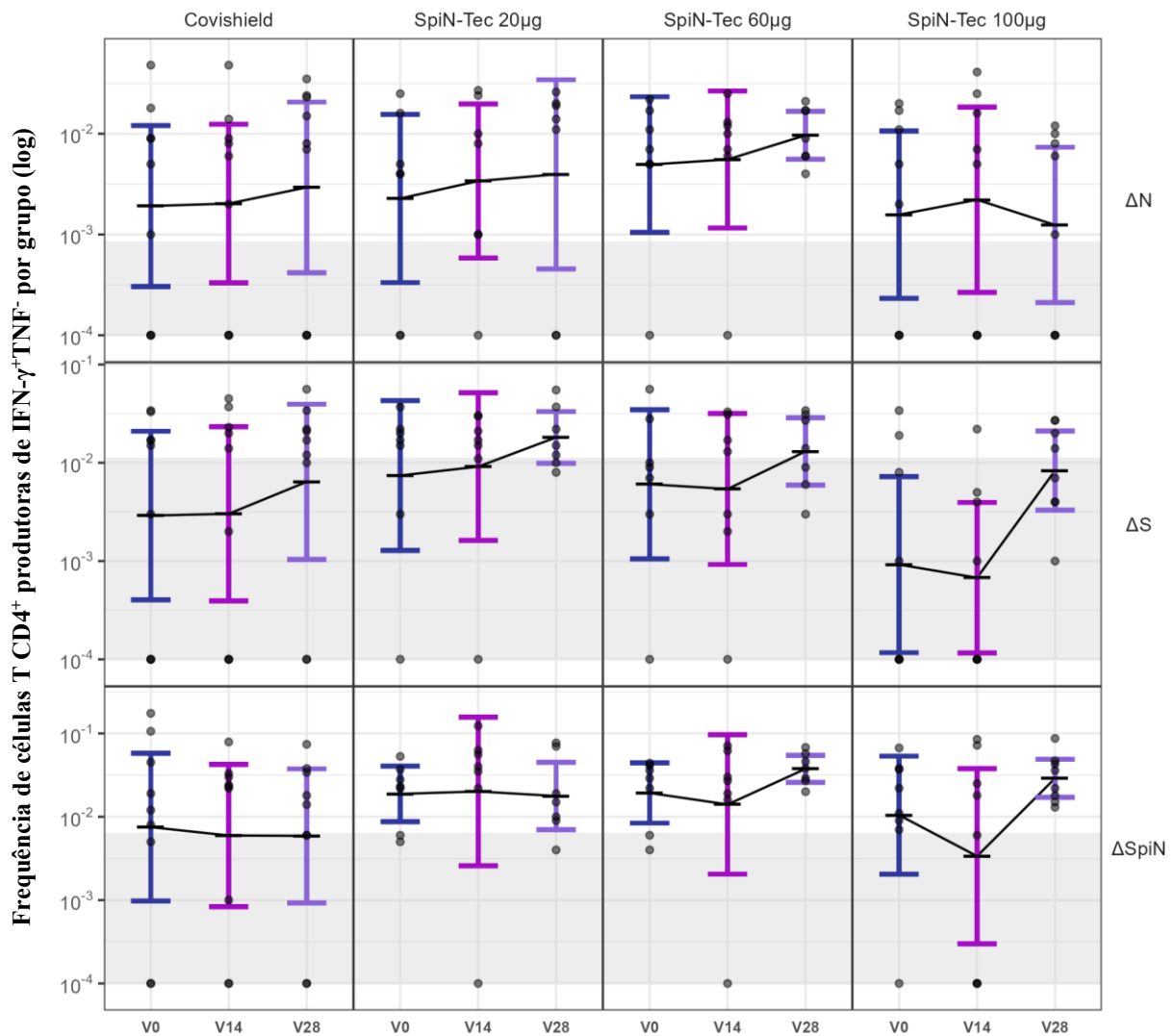
**Figura 25 – Proporção de citocinas produzidas por células DN ao longo do tempo.** Comparação da proporção de células T DN produtoras de IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IFN- $\gamma$ +TNF+, por grupo, nos tempos V0, V14 e V28. Cada citocina é representada por uma cor. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. PP: n = 8; CoronaVac: n = 9; SpiN-Tec 20  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 60  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 100  $\mu$ g: n = 8. Fonte: elaborado pela autora, 2024.

Foi possível observar que as células DN de todos os grupos foram progressivamente assemelhando seu perfil de proporção de produção de citocinas com o passar do tempo quando não foi adicionado nenhum estímulo ao cultivo celular (**Figura 25**, primeira linha). Sob estímulo da proteína N, foi possível observar um predomínio evidente de células DN produtoras de IFN- $\gamma$  durante todo o período de observação (**Figura 25**, segunda linha). Sob estímulo da proteína S, o perfil de produção de citocinas em células DN não se alterou ao longo do tempo, com equilíbrio na proporção de secreção de IFN- $\gamma$ , TNF e células multifuncionais (**Figura 25**,

terceira linha). Sob estímulo de SpiN, foi possível observar aumento progressivo na frequência de células DN produtoras de IFN- $\gamma$  ao longo do tempo no grupo CoronaVac. No grupo que recebeu SpiN-Tec 20  $\mu$ g, detectou-se aumento na frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$  apenas entre os tempos V14 e V28. Nos grupos que receberam SpiN-Tec 60 e 100  $\mu$ g, foi observada diminuição na frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$  ao longo do tempo (**Figura 25**, quarta linha).

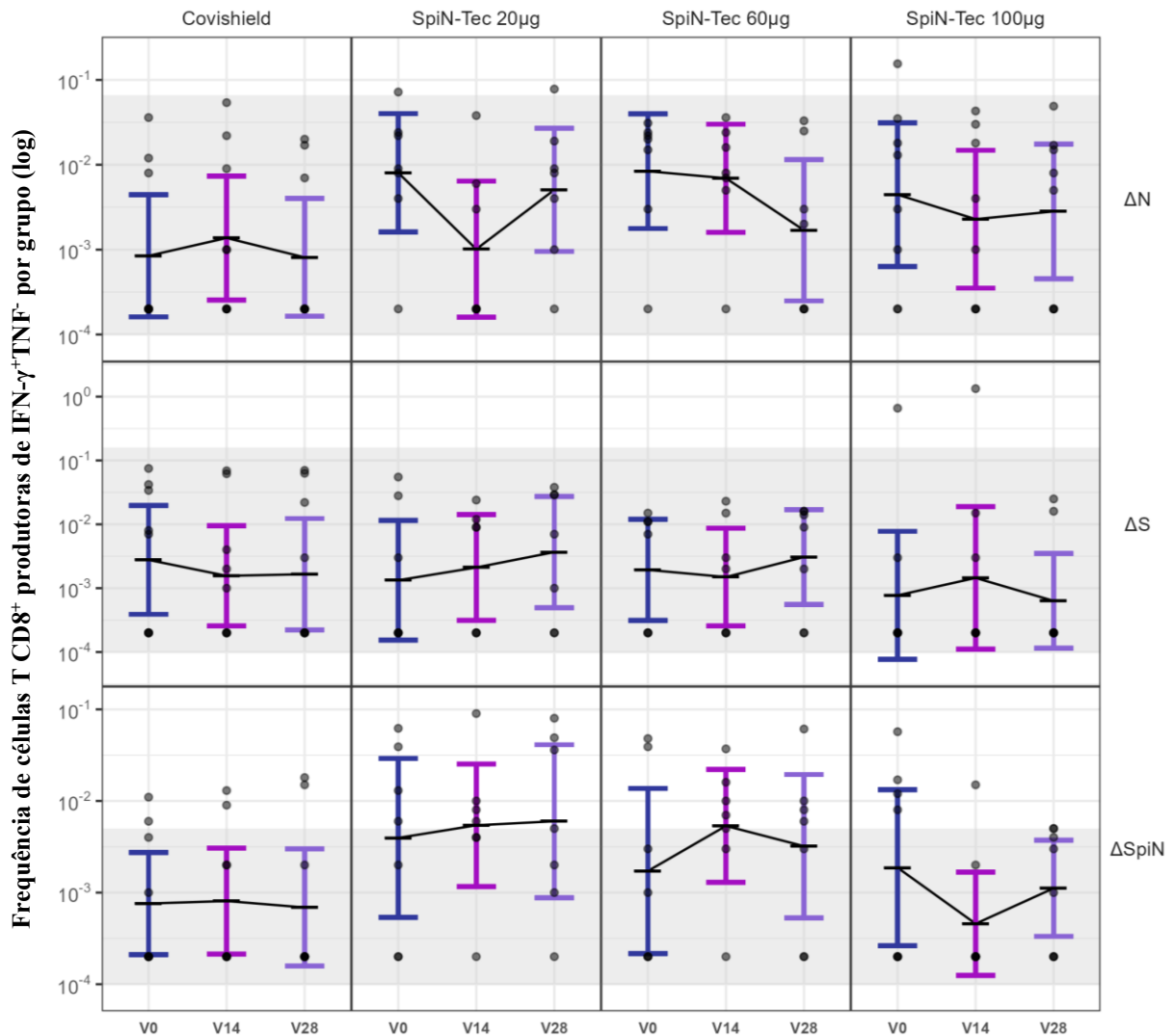
#### ***4.4.2 Evolução da produção de IFN- $\gamma^+$ TNF $^+$ ao longo do tempo, por grupo experimental***

Para avaliar se houve melhora da resposta ao longo do tempo, foi comparada a frequência de células co-produtoras de IFN- $\gamma^+$ TNF $^+$  em V14 e V28 com a resposta antes da administração do reforço, em cada grupo experimental, sob os diferentes estímulos. Ao fundo de cada gráfico, foi representada uma área sombreada em cinza claro, delimitada pelos valores mínimo e máximo de IFN- $\gamma^+$ TNF $^+$  em PP, para uso como referência do perfil de resposta antes da pandemia. A média de cada distribuição de frequência é marcada por um ponto preto. A linha que liga os pontos de média permite visualizar a tendência geral de cada população.



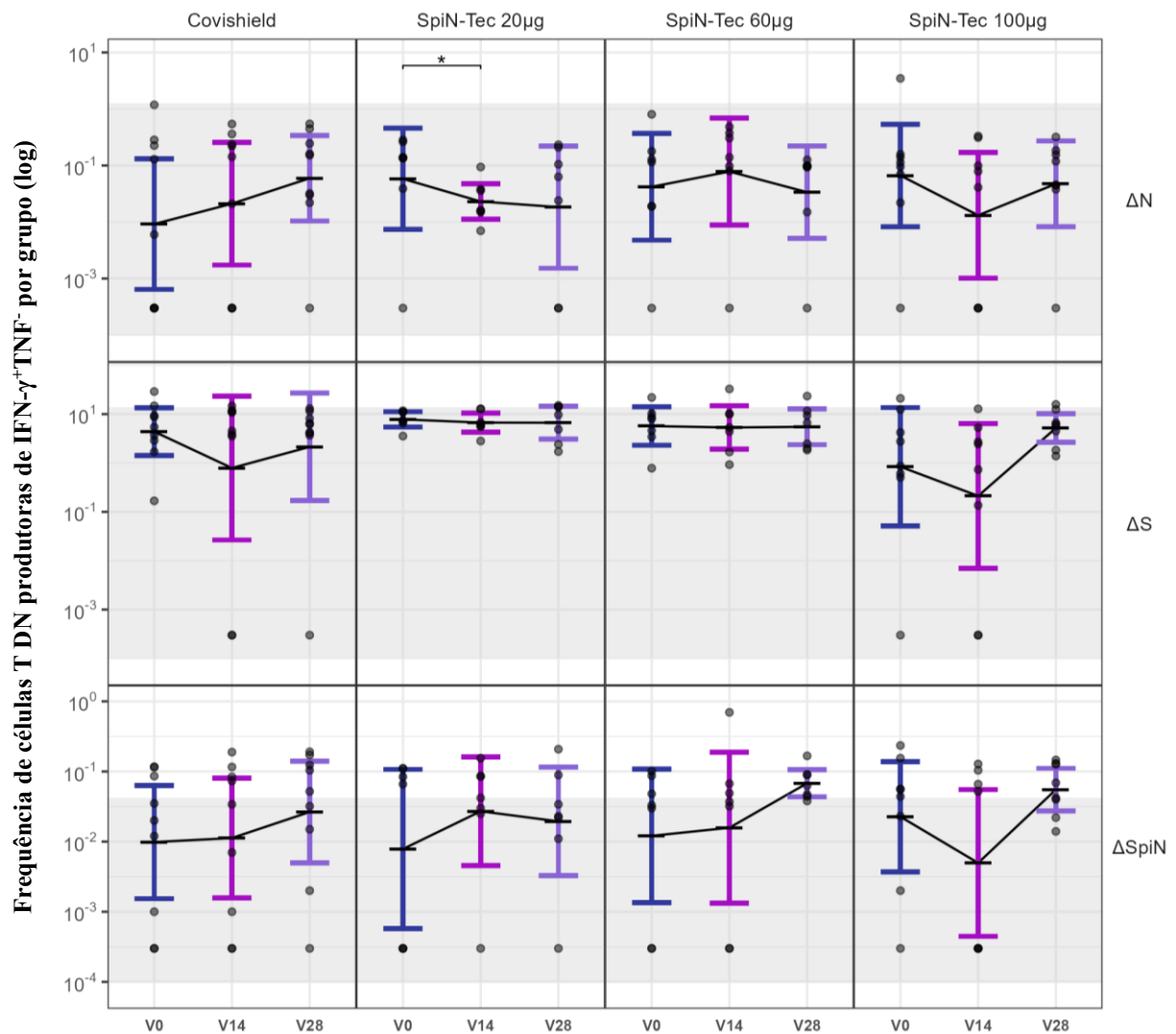
**Figura 26 – Expressão de  $CD4^+IFN-\gamma^+TNF^+$  por grupo, ao longo do período observacional.** Média geométrica das frequências de células  $CD4^+$  co-expressando  $IFN-\gamma^+TNF^+$  por grupo, nos 3 tempos de coleta de amostra ao longo do período observacional do estudo, sob os 3 estímulos proteicos. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95% para a média geométrica das frequências de produção da citocina sob determinada combinação de condições experimentais. A média geométrica é representada pela barra horizontal contida em cada barra de erro. A tendência da média geométrica ao longo do tempo é representada pelas linhas pretas que ligam as barras de média geométrica. A área sombreada de cinza é delimitada pelos valores mínimo e máximo de frequência, em PP, para a respectiva citocina e condições experimentais. PP: n = 8; CoronaVac: n = 9; SpiN-Tec 20  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 60  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 100  $\mu$ g: n = 8 (para cada ponto de tempo representado). Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon (grupo referência = V0). Fonte: elaborado pela autora, 2024.

A **Figura 26** mostra que, dentro de cada grupo experimental, não foi detectada diferença estatisticamente significativa na média geométrica da frequência de células  $CD4^+$  co-expressando  $IFN-\gamma$  e  $TNF$  entre os dias V14 e V0 ou entre os dias V28 e V0, independentemente de qual proteína tenha sido utilizada como estímulo.



**Figura 27 – Expressão de  $CD8^+IFN-\gamma^+TNF^+$  por grupo, ao longo do período observacional.** Média geométrica das frequências de células  $CD8^+$  co-expressando  $IFN-\gamma^+TNF^+$  por grupo, nos 3 tempos de coleta de amostra ao longo do período observacional do estudo, sob os 3 estímulos proteicos. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à a frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95% para a média geométrica das frequências de produção da citocina sob determinada combinação de condições experimentais. A média geométrica é representada pela barra horizontal contida em cada barra de erro. A tendência da média geométrica ao longo do tempo é representada pelas linhas pretas que ligam as barras de média geométrica. A área sombreada de cinza é delimitada pelos valores mínimo e máximo de frequência, em PP, para a respectiva citocina e condições experimentais. PP: n = 8; CoronaVac: n = 9; SpiN-Tec 20  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 60  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 100  $\mu$ g: n = 8 (para cada ponto de tempo representado). Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon (grupo referência = V0). Fonte: elaborado pela autora, 2024.

A **Figura 27** mostra que, dentro de cada grupo experimental, não foi detectada diferença estatisticamente significativa na média geométrica da frequência de células  $CD8^+$  co-expressando  $IFN-\gamma$  e  $TNF$  entre os dias V14 e V0 ou entre os dias V28 e V0, independentemente de qual proteína tenha sido utilizada como estímulo.



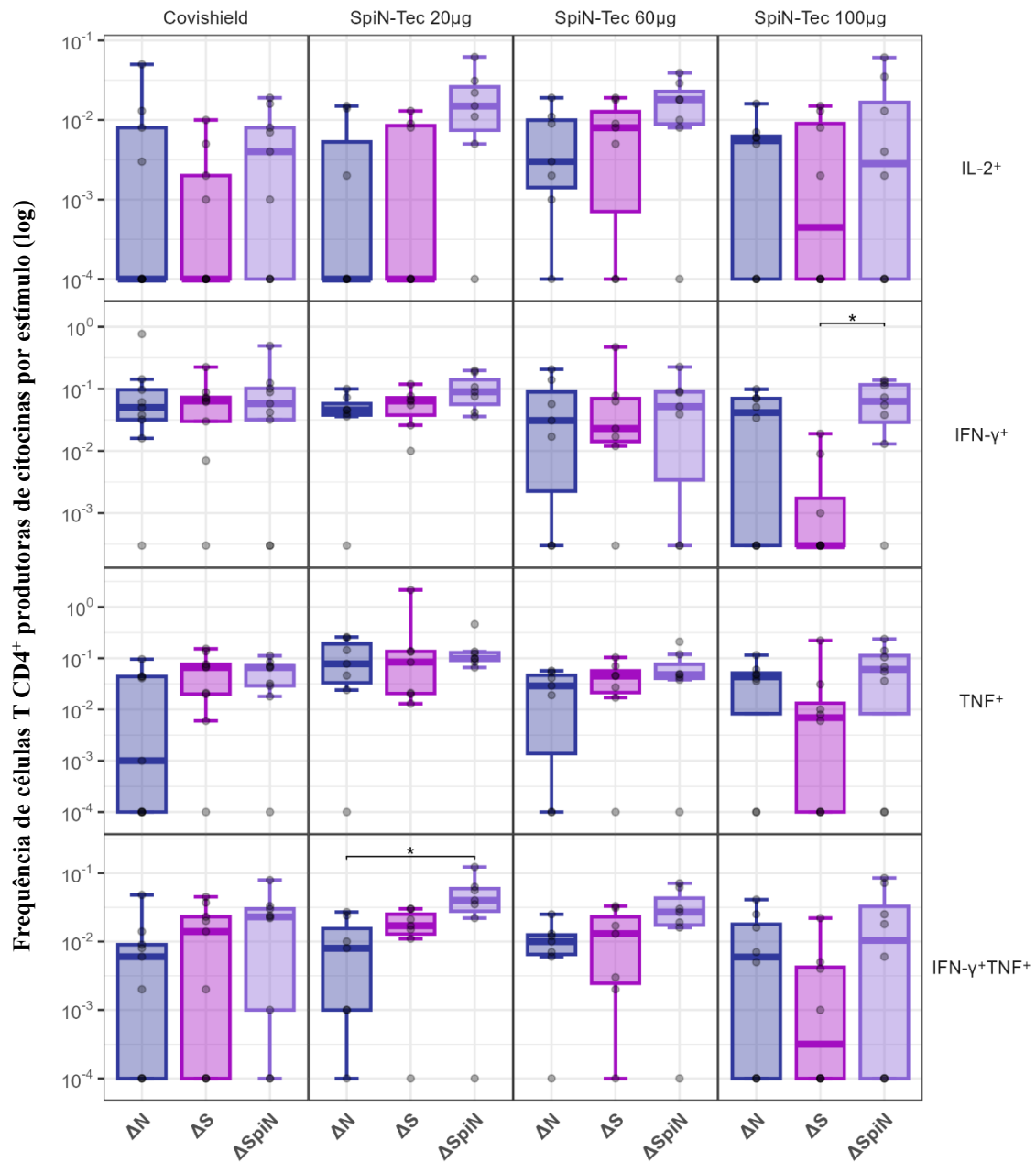
**Figura 28 – Expressão de DN<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> por grupo, ao longo do período observacional.** Média geométrica das frequências de células DN co-expressando IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> por grupo, nos 3 tempos de coleta de amostra ao longo do período observacional do estudo, sob os 3 estímulos proteicos. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à a frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95% para a média geométrica das frequências de produção da citocina sob determinada combinação de condições experimentais. A média geométrica é representada pela barra horizontal contida em cada barra de erro. A tendência da média geométrica ao longo do tempo é representada pelas linhas pretas que ligam as barras de média geométrica. A área sombreada de cinza é delimitada pelos valores mínimo e máximo de frequência, em PP, para a respectiva citocina e condições experimentais. PP: n = 8; CoronaVac: n = 9; SpiN-Tec 20  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 60  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 100  $\mu$ g: n = 8 (para cada ponto de tempo representado). Análise estatística realizada por teste de Wilcoxon (grupo referência = V0). Significância estatística foi determinada por \*:  $p \leq 0,05$ . Fonte: elaborado pela autora, 2024.

A primeira linha da **Figura 28** aponta que, sob estímulo da proteína N, o grupo SpiN-Tec 20  $\mu$ g foi o único que apresentou diminuição significativa na média geométrica da frequência de células DN co-expressando IFN- $\gamma$  e TNF entre os dias V14 e V0. Esta tendência de queda parece ser mantida entre os dias V28 e V14, porém a diferença não apresenta significância estatística. Esta diminuição significativa pode se associar à linfopenia reportada

em infecções virais, incluindo pelo SARS-CoV-2. Para os demais estímulos, dentro de cada grupo experimental, não foi detectada diferença estatisticamente significativa na média geométrica da frequência de células multifuncionais entre os dias V14 e V0 ou entre os dias V28 e V0.

#### **4.5 Avaliação das proteínas N, S e SpiN como estímulos imunes**

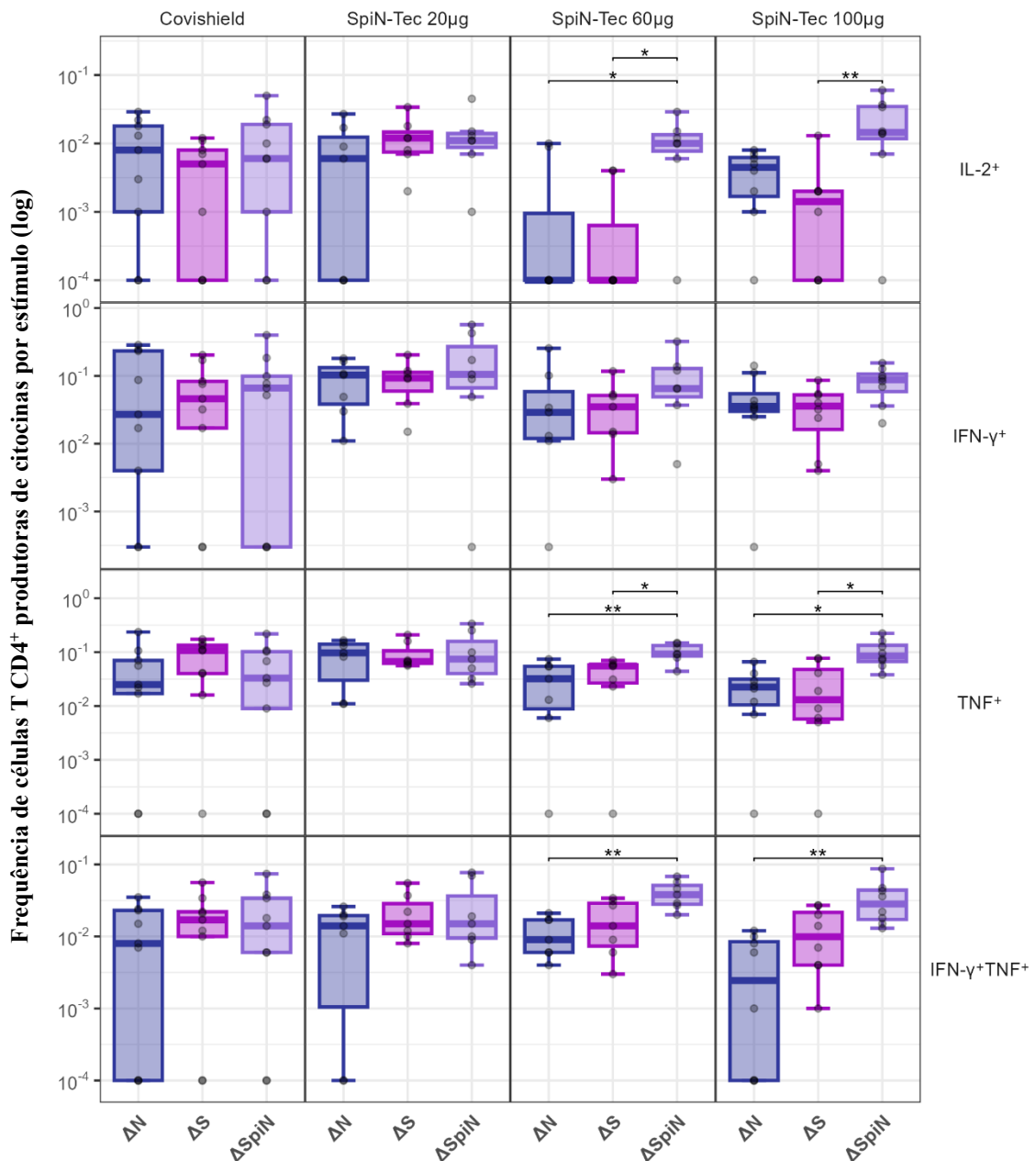
Os resultados observados até aqui indicaram que a proteína SpiN pode ser um estímulo antigênico mais potente que as proteínas N e S separadamente. Com o objetivo de testar a proteína SpiN como estímulo para os diferentes regimes de tratamento delineados neste estudo e comparar seu desempenho com o das proteínas N e S separadamente, foi avaliada frequência média de células T específicas induzidas por cada proteína após a administração de dose de reforço (tempos V14 e V28).



**Figura 29 – Comparação entre as proteínas N, S e SpiN como estímulo antigênico para células CD4<sup>+</sup> em V14.** Frequências de células CD4<sup>+</sup> produzindo as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IFN- $\gamma$ +TNF<sup>+</sup>, por grupo tratado, sob estímulo pelas proteínas N, S ou SpiN. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As caixas dos *boxplots* são delimitadas pelos percentis 25% (Q1) e 75% (Q3). As linhas dentro das caixas denotam as medianas. Cálculo para limite inferior:  $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Cálculo para limite superior:  $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . PP: n = 8; CoronaVac: n = 9; SpiN-Tec 20  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 60  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 100  $\mu$ g: n = 8. Análise estatística realizada por teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunn com correção de Bonferroni. Significância estatística foi determinada por \*:  $p \leq 0,05$ . Fonte: elaborado pela autora, 2024.

No tempo V14, a proteína SpiN parece ser o antígeno capaz de induzir maior aumento na produção de todas as citocinas por células CD4<sup>+</sup>, sob todas as combinações de condições experimentais. Entretanto, foi detectada frequência significativamente maior de produção de

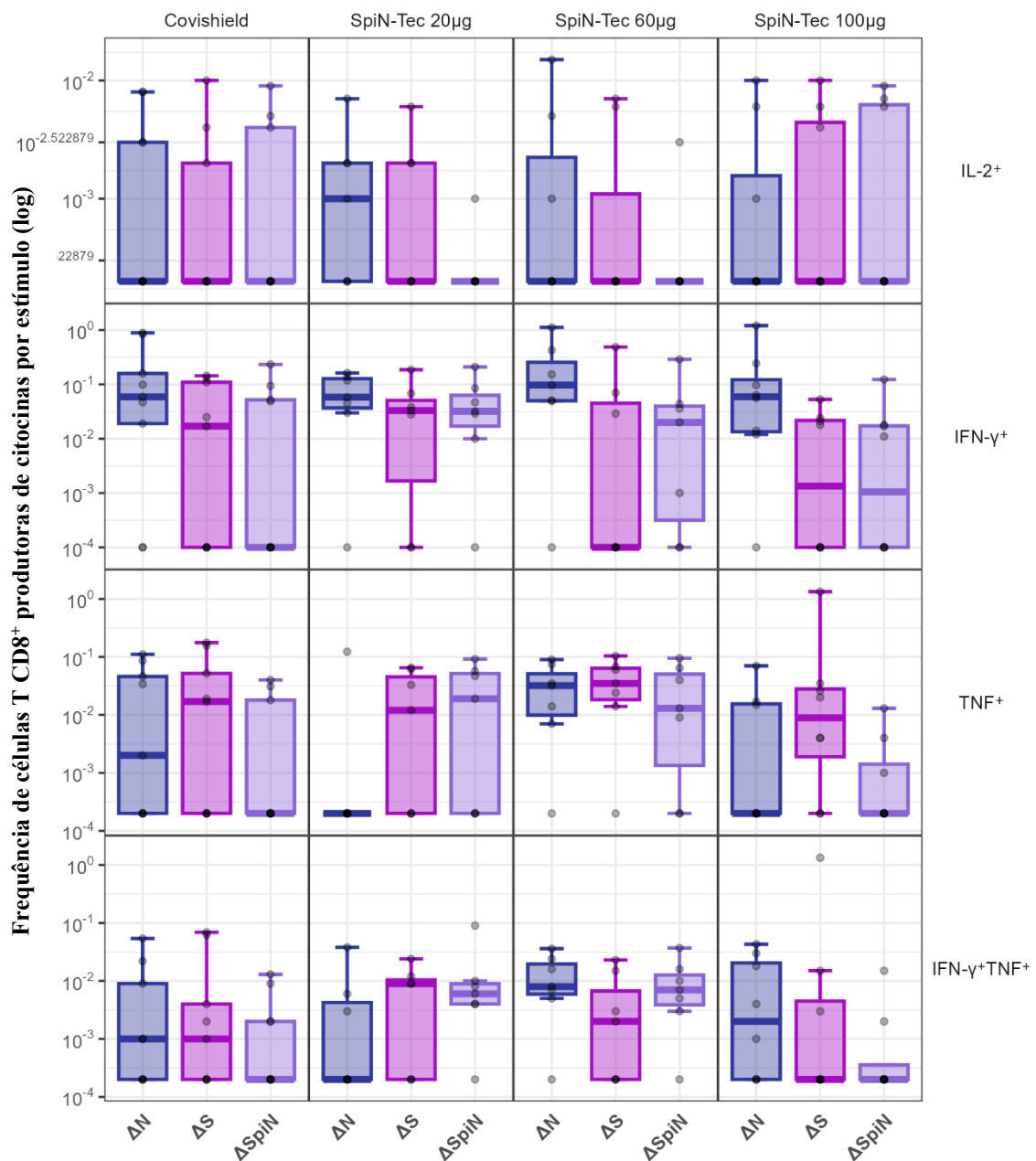
células CD4<sup>+</sup> multifuncionais apenas no grupo que recebeu SpiN-Tec 20 µg sob estímulo de SpiN em comparação com estímulo de N (**Figura 29**, segunda coluna), assim como na produção de IFN-γ pelo grupo que recebeu SpiN-Tec 100 µg em comparação com estímulo por S (**Figura 27**, quarta coluna).



**Figura 30 – Comparação entre as proteínas N, S e SpiN como estímulo antigênico para células CD4<sup>+</sup> em V28.** Frequências de células CD4<sup>+</sup> produzindo as citocinas IL-2, IFN-γ, TNF e IFN-γ+TNF<sup>+</sup>, por grupo tratado, sob estímulo pelas proteínas N, S ou SpiN. O valor delta (Δ) equivale à a frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As caixas dos *boxplots* são delimitadas pelos percentis 25% (Q1) e 75% (Q3). As linhas dentro das caixas denotam as medianas. Cálculo para limite inferior: Q1 - 1,5 x (Q3 - Q1). Cálculo para limite superior: Q3 + 1,5 x (Q3 - Q1). PP: n = 8; CoronaVac: n = 9; SpiN-Tec 20 µg: n = 7; SpiN-Tec 60 µg: n = 7; SpiN-Tec 100 µg: n = 8. Análise estatística realizada por teste de Kruskal-Wallis e teste

*post hoc* de comparações múltiplas de Dunn com correção de Bonferroni. Significância estatística foi determinada por \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ . Fonte: elaborado pela autora, 2024.

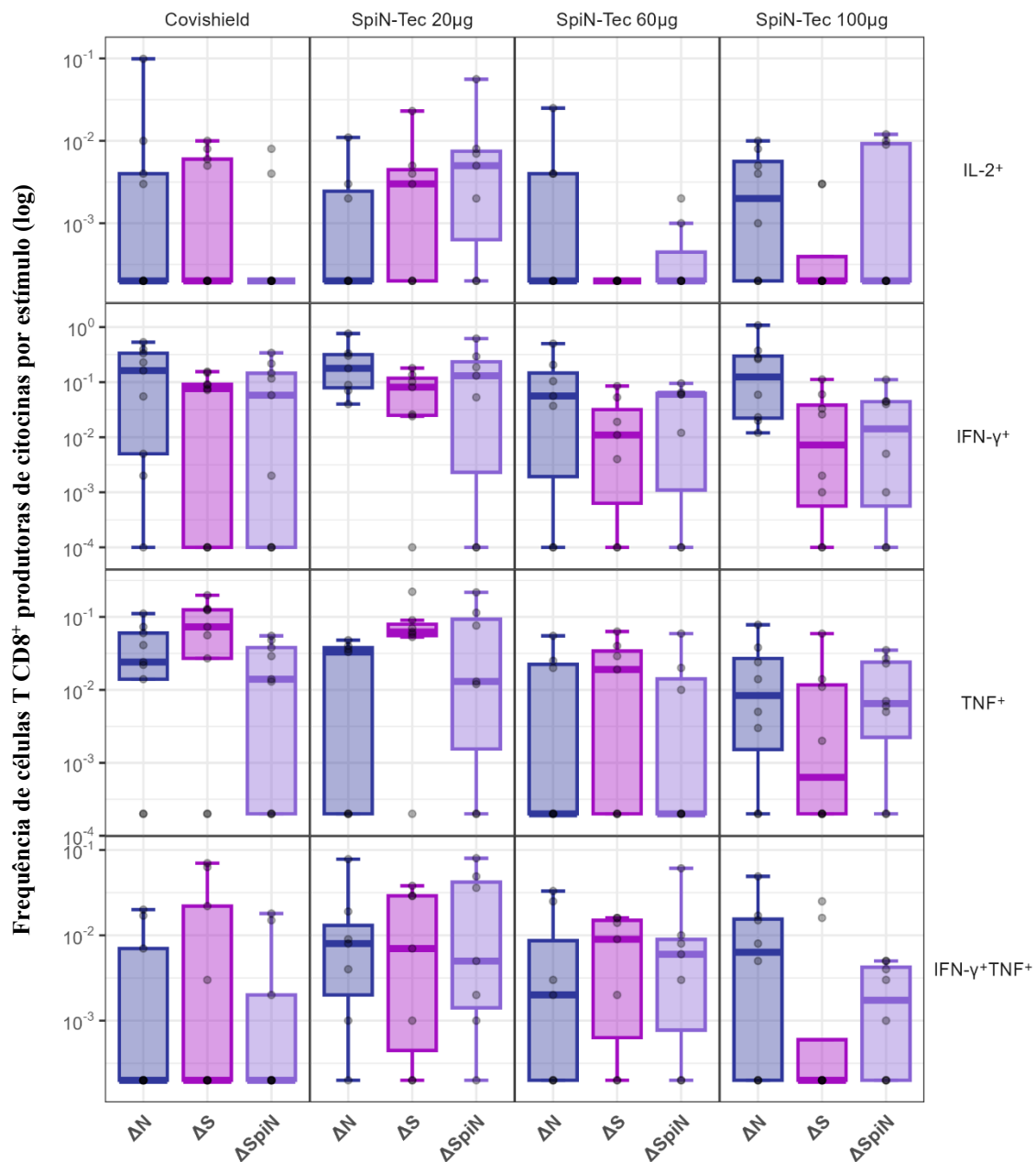
No tempo V28, foi detectada frequência significativamente maior de células  $CD4^+$  produtoras de IL-2 nos grupos que receberam SpiN-Tec 60  $\mu\text{g}$  e SpiN-Tec 100  $\mu\text{g}$ , sob estímulo de SpiN, em comparação com estímulo de N e S e em comparação somente com estímulo de S, respectivamente., assim como na frequência de células  $CD4^+$  produtoras de IFN- $\gamma$  no grupo que recebeu SpiN-Tec 100  $\mu\text{g}$  em comparação com estímulo por S (**Figura 30**, terceira e quarta colunas).



**Figura 31 – Comparação entre as proteínas N, S e SpiN como estímulo antigênico para células  $CD8^+$  em V14.** Frequências de células  $CD8^+$  produzindo as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IFN- $\gamma$ +TNF+, por grupo tratado, sob estímulo pelas proteínas N, S ou SpiN. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à a frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas

para este marcador sob determinado estímulo proteico. As caixas dos *boxplots* são delimitadas pelos percentis 25% (Q1) e 75% (Q3). As linhas dentro das caixas denotam as medianas. Cálculo para limite inferior:  $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Cálculo para limite superior:  $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . PP: n = 8; CoronaVac: n = 9; SpiN-Tec 20  $\mu\text{g}$ : n = 7; SpiN-Tec 60  $\mu\text{g}$ : n = 7; SpiN-Tec 100  $\mu\text{g}$ : n = 8. Análise estatística realizada por teste de Kruskal–Wallis e teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunn com correção de Bonferroni. Fonte: elaborado pela autora, 2024.

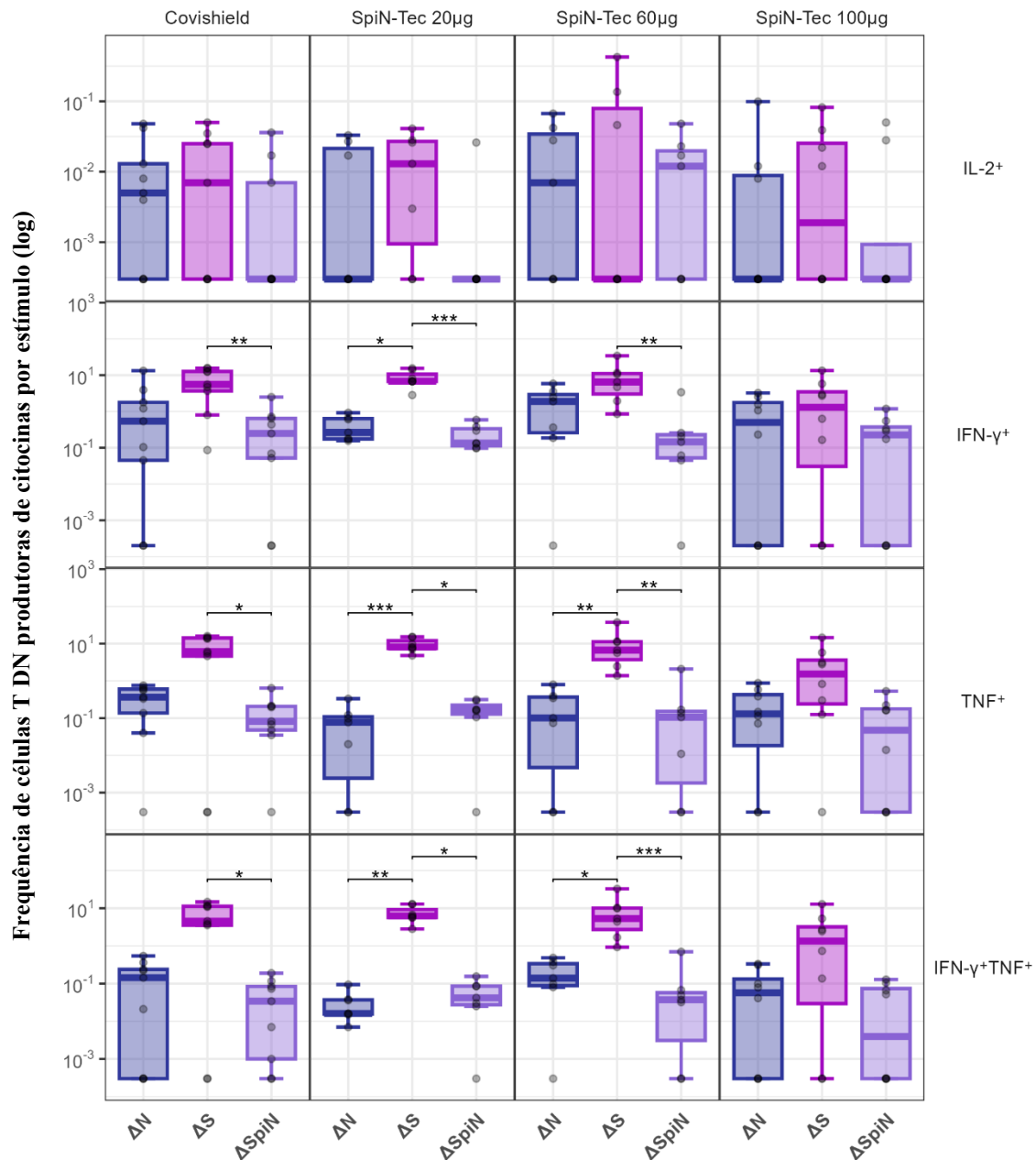
A **Figura 31** mostra que, no tempo V14, nenhum dos estímulos foi capaz de induzir diferença estatisticamente significativa, dentro dos grupos, na frequência de células  $\text{CD8}^+$  produtoras de citocinas.



**Figura 32** – Comparação entre as proteínas N, S e SpiN como estímulo antigênico para células  $\text{CD8}^+$  em V28. Frequências de células  $\text{CD8}^+$  produzindo as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IFN- $\gamma$ +TNF+, por grupo tratado, sob estímulo pelas proteínas N, S ou SpiN. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à a frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As caixas dos *boxplots* são delimitadas pelos percentis 25%

(Q1) e 75% (Q3). As linhas dentro das caixas denotam as medianas. Cálculo para limite inferior:  $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Cálculo para limite superior:  $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . PP: n = 8; CoronaVac: n = 9; SpiN-Tec 20  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 60  $\mu$ g: n = 7; SpiN-Tec 100  $\mu$ g: n = 8. Análise estatística realizada por teste de Kruskal–Wallis e teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunn com correção de Bonferroni. Fonte: elaborado pela autora, 2024.

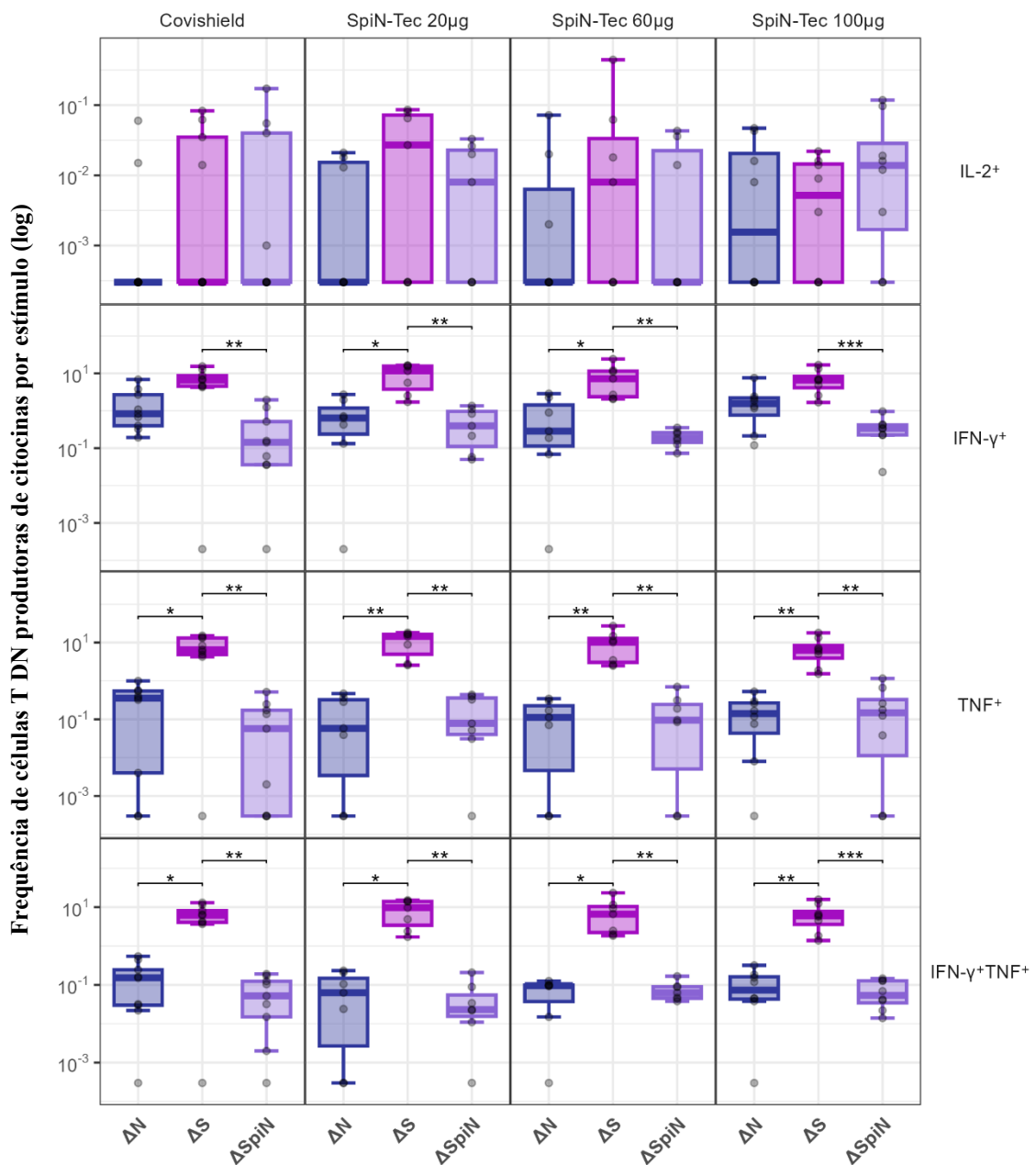
A **Figura 32** mostra que, no tempo V28, nenhum dos estímulos foi capaz de induzir diferença estatisticamente significativa, dentro dos grupos, na frequência de células CD8<sup>+</sup> produtoras de citocinas.



**Figura 33 – Comparação entre as proteínas N, S e SpiN como estímulo antigênico para células DN em V14.** Frequências de células DN produzindo as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup>, por grupo tratado, sob estímulo pelas proteínas N, S ou SpiN. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à a frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador sob determinado estímulo proteico. As caixas dos *boxplots* são delimitadas pelos percentis 25% (Q1) e 75% (Q3). As linhas dentro das caixas denotam as medianas. Cálculo para limite inferior:  $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Cálculo para limite superior:  $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . PP: n = 8; CoronaVac: n = 9; SpiN-Tec 20  $\mu$ g: n = 7;

SpiN-Tec 60  $\mu\text{g}$ : n = 7; SpiN-Tec 100  $\mu\text{g}$ : n = 8. Análise estatística realizada por teste de Kruskal–Wallis e teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunn com correção de Bonferroni. Significância estatística foi determinada por \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . Fonte: elaborado pela autora, 2024.

No tempo V14, a proteína S foi capaz de induzir frequência significativamente maior de células DN produtoras de todas as citocinas, exceto por IL-2, nos grupos que receberam CoronaVac, SpiN-Tec 20  $\mu\text{g}$  e SpiN-Tec 60  $\mu\text{g}$  em comparação com os demais estímulos (**Figura 33**, primeira a terceira coluna).



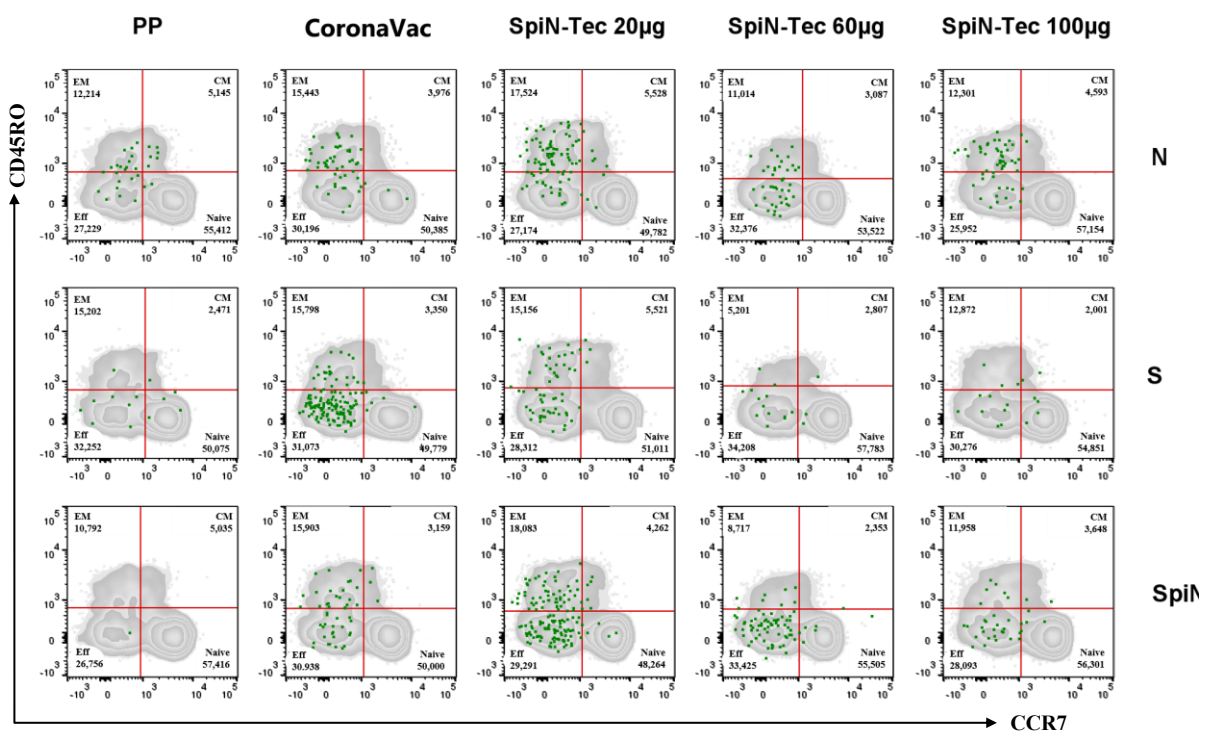
**Figura 34** – Comparação de N, S e SpiN como estímulo antigênico para células DN em V28. Frequências de células DN produzindo as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IFN- $\gamma$ +TNF+, por grupo tratado, sob estímulo pelas proteínas N, S ou SpiN. O valor delta ( $\Delta$ ) equivale à frequência de células positivas para um marcador na amostra não estimulada (*background de sua expressão basal*) menos a frequência de células positivas para este marcador

sob determinado estímulo proteico. As caixas dos *boxplots* são delimitadas pelos percentis 25% (Q1) e 75% (Q3). As linhas dentro das caixas denotam as medianas. Cálculo para limite inferior:  $Q1 - 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . Cálculo para limite superior:  $Q3 + 1,5 \times (Q3 - Q1)$ . PP: n = 8; CoronaVac: n = 9; SpiN-Tec 20 µg: n = 7; SpiN-Tec 60 µg: n = 7; SpiN-Tec 100 µg: n = 8. Análise estatística realizada por teste de Kruskal–Wallis e teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunn com correção de Bonferroni. Significância estatística foi determinada por \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . Fonte: elaborado pela autora, 2024.

No tempo V28, a proteína S foi capaz de induzir frequência significativamente maior de células DN produtoras de todas as citocinas, exceto por IL-2, em todos os grupos que receberam tratamento em comparação com os demais estímulos (**Figura 34**, segunda a quarta linha).

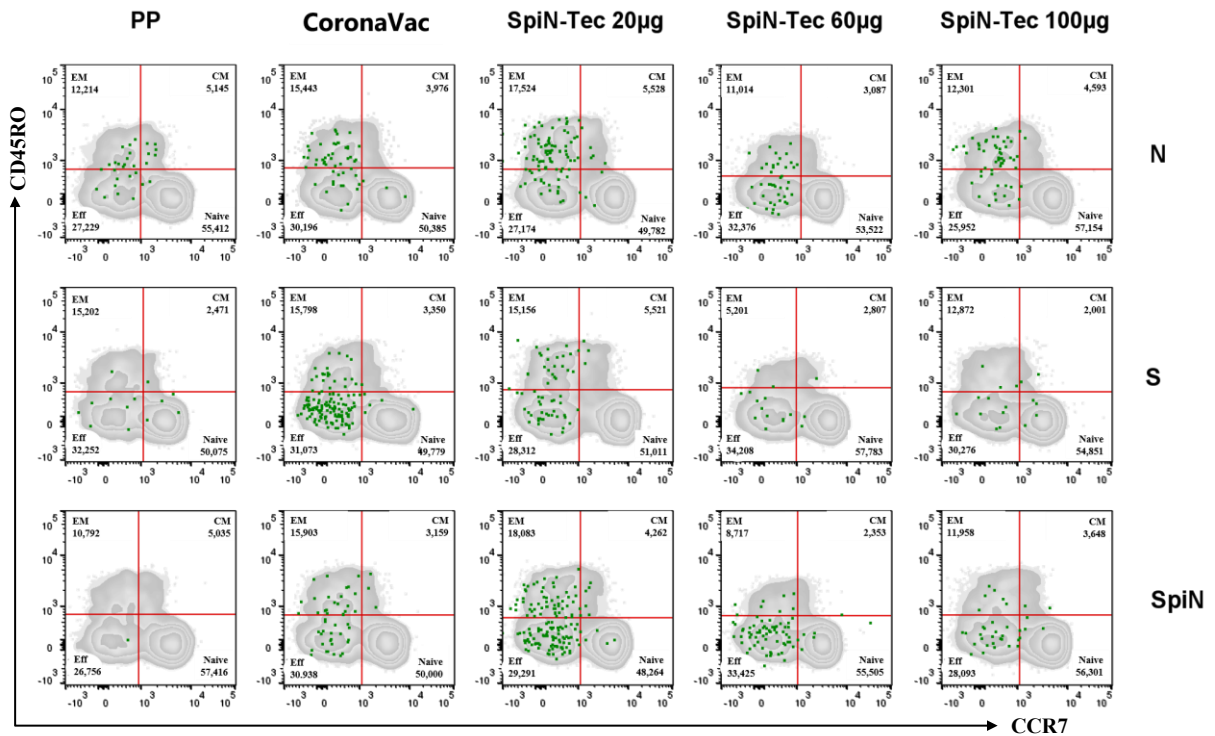
#### 4.6 Avaliação das subpopulações de memória celular

Para determinar os fenótipos das células T específicas induzidas pela administração das doses de reforço no último ponto de coleta de amostras dentro do período de observação, foi avaliada a proporção de células  $CD4^+$  e  $CD8^+$  co-produtoras de  $IFN-\gamma^+TNF^+$  em cada compartimento de memória, de acordo com a expressão de CD45RO e CCR7. Cada painel que constitui as **Figuras 35 e 36** representa compartimento de memória em que foram incluídas as células multifuncionais dentro um grupo experimental específico e sob determinado estímulo. Sendo assim, para facilitar a identificação de cada combinação de características experimentais para cada ponto da análise, os painéis serão designados doravante de acordo com sua posição [x, y], assumindo que as figuras sejam interpretadas como uma matriz de 5x3.



**Figura 35 – Localização das células  $CD4^+IFN-\gamma^+TNF^+$  nas subpopulações de memória em V28.** Imagem representativa da localização, dentro das subpopulações de memória, de células  $CD4^+$  com co-expressão de  $IFN-\gamma^+TNF^+$ . Representação mediante concatenação das amostras de todos os pacientes incluídos na análise estatística em cada grupo. Os eixos vermelhos dividem os painéis em quadrantes, de acordo com a expressão de  $CD45RO$  e de  $CCR7$ . O quadrante superior esquerdo (Q1) representa as células de EM, com fenótipo  $CD45RO^+CCR7^-$ . O quadrante superior direito (Q2) representa as células de CM, com fenótipo  $CD45RO^+CCR7^+$ . O quadrante inferior esquerdo (Q3) representa as células Eff, com fenótipo  $CD45RO^-CCR7^-$ . O quadrante inferior direito (Q4) representa as células naïve, de fenótipo  $CD45RO^-CCR7^+$ . As células  $CD4^+$  multifuncionais são representadas pelos pontos verdes. Fonte: elaborado pela autora, 2024.

No grupo PP, é possível observar uma frequência muito baixa de células  $CD4^+$  com co-expressão de  $IFN-\gamma^+TNF^+$ , sob todos os estímulos, localizadas predominantemente no compartimento de CM (**Figura 35**, Q2 dos painéis [1,1], [1,2] e [1,3]). O compartimento que concentra mais as células  $CD4^+$  co-produtoras de  $IFN-\gamma^+TNF^+$ , em todos os grupos tratados e sob todos os estímulos, é o compartimento de EM. Foi observado aumento significativo na frequência destas células em todos os grupos em comparação com PP (**Figura 35**, Q1 dos painéis [2,1], [3,1], [4,1] e [5,1] vs [1,1]). O segundo compartimento que mais concentra células  $CD4^+$  co-produtoras de  $IFN-\gamma^+TNF^+$ , em todos os grupos tratados e sob todos os estímulos, é o compartimento de CM. Sob estímulo de SpiN, todos os grupos que receberam SpiN-Tec apresentam aumento significativo na frequência destas células em comparação com PP (**Figura 35**, Q2 dos painéis [3,3], [3,4] e [3,5] vs [1,1]). Sob estímulo de SpiN, grupos que receberam SpiN-Tec 20 e 60  $\mu$ g apresentam, ainda, aumento significativo na frequência de células  $CD4^+$  co-produtoras de  $IFN-\gamma^+TNF^+$  localizadas no compartimento de Eff em comparação com PP (**Figura 35**, Q3 dos painéis [3,4] e [3,5] vs [1,1]).



**Figura 36 – Localização das células  $CD8^+IFN-\gamma^+TNF^+$  nas subpopulações de memória em V28.** Imagem representativa da localização, dentro das subpopulações de memória, de células  $CD8^+$  com co-expressão de  $IFN-\gamma^+TNF^+$ . Representação mediante concatenação das amostras de todos os pacientes incluídos na análise estatística em cada grupo. Os eixos vermelhos dividem os painéis em quadrantes, de acordo com a expressão de CD45RO e de CCR7. O quadrante superior esquerdo (Q1) representa as células de EM, com fenótipo  $CD45RO^+CCR7^-$ . O quadrante superior direito (Q2) representa as células de CM, com fenótipo  $CD45RO^+CCR7^+$ . O quadrante inferior esquerdo (Q3) representa as células Eff, com fenótipo  $CD45RO^-CCR7^-$ . O quadrante inferior direito (Q4) representa as células naïve, de fenótipo  $CD45RO^-CCR7^+$ . As células  $CD8^+$  multifuncionais são representadas pelos pontos verdes. Fonte: elaborado pela autora, 2024.

No grupo PP, é possível observar uma frequência muito baixa de células  $CD8^+$  com co-expressão de  $IFN-\gamma^+TNF^+$ , sob todos os estímulos, localizadas, em ordem decrescente de predominância, nos compartimentos Eff, EM e CM, respectivamente (**Figura 36**, painéis [1,1], [1,2] e [1,3]). Sob estímulo da proteína N, todos os grupos tratados apresentam ordem decrescente de predominância de células  $CD8^+$  co-produtoras de  $IFN-\gamma^+TNF^+$  nos compartimentos EM, Eff e CM, respectivamente (**Figura 36**, Q2 dos painéis [2,1], [3,1] e [4,1] vs [1,1]). Sob estímulo das proteínas S e SpiN, todos os grupos tratados exceto SpiN-Tec 20  $\mu$ g apresentam ordem decrescente de predominância de células  $CD8^+$  co-produtoras de  $IFN-\gamma^+TNF^+$  nos compartimentos Eff, EM e CM, respectivamente (**Figura 36**, Q3 dos painéis [2,2], [4,2] e [5,2] vs [1,2] e Q3 dos painéis [2,3], [4,3] e [5,3] vs [1,3]). Já o grupo SpiN-Tec 20  $\mu$ g, em comparação com PP, apresentou aumento significativo na frequência dessas células em EM sob estímulo de S e em Eff sob estímulo de SpiN (**Figura 36**, Q2 do painel [3,2] vs [1,2] e Q3 do painel [3,3] vs [1,3]). As versões das **Figuras 35 e 36** contendo a estatística estão disponíveis nos **ANEXOS A e B**.

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou a resposta imune celular induzida pela administração da vacina recombinante SpiN-Tec MCTI UFMG como candidata a dose de reforço no regime de vacinação heteróloga contra a COVID-19. Para isso, foram empregados marcadores de ativação de superfície celular de células T, de produção de citocinas e marcadores de compartimentos de memória imune, cuja expressão combinada permite determinar os fenótipos e frequências das populações celulares induzidas após a imunização com o produto investigacional, assim como comparar seu desempenho com o desempenho do comparador ativo.

Como pano de fundo para essa discussão, é importante relembrar o contexto imunológico em que se encontra a população de estudo em dois pontos no tempo: para as amostras coletadas no período que antecede a pandemia (amostras de pacientes saudáveis, coletadas para um estudo anterior com o tema Dengue, negativas para anticorpos contra a proteína NS1, incluídas aqui em um grupo chamado de PP ou Pré-Pandêmico), podemos afirmar que os indivíduos são naïve para as proteínas do SARS-CoV-2 e não havia influência destas sobre os marcadores de referência; no período em que se deu o início do estudo, virtualmente toda a população já foi exposta direta ou indiretamente aos antígenos do vírus, seja através da infecção ou da vacinação. Portanto, neste panorama investigacional, as amostras PP foram empregadas como grupo controle não exposto e esperava-se que os PBMCs desses participantes não apresentassem resposta adaptativa quando estimulados pelas proteínas N, S e SpiN. Em contraste, já se esperava detectar resposta imune específica prévia em todas as amostras dos participantes do ensaio clínico (adquirida pelo regime primário de imunização + uma dose de reforço).

Nossas análises relativas ao tempo zero, anterior à administração das doses de reforço, apontam que a adição dos estímulos proteicos N, S e SpiN induziu a ativação e expansão de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> específicas (**Figuras 8 e 9**), validando nossa metodologia para a avaliação do candidato vacinal. Houve aumento da frequência de células CD4<sup>+</sup> expressando todos os marcadores de ativação mediante estímulo de SpiN, que não causou a mesma resposta nas células CD8<sup>+</sup>. No entanto, era esperado que as amostras de participantes do estudo, sabidamente imunes, apresentassem frequências mais altas de expressão dos marcadores de ativação em comparação ao grupo PP, que estaria, teoricamente, montando uma resposta primária contra as proteínas do SARS-CoV-2. Entretanto, alguns dos resultados não confirmaram esse pressuposto – como a frequência de células CD4 e CD8 expressando CD69,

que foi maior no grupo PP sob estímulo da proteína S – e podem ser indicativos de reação cruzada de células T induzidas, por exemplo, contra os coronavírus endêmicos que causam infecções respiratórias sazonalmente. Estas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ativadas responderam ao estímulo pela produção de citocinas (**Figuras 11 e 12**). Em comparação com os resultados do grupo PP, células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> apresentaram aumento estatisticamente significativo na produção de IFN- $\gamma$  e na co-produção de IFN- $\gamma$  e TNF na presença do estímulo por SpiN, o que não foi verificado na produção isolada de TNF. A literatura aponta inúmeros casos de indivíduos considerados naïve para a infecção pelo SARS-CoV-2 que apresentam resposta de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em cultura de PBMC sob estímulo da proteína S, indicativo de resposta cruzada de células que reconhecem outros coronavírus endêmicos que causam infecções das vias aéreas sazonalmente (GUERRERA *et al.*, 2021; MARINGER *et al.*, 2022; NELDE *et al.*, 2021; PAINTER *et al.*, 2021), corroborando com nossos achados.

Os marcadores de ativação CD69, CD134, CD137 e CD154 são frequentemente empregados na detecção de células T específicas para determinado antígeno, pois passam por regulação positiva após o estímulo do TCR e são localizados na superfície celular (LEMIEUX *et al.*, 2024; LIECHTI; ROEDERER, 2019). CD69 é o marcador mais amplamente usado em amostras de sangue periférico, apresenta expressão rápida e permite aumentar a especificidade da detecção de células produtoras de citocinas após estímulo em cultura, que podem representar uma fração muito pequena de células T. CD137 é uma molécula co-estimulatória, que melhora a sinalização da ativação de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>). CD154 é positivamente regulado em células T CD4<sup>+</sup> e também é expresso rapidamente após a ativação do linfócito (LIECHTI; ROEDERER, 2019). CD134 é uma molécula de ativação de expressão tardia e o tempo ótimo de estimulação para sua expressão em cultura de PBMC é de 24 horas (LEMIEUX *et al.*, 2024).

Diferentes combinações destes marcadores são frequentemente empregadas na detecção da ativação específica de células T e foram muito usadas na pandemia da COVID-19 para avaliar a resposta imune celular às vacinas contra o SARS-CoV-2. As combinações mais frequentes são CD69 e CD154 para detecção de células T CD4<sup>+</sup> ativadas (CAI *et al.*, 2023; GAO *et al.*, 2022; GUERRERA *et al.*, 2021) e CD69 e 137 para detecção de células T CD8<sup>+</sup> ativadas (COSTA *et al.*, 2022; GAO *et al.*, 2022; GUERRERA *et al.*, 2021; LIU, Yihao *et al.*, 2022; TARKE *et al.*, 2022). Klemis *et al.* (2021), Schmidt *et al.* (2021) e Swanson *et al.* (2021) determinaram ativação das células T pela expressão de CD69 associada à produção de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 – vale destacar que CD69 é uma molécula pouco específica. Costa *et al.* (2022), Yihao Liu *et al.* (2022) e Tarke *et al.* (2022) definiram a ativação de células CD4<sup>+</sup> pelo fenótipo CD134<sup>+</sup>CD137<sup>+</sup> – o emprego deste par de marcadores, em um ensaio que também incluía CD69,

inutilizaria o par CD69<sup>+</sup>137<sup>+</sup> como co-expressão associado a células CD8<sup>+</sup>. Painter et al. (2021) definiram a ativação de células T CD4<sup>+</sup> pelo fenótipo CD200<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>. Para as células CD8<sup>+</sup>, a ativação seria definida pela co-expressão de CD137 e IFN- $\gamma$ , mas esta estratégia se mostrou subótima dados os altos níveis basais de expressão destas moléculas, que foi associada à reatividade cruzada com coronavírus sazonais (corroborando, inclusive, com nossos achados). Por fim, a ativação foi definida pela co-expressão de pelo menos 4 destes marcadores: CD200, CD154, CD137, CD107a e IFN- $\gamma$ . Ewer et al. (2021), Keeton et al. (2022), Maringer et al. (2022), Oberhardt et al. (2021), Reinscheid et al. (2022) e Sahin et al. (2020), por sua vez, não empregaram marcadores de ativação e se basearam apenas na produção de citocina como evidência de ativação específica de células T. A integração dos quatro marcadores, empregada neste trabalho e avaliada por Lemieux et al. (2024) permite melhorar a sensibilidade da detecção de linfócitos ativados. A redundância da co-expressão de mais de dois marcadores aumenta o sinal das células positivas sem aumentar o *background* de fluorescência pré adição de estímulo celular em comparação com os pares de marcadores. Além disso, é útil em ensaios que buscam medir a ativação e expressão de marcadores que podem ser diferencialmente expressos em determinadas subpopulações de células T, como ensaios clínicos que avaliam vacinas e usam amostras de sangue periférico (LEMIEUX *et al.*, 2024). A discussão dos resultados do presente estudo, daqui para a frente, serão focados na resposta efetora de células T, com ênfase na produção de citocinas em resposta à administração das doses de reforço vacinal.

Nossos resultados confirmam que a vacina SpiN-Tec MCTI UFMG é capaz de induzir resposta específica de células T contra as proteínas N e S do SARS-CoV-2. Os participantes que receberam SpiN-Tec como dose de reforço produziram resposta específica funcional de células T, com maior robustez de resposta de células CD4<sup>+</sup> (**Figura 14 e 15**) do que de células CD8<sup>+</sup> (**Figura 17 e 18**). Este achado vai de encontro com vários estudos que avaliam a resposta celular induzida pelas vacinas AZD1222 e BNT162b2 em caráter de imunização primária (EWER *et al.*, 2021; GUERRERA *et al.*, 2021; KEETON *et al.*, 2022) ou como doses de reforço (MARINGER *et al.*, 2022; SCHMIDT *et al.* 2021), como foi aqui empregada a SpiN-Tec MCTI UFMG. Schmidt et al. (2021), entretanto, detectaram que a imunização primária com AZD1222 e reforçada por uma vacina de mRNA induziu ativação levemente superior de células CD8<sup>+</sup> do que CD4<sup>+</sup>. Para os regimes de vacinação homóloga, foi vista maior robustez de células CD4<sup>+</sup>. Oberhardt et al. (2021) também obtiveram resultados diferentes ao avaliar a vacinação primária, desta vez com BNT162b2. Nesta coorte, foi detectada ativação elevada de células T CD8<sup>+</sup>, enquanto a detecção de células T CD4<sup>+</sup> só foi possível após enriquecimento de MCH de classe

II baseada em tetrâmero. Costa et al. (2022) avaliaram a imunidade induzida pela vacinação primária por CoronaVac e não detectaram resposta significativa de células  $CD8^+$  em culturas de PBMC dos vacinados estimuladas por um *pool* de peptídeos desenvolvidos a partir das proteínas estruturais do SARS-CoV-2.

Em relação à avaliação da produção de citocinas após administração de SpiN-Tec MCTI UFMG ou CoronaVac, a administração de qualquer dose de reforço induziu frequências semelhantes de células T  $CD4^+$  produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF. Uma maior proporção de células T  $CD4^+$  responderam ao estímulo da proteína N com produção de IFN- $\gamma$  em comparação às demais citocinas, enquanto a proteína S induziu proporções similares de células produtoras de TNF e IFN- $\gamma$  em todos os grupos tratados (**Figura 23**). A co-expressão de IFN- $\gamma^+TNF^+$  em células T  $CD4^+$  estimuladas com as proteínas N, S e SpiN se mostrou significativamente superior em todos os grupos tratados em comparação com a mesma população celular no grupo PP. Este padrão foi observado para todos os estímulos (**Figura 15**), mostrando ser o melhor marcador para o efeito da administração de uma dose de reforço neste estudo.

A maior parte dos estudos que exploraram a resposta celular induzida pela vacinação contra o SARS-CoV-2 teve foco na indução de células T específicas contra a proteína S, visto que é o antígeno presente nas vacinas de mRNA e vetor viral. Swanson et al. (2021), em estudo clínico envolvendo a vacina AZD1222, observaram a produção de citocinas por células T  $CD4^+$  específicas para a proteína S, na ordem hierárquica de frequência de produção de TNF, seguida de IL-2 e IFN- $\gamma$ , além de grau elevado de multifuncionalidade. Guerrero et al. (2021), em estudo sobre vacinação primária com BNT162b2, detectaram produção de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 por células T  $CD4^+$  específicas para a proteína S, com elevado grau de multifuncionalidade e o fenótipo IFN- $\gamma^+IL-2^+$  induzido em 99% dos indivíduos após 2 semanas da imunização. Cai et al. (2023) trouxeram uma abordagem interessante em seu trabalho. O grupo avaliou a resposta de pacientes com COVID-19 depois da imunização primária com vacinas de mRNA ou de vetor viral (não especificadas no estudo). A resposta de células T  $CD4^+$  produtoras de citocinas foi avaliada de acordo com a especificidade contra a proteína N ou S do SARS-CoV-2. A resposta específica de células  $CD4^+$  contra a proteína S mobilizou predominantemente TNF e apresentou grau elevadíssimo de multifuncionalidade, com maior proporção do fenótipo IFN- $\gamma^+TNF^+IL-2^+$ , seguido de  $IL-2^+TNF^+$  (CAI *et al.*, 2023). A resposta específica contra a proteína N se manifestou com menor robustez de produção de citocinas, pouca mobilização de IFN- $\gamma$  e com predomínio do fenótipo  $IL-2^+TNF^+$  e seguido dos fenótipos IFN- $\gamma^+TNF^+IL-2^+$ , apenas  $IL-2^+$  e apenas  $TNF^+$  em frequências similares (CAI *et al.*, 2023). Maringer et al. (2022) compararam a expressão de IFN- $\gamma$  e TNF em indivíduos que receberam duas doses de vacinas

de mRNA (mRNA-1273 e BNT162b2), duas doses de AZD1222, 1 dose de Ad26.COV2.S ou 1 dose de AZD1222 + 1 dose de vacina de mRNA. Para todos os regimes vacinais, foi observada a seguinte predominância na frequência de produção de citocinas por células T CD4<sup>+</sup>: TNF<sup>+</sup> > IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> > IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (MARINGER *et al.*, 2022). Destaca-se que duas doses de vacinas de mRNA obtiveram melhor resultado que a vacinação heteróloga sob estas condições. A variedade de respostas de células T CD4<sup>+</sup> específicas produzidas após a vacinação contra o SARS-CoV-2 parece estar associada ao perfil e tamanho de cada população de estudo e à plataforma vacinal explorada. O fator comum observado em todos os casos é a indução de multifuncionalidade de células T CD4<sup>+</sup>, aumentada pela administração de reforço (especialmente heterólogo), corroborando nossos achados para a SpiN-Tec MCTI UFMG.

Após a imunização com SpiN-Tec MCTI UFMG ou com CoronaVac, foi possível detectar a formação de memória celular, que praticamente não estava presente no grupo PP. Os indivíduos que participaram do ensaio clínico tiveram concentração predominante de células CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> no compartimento de Memória Efetora (EM). Todos os grupos tratados apresentaram aumento significativo na frequência de células multifuncionais de fenótipo CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> (EM) em comparação ao grupo PP. Este foi mais um padrão observado para todos os estímulos. O segundo compartimento de memória com maior frequência de células CD4<sup>+</sup> multifuncionais foi CM (CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) em todos os grupos tratados (**Figura 35**). Apenas Guerrero *et al.* (2021) encontraram resultados similares após administração de BNT162b2, com predominância do compartimento EM, seguido de CM. Entretanto, a dose de reforço não provocou diferença significativa no tamanho de cada compartimento, diferente da expansão de EM que observamos no nosso estudo. Nos demais estudos analisados, a imunização com duas doses da vacina de vírus inativado BBIBP-CorV (LIU, Yihao *et al.*, 2022), de CoronaVac (COSTA *et al.*, 2022) ou de BNT162b2 (GAO *et al.*, 2022) também induziu produção de memória celular, com predominância do compartimento CM, seguido de EM. Painter *et al.* (2021) também observaram predomínio do compartimento CM, seguido de EM, mas o estudo não especifica qual vacina de mRNA os pacientes receberam.

Retomando o tópico da população de células T CD8<sup>+</sup>, a administração do reforço de SpiN-Tec MCTI UFMG ou CoronaVac também induziu produção de citocinas mediante adição de estímulo pelas proteínas N, S e SpiN, apesar da frequência ter sido consideravelmente inferior em comparação com as células CD4<sup>+</sup>. Na comparação entre os grupos experimentais, foi detectada diferença significativa em relação ao PP somente na frequência de células CD8<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> para os grupos CoronaVac e SpiN-Tec 20  $\mu$ g quando estimulados pela proteína S (**Figura 18**). A maioria absoluta de células T CD8<sup>+</sup>, em todos os grupos tratados, responderam

ao estímulo da proteína N com produção de IFN- $\gamma$  em comparação às demais citocinas, com proporção mínima de produção de TNF. Já a proteína S induziu proporções mais equilibradas de células IFN- $\gamma^+$  e de células TNF $^+$ , assim como um aumento na proporção de células IFN- $\gamma^+$ TNF $^+$  em todos os grupos tratados, exceto por SpiN-Tec 100  $\mu$ g. Este último grupo apresentou aproximadamente 2/3 de células CD8 $^+$  produtoras apenas de IFN- $\gamma$  e diminuição das células IFN- $\gamma^+$ TNF $^+$  ao longo do tempo (**Figura 24**). Por fim, não foi observada diferença na produção de nenhuma citocina na comparação das proteínas N, S e SpiN como estímulo proteico. Este comportamento foi observado dentro de todos os grupos tratados (**Figura 31 e 32**). No estudo de Schmidt et al. (2021) a resposta de células T CD8 $^+$  específicas contra a proteína S, em diferentes regimes vacinais foi mediada por IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2. Analisando pacientes que receberam vacinação primária com AZD1222 e reforço com vacina de mRNA, pacientes que receberam regime homólogo de reforço com AZD1222 e pacientes que receberam regime homólogo de vacina de mRNA, detectou-se um fenótipo IFN- $\gamma^+$ TNF $^+$  predominante entre os três grupos, além de todos terem apresentado a co-expressão de IFN- $\gamma^+$ TNF $^+$ IL-2 $^+$ . Swanson et al. (2021) detectaram que maioria das células T CD8 $^+$  específicas contra a proteína S induzidas após a vacinação com AZD1222 era produtora predominantemente de IFN- $\gamma$  (isolada ou em co-expressão), seguido de maior proporção de produção de TNF e IL-2. A observação de respostas de múltiplas citocinas enfatiza que a administração do reforço vacinal aumenta não só a qualidade da resposta celular como também a quantidade. Oberhardt et al. (2021) e Reinscheid et al. (2022) conduziram estudos muito similares para a avaliação da resposta de células CTLs após imunização primária com BNT162b2. Ambos os trabalhos detectaram que a administração de doses de reforço de vacinas de mRNA induz um aumento transitório na frequência de células T CD8 $^+$  de função efetora, que é revertido em alguns meses. Observou-se a expansão rápida e robusta de células CD8 $^+$  específicas contra a proteína S, com predomínio de fenótipo IFN- $\gamma^+$ TNF $^+$  e citotoxicidade rápida, mediada por granzima B e perforina. A capacidade de expansão e resposta desta população, confirmada pela frequência de células produtoras de citocinas e expressão de CD107a como marcador de degranulação, se manteve estável depois do reforço vacinal, seja a terceira ou quarta dose homóloga. Este seria um indicativo de que o *pool* de células CD8 $^+$  de memória efetora já é eficientemente estimulado com a vacinação primária e que as doses de reforço atuam na manutenção da resposta a longo prazo.

A imunização com SpiN-Tec MCTI UFMG ou com CoronaVac induziu formação significativa de memória celular nas células CD8 $^+$ , praticamente indetectáveis no grupo PP. Sob estímulo da proteína N, as células CD8 $^+$  multifuncionais de todos os grupos tratados

apresentaram maior frequência de fenótipo de EM ( $CD45RO^+CCR7^-$ ), seguido do fenótipo de Eff ( $CD45RO^-CCR7^-$ ) e, por fim, CM ( $CD45RO^+CCR7^+$ ). Entretanto, sob estímulo da proteína S, o grupo SpiN-Tec 20  $\mu$ g teve comportamento excepcional mais uma vez, enquanto os demais grupos apresentando uma maior frequência do fenótipo de Eff, seguido de EM e CM (**Figura 36**). Estes achados podem ser indicativos da ocorrência de apresentação cruzada dos antígenos advindos da proteína S, induzindo a especialização das células T em funções citotóxicas fora do linfonodo e sem o fenótipo de memória. Guerrero et al. (2021) descreveram mudanças na programação funcional das células T  $CD8^+$  de memória específicas contra a proteína S ao longo do tempo. Antes da administração da segunda dose de BNT162b2, detectava-se um predomínio de células com fenótipo de EM, seguido de Eff e baixíssima ocorrência de CM. Após 14 dias da aplicação do reforço, foi observado aumento na frequência de células de fenótipo EM e CM, associadas a uma queda na frequência de células Eff. Na marca de 6 meses após a imunização com a primeira dose, foi detectada frequência superior de Eff em comparação com EM e um aumento considerável de CM. A vacinação primária é necessária para produzir um *pool* de células de memória, com aumento progressivo na especialização da função efetora. Em contraste, Gao et al. (2022) reportaram resultados similares aos resultados reportados aqui após a vacinação com BNT162b2. Foi observada indução de células T  $CD8^+$  específicas contra a proteína S com frequência predominante do fenótipo Eff, seguido de EM e CM. Yihao Liu et al. (2022) detectaram o mesmo padrão de fenótipo de memória para células  $CD8^+$  específicas contra a proteína S, sendo o compartimento de Eff predominante e o compartimento de EM equivalente a aproximadamente 1/4 do total das células T  $CD8^+$  de memória.

A administração de SpiN-Tec MCTI UFMG, assim como de CoronaVac, não provocou diferenças significativas ao longo do tempo na robustez da resposta de células T  $CD4^+$  (**Figura 26**) ou de células  $CD8^+$  (**Figura 27**). A robustez foi ilustrada pela frequência de células T  $CD4^+$  ou  $CD8^+$  produtoras de  $IFN\gamma^+TNF^+$ , que não apresentou aumento significativo nos dias V14 e V28 em comparação com o observado em V0. Este mesmo comportamento de manutenção sem melhora da resposta de células T  $CD4^+$  foi observado por outros grupos, como Cai et al. (2023). Maringer et al. (2022) apontam que a frequência e intensidade da resposta das células T não foi melhorada após a administração de doses de reforço, mas também não sofreu uma queda tão demarcada quanto os títulos de anticorpos. Reinscheid et al. (2022) apontam que uma resposta específica competente e duradoura de células T  $CD8^+$  já era detectável após administração da segunda dose de BNT162b2 e que esta resposta não foi “tremendamente” afetada após a dose de reforço homóloga. Na mesma linha, outros trabalhos mostram que a frequência de células T  $CD8^+$  permaneceu constante com a administração da terceira (OBERHARDT *et al.*, 2021) e

quarta doses (REINSCHIEID *et al.*, 2022) de reforço homólogo de BNT162b2 e que o *pool* de precursores de memória estável já foi induzido pela vacinação primária. Nestes casos, a memória celular já foi ativada e reforçada o suficiente anteriormente para chegar no seu teto de resposta. Novas imunizações a partir deste ponto serviriam apenas para renovar o desafio e manter a memória celular em estado de prontidão para responder a uma nova exposição.

Uma das inovações demonstradas neste estudo foi a proteína SpiN como estímulo antigênico em potencial. Na comparação entre os tempos V28 e PP, sob estímulo de SpiN, foi detectado aumento significativo na frequência de células T CD4<sup>+</sup> (**Figura 15**) e CD8<sup>+</sup> (**Figura 18**) produtoras de IFN- $\gamma$  isoladamente em todos os grupos experimentais, de células CD4<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> em todos os grupos que receberam SpiN-Tec MCTI UFMG (**Figura 15**), de células CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> nos grupos SpiN-Tec 20  $\mu$ g e SpiN-Tec 60  $\mu$ g e de células CD8<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> no grupo SpiN-Tec 20  $\mu$ g (**Figura 18**). Além disso, em comparação com o padrão anterior à pandemia, o estímulo de SpiN induziu frequência significativamente maior de células CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> no compartimento de CM para todos os grupos que receberam SpiN-Tec (**Figura 35**) e frequência significativamente maior de células no compartimento de Eff nos grupos que receberam as 2 doses mais baixas de SpiN-Tec (**Figura 35**). Efetivamente, pudemos observar que a proteína SpiN foi um estímulo superior às proteínas N e S separadamente na indução da produção de IL-2, TNF e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> por células T CD4<sup>+</sup> (**Figura 30**, terceira e quarta colunas).

A avaliação fenotípica e funcional das populações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> abordada até este ponto decorre da apresentação clássica de antígenos peptídicos pelas proteínas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), uma vez que “as respostas imunes inatas contra vírus aumentam a expressão das moléculas do MHC que apresentam antígenos virais para as células T específicas para vírus” e “CD4 e o CD8 são expressos em subpopulações distintas de linfócitos T maduros e participam, junto aos receptores de antígenos, no reconhecimento do antígeno” (ABBAS, 2017, p. 276–279). Apesar de este paradigma de resposta imune ser o mais comum no contexto de resposta de células T, a literatura descreve vias alternativas de apresentação de antígenos para **células T não convencionais** (GODFREY *et al.*, 2015), como os linfócitos duplo-negativos (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) detectados neste estudo e ainda pouco explorados nos trabalhos acerca da imunologia das vacinas contra a COVID-19 (ODAK *et al.*, 2020).

Os receptores de células T são compostos por 2 cadeias polipeptídicas, que apresentam elevado grau de poliimorfismo. Cada cadeia é constituída por uma região variável, uma região constante e um segmento de dobradiça, onde se encontra um resíduo de cisteína. As cadeias

estão ligadas covalentemente por uma a ponte dissulfeto entre as moléculas de cisteína, localizadas na porção extracelular do receptor. A região hidrofóbica transmembrana se associa não covalentemente aos demais componentes do complexo TCR: as proteínas CD3 e as cadeias  $\zeta$ , que são envolvidas na transdução de sinais para o interior da célula (ABBAS, 2017, p. 328; MURPHY *et al.*, 2008, p. 123–124).

Em adultos, a maioria das células apresenta o par de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , enquanto o par de cadeias  $\gamma$  e  $\delta$  possui propriedades de reconhecimento de antígeno diferentes e é menos frequente (ABBAS, 2017, p. 328). Os genes que codificam as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  se organizam no mesmo *locus* do gene do MCH e, depois de passarem por recombinações aleatórias, geram uma diversidade de complexos TCR capazes de reconhecer peptídeos de virtualmente qualquer patógeno (GODFREY *et al.*, 2015). Em geral, células T que expressam TCR $\alpha\beta$  estão envolvidos na resposta adaptativa e as que expressam TCR $\gamma\delta$  participam tanto da imunidade inata quanto da adaptativa, atuando, inclusive, como ponte entre estas etapas (GODFREY *et al.*, 2015), considerando-se que as respostas antivirais ocorrem em duas camadas: a resposta efetora rápida de células *natural killer* (NK) inatas, células NKT (descritas a seguir) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> visa evitar que a doença prossiga para uma fase grave, enquanto os linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares são preparados para reprogramar células B no sentido da formação de anticorpos neutralizantes específicos, conferindo imunidade humoral e celular duradoura (ODAK *et al.*, 2020).

Durante a apresentação clássica de antígenos, o TCR reconhece e se liga não só ao antígeno peptídico, mas também à molécula de MHC que o carrega. Essa ligação é chamada de **restrição ao MHC**, pois “um receptor de célula T não é específico somente para um peptídeo antigênico estranho, mas para uma combinação única entre um peptídeo e uma determinada molécula do MHC” (MURPHY *et al.*, 2008, p. 112, grifo do autor). Na apresentação clássica de antígenos, os correceptores CD4 e CD8 reconhecem regiões não polimórficas do complexo MHC–antígeno. CD4 é uma proteína de cadeia única que interage com a molécula de MHC de classe II. CD8 é formada por duas cadeias ligadas por ponte dissulfeto que interagem com a molécula de MHC de classe I (ABBAS, 2017, p. 334–335).

O processamento antigênico consiste na conversão de proteínas nativas em peptídeos MHC-associados. O processo consiste na introdução de antígenos proteicos exógenos em vesículas de APCs ou na síntese de antígenos no citosol, seguida da degradação proteolítica destas proteínas em peptídeos, ligação dos peptídeos a moléculas do MHC e exibição dos complexos peptídeo-MHC na superfície da APC, para reconhecimento pelas células T (ABBAS, 2017, p. 339–340).

Na via do MHC de classe I, os antígenos proteicos são degradados pelo proteassomo, gerando pequenos fragmentos peptídicos. Já na via do MHC de classe II, os antígenos são internalizados em endossomos, onde são clivados por enzimas nos lisossomos e endossomos tardios. Os

produtos das clivagens são associados às suas respectivas moléculas de MHC e o complexo MHC-peptídeo é apresentado na superfície celular: todas as células nucleadas podem expressar MHC de classe I e as células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos e células dendríticas, são os principais tipos celulares que expressam MHC de classe II (ABBAS, 2017, p. 339).

Em contraste, células T não convencionais, também chamadas de células não restritas ao MHC, reconhecem antígenos apresentados por outras moléculas e possuem funções imunes inatas e adaptativas (GODFREY *et al.*, 2015), que serão discutidas a seguir. Especificamente, células T duplo-negativas (DN) possuem fenótipo positivo para CD3, não possuem correceptores CD4 ou CD8 em sua superfície, podem expressar TCR $\alpha\beta$  ou TCR $\gamma\delta$  e não expressam marcadores de células *natural killer* ou NK (MURPHY *et al.*, 2008, p. 211; WU *et al.*, 2022). Células T não convencionais representam uma pequena subpopulação de aproximadamente 3–5% dos linfócitos T no sangue periférico. Nos tecidos periféricos, se comportam como células residentes de memória pré-ativadas, marcadas pela expressão de CD44, CD11a e CD103 (WU *et al.*, 2022). Possuem resposta rápida a patógenos (já reportada em infecções virais causadas pelo Influenza A, dengue, entre outros) e sua função efetora (mediada por FasL, perforina-granzima e IFN- $\gamma$ ) é desencadeada após algumas horas após exposição ao antígeno, em contraste com o período de dias ou semanas necessário para células T restritas ao MHC montarem resposta primária (GODFREY *et al.*, 2015; LO PRESTI *et al.*, 2022).

Figura 37 – Comparação entre a resposta de células T restritas ao MHC e células T não convencionais.

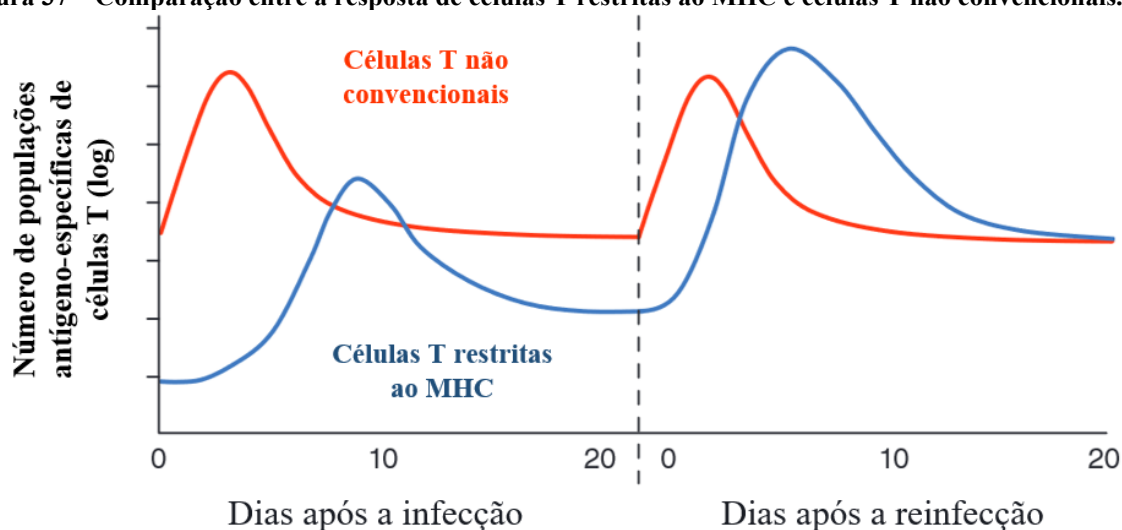


Figura 37 – Comparação entre a resposta de células T restritas ao MHC e células T não convencionais. O gráfico ilustra a dinâmica de ativação de linfócitos convencionais e não convencionais. A cinética de uma reação imune primária está representada à esquerda e uma reação imune adaptativa, baseada em células de memória, está representada à direita. O eixo y do gráfico representa o número de populações antígeno-específicas de células T

ao longo do eixo y, que representa o tempo antes e depois da resposta contra o antígeno em questão. Fonte: adaptado de GODFREY et al. (2015).

Existem três tipos principais de linfócitos T não convencionais.

As células T invariantes associadas à mucosa (MAIT) apresentam TCR de cadeia  $\alpha$  invariante e representam entre 1–5% das células T no sangue periférico humano. São predominantemente negativas para CD4 e CD8 e reconhecem antígenos apresentados pela molécula do MHC tipo I MR1 (LO PRESTI *et al.*, 2022; ORUMAA; DUNE, 2021). Também são tipicamente ativadas por citocinas e têm papel importante na resposta imune contra vírus, especialmente nos tecidos inflamados e de mucosa, promovendo a ponte entre imunidade inata e adaptativa (GODFREY *et al.*, 2015). Evidências apontam que as células MAIT também apresentam redução em pacientes com quadros graves de COVID-19 (FLAMENT *et al.*, 2021; JOUAN *et al.*, 2020; ODAK *et al.*, 2020). ODAK et al. (2020) observaram que a queda na contagem dessas células não ocorre em pacientes com quadros classificados como moderados. Pacientes moderados que apresentaram níveis similares de células T não convencionais ao grupo controle de pacientes saudáveis, em contraste aos pacientes acometidos com COVID-19 de maior gravidade. Jouan et al. (2020) publicaram um estudo que compara a resposta imune de pacientes com quadros graves de COVID-19, pacientes recebendo ventilação mecânica não relacionada à COVID e indivíduos saudáveis. Flament et al. (2021) compararam a resposta de indivíduos saudáveis com duas coortes de pacientes com COVID-19, provenientes de uma unidade de doenças infecciosas e de uma unidade de cuidados intensivos. Parrot et al. (2020) compararam a resposta de pacientes com COVID-19 grave, moderada e pacientes saudáveis. Em todos os estudos, pacientes com COVID-19 grave apresentaram maior ativação das células MAIT (e NKT), demonstrada pela expressão de CD69 em sua superfície. Jouan et al. (2020) apontaram que, para indivíduos que receberam alta após 15 dias com melhora no quadro, as células MAIT (e NKT) apresentavam maior expressão de CD69 no momento da internação, fator positivamente correlacionado com menores níveis de hipóxia. Para Parrot et al. (2020), a avaliação do prognóstico apontou associação positiva entre casos de óbito e a expressão de CD69 em células MAIT em uma coortes, porém este resultado não foi observado na segunda coorte, em que a média de células MAIT expressando CD69 foi ligeiramente superior em pacientes que sobreviveram. Ao avaliar o intervalo entre manifestação de sintomas e coleta da amostra, a segunda coorte teve coletadas significativamente mais tardia que a primeira, sugerindo que níveis mais altos de ativação de células MAIT no início da doença podem estar associados a um desfecho clínico. A produção de IFN- $\gamma$  por células MAIT (e NKT) não

demonstrou correlação com a evolução clínica positiva dos pacientes segundo Jouan et al. (2020). Em contraste, os títulos de IFN- $\gamma$ , IL-2 e granzima B foram proporcionalmente associados à gravidade do quadro no estudo de Flament et al. (2021). Provine et al. (2021) avaliaram o papel das células MAIT na imunogenicidade de vacinas de vetor viral, com base em sua capacidade de amplificar a resposta imune em infecções por influenza. Utilizando PBMCs de voluntários, eles compararam os adenovírus Ad5 e ChAdOx1 (usados nas vacinas Jansen e AstraZeneca). O ChAdOx1 induziu maior ativação de células MAIT (CD69, granzima B e IFN- $\gamma$ ) do que o Ad5 (PROVINE *et al.*, 2021). Em camundongos, o ChAdOx1 também aumentou a expressão de CD69 e granzima B (PROVINE *et al.*, 2021). Dados de voluntários humanos imunizados com o vetor ChAdOx1 demonstraram correlação entre o aumento de CD69 em células MAIT e os níveis séricos de IFN- $\gamma$  (PROVINE *et al.*, 2021). Sequenciamento de RNA mostrou ativação de sinalização intracelular de IFN tipo I e IL-1, IL-12 e IL-2 (PROVINE *et al.*, 2021). A ativação das células MAIT foi dependente de IFN- $\alpha$  e IL-18, mas independente de TCR, e envolveu monócitos produtores de TNF e IL-18 (PROVINE *et al.*, 2021). O estudo concluiu que as células MAIT detectam e respondem ao contexto imune criado pelos vetores adenovirais, integrando-se à resposta adaptativa.

As células T *natural killer* (NKT) carregam propriedades de células T $\alpha\beta$  convencionais e reagem a antígenos (lipídicos e glicolipídicos) apresentados pela molécula do MHC tipo I não clássica CD1d, expressa em células apresentadoras de antígeno (GODFREY *et al.*, 2015). Essa população possui dois subtipos, sendo o mais prevalente o tipo I. Células NKT tipo I ou células iNKT, expressam TCR $\alpha$  invariante, predominantemente V $\alpha$ 24 $\alpha$ 18 em humanos (LO PRESTI *et al.*, 2022; ORUMAA; DUNE, 2021). Podem regular positivamente sua expressão de CD154 e, em conjunto com a expressão de citocinas, potencializa a ativação de células apresentadoras de antígenos. Subsequentemente, a apresentação de antígenos via MHC para células T e B é aumentada (GODFREY *et al.*, 2015). A literatura aponta que estas células têm atuação importante na supressão de infecções virais, com funções variadas de promoção e supressão da resposta imune (HACKSTEIN; KLENERMAN, 2022; LO PRESTI *et al.*, 2022; ORUMAA; DUNE, 2021). Jouan et al. (2020) e Odak et al. (2020) demonstraram que pacientes com quadros graves de COVID-19 apresentam linfopenia, sendo as células NKT uma das populações significativamente reduzidas em comparação com indivíduos controle saudáveis. Nestes pacientes, foi observada uma diminuição da produção de IFN- $\gamma$  e aumento de IL-17 pelas células NKT e foi demonstrada uma ligação entre a ativação destas e a severidade da doença (LO PRESTI *et al.*, 2022).

As células T $\gamma\delta$  apresentam TCR composto por uma cadeia  $\gamma$  e uma cadeia  $\delta$ , sendo V $\delta$ 1, V $\delta$ 2 e V $\delta$ 3 as principais subpopulações presentes em humanos. Representam entre 0.5–16% do total de células CD3<sup>+</sup> em vários tecidos e aproximadamente 4% no sangue periférico, onde domina a subpopulação V $\delta$ 2, geralmente pareada com a cadeia V $\gamma$ 9 (ORUMAA; DUNE, 2021; TERZOLI *et al.*, 2024). Não têm reconhecimento de antígeno limitada por MHC, por isso, reconhecem tipos variados de antígenos, como proteínas e lipídeos, assim como moléculas fosforiladas (VON MASSOW *et al.*, 2021). Em pacientes com COVID–19 grave, as subpopulações de células T $\gamma\delta$  mostram mudanças distintas, com expansão de algumas populações, como V $\delta$ 2+, e diminuição na frequência de outras (JOUAN *et al.*, 2022; ORUMAA; DUNE, 2021; VON MASSOW *et al.*, 2021). Flament *et al.* (2021) e Odak *et al.* (2020) apontaram queda na população de células T $\gamma\delta$  em pacientes com COVID–19 sob cuidados intensivos, com maior expressão de CD69 em comparação com indivíduos saudáveis. Os pacientes que chegaram a óbito apresentaram, ainda, maior expressão de IL–10 nesta população celular (FLAMENT *et al.*, 2021). Odak *et al.* (2020) definem o fenótipo das células T $\gamma\delta$  de acordo com a expressão dos marcadores CD45RA e CD62L e detectaram maior contagem absoluta e frequência de células circulantes com fenótipo naíve (CD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) e efeito proporcional inverso nas células com fenótipo efetor (CD45RA<sup>–</sup>CD62L<sup>–</sup>), possível indicativo de recrutamento de células efetoras para os órgãos periféricos. Células T $\gamma\delta$  apresentam plasticidade funcional (incluindo produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF, IL–6 e IL–17 e citotoxicidade mediada por perforina e granzimas) e estão envolvidas no reparo e regeneração de tecidos, ainda que o mecanismo específico não esteja bem elucidado (JOUAN *et al.*, 2022; ODAK *et al.*, 2020; ORUMAA; DUNE, 2021; VON MASSOW *et al.*, 2021).

O presente estudo demonstrou a ocorrência de uma vasta população de células DN que, após a adição de estímulo pelas proteínas N, S e SpiN, são ativadas. Esta população está presente nas amostras não estimuladas, apontando ser independente de estímulo. A resposta específica contra estas proteínas, antes da administração de qualquer reforço vacinal, foi demonstrada pelo aumento na frequência de expressão dos marcadores de ativação CD69, CD137 e CD154 (**Figura 10**) e produção de IFN- $\gamma$  e TNF (**Figura 12**). Destaca-se que, na presença da proteína N, a expressão de CD69 nas células DN é significativamente maior que no grupo PP e a resposta é predominantemente mediada pela produção de IFN- $\gamma$  (**Figura 25**). Já na presença da proteína S, a expressão de CD137, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> é significativamente maior e a produção dos marcadores é equilibrada, com altíssimo grau de multifuncionalidade (**Figura 25**). As células DN apresentam, ainda, expressão maior de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> na presença da proteína SpiN. Quando comparados com o grupo PP, todos os grupos imunizados

com o produto investigacional apresentaram aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$ , TNF e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> por células DN, o que não ocorreu no grupo CoronaVac. Entretanto, neste mesmo cenário, o estímulo da proteína SpiN é capaz de induzir aumento na produção de IFN- $\gamma$  e IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> em todos os grupos que receberam reforço (**Figura 21**). Com o estímulo de SpiN, houve predomínio de produção de IFN- $\gamma$  nos grupos CoronaVac e SpiN-Tec 20  $\mu$ g e equilíbrio entre a proporção de células T produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF isoladamente nos demais grupos (**Figura 25**). A proteína Spike demonstrou ser um estímulo fortíssimo para essas células, superior às proteínas N e S isoladamente, especialmente para os grupos que receberam reforço de SpiN-Tec 20 e 60  $\mu$ g e CoronaVac (**Figuras 33 e 34**). Esta observação pode ser explicada pelo mecanismo de produção das proteínas empregadas: enquanto as proteínas N e SpiN são expressas em sistema procarioto, a proteína Spike é expressa em células HEK e, portanto, passa por modificações pós-traducionais que incluem a glicosilação. A glicosilação de uma proteína tem implicações de mudanças em sua estrutura tridimensional e, portanto, altera sua estabilidade – podendo protegê-la de degradação proteolítica – e sua interação com demais moléculas, incluindo as cadeias de TCR e moléculas de MHC (REF).

As células T DN que identificamos podem, teoricamente, se encaixar em qualquer categoria de células T não convencionais descritas na acima. Hackstein e Klenerman (2022) apontam que o emprego de adjuvantes em vacinas de vírus inativados ou baseados em proteínas recombinantes induz atividade de células MAIT via sinalização de TLR. Além disso, estas células, assim como células iNKT e células T $\gamma\delta$ , são capazes de atuar como células auxiliares, produtoras de citocinas envolvidas na ativação de células B e produção de anticorpos. Células MAIT podem, ainda, ativar diretamente células B pela ligação de CD154 e CD40 (GODFREY et al, 2015). Boulouis et al. (2022) avaliaram a resposta de voluntários saudáveis e imunocomprometidos que receberam duas doses da vacina BNT162b2. Enquanto indivíduos saudáveis apresentaram aumento progressivo da resposta específica de células CD4<sup>+</sup> contra a proteína Spike, a frequência de células MAIT permaneceu constante entre todos os voluntários vacinados, incluindo indivíduos saudáveis e imunocomprometidos. O tamanho da população de células MAIT apresentou correlação positiva com a resposta de células CD4<sup>+</sup> e com os títulos de anticorpos anti-Spike após a vacinação em indivíduos saudáveis. Estes achados apresentam concordância com a hipótese de que células MAIT auxiliam no estabelecimento da resposta imune adaptativa, como apontaram Provine et al. (2021) e Hackstein e Klenerman et al. (2022). Entretanto, a ativação de células MAIT (medida pela expressão de CD69) antes e depois da vacinação com BNT162b2 apresentou correlação negativa com a resposta específica de células T após a vacinação. Células MAIT estimuladas por IL-12 e IL-18 apresentaram aumento da

expressão de CD69, granzima B e IFN- $\gamma$  e foi detectada alguma expressão de TNF e CD107a, mas este padrão não foi alterado pela vacinação em nenhum dos pontos de observação. Estes resultados apontam para uma tendência maior das células MAIT em desempenhar atividades citotóxicas do que auxiliares na modulação de resposta das células B (BOULOUIS *et al.*, 2022).

Chambers *et al.* (2024), por sua vez, avaliaram a resposta de células T a peptídeos do SARS-CoV-2 em pacientes grávidas que receberam até três doses das vacinas de mRNA da Moderna e/ou da Pfizer/BioNTec. Durante a análise, ao delinear as células positivas para CD3 como auxiliares CD4<sup>+</sup> ou citotóxicas CD8<sup>+</sup>, foram detectadas numerosas células DN (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) específicas para a proteína Spike do SARS-CoV-2 com TCR maduro em 17 das 19 participantes grávidas, assim como homens e mulheres do grupo controle de pacientes saudáveis (CHAMBERS *et al.*, 2024). Neste trabalho, é sugerida uma possível função citotóxica para as células DN, uma vez que respondem ao estímulo por anticorpos anti-CD3/CD28 com a expressão de CD137 e CD69, marcadores utilizados pelo grupo para identificar células CTL, o que vai de encontro com os nossos resultados (CHAMBERS *et al.*, 2024). Os autores questionam qual seria a especificidade dessas células DN, pois os epítomos reconhecidos por elas podem ser diferentes daqueles reconhecidos pelas células T citotóxicas clássicas, de modo que a resposta dessa população pode ser específica ou não para a proteína Spike. Dado que os pacientes receberam vacinas que contém codificação apenas para a proteína Spike, trago aqui a reflexão de que, caso fosse verificado que as células DN não são Spike-específicas, poderíamos ter um indício de ativação mediada por moléculas não peptídicas, o que limita os possíveis fenótipos para a população.

Retomando a discussão sobre os sistemas de produção das proteínas N, S e SpiN no presente estudo, o comportamento impressionante das células DN mediante estímulo por Spike poderia, também, ser fruto de ativação mediada por epítomos associados à sua glicosilação. A molécula CD1d, responsável pela apresentação de antígenos para células NKT, não apresenta peptídeos para o TCR $\alpha\beta$ , mas sim lipídios ou glicolipídios, ao passo que cadeias de açúcares mais longas podem induzir respostas de células T $\gamma\delta$  (RUDD *et al.*, 2001). Por exemplo, a glicosilação de aminoácidos próximos aos sítios de clivagem proteolítica pode bloquear a proteólise, o que, por sua vez, impede a formação de peptídeos ou glicopeptídeos para apresentação ao MHC de classe I ou II (RUDD *et al.*, 2001). A presença de glicanos maiores já demonstrou resultar em perda do reconhecimento restrito por MHC células T específicas para glicopeptídeos, e, conseqüentemente, uma tendência para induzir células T $\gamma\delta$  que reconhecem o antígeno glicosilado independentemente de este estar ligado à superfície das células apresentadoras de antígenos (APC) via ao MHC ou por uma cauda lipídica (RUDD *et al.*, 2001).

Neste cenário, uma ativação de células DN tão destacada especificamente sob estímulo da proteína Spike pode reforçar um possível caminho alternativo de apresentação de antígeno, independente de MHC, aumentando a amplitude da resposta imune.

Terzoli et al. (2024) avaliaram a resposta de células T $\gamma\delta$  após duas doses da vacina BNT162b2. Análises de sequenciamento de RNA apontaram que a vacinação induz ativação e expansão de células T V $\delta$ 2, promovendo a maturação de sua função e desenvolvimento de memória (TERZOLI *et al.*, 2024). Mudanças no perfil transcricional destas células ao longo do tempo revelaram uma população de células de CM, marcada pela expressão dos genes IL7R, TCF7, EOMES (associados à formação e manutenção de células T de memória) e CXCR3, evoluindo para um perfil de células altamente diferenciadas (marcadas pela expressão de CD56 e CD16) produtoras de citocinas e quimiocinas relacionadas à resposta efetora (IFNG, CCL3, CCL4L2) e moléculas citotóxicas (GZMB, GZMH, PFR1, GNLY). Além disso, a segunda dose da vacina melhorou a resposta das células T V $\delta$ 2 em termos de resposta efetora e proliferação (TERZOLI *et al.*, 2024). Genes que regulam a resposta efetora (IFNG, TNF e XCL2) aumentaram após a primeira dose da vacina e atingiram o pico após a segunda dose (TERZOLI *et al.*, 2024). Mudanças semelhantes foram observadas para os genes associados à memória que, além disso, resultaram em um fenótipo de memória mais durável detectado em células V $\delta$ 2T ao longo de 3 meses após a vacinação. Nossas células DN apresentaram dois fenótipos predominantes: CD45RO<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>, que seria equivalente a células de memória efetora, e CD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>, que seria equivalente a células terminalmente diferenciadas, também efetoras. Em associação com a produção de IFN- $\gamma$  e TNF, nossos resultados poderiam ser compatíveis, também, com os achados de Terzoli et al.

Entretanto, uma caracterização mais aprofundada destas células ainda é necessária para determinar melhor seu fenótipo e avaliar sua função efetora e, possivelmente, de memória. Isso pode ser alcançado pela inclusão de alguns anticorpos no painel de citometria de fluxo, como o ligante MR1-5-OP-RU marcado por fluorescência, anti-TCR $\alpha\beta$ , anti-perforina, anti-granzima B e anti-CD107a.

## 6 CONCLUSÃO

O presente trabalho investigou a resposta imune multifuncional induzida pela vacina SpiN-Tec MCTI UFMG como reforço no regime de vacinação heteróloga contra a COVID-19. Por meio de imunofenotipagem das amostras de PBMC dos participantes, realizada por citometria de fluxo, foi possível demonstrar que a vacina ativou e potencializou significativamente a resposta multifuncional específica das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> contra as proteínas do SARS-CoV-2. A resposta induzida pelo produto investigacional foi mediada por uma produção robusta das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2, características de uma forte resposta de perfil T<sub>H</sub>1. Esta resposta foi mantida durante todo o período observacional do estudo e foi verificada em todos os participantes até o dia V28. Além disso, SpiN-Tec promoveu a expansão de células T de memória central e efetoras, de maneira comparável ou superior ao comparador ativo, CoronaVac. A proteína SpiN, antígeno presente na vacina, demonstrou ser um estímulo mais potente em induzir a produção de citocinas em células T CD4<sup>+</sup> em comparação com as proteínas N e S separadamente. Ademais, foi identificada uma subpopulação pronunciada de células T duplamente negativas (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), que também foi ativado pelos antígenos do SARS-CoV-2 e respondeu com produção das citocinas mencionadas anteriormente, indicando possíveis funções efetoras. A melhor compreensão do fenótipo e funcionalidade desta população é necessário para explorar mais um potencial mecanismo de defesa induzido pela SpiN-Tec.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. et al. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015.
- ANDREWS, N. et al. Covid-19 Vaccine Effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) Variant. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 16, p. 1532–1546, 21 abr. 2022.
- BERTOLETTI, A. et al. SARS-CoV-2-specific T cells in infection and vaccination. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 18, n. 10, p. 2307–2312, out. 2021.
- BOULOUIS, C. et al. MAIT cell compartment characteristics are associated with the immune response magnitude to the BNT162b2 mRNA anti-SARS-CoV-2 vaccine. **Molecular Medicine**, v. 28, n. 1, p. 54, dez. 2022.
- CAI, C. et al. SARS-CoV-2 vaccination enhances the effector qualities of spike-specific T cells induced by COVID-19. **Science Immunology**, v. 8, n. 90, p. eadh0687, 22 dez. 2023.
- CASTRO, J. T. et al. Promotion of neutralizing antibody-independent immunity to wild-type and SARS-CoV-2 variants of concern using an RBD-Nucleocapsid fusion protein. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, dez. 2022.
- CELE, S. et al. Omicron extensively but incompletely escapes Pfizer BNT162b2 neutralization. **Nature**, v. 602, n. 7898, p. 654–656, 24 fev. 2022.
- CHAMBERS, C. D. et al. T Cell Responses in Pregnant Women Who Received mRNA-Based Vaccination to Prevent COVID-19 Revealed Unknown Exposure to the Natural Infection and Numerous SARS-CoV-2-Specific CD4- CD8- Double Negative T Cells and Regulatory T Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 4, p. 2031, 7 fev. 2024.
- COHEN, K. W. et al. Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells. **Cell Reports Medicine**, v. 2, n. 7, jul. 2021.
- CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, 2 mar. 2020.
- COSTA CLEMENS, S. A. et al. Heterologous versus homologous COVID-19 booster vaccination in previous recipients of two doses of CoronaVac COVID-19 vaccine in Brazil (RHH-001): a phase 4, non-inferiority, single blind, randomised study. **The Lancet**, v. 399, n. 10324, p. 521–529, fev. 2022.
- COSTA, P. R. et al. Humoral and cellular immune responses to CoronaVac up to one year after vaccination. **Frontiers in Immunology**, v. 13, out. 2022.
- DIAS ASSIS, B. R. et al. Quality Attributes of Ctvad1, A Nanoemulsified Adjuvant for Phase I Clinical Trial of SpiN COVID-19 Vaccine. **Nanomedicine**, v. 18, n. 18, p. 1175–1194, ago. 2023.

EWER, K. J. et al. T cell and antibody responses induced by a single dose of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine in a phase 1/2 clinical trial. **Nature Medicine**, v. 27, n. 2, p. 270–278, fev. 2021.

FADLYANA, E. et al. A phase III, observer-blind, randomized, placebo-controlled study of the efficacy, safety, and immunogenicity of SARS-CoV-2 inactivated vaccine in healthy adults aged 18–59 years: An interim analysis in Indonesia. **Vaccine**, v. 39, n. 44, p. 6520–6528, out. 2021.

FALSEY, A. R. et al. Phase 3 Safety and Efficacy of AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19) Covid-19 Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 25, p. 2348–2360, 16 dez. 2021.

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. Em: **Coronaviruses: Methods and Protocols**. [s.l.] Springer New York, 2015. p. 1–23.

FLAMENT, H. et al. Outcome of SARS-CoV-2 infection is linked to MAIT cell activation and cytotoxicity. **Nature Immunology**, v. 22, n. 3, p. 322–335, mar. 2021.

FOLEGATTI, P. M. et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 396, n. 10249, p. 467–478, ago. 2020.

GAO, Y. et al. Ancestral SARS-CoV-2-specific T cells cross-recognize the Omicron variant. **Nature Medicine**, v. 28, n. 3, p. 472–476, mar. 2022.

GHOSH, S. et al.  $\beta$ -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. **Cell**, v. 183, n. 6, p. 1520–1535.e14, dez. 2020.

GODFREY, D. I. et al. The burgeoning family of unconventional T cells. **NATURE IMMUNOLOGY**, v. 16, n. 11, 2015.

GONÇALVES-PEREIRA, M. H. et al. Dysfunctional phenotype of systemic and pulmonary regulatory T cells associate with lethal COVID -19 cases. **Immunology**, v. 168, n. 4, p. 684–696, abr. 2023.

GROSS, R. et al. Heterologous ChAdOx1 nCoV-19 and BNT162b2 prime-boost vaccination elicits potent neutralizing antibody responses and T cell reactivity against prevalent SARS-CoV-2 variants. **eBioMedicine**, v. 75, p. 103761, jan. 2022.

GUERRERA, G. et al. BNT162b2 vaccination induces durable SARS-CoV-2–specific T cells with a stem cell memory phenotype. **Science Immunology**, v. 6, n. 66, p. eabl5344, 24 dez. 2021.

HACKSTEIN, C.-P. Emerging features of MAIT cells and other unconventional T cell populations in human viral disease and vaccination. **Seminars in Immunology**, 2022.

HADFIELD, J. et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. **Bioinformatics**, v. 34, n. 23, p. 4121–4123, 1 dez. 2018.

- HU, B. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141–154, mar. 2021.
- JARA, A. et al. Effectiveness of an Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine in Chile. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 10, p. 875–884, 2 set. 2021.
- JARA, A. et al. Effectiveness of homologous and heterologous booster doses for an inactivated SARS-CoV-2 vaccine: a large-scale prospective cohort study. **The Lancet Global Health**, v. 10, n. 6, p. e798–e806, jun. 2022.
- JOUAN, Y. et al. Phenotypical and functional alteration of unconventional T cells in severe COVID-19 patients. [s.d.].
- KAMIŃSKA, D. et al. Immunity after COVID-19 Recovery and Vaccination: Similarities and Differences. **Vaccines**, v. 10, n. 7, p. 1068, 3 jul. 2022.
- KARIM, S. S. A.; KARIM, Q. A. Omicron SARS-CoV-2 variant: a new chapter in the COVID-19 pandemic. **The Lancet**, v. 398, n. 10317, p. 2126–2128, dez. 2021.
- KEETON, R. et al. T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron. **Nature**, v. 603, n. 7901, p. 488–492, mar. 2022.
- KIM, J.; THAPA, N. The COVID-19 Vaccines: The Current Standpoint. Em: Y. ABDURAKHMONOV, I. (Ed.). **COVID-19 Vaccines - Current State and Perspectives**. [s.l.] IntechOpen, 2023.
- KLEMIS, V. et al. Comparative immunogenicity and reactogenicity of heterologous ChAdOx1-nCoV-19-priming and BNT162b2 or mRNA-1273-boosting with homologous COVID-19 vaccine regimens. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, dez. 2022.
- KONINGS, F. et al. SARS-CoV-2 Variants of Interest and Concern naming scheme conducive for global discourse. **Nature Microbiology**, v. 6, n. 7, p. 821–823, 9 jun. 2021.
- KURHADE, C. et al. Neutralization of Omicron BA.1, BA.2, and BA.3 SARS-CoV-2 by 3 doses of BNT162b2 vaccine. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, dez. 2022.
- LAMOREAUX, L.; ROEDERER, M.; KOUP, R. Intracellular cytokine optimization and standard operating procedure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1507–1516, ago. 2006.
- LEMIEUX, A. et al. Enhanced detection of antigen-specific T cells by a multiplexed AIM assay. **Cell Reports Methods**, v. 4, n. 1, p. 100690, jan. 2024.
- LIECHTI, T.; ROEDERER, M. OMIP-060: 30-Parameter Flow Cytometry Panel to Assess T Cell Effector Functions and Regulatory T Cells. **Cytometry Part A**, v. 95, n. 11, p. 1129–1134, nov. 2019.
- LIU, J. et al. Vaccines elicit highly conserved cellular immunity to SARS-CoV-2 Omicron. **Nature**, v. 603, n. 7901, p. 493–496, mar. 2022a.
- LIU, Y. et al. Robust induction of B cell and T cell responses by a third dose of inactivated SARS-CoV-2 vaccine. **Cell Discovery**, v. 8, n. 1, dez. 2022b.

LO PRESTI, E. et al. Comprehensive Analysis of the ILCs and Unconventional T Cells in Virus Infection: Profiling and Dynamics Associated with COVID-19 Disease for a Future Monitoring System and Therapeutic Opportunities. **Cells**, v. 11, n. 3, p. 542, 4 fev. 2022.

LU, L. et al. Neutralization of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Omicron Variant by Sera From BNT162b2 or CoronaVac Vaccine Recipients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 75, n. 1, p. e822–e826, 24 ago. 2022.

MAHNKE, Y. D. et al. The who's who of T -cell differentiation: Human memory T -cell subsets. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 11, p. 2797–2809, nov. 2013.

MALONE, B. et al. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 21–39, jan. 2022.

MARINGER, Y. et al. Durable spike-specific T cell responses after different COVID-19 vaccination regimens are not further enhanced by booster vaccination. **Science Immunology**, v. 7, n. 78, p. eadd3899, 16 dez. 2022.

MARKOV, P. V. et al. The evolution of SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 361–379, jun. 2023.

MERAD, M. et al. The immunology and immunopathology of COVID-19. **Science**, v. 375, n. 6585, p. 1122–1127, 11 mar. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Vacinômetro COVID-19**. Departamento de Monitoramento, Avaliação e Disseminação de Informações Estratégicas em Saúde (DEMÁS) da Secretaria de Informação e Saúde Digital (SEIDIGI), 2024. Disponível em: [https://infoms.saude.gov.br/extensions/SEIDIGI\\_DEMAS\\_Vacina\\_C19/SEIDIGI\\_DEMAS\\_Vacina\\_C19.html](https://infoms.saude.gov.br/extensions/SEIDIGI_DEMAS_Vacina_C19/SEIDIGI_DEMAS_Vacina_C19.html).

MOSS, P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. **Nature Immunology**, v. 23, n. 2, p. 186–193, fev. 2022.

MURPHY, K. M. et al. **Janeway's immunobiology**. 7. ed ed. New York, NY: Garland Science, 2008.

NARANBHAI, V. et al. T cell reactivity to the SARS-CoV-2 Omicron variant is preserved in most but not all individuals. **Cell**, v. 185, n. 6, p. 1041- 1051.e6, mar. 2022.

NELDE, A. et al. SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. **Nature Immunology**, v. 22, n. 1, p. 74–85, jan. 2021.

OBERHARDT, V. et al. Rapid and stable mobilization of CD8+ T cells by SARS-CoV-2 mRNA vaccine. **Nature**, v. 597, n. 7875, p. 268–273, 9 set. 2021.

ODAK, I. Reappearance of effector T cells is associated with recovery from COVID-19. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Documento técnico.

**Updated working definitions and primary actions for SARS-CoV-2 variants, 4 October 2023.** [S.l.], 04 Out. 2023b. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/updated-working-definitions-and-primary-actions-for-SARS-CoV-2-variants>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Media briefing. **WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020.** [S.l.], 11 Fev. 2020b. Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Media briefing. Opening Remarks. **WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020.** [S.l.], 11 Mar. 2020a. Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19-11-march-2020>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Media briefing. Opening Remarks. **WHO Director-General's opening remarks at the media briefing – 5 May 2023.** [S.l.], 05 Mai. 2023a. Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-5-may-2023>.

ORUMAA, K.; DUNNE, M. R. The role of unconventional T cells in COVID-19. **Irish Journal of Medical Science (1971 -)**, v. 191, n. 2, p. 519–528, abr. 2022.

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

PALACIOS, R. et al. Efficacy and Safety of a COVID-19 Inactivated Vaccine in Healthcare Professionals in Brazil: The PROFISCOV Study. **SSRN Electronic Journal**, 2021.

PARROT, T. et al. MAIT cell activation and dynamics associated with COVID-19 disease severity. **Science Immunology**, v. 5, n. 51, p. eabe1670, 18 set. 2020.

PATALON, T. et al. Waning effectiveness of the third dose of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, dez. 2022.

PIZZATO, M. et al. SARS-CoV-2 and the Host Cell: A Tale of Interactions. **Frontiers in Virology**, v. 1, p. 815388, 12 jan. 2022.

POLACK, F. P. et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 27, p. 2603–2615, 31 dez. 2020.

PROVINE, N. M. et al. MAIT cell activation augments adenovirus vector vaccine immunogenicity. **Science**, v. 371, n. 6528, p. 521–526, 29 jan. 2021.

RAMBAUT, A. et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1403–1407, 15 jul. 2020.

RANZANI, O. T. et al. Effectiveness of an inactivated Covid-19 vaccine with homologous and heterologous boosters against Omicron in Brazil. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, dez. 2022.

REINSCHEID, M. et al. COVID-19 mRNA booster vaccine induces transient CD8<sup>+</sup> T effector cell responses while conserving the memory pool for subsequent reactivation. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, dez. 2022.

RODDA, L. B. et al. Imprinted SARS-CoV-2-specific memory lymphocytes define hybrid immunity. **Cell**, v. 185, n. 9, p. 1588- 1601.e14, abr. 2022.

RUDD, P. M. et al. Glycosylation and the Immune System. **Science**, v. 291, n. 5512, p. 2370–2376, 23 mar. 2001.

SAHIN, U. et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. **Nature**, v. 586, n. 7830, p. 594–599, 22 out. 2020.

SCHMIDT, T. et al. Immunogenicity and reactogenicity of heterologous ChAdOx1 nCoV-19/mRNA vaccination. **Nature Medicine**, v. 27, n. 9, p. 1530–1535, set. 2021.

SETTE, A.; CROTTY, S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. **Cell**, v. 184, n. 4, p. 861–880, fev. 2021.

SORACI, L. et al. COVID-19 Vaccines: Current and Future Perspectives. **Vaccines**, v. 10, n. 4, p. 608, 13 abr. 2022.

SWANSON, P. A. et al. AZD1222/ChAdOx1 nCoV-19 vaccination induces a polyfunctional spike protein-specific T<sub>H</sub>1 response with a diverse TCR repertoire. **Science Translational Medicine**, v. 13, n. 620, p. eabj7211, 17 nov. 2021.

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

TARKE, A. et al. SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron. **Cell**, v. 185, n. 5, p. 847- 859.e11, mar. 2022.

TERZOLI, S. Expansion of memory Vδ2 T cells following SARS-CoV-2 vaccination revealed by temporal single-cell transcriptomics. **npj Vaccines**, 2024.

THOMAS, S. J. et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine through 6 Months. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 19, p. 1761–1773, 4 nov. 2021.

VIANA, R. et al. Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. **Nature**, v. 603, n. 7902, p. 679–686, 24 mar. 2022.

VON MASSOW, G. et al. Gamma Delta T Cells and Their Involvement in COVID-19 Virus Infections. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 741218, 29 out. 2021.

VOYSEY, M. et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. **The Lancet**, v. 397, n. 10269, p. 99–111, jan. 2021.

WANG, A. Advantages And Disadvantages of Different COVID-19 Vaccines. **Highlights in Science, Engineering and Technology**, v. 45, p. 319–324, 18 abr. 2023a.

WU, Z. et al. CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 816005, 10 fev. 2022.

XIN, Q. et al. Six-month follow-up of a booster dose of CoronaVac in two single-centre phase 2 clinical trials. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, dez. 2022.

XU, S. Development of Current COVID-19 Vaccines, A Review. **Theoretical and Natural Science**, v. 3, n. 1, p. 71–79, abr. 2023.

ZENG, G. et al. Immunogenicity and safety of a third dose of CoronaVac, and immune persistence of a two-dose schedule, in healthy adults: interim results from two single-centre, double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 clinical trials. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 483–495, abr. 2022.

## ANEXO A – Localização das células $CD4^+IFN-\gamma^+TNF^+$ nas subpopulações de memória em V28 incluindo análise estatística.

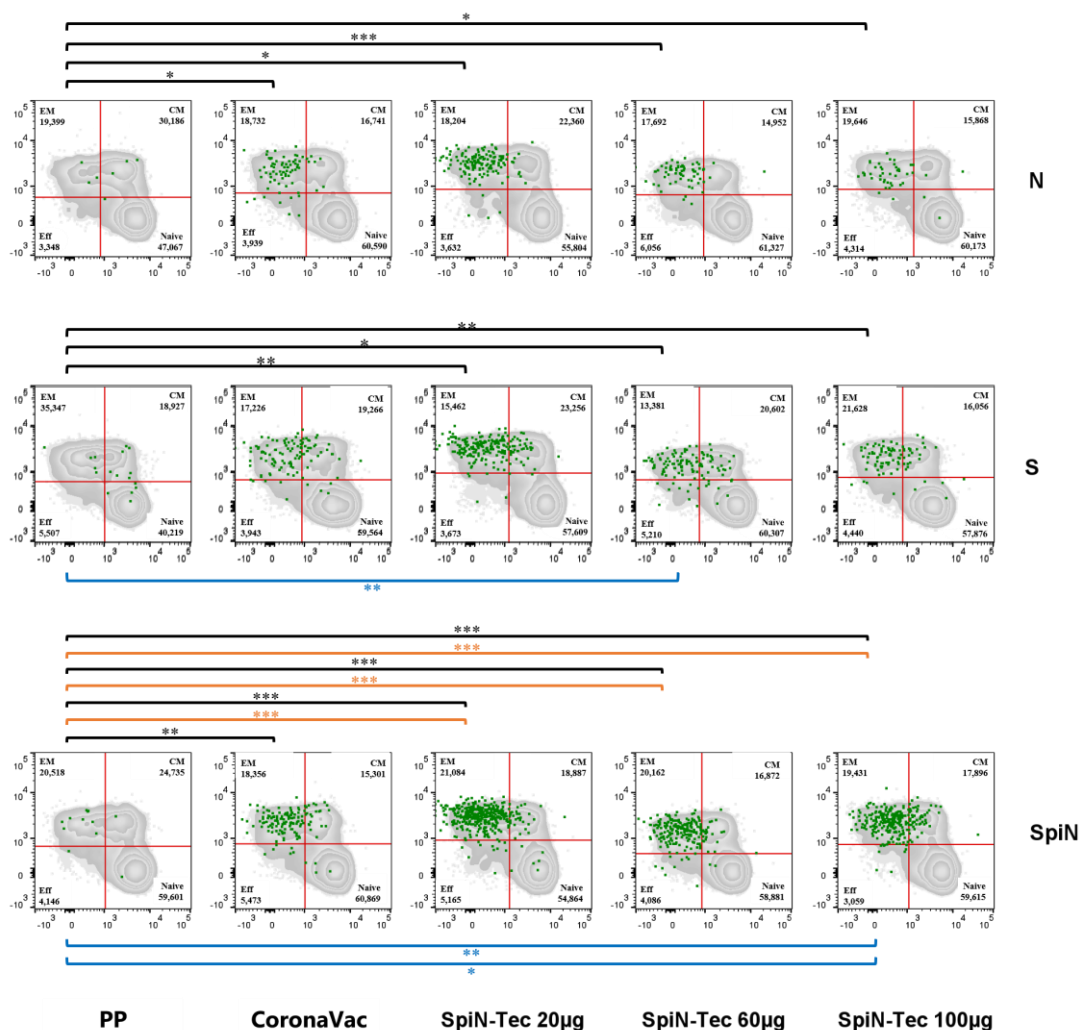


Imagem representativa da localização, dentro das subpopulações de memória, de células  $CD4^+$  com co-expressão de  $IFN-\gamma^+TNF^+$ . Representação mediante concatenação das amostras de todos os pacientes incluídos na análise estatística em cada grupo. Os eixos vermelhos dividem os painéis em quadrantes, de acordo com a expressão de  $CD45RO$  e de  $CCR7$ . O quadrante superior esquerdo (Q1) representa as células de EM, com fenótipo  $CD45RO^+CCR7^-$ . O quadrante superior direito (Q2) representa as células de CM, com fenótipo  $CD45RO^+CCR7^+$ . O quadrante inferior esquerdo (Q3) representa as células Eff, com fenótipo  $CD45RO^-CCR7^-$ . O quadrante inferior direito (Q4) representa as células naïve, de fenótipo  $CD45RO^-CCR7^+$ . As células  $CD4^+$  multifuncionais são representadas pelos pontos verdes. Análise estatística realizada por teste de Kruskal–Wallis e teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunn com correção de Bonferroni. Significância estatística foi determinada por \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . Fonte: elaborado pela autora, 2024.

## ANEXO B – Localização das células $CD8^+IFN-\gamma^+TNF^+$ nas subpopulações de memória em V28 incluindo análise estatística.

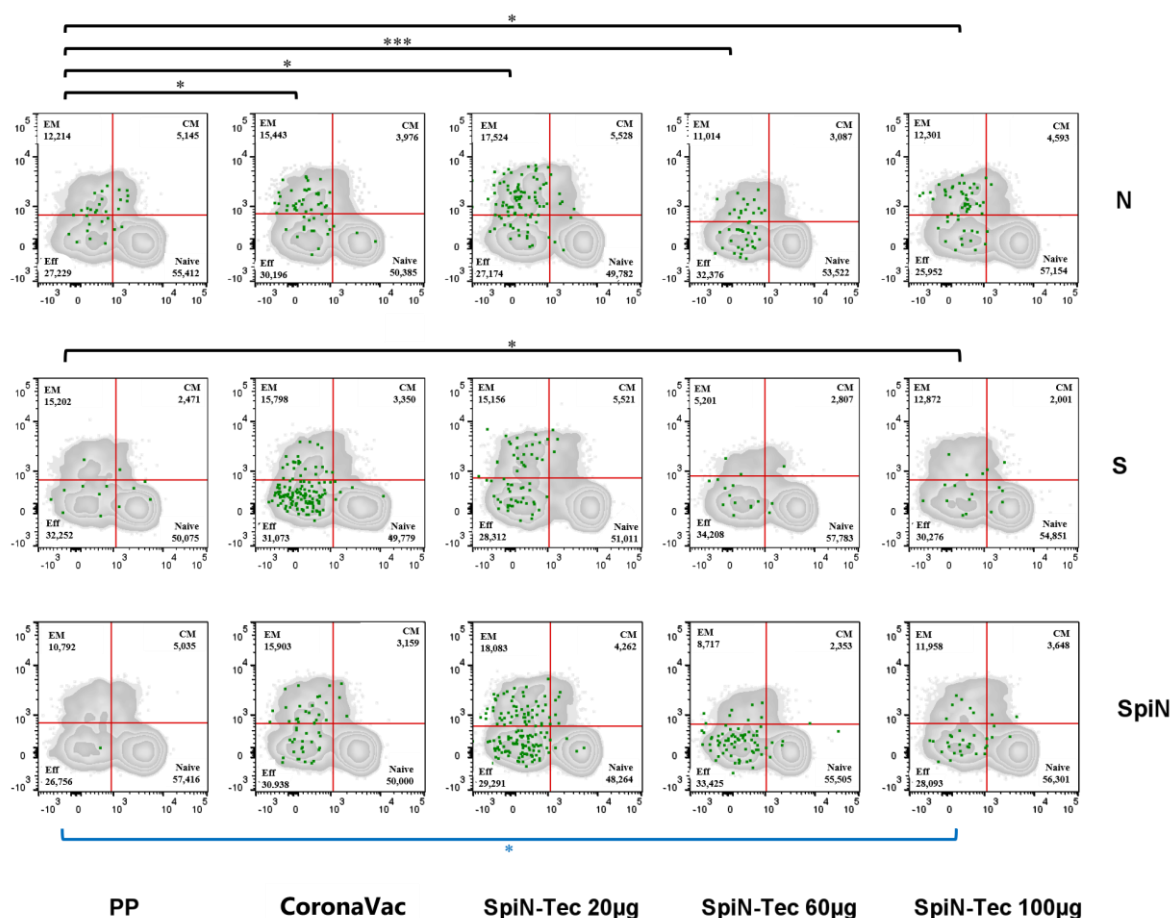


Imagem representativa da localização, dentro das subpopulações de memória, de células  $CD8^+$  com co-expressão de  $IFN-\gamma^+TNF^+$ . Representação mediante concatenação das amostras de todos os pacientes incluídos na análise estatística em cada grupo. Os eixos vermelhos dividem os painéis em quadrantes, de acordo com a expressão de  $CD45RO$  e de  $CCR7$ . O quadrante superior esquerdo (Q1) representa as células de EM, com fenótipo  $CD45RO^+CCR7^-$ . O quadrante superior direito (Q2) representa as células de CM, com fenótipo  $CD45RO^+CCR7^+$ . O quadrante inferior esquerdo (Q3) representa as células Eff, com fenótipo  $CD45RO^-CCR7^-$ . O quadrante inferior direito (Q4) representa as células naïve, de fenótipo  $CD45RO^-CCR7^+$ . As células  $CD4^+$  multifuncionais são representadas pelos pontos verdes. Análise estatística realizada por teste de Kruskal–Wallis e teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunn com correção de Bonferroni. Significância estatística foi determinada por \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,001$ . Fonte: elaborado pela autora, 2024.