



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA (IPTSP)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO
PARASITO-HOSPEDEIRO (PPGBRPH)

LETÍCIA CARRIJO MASSON

Avaliação da resposta imune após vacinação para COVID-19

GOIÂNIA
2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

LETÍCIA CARRIJO MASSON

3. Título do trabalho

Avaliação da resposta imune após vacinação para COVID-19

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Simone Gonçalves Da Fonseca, Professor do Magistério Superior**, em 22/11/2023, às 22:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Letícia Carrijo Masson, Discente**, em 24/11/2023, às 09:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4001821** e o código CRC **27537868**.

Referência: Processo nº 23070.048578/2023-13

SEI nº 4001821

LETÍCIA CARRIJO MASSON

Avaliação da resposta imune após vacinação para COVID-19

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás (UFG), como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro.

Área de concentração: Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro

Orientadora: Professora Doutora Simone Gonçalves da Fonseca

GOIÂNIA
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Masson, Leticia Carrijo
Avaliação da resposta imune após vacinação para COVID-19
[manuscrito] / Leticia Carrijo Masson. - 2023.
142 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2023.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Resposta imune humoral. 2. COVID-19. 3. Vacinas anti-SARS CoV-2. 4. IgG anti-RBD. 5. IgG anti-spike. I. Fonseca, Simone Gonçalves da, orient. II. Título.

CDU 612.017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LETÍCIA CARRIJO MASSON - Aos vinte e oito dias do mês de agosto do ano de 2023 (28/08/2023), às 14h00min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. **SIMONE GONÇALVES DA FONSECA** (IPTSP/UFG), **ANA PAULA JUNQUEIRA KIPNIS** (IPTSP/UFG) e **MILTON ADRIANO PELLI DE OLIVEIRA** (IPTSP/UFG) para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada na Sala 402 do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da UFG, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“Avaliação da resposta imune após vacinação para COVID-19”**, em nível de MESTRADO, área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, de autoria de **LETÍCIA CARRIJO MASSON**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. **SIMONE GONÇALVES DA FONSECA**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1492/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata Aprovada ou Reprovada:

Banca Examinadora

Profa. Dra. **Simone Gonçalves da Fonseca**

Profa. Dra. **Ana Paula Junqueira Kipnis**

Prof. Dr. **Milton Adriano Pelli de Oliveira**

Aprovada / Reprovada

Aprovada

Aprovada

Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Habilitada**, cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRA EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, na área de concentração em **BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16h e 18 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, **HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Simone Gonçalves Da Fonseca**, **Professora do Magistério Superior**, em 28/08/2023, às 16:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Junqueira Kipnis, Professor do Magistério Superior**, em 28/08/2023, às 16:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Milton Adriano Pelli De Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 28/08/2023, às 16:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3996564** e o código CRC **1AD9C94F**.

Referência: Processo nº 23070.048578/2023-13

SEI nº 3996564

**Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da
Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Leticia Carrijo Masson

Orientador (a): Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca

Co-orientador (a):

Membros:

1. Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca

2. Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis

3. Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

Data: 28/08/2023

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer minha família, meus pais, Cláudia e Adolfo e minha irmã, Isadora, por todo o apoio e acolhimento durante esse período.

Agradeço meus amigos do Laboratório de Imunorregulação, Carolina, João Marcos e João Lucas, pelos anos de parceria, ajuda, ensinamentos e risadas, e meus amigos dos demais laboratórios. Vocês tornaram meus dias melhores. Foi um prazer conhecer e trabalhar com todos vocês.

Agradeço também a minha orientadora, Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca, pela disponibilidade e oportunidade de realizar esta pesquisa, por me receber no seu laboratório e por todos os conhecimentos transmitidos.

Agradeço a todos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro pela oportunidade de fazer mestrado e contribuir para o desenvolvimento da pesquisa científica.

Agradeço os participantes do estudo, pela disponibilidade e interesse em fazer parte da pesquisa. Vocês foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo financiamento do projeto.

Por fim, agradeço os membros da banca, Profa. Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis e Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira, por sua disponibilidade em avaliar o trabalho e contribuir para sua melhoria.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Infecção pelo sars-cov-2 e a covid-19.....	16
1.2. Estrutura do SARS-CoV-2 e mecanismo de infecção celular.....	18
1.3. Linfócitos T e B e suas funções no desenvolvimento da resposta imune.....	19
1.4. Linfócitos B1 e B2.....	21
1.5. Formação de linfócitos B de memória e produção de anticorpos.....	21
1.6. Receptores de anticorpos.....	23
1.7. Resposta imune inata induzida pela infecção por SARS-CoV-2.....	24
1.8. Resposta imune celular induzida pela infecção por SARS-CoV-2.....	25
1.9. Resposta imune humoral induzida pela infecção por SARS-CoV-2.....	26
1.10. Tipos de vacinas anti-SARS-CoV-2.....	27
1.11. Resposta imune celular às vacinas anti-SARS-CoV-2.....	29
1.12. Resposta imune humoral às vacinas anti-SARS-CoV-2.....	31
1.13. Variantes do SARS-CoV-2.....	32
1.14. Esquemas de doses e reforço das vacinas anti-SARS-CoV-2.....	34
2. JUSTIFICATIVA.....	37
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. Objetivo geral.....	38
3.2. Objetivos específicos.....	38
4. METODOLOGIA DETALHADA.....	39
4.1. Delineamento do estudo.....	39
4.2. Aspectos éticos.....	39
4.3. Critérios de Inclusão.....	39
4.4. Critérios de exclusão.....	40
4.5. Indivíduos e períodos de coleta.....	40
4.6. Extração de RNA do SARS-CoV-2 e RT-qPCR.....	41
4.7. Obtenção e armazenamento de plasma e soro.....	42
4.8. ELISA para IgG e IgA anti-RBD e IgG anti-spike.....	42
4.9. Análise Estatística.....	43
5. RESULTADOS.....	45
5.1. Características dos participantes do estudo.....	45

5.2. Avaliação da produção de anticorpos séricos após vacinação com ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac em diferentes tempos de coleta.....	50
5.3. Análise longitudinal da produção de anticorpos séricos após as vacinas ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac.....	54
5.4. Avaliação da influência do sexo sobre os níveis séricos de IgG e IgA.....	56
5.5. Avaliação da influência da idade sobre os níveis séricos de IgG e IgA.....	60
5.6. Avaliação da variação dos níveis séricos de IgG e IgA devido à comorbidades.....	62
5.7. Análise da influência do histórico de infecção por SARS-CoV-2 sobre os níveis séricos de IgG e IgA.....	64
5.8. Comparação da produção de IgG anti-spike e anti-RBD em diferentes tempos para diferentes vacinas.....	67
6. DISCUSSÃO.....	69
7. CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXOS – TCLE, Parecer do Comitê de Ética.....	96

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1: Modelo estrutural do SARS-CoV-2 e mecanismo de infecção celular.

Figura 2: Esquema do estudo e períodos de coleta dos participantes dos grupos da BNT162b2, ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac.

Figura 3: Esquema dos períodos de coleta de sangue de acordo com cada grupo vacinal.

Figura 4: Avaliação da produção sérica de IgA anti-RBD e IgG anti-RBD e anti-spike em diferentes momentos de coleta para as vacinas ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac.

Figura 5: Frequência de indivíduos produtores de IgA anti-RBD em períodos de coleta pós-vacinal.

Figura 6: Fluxograma dos tempos de coleta de amostras de sangue dos indivíduos pré e pós vacinas BNT162b2, ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac.

Figura 7: Análise longitudinal da produção sérica de IgA anti-RBD e IgG anti-RBD e anti-spike para as vacinas BNT162b2, ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac.

Figura 8: Avaliação da influência do sexo sobre os níveis séricos de IgA anti-RBD e IgG anti-RBD e anti-spike após a terceira dose com BNT162b2.

Figura 9: Influência do sexo sobre os níveis séricos de IgA anti-RBD e IgG anti-RBD e anti-spike nos períodos de coleta pós-vacinação para as vacinas BNT162b2, ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac.

Figura 10: Influência da idade sobre os níveis séricos de IgA anti-RBD e IgG anti-RBD e anti-spike para cada período de coleta das vacinas BNT162b2, ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac.

Figura 11: Variação nos níveis séricos de IgA anti-RBD e IgG anti-RBD e anti-spike devido a comorbidades em relação às vacinas BNT162b2, ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac.

Figura 12: Análise da produção sérica de IgA anti-RBD e IgG anti-RBD e anti-spike em relação ao histórico de infecção por SARS-CoV-2.

Figura 13: Análise da produção sérica de IgA anti-RBD e IgG anti-RBD e anti-spike em relação ao histórico de infecção por SARS-CoV-2 para cada período de coleta.

Figura 14: Análise da produção sérica de IgG anti-RBD e anti-spike em relação ao período de coleta e grupo vacinal.

Figura 15: Resumo gráfico da metodologia e dados do estudo. Produzido no BioRender.

Tabela 1: Plataformas e candidatas a vacinas usadas para COVID-19, com informações sobre suas doses, velocidade, resposta imune, vantagens e desvantagens. Adaptado de: Universidade da Califórnia São Francisco, Departamento de Medicina, divisão de HIV, doenças infecciosas e medicina global (Disponível em: <https://hividgm.ucsf.edu/covid-19-vaccines>).

Tabela 2: Caracterização dos anticorpos utilizados para realização dos ELISAs (IgA e IgG) quanto ao tipo, marca e número do catálogo, clone e diluição usada.

Tabela 3: Caracterização da população do estudo de acordo com as vacinas: ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac (N=78).

Tabela 4: Caracterização da população do estudo por período de coleta e estratificação dos grupos de acordo com sexo e vacina: ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac.

Anexo 1 –TCLE, Parecer do Comitê de Ética

Anexo 2 – Outros anexos (Questionário aplicado, artigo publicado)

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Ad: Adenovírus

Ad26 e Ad5: Vacina de dois vetores virais (adenovírus), para COVID-19, desenvolvida pela Sputnik V.

Ad26.CoV2.S ou JNJ-78436735: Vacina de vírus inativado, para COVID-19, desenvolvida pela Johnson&Johnson

ADCC: Citotoxicidade celular mediada por células dependentes de anticorpos

B.1.1.529: Ômicron

B.1.1.7: Alpha

B.1.351: Beta

B.1.617.2: Delta

BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5, BA.1.1, BF.7, BQ.1, XBB, BA.2.10.1, BA.2.75: Subvariantes da Ômicron

BCR: Receptor de linfócito B

Beta-CoVs: beta coronavírus

BNT162b2: Vacina de mRNA, para COVID-19, desenvolvida pela Pfizer/BioNtech

ChAdOx1 nCoV-19 ou AZD1222: Vacina de vetor viral (adenovírus), para COVID-19, desenvolvida pela AstraZeneca

BSA: Albumina Sérica Bovina

CDC: Centro de Controle de Doenças

CG: Centro germinativo

CoronaVac: Vacina de vírus inativado, para COVID-19, desenvolvida pela SinoVac

DAMPs: Padrões moleculares associados a danos

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidade óptica

E: Proteína do Envelope do SARS-CoV-2

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

FcRs: Receptores Fc de Imunoglobulinas

FO: Folicular

IFN- γ : Interferon gamma

Ig: Imunoglobulina (IgA – imunoglobulina A; IgG – imunoglobulina G; IgM – imunoglobulina M)

IL: Interleucina

ITAM: Motivo de ativação do imunorreceptor baseado em tirosina
ITIM: Motivo de inibição do imunorreceptor baseado em tirosina
M: Proteína de Membrana do SARS-CoV-2
MERS: Vírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA-1273: Vacina de mRNA, para COVID-19, desenvolvida pela Moderna
N: Proteína do Nucleocapsídeo do SARS-CoV-2
NET: Redes extracelulares de neutrófilos
NIH: Instituto Nacional de Saúde
NK: *natural killer*
NOD: Domínio de oligomerização de nucleotídeos
NVX-CoV2373: Vacina de nanopartículas da proteína S recombinantes, para COVID-19, desenvolvida pela Novavax
OMS: Organização Mundial da Saúde
P.1: Gamma
PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos
PBMC: Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS: Tampão Fosfato Salino
PRRs: Receptor de reconhecimento de padrão
RBD: Domínio de Ligação ao Receptor
RT-PCR: Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
S/CO: Signal/ cutoff
S: Proteína Spike do SARS-CoV-2
SARS: Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SRAG: Síndrome Respiratória Aguda Grave
Treg: Linfócitos T reguladores
T1: Período de coleta pré-vacina
T2: Período de coleta 1 mês após 2ª dose
T3: Período de coleta 4-6 meses após 2ª dose
T4: Período de coleta 1 mês após 3ª dose
TCD4+: Linfócitos TCD4+
TCD8+: Linfócitos T CD8+
TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido
Tfh: Linfócitos T helper foliculares

TGF- β : Fator de Crescimento Transformador beta

Th: Linfócitos T helper (Th1, Th2, Th17, Th22)

TLR: Receptores do tipo Toll

TMB: Tetrametilbenzidina

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

VOC: Variantes de Preocupação

VOI: Variantes de Interesse

ZM: Zona marginal

RESUMO

As respostas imunes após a vacinação contra COVID-19 devem ser avaliadas em diferentes populações ao redor do mundo. Este estudo comparou as respostas de anticorpos induzidas pelas vacinas ChAdOx1 nCoV-19, CoronaVac e BNT162b2. Amostras de sangue total de vacinados foram coletadas antes e depois das vacinações com a segunda e terceira doses. O estudo compreendeu 78 vacinados, dos quais 62,8% eram mulheres, com as seguintes médias de idades: 26 anos—ChAdOx1 nCoV-19; 40 anos — CoronaVac; 30 anos - BNT162b2. Amostras de soro foram quantificadas, por ELISA, para IgG e IgA anti-Domínio de Ligação ao Receptor (RBD) e IgG anti-spike. Após duas doses da vacina, os vacinados com BNT162b2 produziram níveis mais altos de IgA e IgG anti-RBD e IgG anti-spike em comparação aos vacinados com ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac. A terceira dose de reforço com BNT162b2 induziu níveis maiores de IgA e IgG anti-RBD e IgG anti-spike em vacinados com CoronaVac. Indivíduos que relataram infecção por SARS-CoV-2 antes ou durante o estudo apresentaram maior produção de IgA e IgG anti-RBD. Concluindo, duas doses das vacinas estudadas induziram níveis detectáveis de IgA e IgG anti-RBD e IgG anti-spike em vacinados. O reforço heterólogo com BNT162b2 aumentou os níveis de IgA e IgG anti-RBD e IgG anti-spike em vacinados com CoronaVac e os níveis de IgA anti-RBD em vacinados com ChAdOx1 nCoV-19. Além disso, a infecção por SARS-CoV-2 induziu níveis maiores de IgA e IgG anti-RBD em vacinados com CoronaVac.

Palavras-chave: Resposta imune humoral, COVID-19, Vacinas anti-SARS-CoV-2, IgG anti-RBD, IgA anti-RBD, IgG anti-spike

ABSTRACT

Immune responses after COVID-19 vaccination should be evaluated in different populations around the world. This study compared antibody responses induced by ChAdOx1 nCoV-19, CoronaVac, and BNT162b2 vaccines. Blood samples from vaccinees were collected pre- and post-vaccinations with the second and third doses. The study enrolled 78 vaccinees, of whom 62.8% were women, with the following median ages: 26 years—ChAdOx1 nCoV-19; 40 years—CoronaVac; 30 years—BNT162b2. Serum samples were quantified for anti-Receptor Binding Domain (RBD) IgG and anti-RBD IgA and anti-spike IgG by ELISA. After two vaccine doses, BNT162b2 vaccinees produced higher levels of anti-RBD IgA and IgG, and anti-spike IgG compared to ChAdOx1 nCoV-19 and CoronaVac vaccinees. The third dose booster with BNT162b2 induced higher levels of anti-RBD IgA and IgG, and anti-spike IgG in CoronaVac vaccinees. Individuals who reported a SARS-CoV-2 infection before or during the study had higher anti-RBD IgA and IgG production. In conclusion, two doses of the studied vaccines induced detectable levels of anti-RBD IgA and IgG and anti-spike IgG in vaccinees. The heterologous booster with BNT162b2 increased anti-RBD IgA and IgG and anti-spike IgG levels in CoronaVac vaccinees and anti-RBD IgA levels in ChAdOx1 nCoV-19 vaccinees. Furthermore, SARS-CoV-2 infection induced higher anti-RBD IgA and IgG levels in CoronaVac vaccinees.

Key words: *Humoral immune response, COVID-19, anti-SARS-CoV-2 vaccines, anti-RBD IgG, anti-RBD IgA, anti-spike IgG*

1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Infecção pelo SARS-CoV-2 e a COVID-19

Os coronavírus, pertencentes à família *Coronaviridae* (ordem *Nidovirales*), podem ser classificados em quatro gêneros que incluem *Alpha*, *Beta*, *Gamma* e *Deltacoronavirus*. Os *Alpha* e *Betacoronavirus* causam doenças em mamíferos, os *Gammacoronavirus*, em aves e os *Deltacoronavirus* infectam tanto aves, quanto mamíferos (Fehr et al., 2015). Os coronavírus são responsáveis por ocasionar doenças leves a graves no trato respiratório. Em alguns casos podem provocar surtos, como ocorreu com o vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), responsável pelo primeiro surto de beta-Coronavirus (beta-CoVs) em 2002, inicialmente na China, e com o vírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS), causadora do surto em 2012, inicialmente na Arábia Saudita. O SARS-CoV-2 é um *Betacoronavirus* agente da COVID-19, doença que teve início em 2019, em Wuhan, China, e é responsável pelo terceiro surto zoonótico de beta-CoVs (Wang et al., 2020; Das et al., 2021). Sete coronavírus são conhecidos por serem patogênicos para os humanos. Alguns como o HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43, e HCoV-HKU1, os chamados coronavírus endêmicos, causam infecções com apenas sintomas leves. Já o SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 causam doenças respiratórias graves e potencialmente fatais (Naqvi et al., 2020). O SARS-CoV-2 compartilha cerca de 82% de identidade genômica com os vírus SARS-CoV e MERS-CoV e, mais de 90% de semelhança em proteínas estruturais e enzimas (Naqvi et al., 2020).

A doença causada pelo SARS-CoV-2 recebe o nome COVID-19 devido à sua nomenclatura em inglês: *Coronavirus Disease* (Doença do Coronavírus), e o número 19 está relacionado a 2019, ano de publicação dos primeiros casos na China. Acredita-se que tenha origem zoonótica devido à similaridade genômica de aproximadamente 96% com coronavírus de morcegos, sendo esta uma possível forma preliminar de transmissão para seres humanos, apesar de outros animais, como os pangolins, serem considerados reservatórios virais, devido à 99% de similaridade de coronavírus de pangolins com o genoma do SARS-CoV-2 (KAUR et al., 2021; LIU et al., 2020; WONG et al., 2020).

Com uma patogênese caracterizada por hiperinflamação, tempestade de citocinas (Wong et al., 2004; Xu et al., 2020) e desregulação do sistema imune (Li et

al., 2020), a doença causada pela infecção por SARS-CoV-2 já acometeu mais de 500 milhões de pessoas e foi responsável por mais de seis milhões de óbitos (RITCHIE et al., 2022). A transmissão viral ocorre de pessoa a pessoa, por meio de gotículas respiratórias, tosse e espirro, principalmente. A COVID-19 pode ser caracterizada por quadros clínicos envolvendo a síndrome da angústia respiratória e falência respiratória. Além da inflamação sistêmica, pode cursar com sepse, lesão cardiovascular e insuficiência cardíaca, culminando em falência múltipla de órgãos (Wang et al., 2020).

A patogênese da infecção envolve, principalmente, o comprometimento de células pulmonares (Xu et al., 2020), com casos que variam na sua forma de apresentação. Os casos mais brandos da infecção cursam, essencialmente, com o comprometimento do trato respiratório superior. Quando o SARS-CoV-2 infecta o trato respiratório superior e inferior, pode causar síndrome respiratória leve ou aguda com consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucinas IL-1 β e IL-6 (PIO et al., 2020).

Indivíduos com COVID-19 podem ser classificados em diferentes formas de apresentação da doença de acordo com os sintomas apresentados. Essa classificação foi definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2022) e pelas Diretrizes de Tratamento da COVID-19 (Instituto Nacional de Saúde, EUA) (NIH, 2022) e estratifica indivíduos com infecção por SARS-CoV-2 nas formas leve (diversos sinais e sintomas, porém ausência de falta de ar, dispneia ou imagem torácica anormal), moderada (indivíduos com pneumonite confirmada por diagnóstico radiológico, hospitalizados e em uso de oxigenioterapia), grave (dispneia, frequência respiratória ≥ 30 respirações/min, saturação de oxigênio [SpO₂] $\leq 93\%$, e/ou infiltrado pulmonar $>50\%$ dentro de 24 a 48 horas, incluindo os indivíduos tratados na Unidade de Terapia Intensiva [UTI] e crítica (em uso de ventilação mecânica) e, eventualmente, óbito.

O vírus apresenta período de incubação de um a 14 dias, e a infecção pode causar sintomas como febre, tosse seca, mialgia, fadiga, e mais raramente, diarreia, cefaleia e dor de garganta. Os casos mais graves podem evoluir para pneumonia e cursar com falência respiratória e de múltiplos órgãos (Huang et al., 2020; Yang et al., 2020 b). Além disso, devido ao caráter hiperinflamatório da infecção, a doença pode cursar com aumento dos níveis de marcadores inflamatórios no sangue, com destaque para proteína-C reativa, ferritina e D-dímeros. A leucopenia, neutrofilia, linfopenia e aumento de citocinas e quimiocinas, têm sido relacionados ao agravamento da doença

e óbito (Gao et al., 2020; Wang et al., 2020). Ainda, a infecção por SARS-CoV-2 pode ser assintomática (Almadhi et al., 2021). É estimado pelo CDC que 35% dos casos de COVID-19 são assintomáticos (CDC, 2020).

1.2 Estrutura do SARS-CoV-2 e mecanismo de infecção celular

O SARS-CoV-2 é um coronavírus composto por uma fita simples de RNA sentido positivo (+)ssRNA, não segmentado. Seu genoma possui tamanho de aproximadamente 29,9 kb e é formado por duas grandes “*open reading frames*” (ORF1a e ORF1b) responsáveis por codificar as proteínas não-estruturais e proteínas acessórias (3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b e 9) (Lu et al., 2020; Naqvi et al., 2020; Wu et al., 2020). Estruturalmente SARS-CoV-2 é formado por quatro proteínas principais: *spike* ou espícula do vírion (S), envelope (E), glicoproteína de membrana (M) e proteína do nucleocapsídeo (N) (Kaur et al., 2021). Para exercer seu mecanismo patogênico o SARS-CoV-2 se liga às células hospedeiras por meio de uma glicoproteína trimérica que reconhece a Enzima Conversora da Angiotensina 2 (ECA2), a proteína S. Essa proteína estrutural é clivada em dois domínios, extracelular e transmembranar, por uma proproteína convertase, como a furina, antes de sair da célula infectada (Hoffmann et al., 2020; Shang et al., 2020). Os domínios são conhecidos como S1 e S2, em que o primeiro é responsável por promover a ligação viral ao receptor do hospedeiro, e o segundo, por mediar a fusão das membranas da célula hospedeira com o vírus. A porção S1 contém a RBD, essencial para sua ligação à ECA2 e estabelecimento da infecção celular (Kaur et al., 2021). Para o sucesso da entrada viral na célula hospedeira, é necessário um estímulo promovido por uma clivagem no domínio S2, conhecido como sítio de S2, que induz aproximação das membranas viral e celular, promovendo a formação de um poro de fusão que permite a entrada do genoma viral no citoplasma da célula (Jackson et al., 2022). Para o SARS-CoV-2 essa clivagem é realizada pela serina protease transmembranar 2 (TMPRSS2) (Glowacka et al., 2011; Shulla et al., 2011) ou pela catepsina L (Simmons et al., 2005), após a ligação do vírus a ECA2 e exposição do sítio de S2. A Figura 1 apresenta a estrutura do vírus.

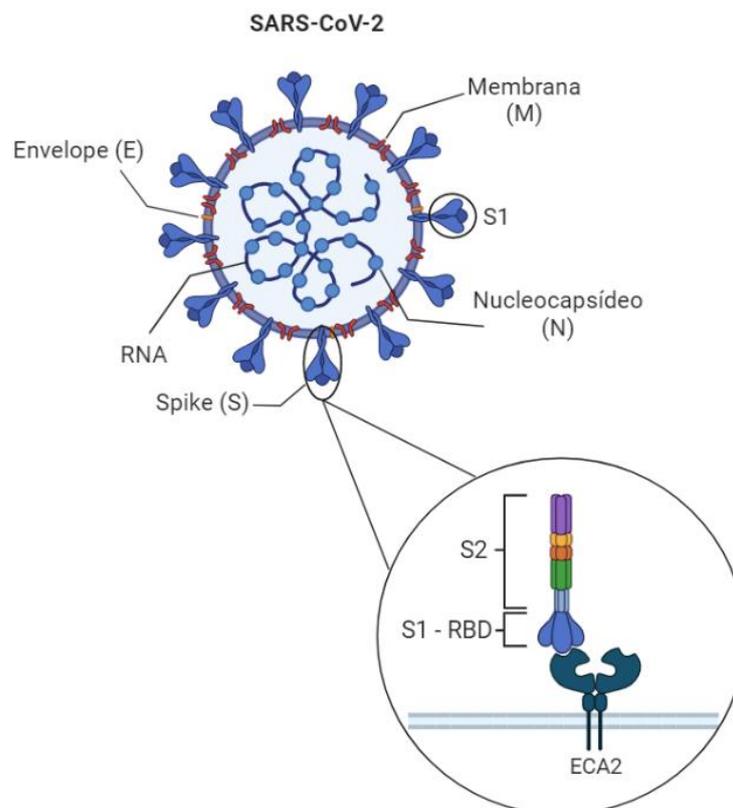


Figura 1: Modelo estrutural do SARS-CoV-2 e mecanismo de infecção celular. O modelo evidencia as principais proteínas estruturais: Spike (S) e seus dois domínios (S1 e S2), Membrana (M), Nucleocapsídeo (N) e Envelope (E). Adaptada de figura do BioRender.

A RBD é considerada alvo para anticorpos neutralizantes por apresentar diversas funções essenciais para o ciclo viral do SARS-CoV-2. Anticorpos que se ligam à proteína spike, especificamente ao domínio RBD e o domínio N-terminal inibem a ligação dos vírus à célula e os neutralizam (Kurup et al., 2021), por isso, altos níveis de anticorpos anti-spike se relacionam a uma atividade neutralizante do vírus.

Além de neutralizarem a proteína S, esses anticorpos também podem se ligar à glicoproteína de superfície N, promovendo a neutralização da infecção de células e tecidos pelo SARS-CoV-2 (Poland et al., 2020).

1.3 Linfócitos T e B e suas funções no desenvolvimento da resposta imune

Para o combate ao vírus é necessário formar uma resposta imune contra o SARS-CoV-2 composta, dentre outros elementos, por linfócitos e anticorpos. Os linfócitos T e B são células especializadas no desenvolvimento de resposta imune antígeno-específica, conhecida como resposta imune adaptativa. O linfócito T é o responsável pela resposta celular e o linfócito B, humoral, pela diferenciação em plasmócitos e produção de anticorpos. Os linfócitos T podem se diferenciar em TCD4+, células T helper, ou TCD8+, células T citotóxicas, dependendo do marcador expresso em sua superfície.

Os linfócitos T helper podem ser divididos em 6 subpopulações principais que se diferem pelo perfil de citocinas secretadas. A população Th1 promove proteção contra patógenos intracelulares, participa na patogênese de doenças autoimunes e na hipersensibilidade tardia, secretando IFN γ . Já a Th2 participa na troca de classe da IgE, no recrutamento de mastócitos, eosinofilia e produção de muco, secretando as citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-10 e IL-25. Outra população é a Th9, que secreta IL-9 e IL-10, e é responsável pelas mesmas funções das células Th2, exceto indução de eosinofilia. As células Th17 induzem produção de quimiocinas e neutrofilia e secretam IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-9, IL-21, IL-22 e TNF- α . A subpopulação Th22 induz produção de peptídeos antimicrobianos, promove proliferação de queratinócitos, porém inibe sua diferenciação por meio da secreção de IL-22, TNF- α , IL-13 e FGF. As células T follicular helper (Tfh) auxiliam na formação de centros germinativos, diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, produção de anticorpos de diferentes isótipos e produção de células B, secretando IL-21, IL-4 e IL-10. Por fim, as células T reguladoras (Treg) atuam na prevenção de doenças autoimunes, evitam exacerbação de processos patológicos e alergias, induzem tolerância em transplantes e durante a gestação, inibem proliferação e ativação de células autorreativas e inibem respostas antitumorais. Estas células secretam citocinas reguladoras como IL-10, TGF- β , IL-35 e adenosina, além da liberação de perforinas e granzimas.

Os linfócitos TCD8+, citotóxicos, são responsáveis pela destruição de células tumorais ou infectadas a partir da liberação de perforina e granzimas. Além disso, pela secreção de IFN- γ e TNF- α atuam na defesa contra infecções virais e na inibição da proliferação de células tumorais (Arbeláez-Cortés et al., 2013).

Como o foco deste trabalho é o desenvolvimento de resposta imune humoral às vacinas anti-SARS-CoV-2, iremos abordar, preferencialmente, explicações acerca dos linfócitos B, produção de anticorpos e suas funções principais.

1.4 Linfócitos B1 e B2

Linfócitos B2 constituem a maioria dos linfócitos B presentes no sangue, compreendendo as células B da zona marginal (ZM) e as células B foliculares (FO) (Vale et al., 2015). Apesar de fenotipicamente semelhantes, os linfócitos B1 pertencem a resposta imune inata (Kageyama et al., 2020). Linfócitos B1 estão envolvidos na primeira linha de defesa contra patógenos ou antígenos próprios derivados de tecidos lesados (Kageyama et al., 2020), sendo responsáveis pela secreção de anticorpos de baixa afinidade das classes IgM e IgG3 ativados por meios independentes de células T, assim como as células B da ZM (Vale et al., 2015). Ambas são estimuladas por receptores inatos, como os receptores do tipo toll ou pela estimulação de IgM por polissacarídeo bacteriano, por exemplo (Vale et al., 2015). Além disso, linfócitos B1 também participam da formação de anticorpos naturais e secreção de moléculas imunomoduladoras, portanto, pode-se dizer que possuem papéis de regulação de processo inflamatório e da tolerância ao próprio (Baumgarth, 2011). Já as células B FO originam anticorpos de alta afinidade que precisam da ajuda de linfócitos T para proliferarem e passarem por hipermutação somática e troca de classes no centro germinativo (CG), dando origem a anticorpos das classes IgG, IgA e IgE (Vale et al., 2015).

1.5 Formação de linfócitos B de memória e produção de anticorpos

Para a produção de anticorpos, as primeiras células B imaturas produzidas na medula óssea sofrem maturação no baço para formar células B maduras (Bhattacharya, 2019). Após a maturação, os linfócitos B que expressam receptores específicos de células B (BCR) encontram antígenos nos folículos linfóides. Nessa região, eles podem seguir dois caminhos diferentes: ativação com ajuda de células T, na qual produzirão plasmócitos de vida curta, ou serão direcionados para o CG, onde sofrerão processos de proliferação de produção de anticorpos, maturação de afinidade e troca de classe para produzir plasmócitos específicas de vida longa ou células B de memória (Lebien et al., 2008; Nutt et al., 2015). As imunoglobulinas são produzidas com a ajuda de células Th2 e T foliculares auxiliares (Tfh) que podem atuar como coestímulo para a diferenciação de células B dependentes de células T em plasmócitos secretores de

anticorpos, que produzem anticorpos com a mesma conformação do BCR que foi expresso na célula B inicial ativada (Nutt et al., 2015). Os isótipos de anticorpos produzidos no CG são IgM, IgA, IgG, IgE e IgD. A diferenciação dos anticorpos em um dos isótipos depende do tipo de célula B que originou os plasmócitos e do estágio de troca de classe (Nutt et al., 2015). A hipermutação somática e a troca de isótipos de anticorpos ocorrem normalmente no GC, sob estimulação de Tfh, e esse processo pode originar células B de memória importantes para uma melhor resposta em um encontro secundário com o antígeno. Foi demonstrado que essa interação célula T-célula B também ocorre na imunidade induzida por vacinas anti-SARS-CoV-2 e na ausência de células Tfh, induzindo uma resposta humoral mais diversificada, mas ainda produzindo plasmócitos de vida longa (Chen et al., 2022 b).

As imunoglobulinas podem apresentar dois papéis distintos, incluindo os de receptores antigênicos de superfície, permitindo sinalização e ativação celular e de moléculas efetoras solúveis capazes de neutralizar antígenos. São apresentadas na forma de cinco isótipos, dentre eles IgG, IgM, IgA, IgE e IgD. A imunoglobulina A é encontrada em mucosas e tem papel essencial na proteção contra toxinas, vírus e bactérias por meio da neutralização ou inibição da ligação à superfície mucosa. O receptor de IgA é expresso em neutrófilos que podem ser ativados para induzir a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) local (Schroeder et al., 2010). Esse isótipo apresenta duas subclasses: IgA2 predomina em secreções mucosas, como no trato genital, enquanto IgA1, no soro, compondo mais de 90% das IgAs circulantes (Schroeder et al., 2010).

IgM é a primeira linha de defesa humoral e a primeira imunoglobulina expressa por células B. Estão presentes em respostas imunes agudas a antígenos e esse isótipo é mais polirreativo que os demais, por isso, células B que expressam IgM são capazes de responder a uma variedade de imunógenos. Apresentam baixa afinidade, e desempenham papel na imunorregulação. Sua função principal está envolvida na fixação do complemento (Schroeder et al., 2010).

A imunoglobulina G apresenta a maior prevalência das classes de imunoglobulinas plasmáticas, cerca de 10-20%, e pode ser dividida em 4 subclasses seguindo a ordem de domínio: IgG1 (60-70%), IgG2(20-30%), IgG3 (5-8%) e IgG4 (1-4%). IgG1 promove respostas a antígenos proteicos solúveis e proteínas de membrana. Por ser a subclasse mais prevalente, deficiências em seus níveis normalmente resultam em diminuição da IgG total, causando a hipogamaglobulinemia

e, em alguns casos, infecções recorrentes, principalmente se associado a níveis diminuídos de outras subclasses. Já a IgG2 é responsável pela resposta a antígenos polissacarídeos capsulares de bactérias e sua deficiência se associa a maior suscetibilidade a algumas infecções bacterianas. IgG3 é um anticorpo pró-inflamatório envolvido na indução de funções efetoras. Em infecções virais, geralmente há indução de respostas IgG1 e IgG3, sendo a subclasse IgG3 inicial na resposta à infecção. Por fim, em relação à IgG4, alérgenos usualmente são indutores dessa subclasse e podem ser formados por exposição frequente a antígenos não infecciosos. Também se associam na resposta imune a proteínas terapêuticas, como nos fatores VIII e IX da coagulação, anticorpos recombinantes, infecções helmínticas ou por parasitos filariais. (Sigal, 2012; Vidarsson et al., 2014). A meia-vida biológica das subclasses de IgG é de, aproximadamente, 3 semanas para IgG1, IgG2 e IgG4 e de 1 semana para IgG3 (Morell et al., 1970). As subclasses 1 e 3 são essenciais para o estímulo de funções efetoras (Vidarsson et al., 2014), mas como a IgG1 possui uma meia-vida maior ela normalmente é a escolhida em casos terapêuticos que necessitam destas funções (Reichert, 2017). Porém, já foi demonstrado que a meia-vida plasmática da IgG1 terapêutica pode variar de 6 a 32 dias (Carter et al., 2018).

1.6 Receptores de anticorpos

Receptores Fc (fragmento cristalizável) de Imunoglobulinas (FcRs) são receptores de membrana expressos em várias células hematopoiéticas. Cada classe de imunoglobulina expressa um tipo de receptor como: FcR para IgG (FcγRI, FcγRII e FcγRIII), FcεRI para IgE, FcαRI para IgA e FcμR para IgM (Mkaddem et al., 2019), dentre outros. São responsáveis pelas respostas imunes inata e humoral, em que desempenham papéis pró e anti-inflamatórios e imunomodulatórios. A sinalização mediada pelos receptores FcRs requer a presença do Motivo de Ativação do Imunorreceptor Baseado em Tirosina (ITAM), normalmente presente na parte citoplasmática da cauda desses receptores. Essa sinalização induz funções como fagocitose, secreção de citocinas, degranulação, ADCC e produção de superóxido (Mkaddem et al., 2019). Em relação aos FcγR, FcγRIIB é o único receptor inibitório conhecido e exerce sua função por meio do Motivo de Inibição do Imunorreceptor Baseado em Tirosina (ITIM), também presente na parte citoplasmática da cauda do receptor (Nimmerjahn et al., 2008).

1.7 Resposta imune inata induzida pela infecção por SARS-CoV-2

Em respostas imunes inatas contra patógenos, os receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) reconhecem componentes específicos de microrganismos e promovem respostas que eliminam os microrganismos invasores (Brubaker et al., 2015). Esses PRRs correspondem aos receptores de lectina do tipo C ligados à membrana, proteínas citosólicas, como receptores “Toll-like” (TLRs), receptores similares ao domínio de oligomerização de nucleotídeos (NOD), genes indutores de ácido retinóico tipo I (RIG-I) e algumas proteínas não identificadas que medeiam a detecção de componentes microbianos (Brubaker et al., 2015). Os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) induzem células T inflamatórias indiretamente, por meio da indução da produção de citocinas pró-inflamatórias por células imunes inatas, ou diretamente, pela ligação a PRRs em células T (Reynolds et al., 2013).

Com a infecção celular pelo SARS-CoV-2 as células residentes na região de entrada viral promovem uma resposta imune local na tentativa de eliminar o vírus e evitar o acometimento do sistema respiratório inferior (Newton et al., 2016; Schultze et al., 2021). Esta resposta local envolve a participação de células imunes inatas como neutrófilos, macrófagos e células NK (*Natural killer*). Na COVID-19, pela secreção de quimiocinas, como CXCL1, CXCL3, CXCL6, CXCL15, CXCL16, e CXCL17, a imunidade inata promove a migração de neutrófilos e monócitos para a região de entrada viral. Em pacientes graves, os níveis dessas quimiocinas e células inatas geralmente estão elevados nos tecidos acometidos pelo vírus (Chua et al., 2020). Ainda, os neutrófilos parecem exercer a formação de Redes Extracelulares de Neutrófilos (NETs) como uma forma de eliminar o SARS-CoV-2 do organismo (Schulte-Schrepping et al., 2020). Foi detectada a presença de macrófagos nos pulmões de pacientes críticos com COVID-19, favorecendo o desenvolvimento de um ambiente pró-inflamatório, com consequente recrutamento de monócitos e granulócitos (Chua et al., 2020; Liao et al., 2020). Além disso, o maior recrutamento destas células também pode ocasionar neutrofilia e linfocitose, que são atualmente reconhecidos como marcadores de evolução para COVID-19 grave (Mathew et al., 2020; Qin et al., 2020). Ademais, em pacientes graves também foi detectada concentração reduzida de

células NK circulantes, responsáveis pela citotoxicidade mediada pelo sistema imune inato (Zheng et al., 2020).

1.8 Resposta imune celular induzida pela infecção por SARS-CoV-2

A proteção imune celular pode ser gerada pela ação dos linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺. Os linfócitos citotóxicos, ou TCD8⁺, são os responsáveis pela eliminação dos reservatórios virais intracelulares, e os auxiliares, ou TCD4⁺, por diversas funções, que incluem, dentre outras, auxílio aos linfócitos TCD8⁺ citotóxicos e linfócitos B; geração de células de memória, que são importantes caso ocorra um segundo contato com o antígeno (Sahin et al., 2021); e produção direta ou indireta de atividade citotóxica (contra células alvo que expressam MHC de classe II ou pelo IFN- γ , respectivamente) (Sahin et al., 2021).

A geração de linfócitos TCD8⁺, TCD4⁺ e linfócitos B de memória são essenciais para atenuar a gravidade da COVID-19 (Moderbacher et al., 2020), caso ocorra um segundo contato com o vírus, já que responderiam mais rapidamente à infecção secundária. Além disso, limitariam a disseminação da infecção para novos indivíduos. O papel dos linfócitos B de memória reside na produção mais rápida de anticorpos com diversas funções, incluindo a neutralização, situação já observada em outras infecções virais (Purtha et al., 2011; Zhao et al., 2016; Masopust et al., 2019). Em um contato secundário com antígenos do SARS-CoV-2, as células T e B de memória podem levar de três a cinco dias para produzir uma resposta capaz de neutralizar o vírus e diminuir a gravidade da infecção, indicando a importância da memória imunológica para o desenvolvimento de respostas imunes mais rápidas contra o vírus (Dan et al., 2021).

Estudo avaliando a infecção natural por SARS-CoV-2 demonstrou que mesmo na ausência de anticorpos neutralizantes, a imunidade celular foi capaz de mediar proteção em infecções por COVID-19 graves ou prolongadas (Le Bert et al., 2020; Garcia-Beltran et al., 2021). Foram observadas respostas de células TCD4⁺, que consistiram predominantemente em células Th1 secretoras de IFN- γ e reativas contra as proteínas estruturais S, M e N, em estudo conduzido por Grifoni et al., 2020. Os linfócitos TCD8⁺ foram caracterizados pela produção de IFN- γ e TNF- α , com respostas TC1 semelhantes às células TCD4⁺ (Grifoni et al., 2020).

1.9 Resposta imune humoral induzida pela infecção por SARS-CoV-2

Geralmente, na infecção precoce por SARS-CoV-2, a IgM é o principal anticorpo a ser produzido, sendo a primeira imunoglobulina expressa por células B. Sua função principal está envolvida na fixação do complemento (Schroeder et al., 2010). A proteção mediada por IgA impede que os patógenos se liguem e invadam as células hospedeiras e a IgG tem uma duração mais longa (Long et al., 2020; Ma et al., 2020; Zhao et al., 2020). Sugeriu-se que níveis elevados de anticorpos IgG e IgM contra a proteína S1, e especialmente contra a N, nos primeiros 15 dias após o início dos sintomas, poderiam ser considerados fatores de risco para uma doença mais grave, pois foram detectados em níveis mais altos em pacientes com COVID-19 na unidade de terapia intensiva (UTI) e naqueles que morreram (Hashem et al., 2020).

O desenvolvimento da imunidade pela infecção natural do SARS-CoV-2 é caracterizado pela soroconversão de IgM para IgG em cerca de sete a quatorze dias a partir do início dos sintomas, com persistência por semanas ou meses (Lou et al., 2020). A avaliação da produção de anticorpos anti-spike mostrou indução de IgA na primeira semana de infecção, com pico em torno de 20 a 22 dias. Já a IgM apresentou títulos elevados em torno de 10 a 12 dias após o início dos sintomas, com redução significativa após o 18º dia (Padoan et al., 2020). Na resposta imune neutralizante inicial ao SARS-CoV-2, foi proposto que a IgA é dominante e que seus níveis séricos são sete vezes mais eficazes na neutralização do que a IgG (Sterlin et al., 2021). A IgM também é considerada importante na neutralização da infecção na fase aguda, enquanto a IgG participa principalmente na fase posterior da neutralização. Uma maior neutralização viral foi observada quando IgM, IgG e IgA foram detectados simultaneamente, indicando um possível sinergismo entre esses isótopos (Mazzini et al., 2021). Adeniji et al., 2021, estudaram o papel da IgG anti-RBD e anti-Spike nessas respostas e os resultados demonstraram uma maior participação de anticorpos na deposição de complemento, mas uma menor capacidade de fagocitose em pacientes hospitalizados com COVID-19 em comparação com os não hospitalizados (Adeniji et al., 2021).

Em infecção natural por SARS-CoV-2, foi constatado que IgG1 e IgG3 foram as subclasses com maior atividade estando envolvidas na neutralização, opsonização, fixação de complemento e ADCC (Amanat et al., 2020; Mazzini et al., 2021). A detecção de subclasses de IgG é essencial para a compreensão da imunidade protetora

na COVID-19 contra reinfecções (Goh et al., 2021), podendo apresentar semelhante importância na resposta imune induzida pelas vacinas.

1.10 Tipos de vacinas anti-SARS-CoV-2

Diversas medidas preventivas foram e continuam sendo produzidas para o controle da transmissão viral, sendo o desenvolvimento de vacinas o mais importante (Angeli et al., 2021). Diferentes vacinas foram validadas quanto à eficácia e aplicadas na população. Atualmente, o número de pessoas totalmente vacinadas (regime primário mais a dose de reforço) é de 5.105.305.183, em relação a população mundial (WHO, 2023 a). 5.547.104.526 de pessoas foram vacinadas com pelo menos uma dose das vacinas anti-SARS-CoV-2 (WHO, 2023 a).

No Brasil, a administração de vacinas anti-SARS-CoV-2 teve início no começo de 2021 e priorizou profissionais da área da saúde e idosos, que foram imunizados pela CoronaVac (vírus inativado). Gradativamente as vacinas foram aplicadas ao restante da população, em ordem decrescente de idade, já com outras plataformas disponíveis, como a de adenovírus não replicante (ChAdOx1 nCoV-19 e Ad26.COV2.S - Johnson & Johnson) e mRNA (BNT162b2). Com o avanço de estudos analisando a cinética dos anticorpos neutralizantes e a resposta imune de memória, foi evidenciado que a aplicação de duas doses da mesma vacina induzia resposta imune humoral mais robusta, portanto, esse regime de duas doses foi adotado (Demonbreun et al., 2021). Posteriormente, foi atribuído um novo regime de imunização consistindo em aplicação da dose de reforço, empregando preferencialmente a vacinação heteróloga. Dados apresentados pelo Centro de Ciência e Engenharia de Sistemas da Universidade Johns Hopkins (<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>) apontam o mês de abril de 2021 como o período com maior número de mortes por COVID-19 no Brasil (superior a quatro mil mortes por dia) (CSSE, 2023). No Brasil, 109.913.632 pessoas receberam a primeira dose de reforço, o que corresponde a 51,71% de brasileiros vacinados por três doses das vacinas anti-SARS-CoV-2 (WHO, 2023 b).

Inicialmente, a plataforma vacinal empregada foi a de vírus inativado, baseada no cultivo viral e posterior inativação (Krammer, 2020). Alguns métodos de inativação são pelo formaldeído, glutaraldeído, raios ultravioleta e gama (Delrue et al., 2012). Essas vacinas geralmente precisam de adjuvantes para melhorar sua imunogenicidade, ou então, de grandes quantidades de partículas virais contagiosas, já que o processo de

inativação pode destruir epítomos e antígenos virais (Delrue et al., 2012; Awadasseid et al., 2021). A vacina desenvolvida pela Sinovac, conhecida por CoronaVac, é uma vacina de SARS-CoV-2 inativado e utiliza o hidróxido de alumínio como adjuvante (Frenck et al., 2021; Kurup et al., 2021). Um estudo realizado por Binay et al., 2021, demonstrou persistência de anticorpos IgG anti-spike até sete meses após a segunda dose dessa vacina (Binay et al., 2021). Outro estudo demonstrou resposta de células B após 14 dias da primeira dose da CoronaVac, e de linfócitos T, apenas após a segunda dose (Borgonovo et al., 2021; Zhang et al., 2021).

Outra plataforma vacinal empregada no Brasil foi a de adenovírus (Ad) não replicante, como a vacina ChAdOx1 nCoV-19. Essa plataforma se baseia na infectividade inerente dos adenovírus (Crystal, 2014). A retirada de genes importantes para sua replicação, E1 e E3, e a inserção de sequência codificante de um antígeno vacinal impede a replicação dos adenovírus e ao mesmo tempo promove expressão desse antígeno vacinal (Crystal, 2014; Mendonça et al., 2021). Os adenovírus possuem tropismo por vários tecidos corporais e induzem alta expressão do antígeno vacinal, o que os classifica como um dos vetores virais mais imunogênicos (Lasaro et al., 2009; Barry, 2018), e, portanto, fortes candidatos na fabricação de vacinas. A presença de anticorpos anti-adenovírus é uma desvantagem que envolve essa plataforma viral. Anticorpos direcionados ao Ad5 são prevalentes na população, já que a maioria foi exposta a esse vírus por infecção natural (Mendonça et al., 2021), portanto esse tipo de Ad não é indicado para a fabricação de vacinas. A existência prévia de anticorpos pode reduzir a infectividade do vetor, dessa forma, impedindo a expressão do antígeno vacinal e o desenvolvimento de resposta imune (Pichla-Gollon et al., 2009). Os Ads de escolha devem ser aqueles de baixa prevalência na população, de preferência os de animais, como os primatas, com pouca ou nenhuma exposição à população humana (Abbink et al., 2007). Vacinas de adenovírus induzem tanto resposta inata, quanto adaptativa contra ambos o antígeno vacinal e o adenovírus em questão (Jacob-dolan et al., 2022).

A vacina de Ad administrada no Brasil foi a AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19), desenvolvida pela Oxford-AstraZeneca. É uma vacina monovalente composta por um adenovírus de chimpanzé DNA codificante da glicoproteína S. A proteção conferida pela vacina se inicia após 3 semanas da primeira dose, aproximadamente, com melhora da resposta após 15 dias da segunda dose, de acordo com a EMA (European Medicines Agency) (Angeli et al., 2021).

As vacinas de mRNA, desenvolvidas inicialmente nos anos 90, também foram administradas na população (BNT162b2) (Martinon et al., 1993). Essa plataforma se baseia na entrega de um mRNA codificante de um antígeno alvo na célula hospedeira (Mendonça et al., 2021). Esse mRNA normalmente está envolto por uma nanopartícula lipídica, que aumenta sua estabilidade e garante sua entrada no citoplasma da célula hospedeira (Mendonça et al., 2021). Vacinas desenvolvidas pela Pfizer (BNT162b2) e Moderna (mRNA-1273) utilizam essa plataforma de entrega lipídica e mRNA codificante da proteína spike, como antígeno. Estudo realizado com as vacinas de mRNA, BNT162b2 e mRNA-1273, demonstrou 95% de proteção contra a forma sintomática de COVID-19 e 100% contra a forma grave da doença (Kurup et al., 2021).

Ambas as vacinas CoronaVac e ChAdOx1 nCoV-19 podem ser conservadas na temperatura de 2 a 8 °C, o que facilita o seu armazenamento (Holm et al., 2021). Já as vacinas de mRNA, a longo tempo, devem ser armazenadas em temperaturas inferiores a 0°C (BNT162b2 preferencialmente a -70°C, porém, temperaturas entre -25 a -15°C são aceitáveis (Pfizer, 2021); mRNA1273, a -20°C) (Holm et al., 2021). Caso as vacinas de mRNA precisem ser armazenadas em 2-8°C, a validade da BNT162b2 é de 5 dias, e da mRNA1273, 30 dias (Holm et al., 2021). A tabela 1 descreve algumas características das principais vacinas empregadas atualmente.

1.11 Resposta imune celular às vacinas anti-SARS-CoV-2

Tanto a infecção, quanto a vacina podem induzir respostas imunes protetoras contra a COVID-19 (Chodick et al., 2021; Wang et al., 2021), pelo desenvolvimento de respostas humoral (anticorpos) e celular direcionadas às proteínas estruturais do vírus (de acordo com cada plataforma vacinal) e, no caso da infecção e vacina de vírus inativado, às proteínas não estruturais também. Porém a resposta vacinal em alguns estudos demonstrou ser mais robusta que a direcionada à infecção por SARS-CoV-2 (Jalkanen et al., 2021). A efetividade das vacinas pode ser comprovada pela sua habilidade em induzir respostas imunes humoral e celular adequadas e duradouras (van Doremalen et al., 2020; Sahin et al., 2021; Sette et al., 2021).

Tabela 1: Plataformas e candidatas a vacinas usadas para COVID-19, com informações sobre suas doses, velocidade, resposta imune, vantagens e desvantagens. Adaptado de: Universidade da Califórnia São Francisco, Departamento de Medicina, divisão de HIV, doenças infecciosas e medicina global (Disponível em: <https://hividgm.ucsf.edu/covid-19-vaccines> (UCSF, 2023)).

Companhia	Plataforma	Doses	Resultados não-clínicos	Proteção contra hospitalização por COVID-19	Proteção contra COVID-19 grave	Eficácia contra COVID-19 leve	Referência
MODERNA	mRNA-1273 mRNA em nanopartícula lipídica	2	Anticorpos Neutralizantes; Forte Th1 CD4+, CD8+	97%	97% (30 casos em indivíduos com placebo; 0 em vacina, mas 1 grave)	94,1%	(Baden et al., 2021)
PFIZER	BNT162b2 mRNA em nanopartícula lipídica	2	Anticorpos Neutralizantes; Forte Th1 CD4+, CD8+	100%	100% (9 casos em indivíduos com placebo; 0 em vacina- 1 inicialmente grave)	95%	(Polack et al., 2020)
JOHNSON & JOHNSON	JNJ-78436725 Adenovírus humano não-replicante/DNA	1	Anticorpos Neutralizantes; Forte Th1 CD4+ > Th2; CD8+	100%	85,4% em 3 localidades (7 mortes, 16 internações, todas em indivíduos com placebo)	72% EUA; 61% América Latina; 64% África do Sul (96% B1.351)	(Biotech, 2021)
AstraZeneca	AZD1222 Adenovírus de chimpanzé não-replicante-DNA	2	Anticorpos Neutralizantes; Forte Th1 CD4+ > Th2; CD8+	100%	100% (15 indivíduos com placebo – todos hospitalizados; 0 em vacina)	70% geral; 76% 1 dose	(Voysey et al., 2021)
NOVAVAX	NVX-CoV2373 Spike/RBD + Adjuvante Matrix M	2	Anticorpos Neutralizantes; Forte Th1 CD4+ > Th2	100%	100% (10 indivíduos com placebo graves no Reino Unido/África do Sul; 0 em vacina)	96.4% Reino Unido; 89% B117 Reino Unido; 55% África do Sul (94% B1351)	(Novavax, 2021)
SPUTNIK V	Ad26 e Ad5 Adenovírus/DNA	2	Anticorpos neutralizantes; PBMCs secretores de IFN- γ ; resposta celular	100%	100% (20 indivíduos com placebo; 0 vacina)	91,6%	(Logunov et al., 2021)
Sinovac	Vírus inativado	2	Anticorpos (células T)	100%	83%	50,7% geral	(Yang et al., 2021)

Estudo realizado com as vacinas de mRNA, Pfizer e Moderna, demonstrou respostas celulares do tipo Th1, sugerindo a existência de fenótipo de memória antiviral para a vacina BNT162b2, o que também pôde ser observado na resposta à infecção natural (Kurup et al., 2021). Ainda, apresentou resposta celular com ampla expressão de IFN- γ e IL-2, com indução de TCD4+ e TCD8+ específicos para a proteína S (Sahin et al., 2021).

1.12 Resposta imune humoral às vacinas anti-SARS-CoV-2

A vacina ideal é capaz de induzir resposta imune celular e humoral, com a produção de anticorpos neutralizantes proporcionando a imunidade esterilizante e evitando a transmissão viral. Caso a vacina não seja capaz de fornecer essa imunidade, ela pode, ao menos, diminuir a replicação do vírus, evitando óbitos e a doença grave (Sette et al., 2021). Além da neutralização, a resposta imune humoral também é composta por anticorpos que possuem outras funções relacionadas à porção Fc das imunoglobulinas, como opsonização, fixação do sistema complemento e participação na ADCC.

Resultados de um ensaio realizado com 110 indivíduos que receberam vacinas da Pfizer (mRNA BNT162b2) e da Moderna (mRNA-1273) indicam a produção de IgG anti-spike entre 9 a 12 dias após a primeira dose (Krammer et al., 2021). Estudo também dirigido às vacinas Pfizer e Moderna, demonstrou produção de anticorpos IgM, IgG e IgA, com maior significância de IgG, contra as proteínas S e RBD em cerca de dois meses após a segunda dose. Além disso, revelou que a resposta de IgM a RBD e S após vacinação foi 18 a 20 vezes menor quando comparada à de IgG às mesmas proteínas (Wang et al., 2021). Já em um estudo em série de três casos, foi revelado que a resposta de IgM após aplicação das vacinas de mRNA BNT162b2 e mRNA-1273 apresentou os menores níveis séricos quando comparada às demais classes de anticorpos (Danese et al., 2021).

As vacinas de vírus inativados não possuem mecanismo de indução de produção de proteínas, normalmente apresentado por outros tipos vacinais, por isso, baixos níveis de antígenos são apresentados para o sistema imune (Chua et al., 2022 a). Essa é a maior diferença observada entre as vacinas de vírus inativados (CoronaVac) e aquelas de mRNA (Pfizer e Moderna) e adenovírus (AstraZeneca e

Johnson & Johnson). Em contrapartida, as outras plataformas promovem a produção em larga escala da proteína viral, além da síntese de interferons do tipo I e citocinas pró-inflamatórias (Pardi et al., 2018; Sayedahmed et al., 2020).

A avaliação da resposta imune induzida pelas vacinas permite fazer uma análise da manutenção dos títulos de anticorpos e a partir de qual período estes começam a diminuir. Estudos realizados com a CoronaVac e BNT162b2 demonstram redução da eficácia vacinal após seis meses da administração da segunda dose (Chemaitelly et al., 2021; Tartof et al., 2021). Essa redução ocorre principalmente em idosos (≥ 60 anos) (Suah et al., 2022). Outro estudo, conduzido por Suah et al., 2022, demonstrou diminuição da eficácia vacinal contra admissão nas UTIs em três a cinco meses após duas doses da CoronaVac (Suah et al., 2022).

Em relação a aplicação da terceira dose, estudo realizado por Mojadadi et al., 2023, mostrou maior indução de anticorpos em regime vacinal homólogo composto por três doses da vacina mRNA1273 (Moderna). O regime heterólogo de duas doses de BNT162b2 e terceira dose pela mRNA1273 foi o segundo a induzir maiores quantidades de anticorpos (Mojadadi et al., 2023). Quando analisada a produção de anticorpos por vacinas de vetores virais ou inativadas foi identificada melhor indução de anticorpos em regime heterólogo composto por duas doses dessas vacinas e a terceira por vacinas de mRNA (Mojadadi et al., 2023).

1.13 Variantes do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2, dentre outras características, por ser um vírus de RNA, possui altas taxas de mutação (Harvey et al., 2021; Tao et al., 2021). Essas mutações deram origem a diversas novas variantes, conhecidas como VOC (Variantes de Preocupação) e VOI (Variantes de Interesse). As VOIs podem ser definidas como variantes que desenvolveram mutações genéticas capazes de afetar a indução de respostas imunes e, com isso, podem provocar o aumento da transmissão e número de infecções por SARS-CoV-2. Porém, possuem a característica de promoverem surtos limitados a uma região. Já as VOCs podem ser definidas como variantes que possuem mutações capazes de aumentar a transmissão, a gravidade da doença e o número de hospitalizações e óbitos, além de serem capazes de uma maior evasão da resposta imune do hospedeiro. Diferentemente das variantes de interesse, as VOCs têm a capacidade ilimitada de provocar surtos, ou seja, podem afetar vários países ao mesmo tempo (CDC, 2022).

As VOCs que obtiveram maior destaque foram a Alpha (B.1.1.7), descoberta inicialmente no Reino Unido; Beta (B.1.351), na África do Sul; Gamma (P.1), evidenciada no Brasil; Delta (B.1.617.2), descoberta na Índia (Han et al., 2022); e a Ômicron (B.1.1.529), também evidenciada na África do Sul (Mistry et al., 2022).

O surgimento de variantes ameaça novos surtos de COVID-19, já que as vacinas aplicadas atualmente induzem resposta imune contra a spike da cepa ancestral (Dai et al., 2021) e devido a produção de anticorpos neutralizantes e resposta celular direcionados às regiões da spike ou da RBD, também da cepa de Wuhan (Liu et al., 2020 b; Piccoli et al., 2020). Isso pode levar ao escape viral, um mecanismo de resistência do vírus à defesa imune do hospedeiro, pois o sistema imune pode não reconhecer essas novas mutações na proteína spike das variantes. Entretanto, ensaios realizados com as vacinas BNT162b2 e ChAdOx1 nCoV-19 indicam proteção cruzada contra as variantes Alpha, Beta, Epsilon, Gamma e Delta, com mínima perda da reatividade do sistema imune (Chua et al., 2022 a). A CoronaVac, ao ser comparada com a BNT162b2 e ChAdOx1 nCoV-19, demonstrou induzir proteção reduzida contra essas variantes. Em relação à variante Ômicron, alguns trabalhos, como o de Hoffmann et al., 2022, indicam títulos baixos de anticorpos neutralizantes induzidos por duas doses de BNT162b2 contra esta variante, porém demonstram títulos satisfatórios quando a imunização é realizada por uma dose de ChAdOx1 nCoV-19 e outra de BNT162b2, ou seja, quando é aplicado o regime da vacinação heteróloga (Hoffmann et al., 2022). Apesar de apresentar diminuição nos títulos de anticorpos neutralizantes, a resposta geral do sistema imune às variantes foi satisfatória e suficiente para prevenir óbitos e formas mais graves da doença (Han et al., 2022; Mistry et al., 2022).

A resposta celular, no entanto, principalmente de células TCD4+, por ser policlonal, ou seja, por reconhecer vários epítomos ao longo da proteína spike (Mateus et al., 2020), permite menor evasão viral (Williams et al., 2021). Em função disso, a resposta celular direcionada às variantes do SARS-CoV-2, como B.1.1.7 e B.1.351, parece não ser muito prejudicada devido à reação cruzada proporcionada pelo TCD4+ (Mateus et al., 2020). Entretanto, isso se difere do observado em anticorpos neutralizantes, (Geers et al., 2021) já que apresentam declínio da neutralização de variantes por não possuírem essa ampla variedade de epítomos. Tarke et al., 2021, avaliou a resposta de células TCD4+ e TCD8+ de indivíduos imunizados por vacinas de mRNA ou de indivíduos com COVID-19, contra variantes do SARS-CoV-2 (B.1.1.7, B.1.351, P.1), e demonstrou que os epítomos de células T não foram

drasticamente comprometidos pelas mutações, o que proporcionou o desenvolvimento de uma resposta imune protetora, apesar da reatividade celular ter sofrido diminuição (Tarke et al., 2021).

Atualmente, as variantes da Ômicron são as principais cepas circulantes (GISAID, 2023). Descoberta inicialmente em novembro de 2021, possuía dois subtipos principais, BA.1 e BA.2 (Majumdar et al., 2022), com mais de 60 mutações distribuídas por suas proteínas (Hodcroft et al., 2023). Apresenta infectividade superior a Delta (Chen et al., 2022 a), o que pode ser explicado pela maior taxa de replicação viral nas células epiteliais nasais, e consequentemente, maior carga viral nessa região. Pelo fato de se replicar em uma menor taxa nos alvéolos, em relação a Delta (Lamers et al., 2022), provoca sintomatologia mais leve, compatíveis com infecção do trato respiratório superior, apenas, e raramente cursam com pneumonia (Kim et al., 2022; Wolter et al., 2022). Atualmente, existem várias subvariantes conhecidas como Ômicron como B.1.1.529, BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5, BF.7, BQ.1 e XBB. B.1.1.529 compreende as variantes BA.1 e BA.3, enquanto as variantes BA.1.1 e BA.2 são classificadas separadamente. A variante BQ.1 é uma subvariante da BA.5 e a XBB é uma variante recombinante da BA.2.10.1 e BA.2.75 (CDC et al., 2023). Com o desenvolvimento e aparecimento de diversas subvariantes, a preocupação acerca da proteção fornecida pelas vacinas e regimes empregados aumenta. Recentemente, uma nova subvariante da Ômicron conhecida como EG.5 ou Eris foi detectada em indivíduos com COVID-19 (<https://www.yalemedicine.org/news/covid-eg5-eris-latest-coronavirus-strain>). Como sua descoberta ainda é recente, estudos avaliando sua transmissibilidade e patogenicidade são escassos.

1.14 Esquemas de doses e reforço das vacinas anti-SARS-CoV-2

Diante da redução da eficácia vacinal após alguns meses da imunização e pelo surgimento de variantes, foi adotada a aplicação de uma dose de reforço (terceira dose) na tentativa de evitar novas ondas de infecção pelo SARS-CoV-2. As doses de reforço foram aplicadas após a primeira série vacinal, em torno de quatro a seis meses após a segunda dose, dependendo da vacina que foi administrada e do regime de cada país (WHO, 2021).

Indivíduos imunocomprometidos e idosos por apresentarem menor resposta vacinal tiveram preferência na imunização pela dose de reforço (CDC, 2021). Hoffman et al., 2022, demonstraram em seu estudo que, a aplicação de duas doses da BNT162b2, e posteriormente, uma terceira dose, também da Pfizer, induziu resposta imune protetora contra Ômicron, o que não foi obtido somente com a vacinação primária (Hoffmann et al., 2022).

Essa dose de reforço foi aplicada por meio da vacinação homóloga ou heteróloga. A vacinação heteróloga compreende um esquema vacinal que abrange duas doses da mesma vacina e o reforço composto por outra plataforma de entrega. Estudos realizados por Schmidt et al., (Schmidt et al., 2021) e Barros-Martins et al., (Barros-Martins et al., 2021) demonstraram um aumento dos níveis de anticorpos neutralizantes, IgG e IgA, e da resposta celular após estímulo inicial com ChAdOx1 nCoV-19 e aplicação da dose de reforço pela BNT162b2 ou mRNA-1273, quando comparadas à vacinação somente pela ChAdOx1 nCoV-19. Já na vacinação homóloga, aqueles que receberam as duas doses iniciais da BNT162b2, também receberam a mesma vacina (BNT162b2) como dose de reforço. Estudo realizado por Atmar et al., 2022, avaliando doses de reforço pela mRNA-1273, Ad26.COV2.S (Johnson & Johnson) e BNT162b2 apresentou resultados similares ou superiores de reforço usando vacinação heteróloga em comparação à homóloga, porém com resultados satisfatórios em qualquer um dos regimes empregados (Atmar et al., 2022). Isso exprime a relevância e um possível benefício da aplicação de regimes de vacinação heterólogos em relação aos homólogos e a importância da dose de reforço, principalmente para os indivíduos imunizados inicialmente pela CoronaVac (Jara et al., 2022). Existem evidências de que as vacinas baseadas em proteínas induzem maior resposta humoral, enquanto aquelas de vetores virais, mais resposta celular (Deming et al., 2021). Com isso, a combinação de ambas pode favorecer o desenvolvimento de uma resposta imune mais satisfatória, capaz de fornecer melhor proteção.

Estudo conduzido no Brasil (Hayashi et al., 2022) detectou diminuição da imunidade após 75 dias da administração da segunda dose de CoronaVac ou de ChAdOx1 nCoV-19. Porém, a aplicação da BNT162b2 como dose de reforço, induziu aumento das respostas humoral e celular, indicando a importância desse reforço para estímulo do sistema imunológico.

Após o surgimento de novas variantes de preocupação, principalmente a Ômicron, no Brasil começou a ser aplicada a quarta dose de reforço. A plataforma

vacinal empregada na imunização contou com a disponibilidade das vacinas no país, variando entre as quatro formulações já aplicadas na população: ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2, Janssen ou CoronaVac. Bar-On et al., 2022, comprovaram uma maior eficácia contra a infecção por SARS-CoV-2 e na prevenção da forma grave da COVID-19 em um regime de quatro doses de BNT162b2 quando comparado ao regime de apenas três doses da vacina (Bar-On et al., 2022). Reafirmando os resultados encontrados por Bar-On et al., 2022, Magen et al., 2022, também observaram maior proteção contra a infecção por SARS-CoV-2, forma sintomática da doença, hospitalização, forma grave da COVID-19 e óbito entre pessoas com 60 anos ou mais que receberam a quarta dose da BNT162b2 em relação aos indivíduos que receberam apenas três doses (Magen et al., 2022).

Devido ao aparecimento de variantes e sublinhagens da cepa Ômicron (BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5), atualmente, no Brasil, está sendo aplicada como dose de reforço, a vacina bivalente fabricada pela Pfizer-BioNTech. Essa vacina é composta por mRNA codificante da spike do SARS-CoV-2 de Wuhan e mRNA codificante da spike das variantes Ômicron, BA.4 e BA.5, em uma proporção de 1:1 (Gupta et al., 2023). Estudo conduzido por Zou et al., 2022, observou maior neutralização das sublinhagens da variante Ômicron em indivíduos vacinados pela bivalente em relação aos indivíduos vacinados pela BNT162b2 monovalente, indicando maior imunogenicidade induzida pela dose bivalente (Zou et al., 2022). Além da vacina bivalente disponibilizada pela Pfizer-BioNTech, também está sendo aplicada uma dose bivalente produzida pela Moderna, a mRNA-1273.214, que combina mRNA codificante da spike do SARS-CoV-2 de Wuhan e um codificante da spike da variante BA.1 (Gupta et al., 2023; Wagenhäuser et al., 2023), também na proporção 1:1, porém esta vacina não está sendo aplicada no Brasil.

2. JUSTIFICATIVA

A imunização global por vacinas anti-SARS-CoV-2 de distintas plataformas é uma forma eficaz de minimizar a transmissão viral e reduzir o surgimento de variantes. Os esquemas vacinais se diferem entre países e entre as diferentes idades e comorbidades, podendo fornecer, dessa forma, diferentes níveis de proteção. Estudos mostram mais de 90% de proteção ou eficácia fornecida pela BNT162b2 (Alhandod et al., 2023), mais de 70% de eficácia na prevenção da infecção por SARS-CoV-2 para ChAdOx1 nCoV-19 (Alhandod et al., 2023) e 74% de eficácia contra a forma grave da doença e óbito, para CoronaVac (Wei et al., 2023).

A avaliação da produção de anticorpos induzidos pela vacina é uma das maneiras de determinar a extensão da resposta imune do hospedeiro direcionada ao SARS-CoV-2. Como as vacinas são desenvolvidas para produzir resposta imune contra a proteína spike, principalmente, já que é a proteína que permite adesão do vírus à célula do hospedeiro, esse estudo visa avaliar a produção de anticorpos contra esta proteína e porção RBD.

O desenvolvimento de pesquisas para avaliação da resposta imune e eficácia das vacinas em diferentes países e regiões, principalmente naquelas com alta diversidade de variantes, deve ser realizado. Pela escassez de estudos comparativos das respostas imunes humorais induzidas pela ChAdOx1 nCoV-19, CoronaVac e BNT162b2, este estudo possui a finalidade de comparar as respostas imunes humorais induzidas por essas vacinas. Para isso, a proposta é a comparação dos níveis de anticorpos séricos induzidos pelos três grupos vacinais e avaliação longitudinal da produção de IgG e IgA anti-RBD e IgG anti-spike. Também, a observação de possível alteração nos níveis de anticorpos induzida pela aplicação da dose de reforço com BNT162b2. Este estudo nos permitirá avaliar variações na cinética de produção destas imunoglobulinas induzidas pelas diferentes vacinas e esquemas de vacinação e a manutenção dos níveis desses anticorpos.

3. OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1 Objetivo geral

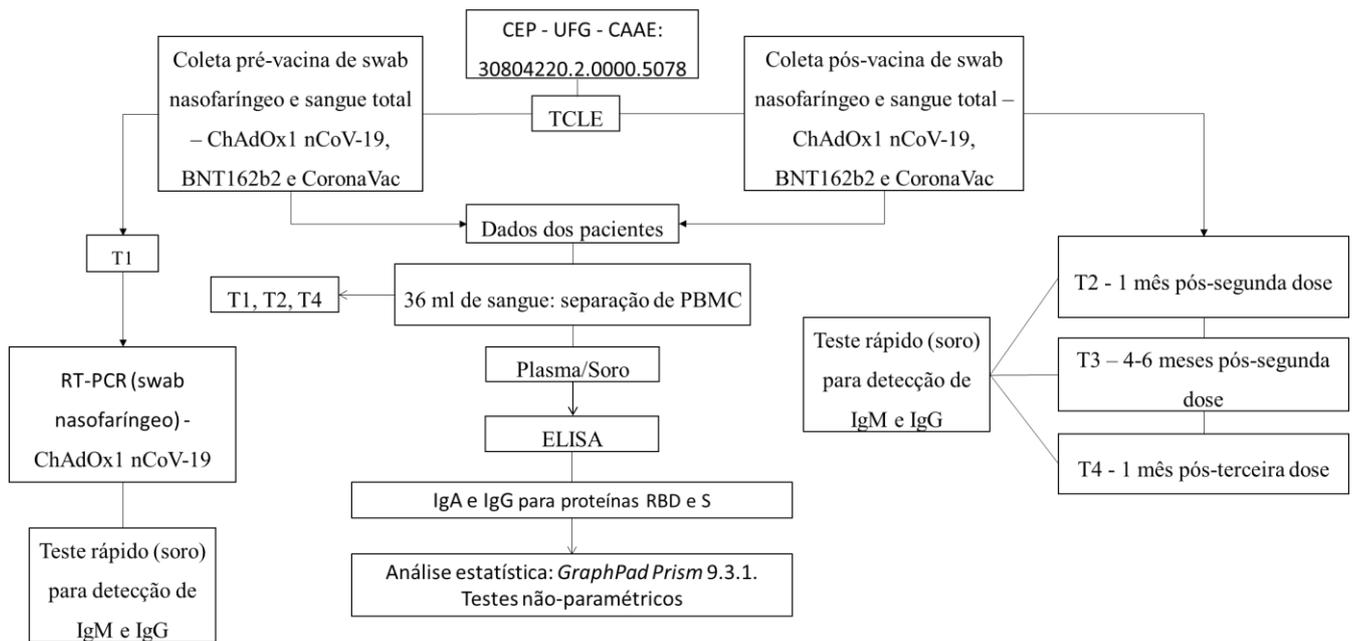
Investigar e comparar a resposta imune humoral induzida pelas vacinas anti-SARS-CoV-2, ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac em indivíduos vacinados.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar e comparar a resposta imune humoral, com dosagem total de IgG anti-RBD e anti-spike e IgA anti-RBD em soros, pré e após regime de imunização primária em comparação aos níveis pré-vacina;
2. Avaliar e comparar o efeito da terceira dose na indução dos anticorpos IgG anti-RBD e anti-spike e IgA anti-RBD entre as três vacinas;
3. Investigar se há variações nos níveis séricos de anticorpos na avaliação longitudinal após vacinação;
4. Investigar se há associações dos índices de anticorpos séricos produzidos em relação ao sexo, idade e presença de comorbidades;
5. Avaliar se a infecção por SARS-COV-2 influencia na produção dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 após vacinação;
6. Comparar a produção dos anticorpos séricos IgG anti-RBD e anti-spike após a vacinação.

4. METODOLOGIA DETALHADA

4.1 Delineamento do estudo



Fluxograma das etapas de realização do trabalho.

Este é um estudo longitudinal destinado a avaliar a resposta imune humoral induzida pelas vacinas ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac, em determinados intervalos de tempo, após duas e três doses.

4.2 Aspectos éticos

O presente estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital das Clínicas sob o número CAAE: 30804220.2.0000.5078 (Anexo 1) e está de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde que regulamenta pesquisas envolvendo seres humanos. A coleta dos dados e das amostras de sangue foram realizadas após a concordância dos indivíduos e mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) pelos indivíduos selecionados para compor a amostra.

4.3 Critérios de Inclusão

Indivíduos maiores de 18 anos, vacinados com duas doses de CoronaVac, ChAdOx1 nCoV-19 ou BNT162b2 e aqueles que receberam, ou não, a terceira dose.

4.4 Critérios de exclusão

Indivíduos não vacinados para COVID-19.

4.5 Indivíduos e períodos de coleta

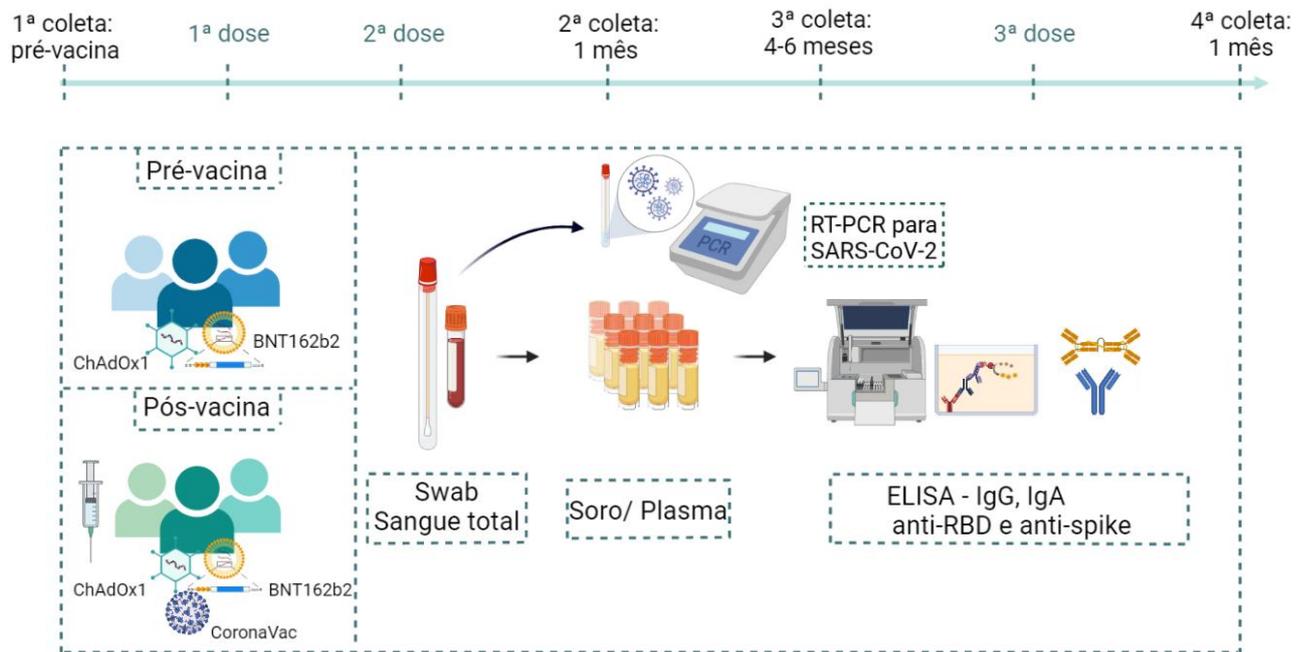


Figura 2: Esquema do estudo e períodos de coleta dos participantes dos grupos da BNT162b2, ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac.

Foram realizadas coletas em 78 voluntários nos momentos pré-imunização (ChAdOx1 nCoV-19 e BNT162b2) e após aplicação da segunda e terceira doses das vacinas ChAdOx1 nCoV-19, CoronaVac e BNT162b2. Previamente a aplicação da vacina, os indivíduos foram convidados a participar do estudo. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi aplicado para os indivíduos que consentiram em participar da pesquisa e após assinatura, foram realizadas as coletas de sangue e swab nasofaríngeo. Os participantes foram recrutados mediante contato por telefone ou pessoalmente, na fila de vacinação, durante a vacinação de profissionais de saúde no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO.

As coletas de sangue pré-vacina foram efetuadas nas filas de recebimento das vacinas, em uma estrutura montada adjacente à fila. O volume de sangue coletado compreendeu 36 mL para cada participante. A coleta pós-vacinação ocorreu em três períodos distintos: um mês e quatro meses após a segunda dose, e um mês após a terceira para indivíduos imunizados pela ChAdOx1 nCoV-19 e BNT162b2. Em indivíduos imunizados pela CoronaVac as coletas foram realizadas após seis meses da segunda dose e um mês após a terceira dose. Os indivíduos foram contatados e convidados a participarem do estudo e receberam uma explicação acerca da pesquisa. Aqueles interessados em realizar as coletas pós-vacina foram convidados a se dirigirem ao Laboratório Margarida Dobler Komma, localizado no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG (IPTSP/UFG) para assinatura do TCLE e realização das coletas secundárias, que também compreenderam coleta de sangue de 36 mL nos períodos já especificados. A Figura 2 mostra o esquema compreendendo os períodos de coleta e os ensaios realizados.

Em todos os grupos houve desistências na participação do estudo, por isso, a quantidade de amostras em cada período de coleta sofreu variações no decorrer da pesquisa.

4.6 Extração de RNA do SARS-CoV-2 e RT-qPCR

Para a extração do ácido ribonucleico (RNA), foi utilizado o kit comercial QIAamp® Viral RNA Mini (Qiagen, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase em tempo real pós-transcrição reversa (RT-qPCR) após a extração do RNA, usando o Promega GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System, de acordo com o protocolo do fabricante (Anjos et al., 2022). Os primers e sondas tiveram como alvo duas regiões do gene N do SARS-CoV-2 (N1 e N2), o gene humano RNase P (RP) e IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA). Todas as amostras que apresentaram um limiar de ciclo (Ct) inferior a 40 (para alvos N1, N2 e RP) foram consideradas positivas para RNA de SARS-CoV-2. Uma curva padrão de diluições seriadas (10⁶ a 10⁰ GC/μL) do controle positivo sintético nCoVPC (isolado de coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave Wuhan-Hu-1, genoma completo, GenBank: 189 NC_045512.2) da Integrated DNA Technologies (IDT, n.d.) foi usado para estimar as cargas virais em cópias genômicas (GCs) por mL/g de amostras clínicas.

4.7 Obtenção e armazenamento de plasma e soro

Após as coletas de sangue dos indivíduos vacinados, foi realizada a centrifugação do sangue total a 1.800 rpm por dez minutos. O soro foi separado e armazenado para subsequente realização dos ELISAs. Primeiramente em freezer -20°C e, posteriormente, em freezer -80°C.

4.8 ELISA para IgG e IgA anti-RBD e IgG anti-spike

Para avaliação da resposta humoral induzida pelas vacinas anti-SARS-CoV-2, foram realizados Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) *in house*, a partir do soro obtido mediante centrifugação do sangue total. Para realização dos ELISAs, placas de meia área de poliestireno de alta ligação de 96 poços (Corning, NY, EUA) foram revestidas com 50 µL por poço com a proteína RBD, expressa de acordo com Amanat et al., 2020 (Amanat et al., 2020), na concentração de 1,5 µg/mL. Ou com 50 µL por poço com a proteína spike (gentilmente cedida pela Dra. Leda Castilho)(Cunha et al., 2021), já utilizada em ELISA conduzido por outros (Cunha et al., 2021; Andreatta-Santos et al., 2022), na concentração de 1,0 µg/mL em tampão carbonato de sódio-bicarbonato de sódio e incubados durante a noite a 4 °C. O *coating* foi removido e a ligação não específica dos anticorpos foi evitada pelo bloqueio com uma solução de 1% de soro de albumina bovina (BSA, Sigma, #A7906, St. Louis, MO, EUA) e 5% de leite em pó desnatado diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo Tween 20 0,02% por 2 h em estufa incubadora a 37 °C. Após cinco lavagens com solução salina tamponada com fosfato com Tween 20 0,02% (PBST), 50 µL de amostras de soro adequadamente diluídas em solução de BSA 0,25% e leite em pó desnatado 5% diluído em PBST (1:50 para IgA e 1:100 para IgG) foram adicionados e incubados por 45 min a 37 °C. Após lavagem cinco vezes com PBST, os anticorpos ligados foram detectados com anticorpos secundários de cabra anti-IgA humana conjugados com peroxidase (Sigma-Aldrich A0295, 1:2500) e IgG (Sigma-Aldrich A0170, 1:4000). Após incubação por 30 min a 37 °C e cinco lavagens com PBST, 50 µL de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA, Cat. n° 002023) foram adicionados a cada poço, e a mistura foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2 N à mistura. O branco foi avaliado em duplicata seguindo os mesmos passos dos testes das

amostras. Uma quantidade de 50 µL do diluente puro composto de 0,25% de BSA e 5% de leite em pó desnatado diluído em PBST foi adicionado a cada poço. Em cada placa foi incluído soro SARS-CoV-2 positivo e negativo para controle, confirmado por RT-PCR. Os controles negativos usados foram soro de amostras pré-pandêmicas. Os controles positivos, por outro lado, eram amostras de pacientes com COVID-19 de diferentes gravidades. Controles positivos e negativos foram testados nas diluições de 1:50, 1:100 e 1:200 para padronização. Observamos melhor desempenho de IgA na diluição de 1:50 e, para IgG, na diluição de 1:100. A densidade óptica (OD) foi medida a 450 nm usando um leitor de microplacas Multiskan (Labsystems Multiskan, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Os valores foram determinados como a densidade óptica (DO) menos o branco e o cutoff foi determinado como a DO média das amostras pré-pandêmicas $\pm 2 \times$ desvio padrão. Os resultados foram normalizados entre os experimentos e transformados como a proporção da amostra individual/cutoff (S/CO). A distribuição da frequência de detecção de anticorpos foi calculada como positiva quando S/CO era maior ou igual a 1.2 e detecção negativa quando S/CO era menor que 1.2. Cada amostra foi analisada em duplicata. Um protocolo semelhante foi utilizado por Oliveira et al., 2023 (Oliveira et al., 2023) e Medeiros et al., 2022 (Medeiros et al., 2022).

Tabela 2: Caracterização dos anticorpos utilizados para realização dos ELISAs (IgA e IgG) quanto ao tipo, marca e número do catálogo, clone e diluição usada.

Anticorpo	Marca Nº catálogo	Clone	Volume da diluição
Anti-IgG humano conjugado com peroxidase (específico para Fc)	Sigma-Aldrich A0170-1ML	Policlonal	1:4.000
Anti-IgA humano conjugado com peroxidase (específico para cadeia α)	Sigma-Aldrich A0295-1ML	Policlonal	1:2.500

4.9 Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas usando GraphPad Prism versão 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). O padrão de distribuição das variáveis foi avaliado por meio dos testes Kolmogorov–Smirnov e Shapiro–Wilk. Para comparações pareadas entre os grupos, foi utilizado o teste não paramétrico Wilcoxon

Matched-Pairs Signed Rank. Análises pareadas foram atribuídas a amostras dos mesmos indivíduos em diferentes momentos de coleta. Grupos não pareados foram analisados com o teste não paramétrico Mann-Whitney U. As análises não pareadas foram atribuídas a um grupo total. Para cálculos de frequência, usamos o teste exato de Fisher. As comparações entre vários grupos foram analisadas por testes estatísticos não paramétricos de Kruskal-Wallis e foram corrigidas usando os métodos de Dunn e Dunnett. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para análises de associação. A existência de correlação foi adotada para $r^2 > 0,5$. Para todos os testes, $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

5.1 Características dos participantes do estudo

Os participantes do estudo foram divididos em três grupos definidos pelas vacinas recebidas ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac. O grupo da ChAdOx1 nCoV-19 é composto por 33 indivíduos, sendo 23 (69,7%) mulheres e 10 (30,3%) homens. Já a BNT162b2 possui um grupo composto por 27 indivíduos, sendo 11 (40,7%) mulheres e 16 (59,3%) homens. Por fim, o grupo da CoronaVac é formado por 18 participantes, sendo 15 (83,3%) mulheres e 3 (16,7%) homens (Tabela 3). Desse modo, a população total é formada por 78 indivíduos. Com o prosseguimento da pesquisa uma parcela da população desistiu, por isso, alguns períodos de coleta apresentaram variações no número de amostras. A tabela 4 apresenta o número de indivíduos em cada tempo coletado. Em relação à idade, no grupo da ChAdOx1 nCoV-19, a mediana foi de 26 anos (21-65 anos), no da BNT162b2, de 30 anos (19-59 anos) e no grupo da CoronaVac, de 40 anos (22-54 anos) (Tabela 3).

Os períodos de coleta de sangue total compreendem T1 (pré-vacina), T2 (1 mês após a aplicação da segunda dose), T3 (4-6 meses após aplicação da segunda dose ou pré terceira dose) e T4 (1 mês após aplicação da terceira dose). Em indivíduos do grupo CoronaVac foram analisados somente os períodos T2, T3 e T4, já que apenas um participante possui coleta no período T1, impossibilitando as análises estatísticas desse tempo. Nos outros grupos, ChAdOx1 nCoV-19 e BNT162b2, foram analisados os 4 períodos coletados. A Figura 3 mostra esse esquema dos períodos de coleta.

Foram coletadas amostras de swab nasofaríngeo dos indivíduos pertencentes aos grupos das vacinas ChAdOx1 nCoV-19 e BNT162b2 nos períodos de coleta pré-vacina e um mês pós-segunda dose. A execução da Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) foi realizada pelo grupo de diagnóstico COVID-19 do IPTSP (Laboratório de Virologia e Cultivo Celular - LabViCC) e o teste qualitativo foi realizado apenas nas amostras obtidas nas coletas pré-vacina do grupo da ChAdOx1 nCoV-19. Todos os participantes deste grupo apresentaram resultados negativos.

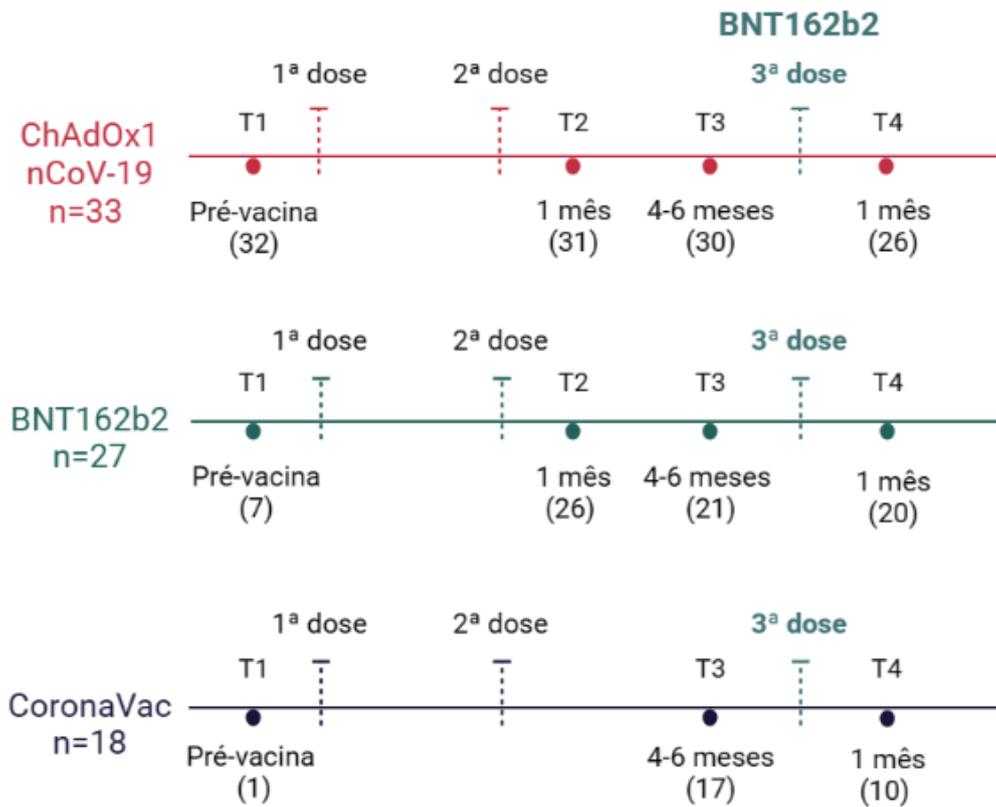


Figura 3: Esquema dos períodos de coleta de sangue de acordo com cada grupo vacinal. O soro de indivíduos imunizados com BNT162b2, ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac foi coletado em T1 (pré-vacina), T2 (1 mês após a aplicação da segunda dose), T3 (4–6 meses após a aplicação da segunda dose ou pré -terceira dose) e T4 (1 mês após a aplicação da terceira dose). Os indivíduos receberam a primeira e segunda doses da mesma vacina e a maioria recebeu BNT162b2 como terceira dose. O número de indivíduos coletados em cada período é indicado entre parênteses. “T” se refere aos tempos de coleta. Produzido em BioRender.

Tabela 3. Caracterização da população do estudo de acordo com as vacinas: ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac (N=78)

	ChAdOx1 nCoV-19 (N=33)	BNT162b2 (N=27)	CoronaVac (N=18)	Valor de p (ChAdOx1 nCoV-19 vs. BNT162b2)	Valor de p (ChAdOx1 nCoV-19 vs. CoronaVac)	Valor de p (BNT162b2 vs. CoronaVac)
Sexo. No (%)						
Mulheres (N=49)	23 (69,7)	11 (40,7)	15 (83,3)	0,0363*	0,3359	0,0061**
Homens (N=29)	10 (30,3)	16 (59,3)	3 (16,7)			
Grupos das idades. No (%)						
18-30	20 (60,6)	15 (55,5)	4 (22,2)	0,7944	0,0176*	0,0347*
31-50	5 (15,2)	4 (14,8)	11 (61,1)	>0,9999	0,0013**	0,0029**
>50	8 (24,2)	8 (29,7)	3 (16,7)	0,7711	0,7255	0,4824
Mediana das idades (mínimo e máximo)	26 (21-65)	30 (19-59)	40 (22-54)			
Tempos de coleta (média ± DP)						
1 mês pós segunda dose	26,0 ± 3,25	27,3 ± 3,33	-			
4-6 meses pós segunda dose	129 ± 4,09	125 ± 8,56	203 ± 23,0			
1 mês pós-terceira dose	32,5 ± 6,71	31 ± 4,05	54 ± 8,74			
Comorbidades. No (%)						

Diabetes	2 (6,06)	3 (11,1)	0	0,6494	0,5341	0,2636
Hipertensão	1 (3,03)	2 (7,4)	2 (11,1)	0,5834	0,2816	>0,9999
Doenças autoimunes	1 (3,03)	2 (7,4)	3 (16,6)	0,5834	0,1200	0,3751
Doenças respiratórias	1 (3,03)	1 (5,6)	2 (11,1)	>0,9999	0,2816	0,5548
Outras	2 (6,06)	2 (3,7)	2 (11,1)	>0,9999	0,6070	>0,9999
Sem comorbidades	27 (81,8)	8 (29,6)	10 (55,5)	0,0148*	0,0620	0,7459

Abreviações: N, quantidade de indivíduos. DP, desvio padrão. Entre parênteses estão representadas as porcentagens. A média dos tempos de coleta (dias) foi calculada de acordo com a data de recebimento da primeira dose da vacina. O teste exato de Fisher foi utilizado para calcular a significância estatística. As significâncias estatísticas são apresentadas como * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Tabela 4. Caracterização da população do estudo por período de coleta e estratificação dos grupos de acordo com sexo e vacina: ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac

Indivíduos por período de coleta. No (% em relação ao total)	Pré-vacina	1 mês pós segunda dose	4-6 meses pós segunda dose	1 mês pós terceira dose
ChAdOx1 nCoV-19 (N= 33)	32 (96,9)	31 (94)	30 (91)	26 (78,8)
Mulher (N=23)	21 (65,6)	20 (64,5)	19 (63,3)	16 (61,5)
Homem (N=10)	11 (34,4)	11 (35,5)	11 (36,7)	10 (38,5)
BNT162b2 (N= 27)	7 (25,9)	26 (96,2)	21 (77,7)	20 (74,1)
Mulher (N=11)	2 (28,6)	11 (42,3)	10 (47,6)	9 (45)
Homem (N=16)	5 (71,4)	15 (57,7)	11 (52,4)	11 (55)
CoronaVac (N= 18)	1 (5,6)	-	17 (94,4)	10 (55,5)
Mulher (N=15)	-	-	14 (82,4)	9 (90)
Homem (N=3)	-	-	3 (17,6)	1 (10)

Abreviações: N, quantidade de indivíduos. Entre parênteses estão representadas as porcentagens.

5.2 Avaliação da produção de anticorpos séricos após vacinação com ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac em diferentes tempos de coleta

A primeira análise realizada foi da capacidade de indução de anticorpos IgG e IgA anti-RBD e IgG anti-spike nos soros, em períodos de coleta distintos, para as vacinas ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac. A vacinação homóloga foi utilizada na série primária de imunização, ou seja, os indivíduos que receberam a primeira dose por uma vacina receberam também a segunda dose da mesma vacina. A Figura 4 mostra os resultados dos níveis de IgA (Figura 4A) e IgG anti-RBD (Figura 4D) e IgG anti-spike (Figura 4G) no período de coleta de um mês após a aplicação da segunda dose. Os três anticorpos apresentaram um aumento significativo após a aplicação das duas primeiras doses, de ambas as vacinas ChAdOx1 nCoV-19 e BNT162b2 o que pode ser verificado pela diferença observada entre os níveis pré-vacina e os de pós-segunda dose (ChAdOx1 nCoV-19: IgA anti-RBD - $p=0,0027$; IgG anti-RBD - $p<0,0001$; IgG anti-spike - $p<0,0001$; BNT162b2: IgA anti-RBD - $p<0,0001$; IgG anti-RBD - $p<0,0001$; IgG anti-spike - $p<0,0001$). Além disso, foi observada uma diferença entre a quantidade de anticorpos induzidos pela BNT162b2 e ChAdOx1 nCoV-19, em que a BNT162b2 foi responsável pela indução de maiores índices (IgA anti-RBD - $p<0,0001$; IgG anti-RBD - $p=0,0094$; IgG anti-spike - $p=0,0459$) (Figura 4A, 4D, 4G).

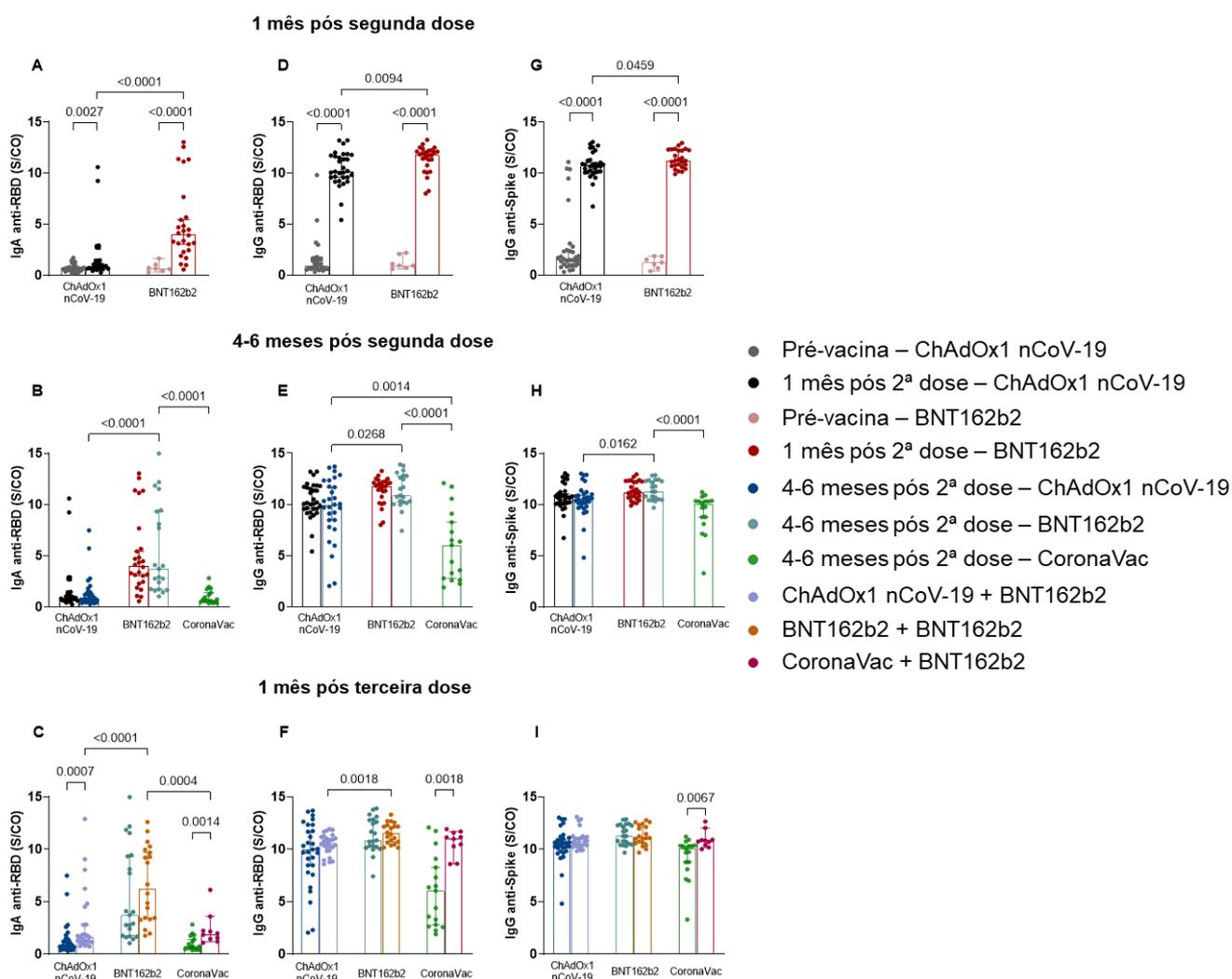


Figura 4: Avaliação da produção sérica de IgA anti-RBD e IgG anti-RBD e anti-spike em diferentes momentos de coleta para as vacinas ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac. O soro de indivíduos imunizados com BNT162b2, ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac foi coletado em T1 (pré-vacina: BNT162b2 n = 7; ChAdOx1 nCoV-19 n = 32), T2 (1 mês após a aplicação da segunda dose: BNT162b2 n = 26; ChAdOx1 nCoV-19 n = 31), T3 (4–6 meses após a aplicação da segunda dose ou pré-terceira dose: BNT162b2 n = 21; ChAdOx1 nCoV-19 n = 30; CoronaVac n = 17) e T4 (1 mês após aplicação da terceira dose: BNT162b2 n = 20; ChAdOx1 nCoV-19 n = 26; CoronaVac n = 10). Os níveis de anticorpos foram comparados entre diferentes momentos: pré-vacina e 1 mês após a segunda dose (A, D, G); 1 mês após a segunda dose e 4–6 meses após a segunda dose ou pré-terceira dose (B,E,H); 4–6 meses após a segunda dose ou pré-terceira dose e 1 mês após a terceira dose (C, F, I). A detecção de anticorpos IgA anti-RBD (A–C) e IgG anti-RBD (D–F) e anti-spike (G–I) foi realizada por meio do imunoenensaio enzimático (ELISA) descrito nos métodos. Os resultados são expressos através do índice calculado entre a razão: densidade óptica média (DO) da amostra/cutoff (S/CO=Signal/Cutoff). Cada ponto representa um único indivíduo. O final da barra indica o valor mediano e as barras horizontais acima e abaixo da mediana indicam o intervalo de confiança de 95%. O teste Mann-Whitney

U foi usado para comparar os níveis de anticorpos induzidos entre as vacinas. A significância estatística foi adotada para $p < 0,05$.

Posteriormente, os níveis séricos de anticorpos obtidos 4 e 6 meses pós-segunda dose foram comparados aos níveis obtidos um mês após a segunda dose (Figura 4B, 4E, 4H). IgA anti-RBD (Figura 4B) e IgG anti-RBD (Figura 4E) e anti-spike (Figura 4H) expressaram índices maiores pela BNT162b2, em comparação à CoronaVac (IgA anti-RBD - $p < 0,0001$; IgG anti-RBD - $p < 0,0001$; IgG anti-spike - $p < 0,0001$). Comparando BNT162b2 à ChAdOx1 nCoV-19, a vacina de mRNA induziu maior quantidade de IgA anti-RBD e IgG anti-RBD e anti-spike (IgA anti-RBD - $p < 0,0001$; IgG anti-RBD - $p = 0,0268$; IgG anti-spike - $p = 0,0162$) (Figura 4B, 4E, 4H). Para IgG anti-RBD, a CoronaVac induziu menores índices de anticorpos em relação a ChAdOx1 nCoV-19 ($p = 0,0014$) (Figura 4E).

Todos os participantes do estudo, exceto dois, receberam a BNT162b2 como terceira dose, ou dose de reforço, nos três grupos de vacinas. Um indivíduo, do grupo da ChAdOx1 nCoV-19, recebeu a dose de reforço pela ChAdOx1 nCoV-19 e outro, do grupo BNT162b2, recebeu a Janssen como terceira dose. Os resultados obtidos após um mês da imunização pela terceira dose (Figura 4C, 4F, 4I) exprimem maior indução das imunoglobulinas pela BNT162b2 em comparação à ChAdOx1 nCoV-19, para IgA ($p < 0,0001$) e IgG ($p = 0,0018$) anti-RBD, e em comparação à CoronaVac, para IgA anti-RBD ($p = 0,0004$). Além disso, as comparações feitas em relação ao período de coleta anterior (quatro e seis meses após a segunda dose ou pré-terceira dose) também demonstraram diferenças entre os níveis de IgA anti-RBD, após a dose de reforço, para as vacinas ChAdOx1 nCoV-19 ($p = 0,0007$) e CoronaVac ($p = 0,0014$) (Figura 4C) e, para a CoronaVac, entre os níveis de IgG anti-RBD ($p = 0,0018$) (Figura 4F), e anti-spike ($p = 0,0067$) (Figura 4I), com níveis maiores após a imunização pela terceira dose.

Todos os vacinados (100%) produziram níveis detectáveis de IgG anti-RBD e anti-spike após cada dose de vacina. A frequência de indivíduos que produziram IgA anti-RBD nos momentos de coleta pós-vacinação é mostrada na Figura 5 (porcentagem de indivíduos positivos 1 mês após a segunda dose: ChAdOx1 nCoV-19 29%, BNT162b2 88%; 4-6 meses após a segunda dose ou pré terceira dose: ChAdOx1 nCoV-19 37%, BNT162b2 95%, CoronaVac 29%; e 1 mês após a terceira dose: ChAdOx1 nCoV-19 65%, BNT162b2 100%, CoronaVac 90%). A comparação entre os níveis de IgA anti-RBD induzida por ChAdOx1 nCoV-19 e BNT162b2 1 mês após a segunda dose (Figura 5A) indicou que os indivíduos do grupo BNT162b2 produziram níveis de anticorpos mais elevados do que os do grupo ChAdOx1 nCoV-19 ($p < 0,0001$). Indivíduos vacinados com BNT162b2 apresentaram maior frequência de produção de IgA anti-RBD em comparação a vacinados com ChAdOx1 nCoV-19 ($p < 0,0001$) e CoronaVac ($p < 0,0001$) 4 a 6 meses após a segunda dose (Figura 5B). 1 mês após a terceira dose, os indivíduos vacinados com BNT162b2 também apresentaram maior frequência de produção de IgA, mas apenas em comparação aos vacinados com ChAdOx1 nCoV-19 ($p = 0,0030$) (Figura 5C).

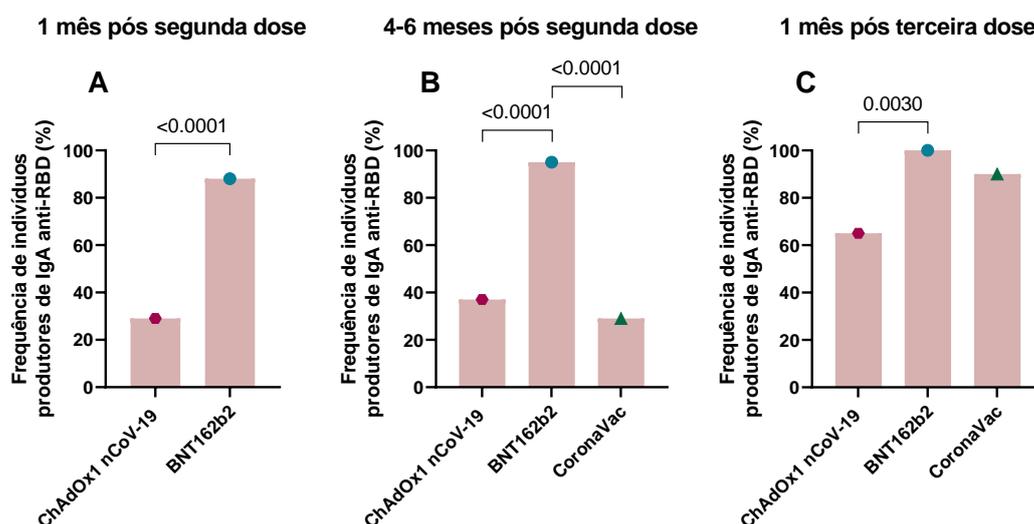


Figura 5. Frequência de indivíduos produtores de IgA anti-RBD em períodos de coleta pós-vacinal. A frequência de indivíduos produtores de IgA anti-RBD foi avaliada por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) descrito na seção de métodos. Esta análise foi realizada para coletas pós-vacinais em T2: 1 mês após a aplicação da segunda dose (A), T3: 4–6 meses após a aplicação da segunda dose ou pré-terceira dose (B) e T4: 1 mês após a aplicação da terceira dose (C) por comparação entre os grupos vacinais. Os resultados são expressos em porcentagem. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparação da resposta de anticorpos entre os grupos. A significância estatística foi adotada para $p < 0,05$.

5.3 Análise longitudinal da produção de anticorpos séricos após as vacinas ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac

Como mencionado anteriormente, as análises foram realizadas em momentos de coleta distintos. Estes períodos compreendem desde T1 até T4, sendo T1: pré-vacinação; T2: um mês após vacinação pela segunda dose; T3: quatro a seis meses após vacinação pela segunda dose ou pré terceira dose; e T4: um mês após vacinação pela terceira dose. A Figura 6 exibe os tempos de coleta para cada vacina avaliada. Observa-se que somente um indivíduo do grupo da vacina CoronaVac possui coleta pré-vacina (T1).

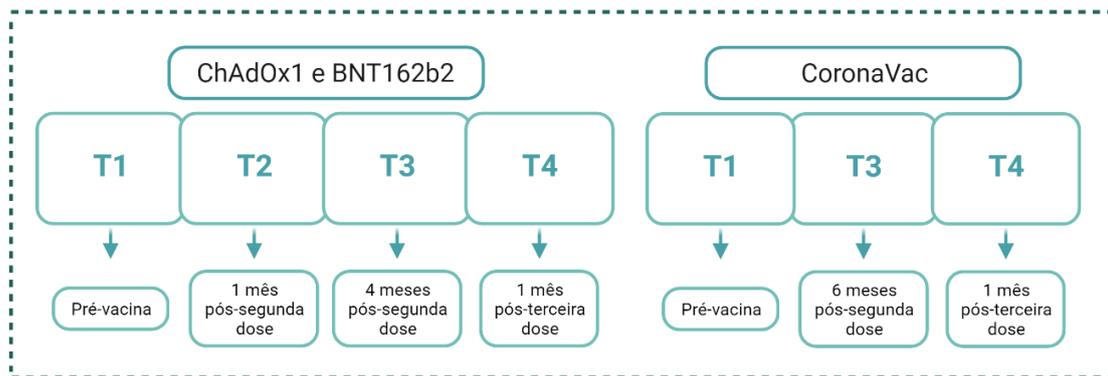


Figura 6: Fluxograma dos tempos de coleta de amostras de sangue dos indivíduos pré e pós vacinas BNT162b2, ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac. O soro dos participantes do estudo foi coletado em quatro momentos distintos, T1, T2, T3 e T4, em que: T1 - Pré-vacina; T2: um mês após a segunda dose; T3: quatro a seis meses após a segunda dose ou pré-terceira dose; T4: um mês pós-terceira dose. O sangue total de indivíduos dos grupos da ChAdOx1 nCoV-19 e BNT162b2 foi coletado nos quatro períodos distintos. Para os integrantes do grupo da CoronaVac, os tempos T1, T3 e T4 foram coletados (somente um indivíduo do grupo da vacina CoronaVac possui coleta no tempo T1). Produzido em BioRender.

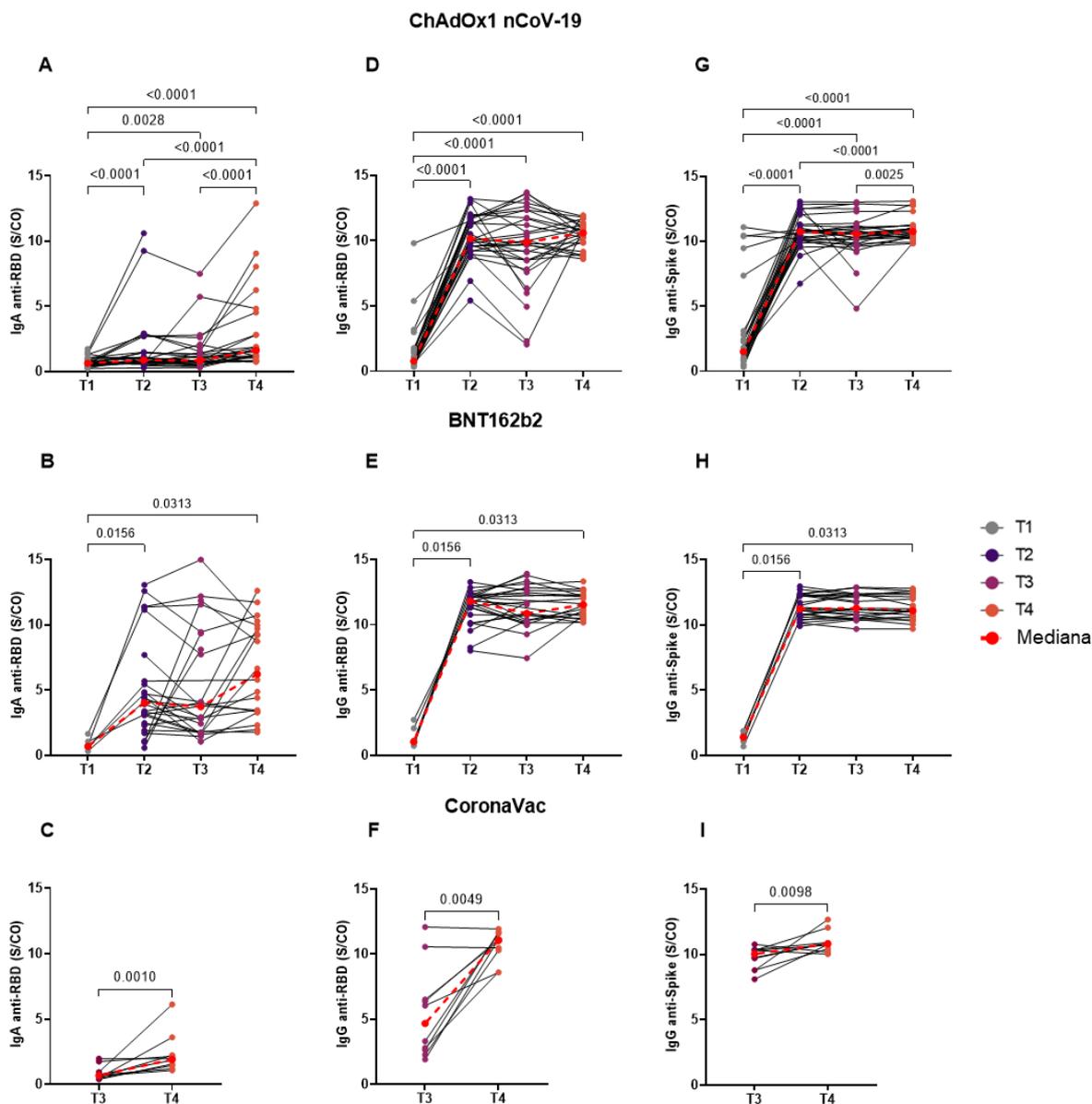


Figura 7: Análise longitudinal da produção sérica de IgA anti-RBD e IgG anti-RBD e anti-spike para as vacinas BNT162b2, ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac. O soro de indivíduos imunizados com ChAdOx1 nCoV-19 (A,D,G), BNT162b2 (B,E,H) e CoronaVac (C,F,I) foi coletado nos tempos T1 (pré-vacina: BNT162b2 n = 7; ChAdOx1 nCoV-19 n = 32), T2 (1 mês após a aplicação da segunda dose: BNT162b2 n = 26; ChAdOx1 nCoV-19 n = 31), T3 (4–6 meses após a aplicação da segunda dose ou pré-terceira dose: BNT162b2 n = 21; ChAdOx1 nCoV-19 n = 30; CoronaVac n = 17) e T4 (1 mês após a aplicação da terceira dose: BNT162b2 n = 20; ChAdOx1 nCoV-19 n = 26; CoronaVac n = 10). O sangue total dos indivíduos dos grupos ChAdOx1 nCoV-19 e BNT162b2 foi coletado nos quatro diferentes períodos. Para os integrantes do grupo CoronaVac, foram coletados apenas os tempos T3 e T4. A detecção de anticorpos IgA anti-RBD (A–C) e IgG anti-RBD (D–F) e anti-spike (G–I) foi realizada no soro por meio do imunoenensaio enzimático (ELISA) descrito nos métodos. Os resultados são expressos através do índice calculado entre a razão: densidade óptica média (DO) da amostra/cutoff

(S/CO-Signal/Cutoff). Cada ponto representa um único indivíduo. O final da barra indica o valor mediano e as barras horizontais acima e abaixo da mediana indicam o intervalo de confiança de 95%. A linha pontilhada vermelha indica a mediana de cada ponto. O teste Wilcoxon Matched-Pairs foi utilizado para comparar os níveis de anticorpos induzidos entre os tempos de coleta. A significância estatística foi adotada para $p < 0,05$.

Posteriormente, foi realizada uma análise longitudinal para avaliação de IgG e IgA em momentos distintos, de modo a investigar possíveis variações na produção de anticorpos. Os resultados dessa avaliação para ChAdOx1 nCoV-19 (Figuras 7A, 7D, 7G) revelaram diferenças estatísticas entre os tempos em relação à pré-vacina, para ambos IgA anti-RBD (T1 e T2: $p < 0,0001$; T1 e T3: $p = 0,0028$; T1 e T4: $p < 0,0001$) e IgG anti-RBD (T1 e T2: $p < 0,0001$; T1 e T3: $p < 0,0001$; T1 e T4: $p < 0,0001$) e anti-spike (T1 e T2: $p < 0,0001$; T1 e T3: $p < 0,0001$; T1 e T4: $p < 0,0001$). Também foi observada uma diferença entre os tempos para IgA anti-RBD (T2 e T4: $p < 0,0001$; T3 e T4: $p < 0,0001$) (Figura 7A) e para IgG anti-spike (T2 e T4: $p < 0,0001$; T3 e T4: $p = 0,0025$) (Figura 7G), com maiores índices expressos no período T4.

A análise longitudinal realizada para a BNT162b2 (Figura 7B, 7E, 7H) não demonstrou significância na produção de IgA (Figura 7B) ou IgG anti-RBD e anti-spike (Figura 7E, 7H) entre os pontos pós-vacina analisados. Entretanto, a comparação de T1 com T2 e T4 revelou maior produção de IgA e IgG anti-RBD e IgG anti-spike nos períodos pós- vacina (T1 e T2: $p = 0,0156$; T1 e T4: $p = 0,0313$) (Figura 7B, 7E, 7H). Para a CoronaVac (Figuras 7C, 7F, 7I), houve diferença entre os tempos T3 e T4, em que o T4 foi superior para IgA ($p = 0,0010$) (Figura 7C) e IgG anti-RBD ($p = 0,0049$) (Figura 7F) e anti-spike ($p = 0,0098$) (Figura 7I). Como apenas um indivíduo do grupo da vacina CoronaVac possui coleta no tempo T1, esse tempo não foi inserido na análise longitudinal.

5.4 Avaliação da influência do sexo sobre os níveis séricos de IgG e IgA

Com o objetivo de avaliar se há variação na indução de anticorpos de acordo com o sexo e idade, a população do estudo foi estratificada conforme o período de coleta e grupo de vacina em relação à idade e sexo.

A avaliação realizada em relação ao sexo, independente do grupo vacinal, não mostrou diferença estatística na produção de anticorpos IgG e IgA anti-RBD 1 mês após a terceira dose (Figura 8A, 8B). Em contrapartida, a comparação dos níveis de

IgG anti-spike revelou maior produção desse anticorpo entre os homens ($p=0,0165$) (Figura 8C).

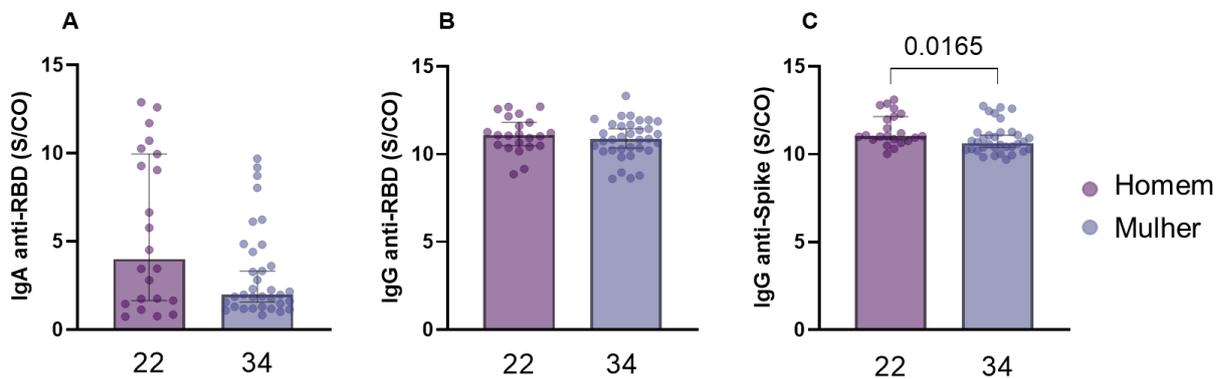


Figura 8: Avaliação da influência do sexo sobre os níveis séricos de IgA anti-RBD e IgG anti-RBD e anti-spike após a terceira dose com BNT162b2. O soro de indivíduos imunizados com BNT162b2, ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac obtido 1 mês após a terceira dose foi avaliado quanto à influência do sexo na produção de IgA anti-RBD (A) e IgG anti-RBD (B) e anti-spike (C) por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) descrito nos métodos. Os resultados são expressos pelo índice calculado entre a razão: densidade óptica média (OD) da amostra/cutoff (S/CO-Signal/Cutoff). Cada ponto representa um único indivíduo. Os números abaixo dos gráficos indicam o número de indivíduos avaliados de acordo com o sexo. O final da barra indica o valor mediano e as barras horizontais acima e abaixo da mediana indicam o intervalo de confiança de 95%. O teste Mann-Whitney U foi usado para comparar os níveis de anticorpos induzidos. A significância estatística foi adotada para $p < 0,05$.

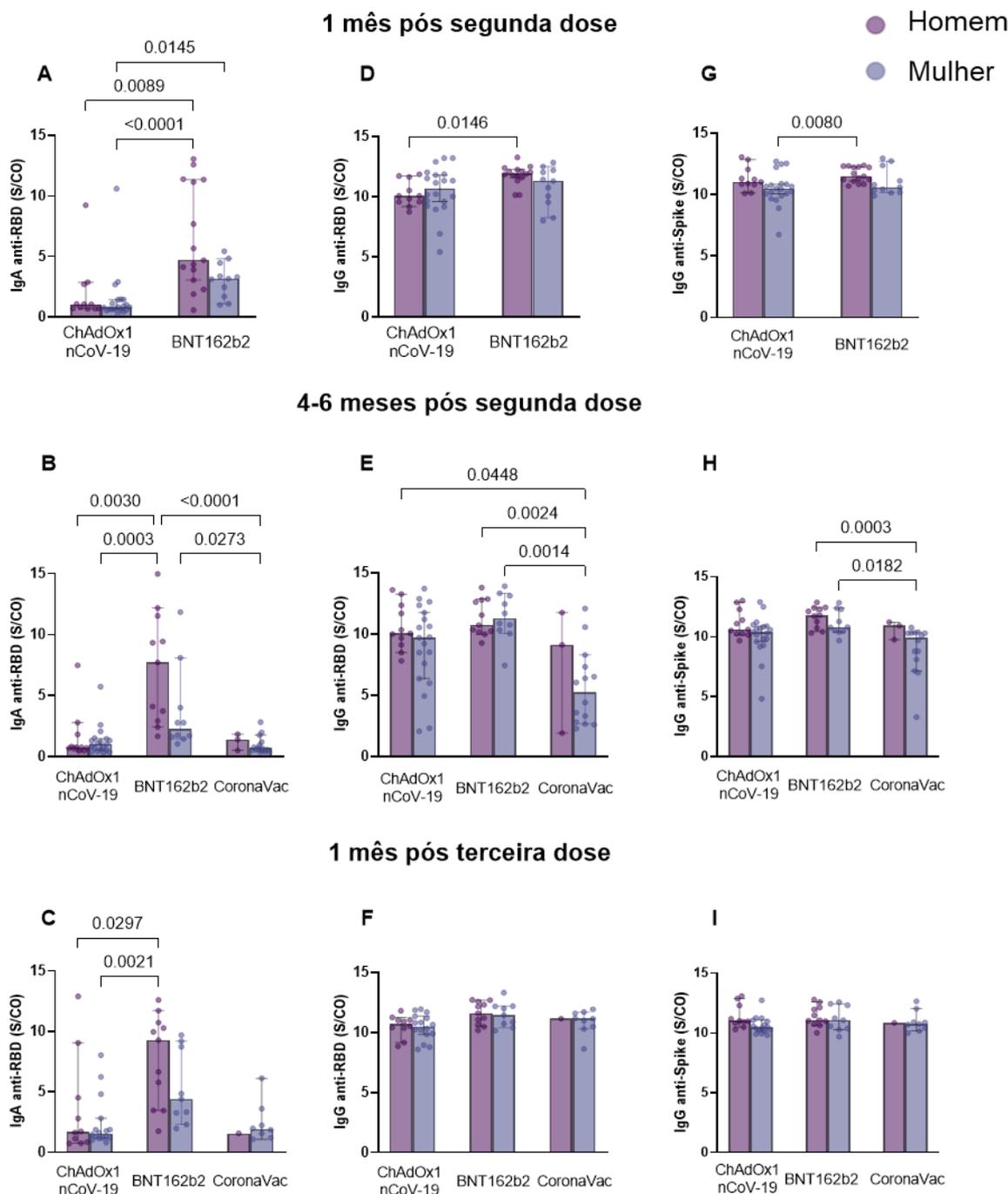


Figura 9: Influência do sexo sobre os níveis séricos de IgA anti-RBD e IgG anti-RBD e anti-spike nos períodos de coleta pós-vacinação para as vacinas BNT162b2, ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac. O soro de indivíduos imunizados com ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac foi coletado nos tempos de coleta T2 (1 mês após a aplicação da segunda dose), T3 (4–6 meses após a aplicação da segunda dose ou pré-terceira dose) e T4 (1 mês após a aplicação da terceira dose) e avaliados quanto à influência do sexo na produção de anticorpos. A detecção de IgA anti-RBD (A–C) e IgG anti-RBD (D–F) e anti-spike (G–I) foi realizada por meio do imunoenensaio enzimático (ELISA) descrito nos métodos. Os resultados são expressos através do índice calculado entre a razão: densidade

óptica média (DO) da amostra/cutoff (S/CO-Signal/Cutoff). Cada ponto representa um único indivíduo. O final da barra indica o valor mediano e as barras horizontais acima e abaixo da mediana indicam o intervalo de confiança de 95%. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparar os níveis de anticorpos induzidos entre as vacinas. A significância estatística foi adotada para $p < 0,05$.

A avaliação dos níveis de anticorpos de acordo com o sexo nos períodos de coleta pós-vacinal (Figura 9) indicou que, 1 mês após a segunda dose, homens imunizados com BNT162b2 apresentaram níveis mais elevados de IgA e IgG anti-RBD em comparação à homens vacinados com ChAdOx1 nCoV-19 (IgA: $p=0,0089$; IgG: $p=0,0146$) e mulheres, também vacinadas com ChAdOx1 nCoV-19 (IgA: $p<0,0001$) (Figura 9A,9D). Além disso, em mulheres vacinadas com BNT162b2, níveis mais altos de IgA anti-RBD foram induzidos em comparação às vacinadas com ChAdOx1 nCoV-19 ($p=0,0145$) (Figura 9A). A avaliação de IgG anti-spike, neste mesmo tempo de coleta (Figura 9G), revelou que homens vacinados com BNT162b2 apresentaram títulos de anticorpos mais elevados do que mulheres vacinadas com ChAdOx1 nCoV-19 ($p = 0,0080$).

Em 4-6 meses após a segunda dose, o grupo de homens vacinados com BNT162b2 exibiu níveis mais elevados de IgA anti-RBD em comparação com homens ($p=0,0030$) e mulheres ($p=0,0003$) imunizados com ChAdOx1 nCoV-19 (Figura 9B). Nesse mesmo momento, as mulheres do grupo CoronaVac produziram níveis mais baixos de IgA anti-RBD em comparação com mulheres ($p=0,0273$) e homens ($p<0,0001$) no grupo BNT162b2 (Figura 9B). Em relação aos níveis de IgG anti-RBD, mulheres do grupo CoronaVac, induziram níveis mais baixos desse anticorpo em comparação aos observados em mulheres ($p=0,0014$) e homens ($p=0,0024$) no grupo BNT162b2 e em comparação aos homens no grupo ChAdOx1 Grupo nCoV-19 ($p=0,0448$) (Figura 9E). Mulheres vacinadas com CoronaVac produziram níveis mais baixos de IgG anti-spike em comparação com homens ($p=0,0003$) e mulheres ($p=0,0182$) vacinadas com BNT162b2 (Figura 9H).

Um mês após a terceira dose, novamente homens vacinados com BNT162b2 apresentaram níveis mais elevados de IgA anti-RBD em comparação a mulheres ($p=0,0021$) e homens ($p=0,0297$) vacinados com ChAdOx1 nCoV-19 (Figura 9C). A análise realizada neste momento para IgG anti-RBD e anti-spike não apresentou significância estatística (Figuras 9F, 9I).

5.5 Avaliação da influência da idade sobre os níveis séricos de IgG e IgA

Para avaliar se a idade poderia influenciar na produção desses anticorpos, foi feita uma segregação dos indivíduos em três grupos distintos, sendo eles, de 18 a 30 anos, de 31 a 50 anos e maiores de 50 anos. A distribuição dos grupos foi determinada de acordo com a prevalência das idades na população de estudo. A Figura 10 apresenta níveis de IgA e IgG anti-RBD e IgG anti-spike de acordo com os grupos de idades e vacinas.

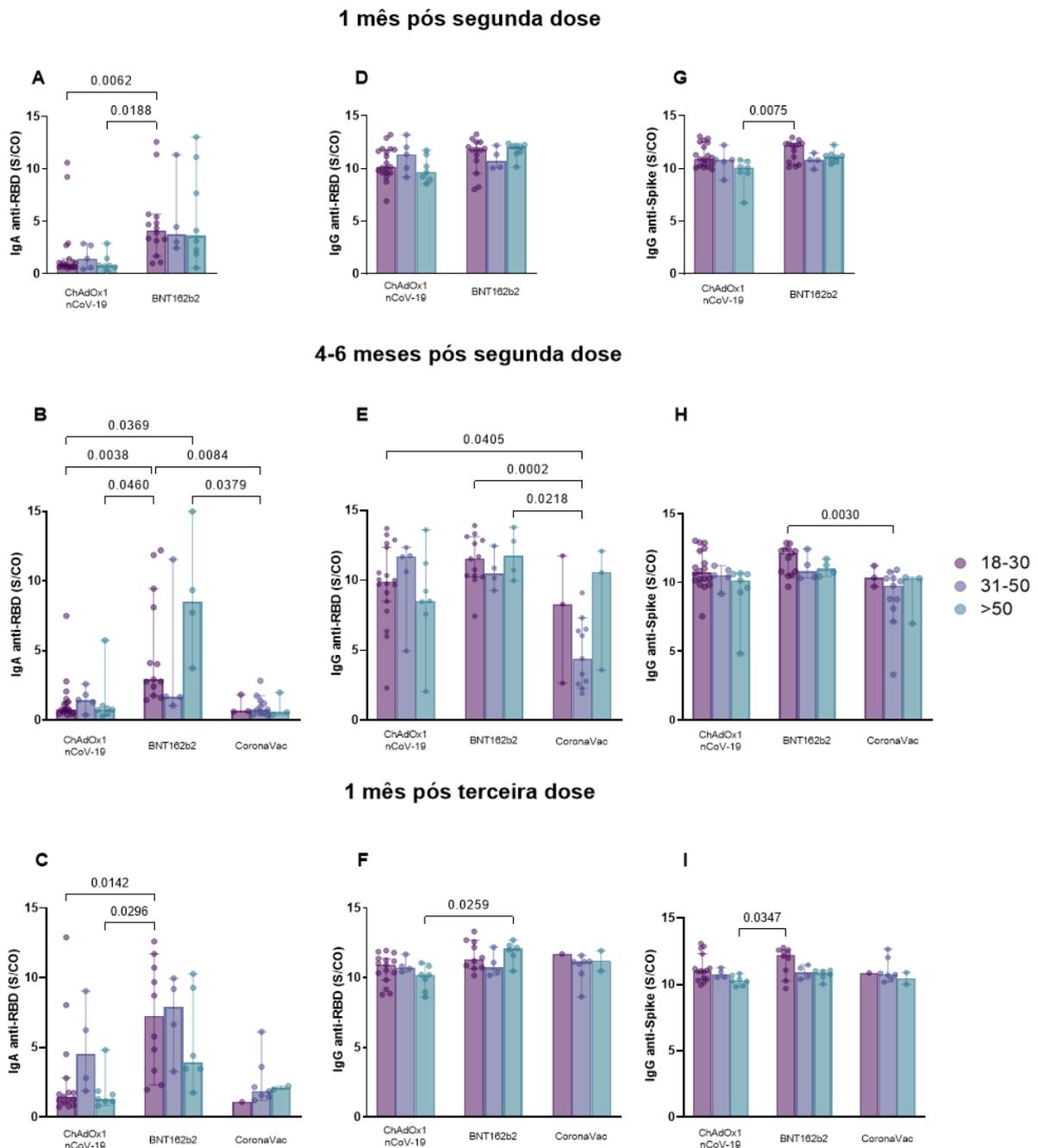


Figura 10: Influência da idade sobre os níveis séricos de IgA anti-RBD e IgG anti-RBD e anti-spike para cada período de coleta das vacinas BNT162b2, ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac. O soro de indivíduos imunizados com BNT162b2, ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac foi coletado nos tempos T2 (1 mês após a aplicação da segunda dose), T3 (4 a 6 meses após a aplicação da segunda dose ou pré-terceira dose) e T4 (1 mês após a aplicação da terceira dose). A avaliação da influência da idade na produção de anticorpos IgA anti-RBD (A–C) e IgG anti-RBD (D–F) e anti-spike (G–I) foi realizada por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) descrito nos métodos. Os indivíduos da população foram segregados em três faixas etárias: de 18 a 30 anos, de 31 a 50 anos e acima de 50 anos. Os resultados são expressos pelo índice calculado entre a razão: densidade óptica média (OD) da amostra/cutoff (S/CO-Signal/Cutoff). Cada ponto representa um único indivíduo. O final da barra indica o valor mediano e as barras horizontais acima e abaixo da mediana indicam o intervalo de confiança de 95%. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparar os níveis de anticorpos induzidos. A significância estatística foi adotada para $p < 0,05$.

A análise do efeito da idade na produção de anticorpos 1 mês após a segunda dose (Figura 10A, 10D, 10G) indicou maior produção de IgA anti-RBD por indivíduos de 18 a 30 anos vacinados com BNT162b2 em comparação com aqueles na mesma faixa etária, mas vacinados com ChAdOx1 nCoV-19 ($p=0,0062$) (Figura 10A). Os indivíduos vacinados com BNT162b2, de 18-30 anos, também apresentaram níveis mais elevados de IgA anti-RBD ($p=0,0188$) e IgG anti-spike ($p=0,0075$) em relação aos maiores de 50 anos vacinados com ChAdOx1 nCoV-19 (Figura 10A, 10G). A análise dos níveis de IgG anti-RBD não apresentou significância estatística (Figura 10D).

Em 4-6 meses após a segunda dose, os indivíduos com idades entre 18-30 anos no grupo BNT162b2 produziram níveis superiores de IgA anti-RBD em comparação com indivíduos na mesma faixa etária ($p=0,0038$) e aqueles com mais de 50 anos ($p=0,0460$) vacinados com ChAdOx1 nCoV-19 (Figura 10B). Eles também produziram maiores níveis de IgA anti-RBD em comparação com indivíduos de 31 a 50 anos vacinados com CoronaVac ($p=0,0084$) (Figura 10B). Aqueles com mais de 50 anos, no grupo vacinado com BNT162b2, apresentaram níveis mais altos de IgA anti-RBD em comparação com indivíduos de 31 a 50 anos ($p=0,0379$) no grupo CoronaVac e em comparação com indivíduos de 18 a 30 anos no grupo ChAdOx1 nCoV-19 ($p=0,0369$) (Figura 10B). Avaliando a produção de IgG anti-RBD neste momento, é possível observar uma maior indução deste anticorpo no soro de indivíduos de 18 a 30 anos vacinados com BNT162b2 ($p=0,0002$) e ChAdOx1 nCoV-19 ($p=0,0405$) em relação aos indivíduos com idade entre 31 e 50 anos no grupo CoronaVac (Figura

10E). Além disso, indivíduos com mais de 50 anos vacinados com BNT162b2 produziram maiores níveis desse anticorpo em comparação à indivíduos de 31-50 anos vacinados com CoronaVac ($p=0,0218$) (Figura 10E). A análise dos níveis de IgG anti-spike mostrou que indivíduos de 18 a 30 anos vacinados com BNT162b2 induziram níveis mais elevados desse anticorpo em relação àqueles de 31 a 50 anos vacinados pela CoronaVac ($p=0,0030$) (Figura 10H).

Um mês após a terceira dose (Figura 10C, 10F, 10I), indivíduos com 18–30 anos do grupo BNT162b2 produziram níveis mais elevados de IgA anti-RBD do que aqueles com mais de 50 anos ($p=0,0296$) e aqueles entre 18–30 anos ($p=0,0142$), ambos vacinados com ChAdOx1 nCoV-19 (Figura 10C). A avaliação de IgG anti-RBD revelou que indivíduos com mais de 50 anos vacinados com BNT162b2 apresentaram níveis mais elevados desse anticorpo em relação à indivíduos da mesma faixa etária, mas vacinados com ChAdOx1 nCoV-19 ($p=0,0259$) (Figura 10F). A análise dos níveis de IgG anti-spike no mesmo período revelou que aqueles com 18-30 anos vacinados com BNT162b2 apresentaram níveis superiores desse anticorpo em comparação com indivíduos com mais de 50 anos vacinados com ChAdOx1 nCoV-19 ($p=0,0347$) (Figura 10I).

5.6 Avaliação da variação dos níveis séricos de IgG e IgA devido à comorbidades

Para avaliar se a presença de comorbidades poderia influenciar na produção de anticorpos, os níveis de IgA e IgG anti-RBD e IgG anti-spike foram avaliados de acordo com a presença de doenças e com os grupos de vacinas. Durante a realização do questionário, dos 78 indivíduos avaliados, 23 declararam possuir comorbidades. Aquelas de maior prevalência foram diabetes, hipertensão, doenças autoimunes e doenças respiratórias. Dislipidemia, aterosclerose, depressão, ansiedade e síndrome do pânico foram agrupadas em “outras”, pelo fato de não serem tão prevalentes. A tabela 3 mostra a prevalência dessas comorbidades na população do estudo.

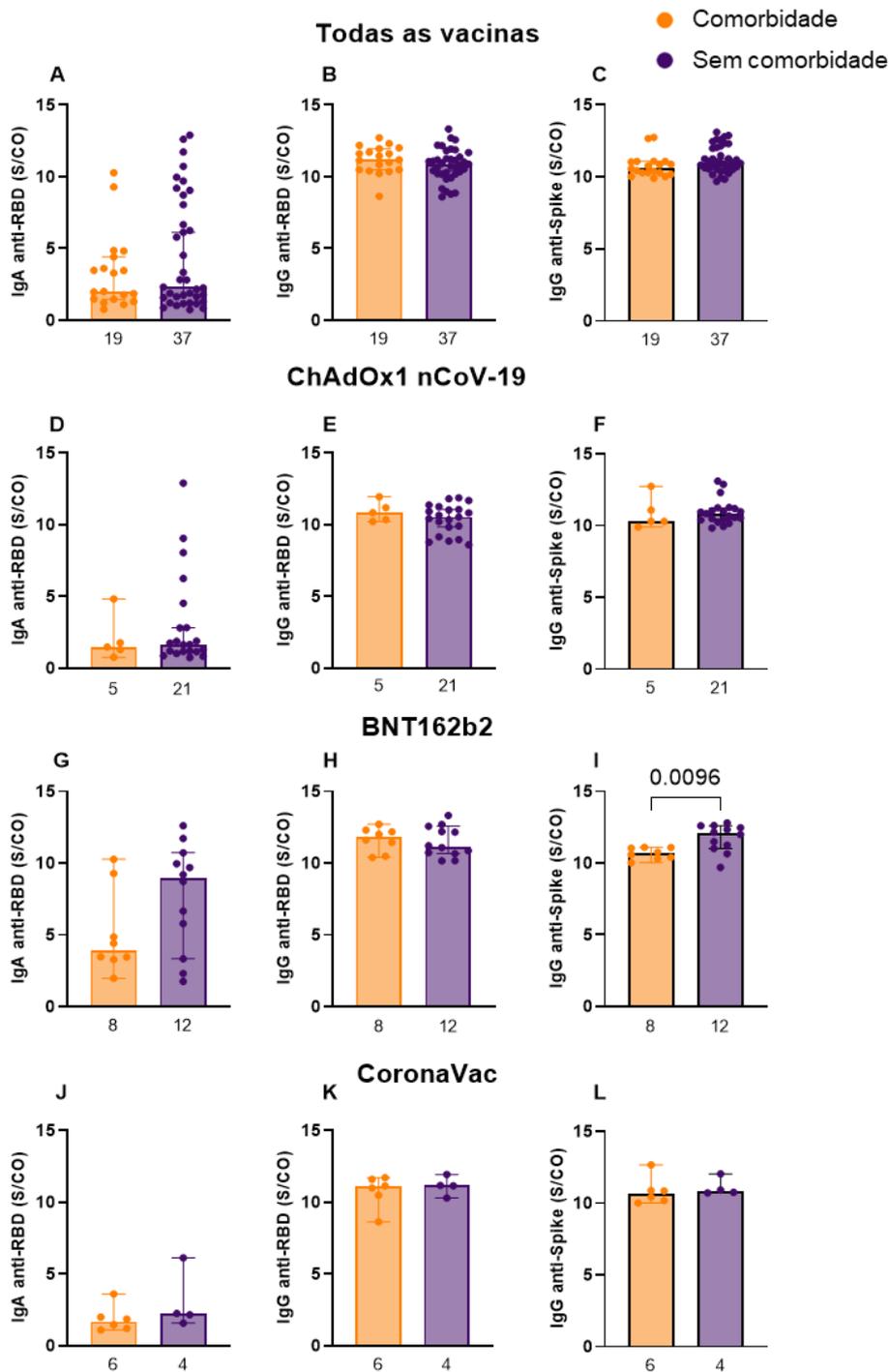


Figura 11: Variação nos níveis séricos de IgA anti-RBD e IgG anti-RBD e anti-spike devido a comorbidades em relação às vacinas BNT162b2, ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac. O soro de indivíduos imunizados com ChAdOx1 nCoV-19 (D–F), BNT162b2 (G–I) e CoronaVac (J–L) foi coletado e avaliado quanto à influência de comorbidades na produção de IgA anti-RBD (A, D, G, J) e IgG anti-RBD (B, E, H, K) e anti-spike (C, F, I, L) por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) descrito nos métodos. Os níveis de anticorpos obtidos do soro coletado no período de 1 mês após a terceira dose foram utilizados como parâmetro de comparação. Inicialmente, uma análise após a terceira

dose dos níveis de anticorpos IgA anti-RBD (A) e IgG anti-RBD (B) e anti-spike (C) foi realizada para todas as três vacinas e, posteriormente, de acordo com cada vacina (D–L). Os resultados são expressos pelo índice calculado entre a razão: densidade óptica média (OD) da amostra/cutoff (S/CO-Signal/Cutoff). Cada ponto representa um único indivíduo. Os números abaixo dos gráficos indicam o número de indivíduos avaliados segundo a presença ou ausência de comorbidades. O final da barra indica o valor mediano e as barras horizontais acima e abaixo da mediana indicam o intervalo de confiança de 95%. O teste Mann-Whitney U foi usado para comparar os níveis de anticorpos induzidos. A significância estatística foi adotada para $p < 0,05$.

Nenhuma das vacinas avaliadas demonstrou alteração na produção de IgG e IgA anti-RBD pelos indivíduos vacinados devido a presença de comorbidades (Figura 11). Em contrapartida, indivíduos sem comorbidades, vacinados com BNT162b2 induziram maior produção de IgG anti-spike em relação aos indivíduos com comorbidades ($p=0,0096$) (Figura 11I). A ausência de significância também foi observada quando a análise independente do grupo vacinal foi realizada (Figura 11A, 11B, 11C).

5.7 Análise da influência do histórico de infecção por SARS-CoV-2 sobre os níveis séricos de IgG e IgA

Com a finalidade de verificar se a infecção prévia pelo SARS-CoV-2 poderia interferir na produção dos anticorpos, foi realizada a comparação dos resultados obtidos de IgA e IgG anti-RBD e IgG anti-spike entre indivíduos que tiveram COVID-19 e os *naive* (não infectados). Como esse dado foi obtido mediante questionário aplicado à população, é possível haver inconsistências nas informações, já que alguns indivíduos podem ter apresentado a forma assintomática da infecção, e conseqüentemente, não terem relatado a doença.

Para IgA anti-RBD, os indivíduos vacinados com ChAdOx1 nCoV-19 ($p=0,0180$) e CoronaVac ($p =0,0136$) que foram infectados com SARS-CoV-2 em qualquer momento durante o estudo apresentaram níveis mais elevados de anticorpos 4 a 6 meses após a segunda dose em comparação com indivíduos não infectados (Figura 12A). O mesmo foi observado para IgG anti-RBD, em indivíduos infectados com SARS-CoV-2 do grupo CoronaVac, que também apresentaram níveis de anticorpos mais elevados em relação a indivíduos não infectados ($p=0,0485$) (Figura 12B). A avaliação dos níveis de IgG anti-spike não apresentou significância estatística (Figura 12C).

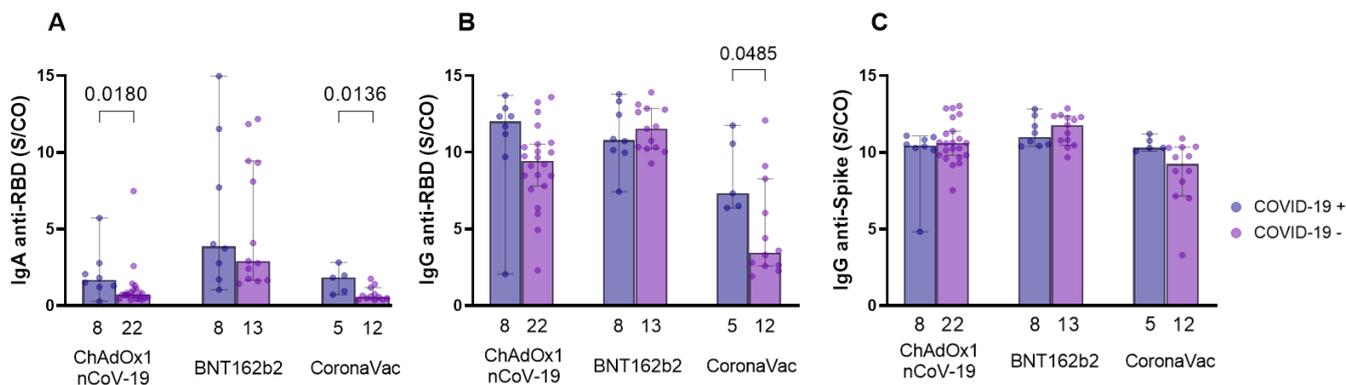


Figura 12: Análise da produção sérica de IgA anti-RBD e IgG anti-RBD e anti-spike em relação ao histórico de infecção por SARS-CoV-2. O soro de indivíduos imunizados com ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac foi coletado em T3 (4–6 meses após a aplicação da segunda dose ou pré-terceira dose - (A–C)) para avaliar a influência do histórico de infecção por SARS-CoV-2 na produção de anticorpos. Um total de 22 indivíduos relataram infecção por SARS-CoV-2 em algum momento antes ou durante o estudo. A detecção de anticorpos IgA anti-RBD (A) e IgG anti-RBD (B) e anti-spike (C) foi realizada por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) descrito nos métodos. Os resultados são expressos através do índice calculado entre a razão: densidade óptica média (DO) da amostra/cutoff (S/CO-Signal/Cutoff). Cada ponto representa um único indivíduo. Os números abaixo dos gráficos indicam a quantidade de indivíduos avaliados de acordo com o histórico de COVID-19 e a vacina avaliada. O final da barra indica o valor mediano e as barras horizontais acima e abaixo da mediana indicam o intervalo de confiança de 95%. O teste Mann-Whitney U foi usado para comparar os níveis de anticorpos induzidos entre as vacinas. A significância estatística foi adotada para $p < 0,05$.

Não observamos significância em outros momentos avaliados (Figura 13) para IgA e IgG anti-RBD. Para IgG anti-spike, foi detectado que indivíduos não infectados com SARS-COV-2, vacinados com ChAdOx1 nCoV-19, induziram níveis mais altos de anticorpos 1 mês após a segunda dose ($p = 0,0330$) (Figura 13F). 1 mês após a terceira dose indivíduos não infectados com SARS-COV-2, vacinados com CoronaVac, produziram níveis superiores desse anticorpo em relação aos infectados ($p=0,0333$) (Figura 13I).

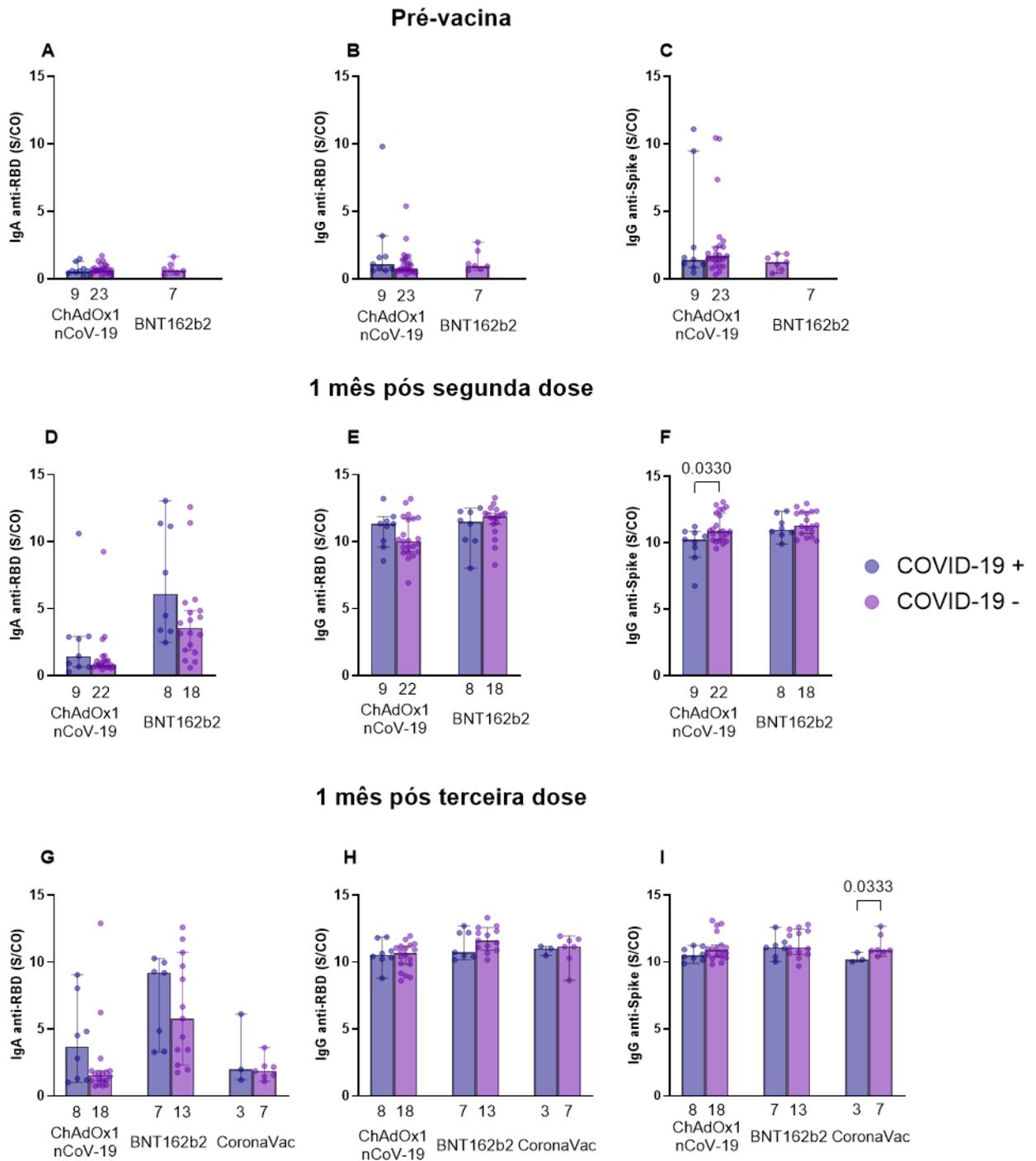


Figura 13: Análise da produção sérica de IgA anti-RBD e IgG anti-RBD e anti-spike em relação ao histórico de infecção por SARS-CoV-2 para cada período de coleta. O soro de indivíduos imunizados com ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac foi coletado nos momentos T1 (pré-vacina—(A–C)), T2 (1 mês após a aplicação da segunda dose—(D–F)) e T4 (1 mês após a aplicação da terceira dose—(G–I)). A detecção de anticorpos IgA anti-RBD (A, D, G) e IgG anti-RBD (B, E, H) e anti-spike (C, F, I) foi realizada através do imunoenensaio enzimático (ELISA), descrito nos métodos, para avaliar a influência do histórico de infecção por SARS-CoV-2 na produção de anticorpos. Os

resultados são expressos através do índice calculado entre a razão: densidade óptica média (DO) da amostra/cutoff (S/CO-Signal/Cutoff). Cada ponto representa um único indivíduo. Os números abaixo dos gráficos indicam o número de indivíduos avaliados de acordo com o histórico de COVID-19 e grupo vacinal. O final da barra indica o valor mediano e as barras horizontais acima e abaixo da mediana indicam o intervalo de confiança de 95%. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparar os níveis de anticorpos induzidos entre as vacinas. A significância estatística foi adotada para $p < 0,05$.

5.8 Comparação da produção de IgG anti-spike e anti-RBD em diferentes tempos para diferentes vacinas

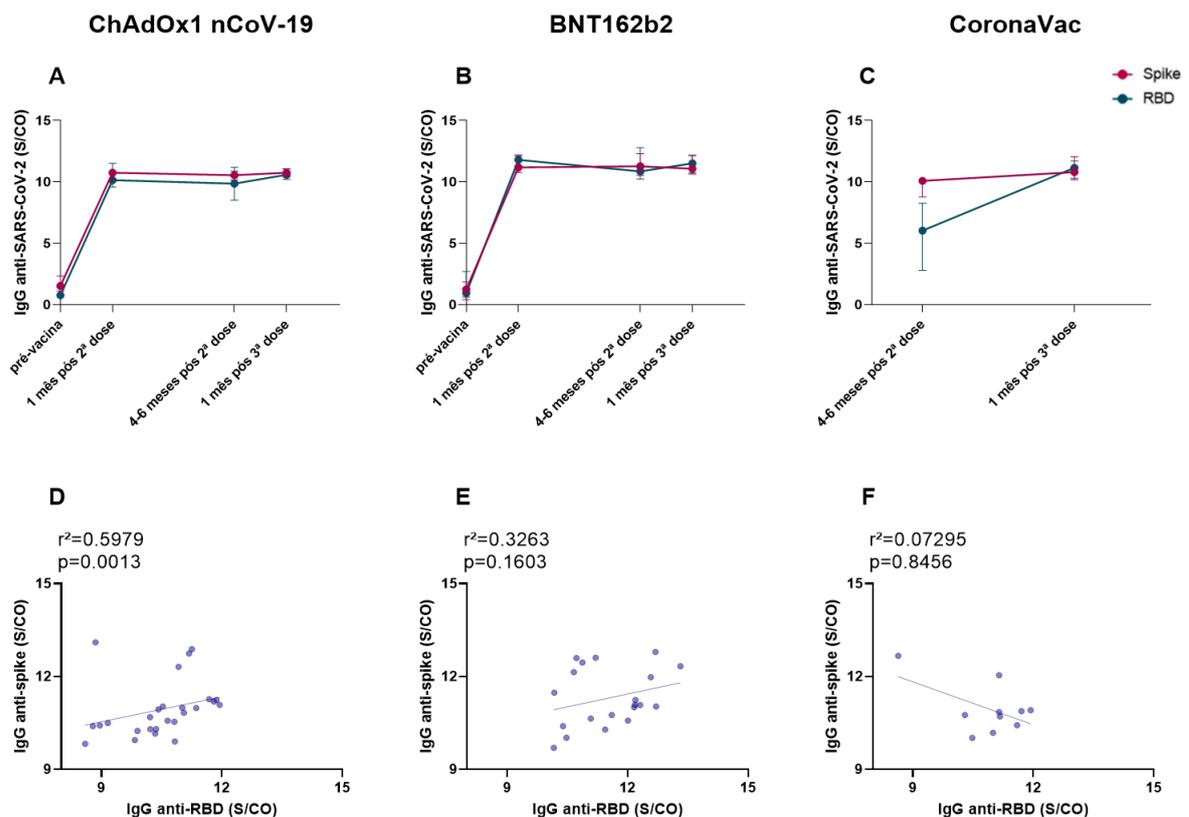


Figura 14: Análise da produção sérica de IgG anti-RBD e anti-spike em relação ao período de coleta e grupo vacinal. O soro de indivíduos imunizados com ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac foi coletado em T1 (pré-vacina), T2 (1 mês após a aplicação da segunda dose), T3 (4–6 meses após a aplicação da segunda dose ou pré -terceira dose) e T4 (1 mês após a aplicação da terceira dose). As proteínas Spike e RBD foram comparadas de acordo com o grupo vacinal, ChAdOx1 nCoV-19 (A), BNT162b2 (B) e CoronaVac (C) e períodos de coleta. Uma análise de associação foi realizada entre IgG anti-spike e anti-RBD de acordo com ChAdOx1 nCoV-19 (D), BNT162b2 (E) e CoronaVac (F), no período de coleta T4. A detecção de anticorpos IgG anti-RBD e anti-spike foi realizada por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA), descrito nos métodos. Os resultados são expressos através do índice calculado entre a razão: densidade óptica média (DO) da amostra/cutoff (S/CO-Signal/Cutoff). Cada ponto representa o valor mediano de cada período de coleta. As barras horizontais acima e abaixo

da mediana indicam o intervalo de confiança de 95%. A correlação de Spearman para cada classe de anticorpo contra as proteínas RBD e Spike do SARS-CoV-2 foi analisada por meio de regressão não linear. A significância estatística foi adotada para $p < 0,05$. A existência de correlação foi adotada para $r^2 > 0,5$.

Por fim, investigamos a produção de IgG anti-spike e anti-RBD em nossa coorte, independentemente de regimes de vacinação homólogos ou heterólogos, e também fizemos uma análise de associação entre os dois anticorpos. As análises da produção foram realizadas entre as medianas de cada período de coleta (Figura 14A–C). A comparação de IgG anti-spike e anti-RBD, avaliada de acordo com cada grupo de vacina e período de coleta, mostrou que todos os vacinados produziram níveis semelhantes de ambos os anticorpos (Figura 14A–C). A análise de associação revelou uma correlação positiva entre IgG anti-spike e anti-RBD, para vacinados do grupo ChAdOx1 nCoV-19 ($r^2 = 0,5979$, $p = 0,0013$) (Figura 14D), após a terceira dose com BNT162b2. Nenhuma correlação foi detectada para indivíduos dos grupos BNT162b2 e CoronaVac (Figura 14E, 14F).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos a resposta imune humoral específica contra as proteínas RBD e spike após a vacinação para COVID-19 com três formulações de vacina: ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 e CoronaVac. Os dados mostraram que, após o regime de vacinação primária (regime de duas doses), todos os vacinados apresentaram um aumento nos níveis de IgG e IgA anti-RBD e IgG anti-spike e foram capazes de manter esses níveis de anticorpos por 4 a 6 meses após duas doses. BNT162b2 induziu maior produção de IgG e IgA anti-RBD e IgG anti-spike em comparação com ChAdOx1 nCoV-19. A aplicação da dose de reforço (terceira dose de BNT162b2) proporcionou aumento dos níveis de anticorpos, principalmente para os indivíduos vacinados com a CoronaVac, indicando a importância da terceira dose no auxílio à indução de uma resposta humoral robusta. O grupo da CoronaVac apresentou níveis de anticorpos mais baixos em 1 mês e 4-6 meses após a segunda dose da vacina em comparação com as outras vacinas. Nesse caso, o reforço com BNT162b2 pôde compensar os níveis mais baixos de anticorpos obtidos após a segunda dose em vacinados com a CoronaVac. Uma maior produção de IgG e IgA anti-RBD no período de coleta de 4 a 6 meses após a administração da segunda dose, foi observada em indivíduos que relataram COVID-19 em seu questionário.

A longevidade da resposta imune induzida pelas vacinas pode variar de acordo com a plataforma vacinal utilizada, entre outros fatores. Encontramos níveis positivos de anticorpos IgG e IgA anti-RBD e IgG anti-spike até 4-6 meses após a segunda dose para as três formulações de vacina avaliadas. Da mesma forma, em outros estudos usando soros de indivíduos imunizados com vacinas de mRNA, como mRNA-1273 (Moderna), a atividade de anticorpos neutralizantes e de ligação contra variantes de SARS-CoV-2 foi detectada seis meses após o regime primário de vacinação (Doria-Rose et al., 2021; Pegu et al., 2021). Maior longevidade do anticorpo foi observada no grupo BNT162b2, uma vez que níveis mais altos de IgA e IgG anti-RBD e IgG anti-spike foram detectados em indivíduos vacinados com BNT162b2 4 a 6 meses após a segunda dose. Não detectamos redução significativa nos níveis de anticorpos entre os períodos de 1 mês e 4-6 meses após a segunda dose, indicando níveis séricos estáveis de IgA e IgG para ambas as proteínas avaliadas.

O uso de doses de reforço já se mostrou essencial na melhora da resposta imune, principalmente contra variantes do SARS-CoV-2 (Chenchula et al., 2022). A

aplicação da terceira dose foi feita em regime heterólogo ou homólogo. Embora a vacinação homóloga tenha induzido uma resposta imune satisfatória e protetora, a vacinação heteróloga demonstrou maior imunogenicidade, como observado em indivíduos previamente vacinados com ChAdOx1 nCoV-19 (Chiu et al., 2021) ou CoronaVac (Çağlayan et al., 2022) que receberam BNT162b2 como terceira dose. Outro estudo, de Filardi et al., 2023, também indicou uma resposta imune mais forte (IgG anti-spike e anti-RBD e anticorpos neutralizantes) em vacinados imunizados com CoronaVac como regime primário e uma dose de reforço com BNT162b2 em comparação com regime homólogo de CoronaVac, com maior taxa de hospitalização e morte e eficácia reduzida no regime CoronaVac/CoronaVac (Filardi et al., 2023). Indivíduos vacinados com esquema homólogo por BNT162b2 não apresentaram melhora nos níveis de anticorpos após a terceira dose. Indivíduos vacinados inicialmente com CoronaVac se beneficiaram com a aplicação da dose de reforço heteróloga de BNT162b2, pois os níveis de IgG e IgA anti-RBD e IgG anti-spike aumentaram após a aplicação da terceira dose, conforme demonstrado por Zuo et al., 2022 (Zuo et al., 2022) e Clemens et al., 2022 (Clemens et al., 2022). Com base nos dados obtidos por essa pesquisa e nos dados da literatura, propomos que ambos os regimes, homólogo e heterólogo, parecem boas estratégias para induzir altos títulos de anticorpos contra SARS-CoV-2 e possivelmente contra variantes virais, mas o reforço heterólogo parece ser mais benéfico na indução da produção desses anticorpos, como mencionado por Filardi et al., 2023 (Filardi et al., 2023).

Para avaliar se fatores do hospedeiro, como sexo, idade e comorbidades, poderiam influenciar na resposta às vacinas, esses fatores foram avaliados para observar alterações na produção de IgG e IgA anti-RBD e IgG anti-spike, uma vez que algumas características do hospedeiro podem interferir no desenvolvimento de respostas imunes contra SARS-CoV-2 (Fernandes et al., 2023). Não foram observadas diferenças entre homens e mulheres do mesmo grupo vacinal na indução da resposta imune humoral. No entanto, com base em nossos resultados, foi observada uma maior indução de anticorpos por homens pertencentes ao grupo BNT162b2 quando comparados a homens e mulheres de outros grupos, o que pode ser explicado por uma resposta global de anticorpos mais elevada em indivíduos imunizados com a vacina de mRNA. Essas distinções observadas entre os sexos na indução de respostas imunes estão relacionadas à presença de diferentes hormônios sexuais e possíveis genes imunes reguladores presentes no cromossomo X (Falahi et al., 2021). Isso pode ajudar

a explicar por que, na maioria dos estudos de vacinas, níveis mais altos de anticorpos foram observados em mulheres (Bayram et al., 2021; Fujigaki et al., 2022). A maior produção de anticorpos em homens encontrada em nosso estudo difere dos dados da literatura, o que pode ser explicado pelo tamanho da amostra e pelas variações na distribuição de homens e mulheres entre os grupos vacinais.

A próxima avaliação realizada de acordo com as características biológicas foi o efeito da idade na produção de anticorpos. Já foi demonstrado que o envelhecimento é responsável por uma diminuição da função imune celular devido ao processo conhecido como imunossenescência (Poland et al., 2018; Dietz et al., 2023). Além disso, também pode afetar a produção de anticorpos de alta afinidade porque esses indivíduos normalmente não conseguem induzir uma resposta robusta de células B (Cancro et al., 2009; Frasca et al., 2011; Dietz et al., 2023). Em nosso estudo, a idade influenciou na produção de IgG e IgA anti-RBD e IgG anti-spike, pois foi observada maior indução desses anticorpos em indivíduos mais jovens pertencentes ao grupo BNT162b2 nos momentos de coleta pós-vacinal. Não observamos diferenças nos níveis de IgG e IgA anti-RBD e IgG anti-spike entre indivíduos de diferentes idades do mesmo grupo vacinal. Alguns estudos, como o de Sugiyama et al., 2022, apontam para uma resposta imune humoral mais robusta induzida em indivíduos mais jovens após um regime de duas doses de mRNA-1273 ou BNT162b2 (Sugiyama et al., 2022). Segundo Medeiros et al., 2022, após duas doses da CoronaVac, indivíduos com mais de 55 anos apresentaram menor indução de resposta imune celular e humoral (Medeiros et al., 2022). Neste trabalho, observamos padrões distintos de produção de anticorpos de acordo com as diferentes faixas etárias, o que pode ser explicado, entre outros fatores, pela variação de idade presente nos grupos vacinais e outras características inerentes a cada vacinado.

Embora a presença de comorbidades possa dificultar a indução de respostas imunes por diferentes vacinas (Zimmermann et al., 2019; Dietz et al., 2023; Liu et al., 2023), em nosso estudo não observamos diferenças estatísticas entre os níveis de IgG e IgA anti-RBD e a presença de comorbidades. Por outro lado, indivíduos sem comorbidades, vacinados com BNT162b2, apresentaram níveis mais elevados de IgG anti-spike. Condições como hipertensão, doenças do sistema respiratório e doenças cardiovasculares podem exacerbar a COVID-19 (Yang et al., 2020 a). Portanto, o mesmo achado pode ser aplicado ao desenvolvimento de proteção imunológica induzida por vacinas em pessoas com doenças de base, conforme expresso por Dietz

et al., 2023, que observaram menor eficácia da vacina em indivíduos com comorbidades (Chung et al., 2021; Dietz et al., 2023). Este dado da literatura pode explicar a maior produção de IgG anti-spike em indivíduos sem comorbidades vacinados com BNT162b2 nesta coorte. A diversidade de comorbidades relatadas pelos participantes foi grande, tornando as doenças altamente heterogêneas e, portanto, difíceis de igualar. Isto pode ter influenciado em alguns dos resultados não significativos.

Nossa pesquisa demonstrou maior produção de IgG e IgA anti-RBD em indivíduos com histórico de infecção por SARS-CoV-2 em comparação a indivíduos *naive*, durante o período de coleta de 4 a 6 meses após a segunda dose, sugerindo que a infecção poderia ter potencializado a produção de anticorpos, principalmente para indivíduos do grupo CoronaVac. Essa hipótese pode ser corroborada pelo estudo realizado por Padoan et al., 2021, que mostraram níveis superiores de IgG anti-S-RBD em indivíduos previamente expostos ao SARS-CoV-2 e imunizados com duas doses da vacina BNT162b2 em comparação a indivíduos *naive* (Padoan et al., 2021). Chua et al., 2022 sugeriram que a exposição à proteína spike do SARS-CoV-2 por infecção natural poderia amplificar a resposta imune direcionada ao vírus e, conseqüentemente, vacinas baseadas na spike (como BNT162b2 e ChAdOx1 nCoV-19) funcionariam como um reforço para produção de anticorpos específicos (Chua et al., 2022 b). Isso poderia explicar por que os indivíduos em nossa coorte com infecção prévia por SARS-CoV-2 apresentaram níveis mais altos de IgA e IgG anti-RBD e IgG anti-spike em relação aos indivíduos não infectados, em 4 a 6 meses após a segunda dose.

Algumas limitações de nosso estudo incluem o tamanho da coorte e as diferenças entre idade e sexo em cada grupo de vacina. Essas limitações poderiam ter influenciado a análise da produção de anticorpos, mas a maioria dos resultados obtidos neste trabalho, como a longevidade da resposta dos anticorpos e níveis superiores de anticorpos induzidos pelo regime heterólogo, são semelhantes aos de outros estudos (Chiu et al., 2021; Doria-Rose et al., 2021; Padoan et al., 2021; Pegu et al., 2021; Çağlayan et al., 2022; Filardi et al., 2023). Outra limitação está relacionada aos períodos de coleta de sangue, que nem sempre foram pareados. Como a CoronaVac foi a primeira vacina a ser aplicada no Brasil, quando iniciamos a coleta das amostras de sangue de indivíduos imunizados por essa vacina, alguns intervalos de coleta já haviam sido ultrapassados. Apesar desses contratempos quanto aos períodos de coleta, pudemos observar que no período de 4 a 6 meses após a segunda dose, a maioria dos

imunizados com as três vacinas ainda apresentava níveis séricos detectáveis de IgG e IgA anti-RBD e IgG anti-spike. As coletas longitudinais para avaliações cinéticas impuseram limitações, pois vários indivíduos acabaram desistindo do estudo, o que dificultou a manutenção da coorte total nos períodos coletados. Além disso, como os dados sobre a infecção por SARS-CoV-2 foram obtidos por meio de um questionário aplicado aos participantes do estudo, é possível haver inconsistências nas informações, pois alguns indivíduos podem ter apresentado a forma assintomática da infecção e, conseqüentemente, a doença pode não ter sido relatada. Isso pode ter prejudicado a detecção precisa da influência da infecção por SARS-CoV-2 na produção de anticorpos.

A partir dos dados obtidos neste trabalho conseguimos avaliar como as diferentes plataformas vacinais se comportam na indução dos anticorpos e como os níveis das imunoglobulinas podem variar de acordo com as características inerentes de cada indivíduo.

7. CONCLUSÕES

Concluindo, duas doses das vacinas BNT162b2, ChAdOx1 nCoV-19 e CoronaVac foram suficientes para induzir níveis detectáveis de anticorpos IgG e IgA anti-RBD e IgG anti-spike. A dose de reforço heteróloga com BNT162b2 aumentou os níveis de IgA e IgG anti-RBD e IgG anti-spike para CoronaVac e IgA anti-RBD para vacinados do grupo ChAdOx1 nCoV-19. Além disso, indivíduos que apresentaram infecção por SARS-CoV-2 em qualquer momento do estudo apresentaram níveis mais elevados de IgA e IgG anti-RBD, 4 a 6 meses após a segunda dose, em comparação a indivíduos não infectados. Novos estudos envolvendo coortes maiores devem ser conduzidos para investigar e encontrar respostas para questões não resolvidas.

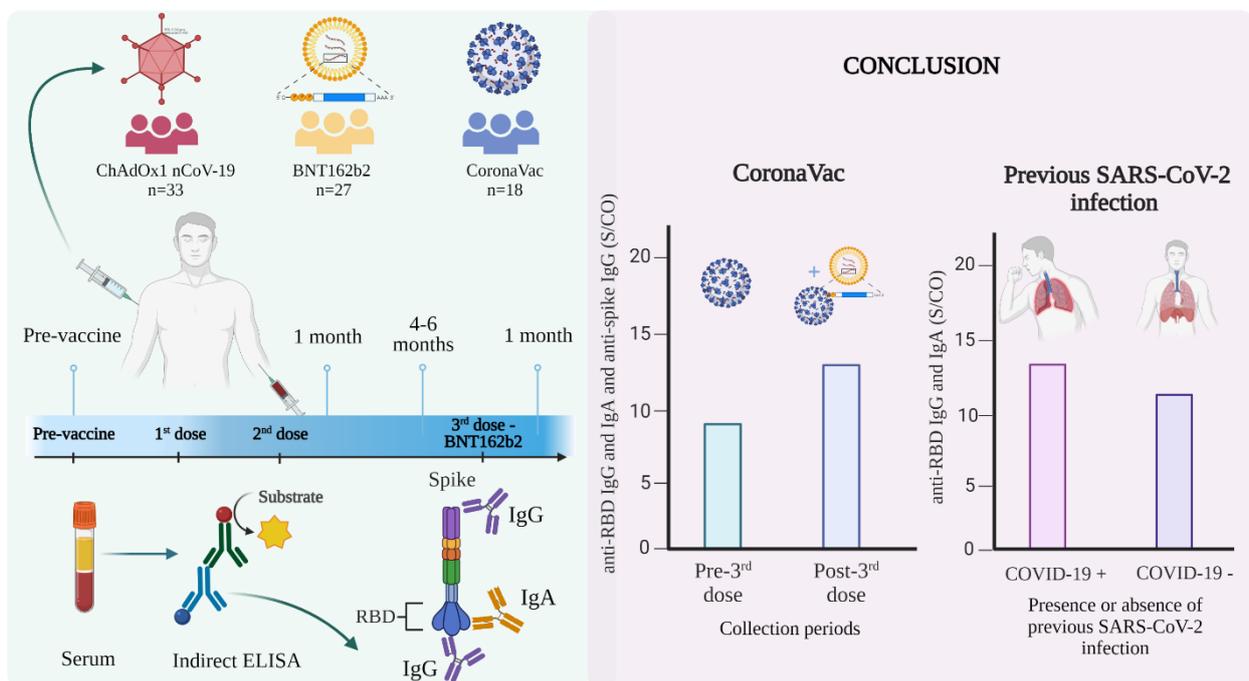


Figura 15: Resumo gráfico da metodologia e dados do estudo. Produzido no BioRender.

REFERÊNCIAS

- Abbink, P.; Lemckert, A. A. C.; Ewald, B. A.; Lynch, D. M.; Denholtz, M.; Smits, S.; Holterman, L.; Damen, I.; Vogels, R.; Thorner, A. R.; O'Brien, K. L.; Carville, A.; Mansfield, K. G.; Goudsmit, J.; Havenga, M. J. E.; Barouch, D. H., 2007: Comparative Seroprevalence and Immunogenicity of Six Rare Serotype Recombinant Adenovirus Vaccine Vectors from Subgroups B and D. *Journal of Virology.*, **81**, 4654–4663.
- Adeniji, O. S.; Giron, L. B.; Purwar, M.; Zilberstein, N. F.; Kulkarni, A. J.; Shaik, M. W.; Balk, R. A.; Moy, J. N.; Forsyth, C. B.; Liu, Q.; Dweep, H.; Kossenkov, A.; Weiner, D. B.; Keshavarzian, A.; Landay, A.; Abdel-Mohsen, M., 2021: COVID-19 Severity Is Associated with Differential Antibody Fc-Mediated Innate Immune Functions. *mBio.*, **12**.
- Alhandod, T. A.; Rabbani, S. I.; Almuqbil, M.; Alshehri, S.; Hussain, S. A.; Alomar, N. F.; Mir, M. A.; Asdaq, S. M. B., 2023, February 1: A Systematic Review on the Safety and Efficacy of COVID-19 Vaccines Approved in Saudi Arabia. *Vaccines*.
- Almadhi, M. A.; Abdulrahman, A.; Sharaf, S. A.; AlSaad, D.; Stevenson, N. J.; Atkin, S. L.; AlQahtani, M. M., 2021: The high prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection reveals the silent spread of COVID-19. *International Journal of Infectious Diseases.*, **105**, 656–661.
- Amanat, F.; Stadlbauer, D.; Strohmeier, S.; Nguyen, T. H. O.; Chromikova, V.; McMahon, M.; Jiang, K.; Arunkumar, G. A.; Jurczynszak, D.; Polanco, J.; Bermudez-Gonzalez, M.; Kleiner, G.; Aydililo, T.; Miorin, L.; Fierer, D. S.; Lugo, L. A.; Kojic, E. M.; Stoeber, J.; Liu, S. T. H. et al., 2020: A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature Medicine.*, **26**, 1033–1036.
- Andreato-Santos, R.; Machado, R. R. G.; Alves, R. P. dos S.; Sales, N. S.; Soares, C. P.; Rodrigues, K. B.; Silva, M. O.; Favaro, M. T. de P.; Rodrigues-Jesus, M. J.; Yamamoto, M. M.; Andrade, J. B. de; Fock, R. A.; Margarido, P. F. R.; Carvalho, C. R. G.; Boscardin, S. B.; Durigon, E. L.; Ferreira, L. C. S., 2022: Validation of Serological Methods for COVID-19 and Retrospective Screening of Health Employees and Visitors to the São Paulo University Hospital, Brazil. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.*, **12**.
- Angeli, F.; Spanevello, A.; Reboldi, G.; Visca, D.; Verdecchia, P., 2021: SARS-CoV-2 vaccines: Lights and shadows. *European Journal of Internal Medicine.*, **88**, 1–8.
- Anjos, D.; Fiaccadori, F. S.; Servian, C. do P.; da Fonseca, S. G.; Guilarde, A. O.;

Borges, M. A. S. B.; Franco, F. C.; Ribeiro, B. M.; Souza, M., 2022: SARS-CoV-2 loads in urine, sera and stool specimens in association with clinical features of COVID-19 patients. *Journal of Clinical Virology Plus.*, **2**.

Arbeláez-Cortés, Á.; Ana Beatriz Santos Bacchiega, Ananías García Cardona, Andrés F. Echeverri, Ángel González, A. G. L.; Beatriz Aristizábal, Carlos A. Cañas, Carlos E. Toro-Gutiérrez, César Jiménez Hernández, Christopher J. Lessard, C. M. P.; Dahyana Cadavid, Damaris E. Lopera H, Édgar Garavito Rodríguez, Eitan Israeli, Esperanza Ávalos-Díaz, F. B. A.; Felipe Cañas-Orduz, Gabriel J. Tobón, Gabriela Medina, Gerardo Quintana López, Gisele Zandman-Goddard, G. M. O.; Gloria Vásquez, Grégory Alfonso García Morán, Griselda Romero-Sánchez, Guilherme de Jesús, Howard Amital, I. E. M.; Jaime Alberto Díaz Galvis, Jenny Amaya-Amaya, John Castiblanco, Jorge H. Izquierdo, Juan Camilo Sarmiento-Monroy, J. C. S. P.; Juan Castellanos-de la Hoz, Juan Manuel Pino, Juan-Sebastián Franco, León Felipe Jaramillo, Lorena Bejarano-Pineda, L. A. M.; Luis Fernando Niño, Luis J. Jara, Luisa Marina Matheus Merino, Luz Elena Cano R, Manuel J. Amador-Patarroyo, M. B.; María Teresa Bernal, María-Teresa Arango, Mario García-Carrasco, Manuella Lima Gomes Ochtrup, Mauricio Arcos-Burgos, M. E.; Miguel A. Saavedra, Miri Blank, Mónica Ararat Sarria, Nazarena Ferreyra Solari, Nidia E. Correa, Nilson Ramírez de Jesús, O. V. L.; Oscar M. Pérez-Fernández, Paola Cruz-Tapias, Paola Ximena Coral-Alvarado, Paul Alejandro Méndez Patarroyo, P. Q. R.; Rafael Herrera Esparza, Rafael Parra-Medina, Rubén D. Mantilla, Sandra Ramírez-Clavijo, Smadar Gertel, Socorro Méndez Martínez, S. Z.; Stephanie Voorduin, Vinicius Domingues, Y. A. F., 2013: *AUTOIMMUNITY From Bench to Bedside*. (Anaya, J. M., Y. Shoenfeld, A. Rojas-Villarraga, R. A. Levy & R. Cervera, Eds.) 1^o. Colombia.

Aschenbrenner, A. C.; Mouktaroudi, M.; Krämer, B.; Oestreich, M.; Antonakos, N.; Nuesch-Germano, M.; Gkizeli, K.; Bonaguro, L.; Reusch, N.; Baßler, K.; Saridaki, M.; Knoll, R.; Pecht, T.; Kapellos, T. S.; Doulou, S.; Kröger, C.; Herbert, M.; Holsten, L.; Horne, A. et al., 2021: Disease severity-specific neutrophil signatures in blood transcriptomes stratify COVID-19 patients. *Genome medicine.*, **13**, 7.

Atmar, R. L.; Lyke, K. E.; Deming, M. E.; Jackson, L. A.; Branche, A. R.; El Sahly, H. M.; Rostad, C. A.; Martin, J. M.; Johnston, C.; Rupp, R. E.; Mulligan, M. J.; Brady, R. C.; Frenck, R. W.; Bäcker, M.; Kottkamp, A. C.; Babu, T. M.; Rajakumar, K.; Edupuganti, S.; Dobrzynski, D. et al., 2022: Homologous and Heterologous Covid-19 Booster Vaccinations. *New England Journal of Medicine.*, **386**, 1046–1057.

Awadasseid, A.; Wu, Y.; Tanaka, Y.; Zhang, W., 2021: Current advances in the development of sars-cov-2 vaccines. *International Journal of Biological Sciences.*, **17**, 8–19.

Baden, L. R.; El Sahly, H. M.; Essink, B.; Kotloff, K.; Frey, S.; Novak, R.; Diemert, D.; Spector, S. A.; Roupheal, N.; Creech, C. B.; McGettigan, J.; Khetan, S.; Segall, N.; Solis, J.; Brosz, A.; Fierro, C.; Schwartz, H.; Neuzil, K.; Corey, L. et al., 2021: Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *New England Journal of Medicine.*, **384**, 403–416.

Bar-On, Y. M.; Goldberg, Y.; Mandel, M.; Bodenheimer, O.; Amir, O.; Freedman, L.; Alroy-Preis, S.; Ash, N.; Huppert, A.; Milo, R., 2022: Protection by a Fourth Dose of BNT162b2 against Omicron in Israel. *New England Journal of Medicine.*, **386**, 1712–1720.

Barros-Martins, J.; Hammerschmidt, S. I.; Cossmann, A.; Odak, I.; Stankov, M. V.; Morillas Ramos, G.; Dopfer-Jablonka, A.; Heidemann, A.; Ritter, C.; Friedrichsen, M.; Schultze-Florey, C.; Ravens, I.; Willenzon, S.; Bubke, A.; Ristenpart, J.; Janssen, A.; Ssebyatika, G.; Bernhardt, G.; Münch, J. et al., 2021: Immune responses against SARS-CoV-2 variants after heterologous and homologous ChAdOx1 nCoV-19/BNT162b2 vaccination. *Nature Medicine.*, **27**, 1525–1529.

Barry, M., 2018: Single-cycle adenovirus vectors in the current vaccine landscape. *Expert Review of Vaccines.*, **17**, 163–173.

Baumgarth, N., 2011: The double life of a B-1 cell: Self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature Reviews Immunology.*, **11**, 34–46.

Bayram, A.; Demirbakan, H.; Günel Karadeniz, P.; Erdoğan, M.; Koçer, I., 2021: Quantitation of antibodies against SARS-CoV-2 spike protein after two doses of CoronaVac in healthcare workers. *Journal of Medical Virology.*, **93**, 5560–5567.

Bhattacharya, M., 2019: Understanding B Lymphocyte Development: A Long Way to Go. *Lymphocytes.*

Binay, U.; Karakeçili, F.; Binali, E.; Barkay, O.; Gul, O.; Mertoglu, C., 2021: Level of SARS-CoV-2 IgG antibodies after two doses CoronaVac vaccine: Primarily report. *Journal of Antivirals & Antiretrovirals.*, **13**, 005.

Biotech, J., 2021: Janssen Ad26.COVS.S Vaccine for the Prevention of COVID-19. *Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting.*

Borgonovo, F.; Passerini, M.; Piscaglia, M.; Morena, V.; Giacomelli, A.; Oreni, L.; Dedivitiis, G.; Lupo, A.; Falvella, S.; Cossu, M. V.; Capetti, A. F., 2021: Is COVID-

19 severity associated with anti-spike antibody duration? Data from the ARCOVID prospective observational study. *Journal of Infection.*, **82**, e28–e30.

Brubaker, S. W.; Bonham, K. S.; Zanoni, I.; Kagan, J. C., 2015: Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. *Annu Rev Immunol.*, **33**, 257–290.

Çağlayan, D.; Süner, A. F.; Şiyve, N.; Güzel, I.; Irmak, Ç.; Işık, E.; Appak, Ö.; Çelik, M.; Öztürk, G.; Alp Çavuş, S.; Ergör, G.; Sayiner, A.; Ergör, A.; Demiral, Y.; Kiliç, B., 2022: An analysis of antibody response following the second dose of CoronaVac and humoral response after booster dose with BNT162b2 or CoronaVac among healthcare workers in Turkey. *Journal of Medical Virology.*, **94**, 2212–2221.

Cancro, M. P.; Hao, Y.; Scholz, J. L.; Riley, R. L.; Frasca, D.; Dunn-Walters, D. K.; Blomberg, B. B., 2009, July: B cells and aging: molecules and mechanisms. *Trends in Immunology*.

Carter, P. J.; Lazar, G. A., 2018: Next generation antibody drugs: Pursuit of the ‘high-hanging fruit’. *Nature Reviews Drug Discovery.*, **17**, 197–223.

CDC, 2020: Pandemic planning scenarios.

CDC, 2021: Interim Clinical Considerations for Use of COVID-19 Vaccines Currently Approved or Authorized in the United States.

CDC; IDSA, 2023: SARS-CoV-2 Variants.

Chemaitelly, H.; Tang, P.; Hasan, M. R.; AlMukdad, S.; Yassine, H. M.; Benslimane, F. M.; Al Khatib, H. A.; Coyle, P.; Ayoub, H. H.; Al Kanaani, Z.; Al Kuwari, E.; Jeremijenko, A.; Kaleeckal, A. H.; Latif, A. N.; Shaik, R. M.; Abdul Rahim, H. F.; Nasrallah, G. K.; Al Kuwari, M. G.; Al Romaihi, H. E. et al., 2021: Waning of BNT162b2 Vaccine Protection against SARS-CoV-2 Infection in Qatar. *New England Journal of Medicine.*, **385**, e83.

Chen, J.; Wang, R.; Gilby, N. B.; Wei, G. W., 2022a: Omicron Variant (B.1.1.529): Infectivity, Vaccine Breakthrough, and Antibody Resistance. *Journal of Chemical Information and Modeling.*, **62**, 412–422.

Chen, J. S.; Chow, R. D.; Song, E.; Mao, T.; Israelow, B.; Kamath, K.; Bozekowski, J.; Haynes, W. A.; Filler, R. B.; Menasche, B. L.; Wei, J.; Alfajaro, M. M.; Song, W.; Peng, L.; Carter, L.; Weinstein, J. S.; Gowthaman, U.; Chen, S.; Craft, J. et al., 2022b: High-affinity, neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 can be made without T follicular helper cells. *Science Immunology.*, **7**.

Chenchula, S.; Karunakaran, P.; Sharma, S.; Chavan, M., 2022: Current evidence on efficacy of COVID-19 booster dose vaccination against the Omicron variant: A

systematic review. *Journal of Medical Virology.*, **94**, 2969–2976.

Chiu, N. C.; Chi, H.; Tu, Y. K.; Huang, Y. N.; Tai, Y. L.; Weng, S. L.; Chang, L.; Huang, D. T. N.; Huang, F. Y.; Lin, C. Y., 2021: To mix or not to mix? A rapid systematic review of heterologous prime–boost covid-19 vaccination. *Expert Review of Vaccines.*, **20**, 1211–1220.

Chodick, G.; Tene, L.; Patalon, T.; Gazit, S.; Tov, A. Ben; Cohen, D.; Muhsen, K., 2021: Assessment of effectiveness of 1 dose of BNT162B2 vaccine for SARS-CoV-2 infection 13 to 24 days after immunization. *JAMA Network Open.*, **4**, 1–9.

Chua, J. X.; Durrant, L. G.; Chok, Y. L.; Lai, O. M., 2022a: ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2 and CoronaVac vaccines do not induce as strong neutralising antibodies with broad variant protection as infection and suggest vaccines that induce broader sterilising immunity are essential to stop the pandemic. *preprint*.

Chua, J. X.; Durrant, L. G.; Chok, Y. L.; Lai, O. M., 2022b: Susceptibility to SARS-CoV-2 omicron following ChAdOx1 nCoV-19 and BNT162b2 versus CoronaVac vaccination. *iScience.*, **25**.

Chua, R. L.; Lukassen, S.; Trump, S.; Hennig, B. P.; Wendisch, D.; Pott, F.; Debnath, O.; Thürmann, L.; Kurth, F.; Völker, M. T.; Kazmierski, J.; Timmermann, B.; Twardziok, S.; Schneider, S.; Machleidt, F.; Müller-Redetzky, H.; Maier, M.; Krannich, A.; Schmidt, S. et al., 2020: COVID-19 severity correlates with airway epithelium–immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nature Biotechnology.*, **38**, 970–979.

Chung, H.; He, S.; Nasreen, S.; Sundaram, M. E.; Buchan, S. A.; Wilson, S. E.; Chen, B.; Calzavara, A.; Fell, D. B.; Austin, P. C.; Wilson, K.; Schwartz, K. L.; Brown, K. A.; Gubbay, J. B.; Basta, N. E.; Mahmud, S. M.; Righolt, C. H.; Svenson, L. W.; MacDonald, S. E. et al., 2021: Effectiveness of BNT162b2 and mRNA-1273 covid-19 vaccines against symptomatic SARS-CoV-2 infection and severe covid-19 outcomes in Ontario, Canada: Test negative design study. *The BMJ.*, **374**, 1–12.

Clemens, S. A. C.; Weckx, L.; Clemens, R.; Almeida Mendes, A. V.; Ramos Souza, A.; Silveira, M. B. V.; da Guarda, S. N. F.; de Nobrega, M. M.; de Moraes Pinto, M. I.; Gonzalez, I. G. S.; Salvador, N.; Franco, M. M.; de Avila Mendonça, R. N.; Queiroz Oliveira, I. S.; de Freitas Souza, B. S.; Fraga, M.; Aley, P.; Bibi, S.; Cantrell, L. et al., 2022: 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.*, **399**, 521–529.

Crystal, R. G., 2014: Adenovirus: The first effective in vivo gene delivery vector. *Human Gene Therapy.*, **25**, 3–11.

CSSE, 2023: COVID-19 Dashboard.

Cunha, L. E. R.; Stolet, A. A.; Strauch, M. A.; Pereira, V. A. R.; Dumard, C. H.; Gomes, A. M. O.; Monteiro, F. L.; Higa, L. M.; Souza, P. N. C.; Fonseca, J. G.; Pontes, F. E.; Meirelles, L. G. R.; Albuquerque, J. W. M.; Sacramento, C. Q.; Fintelman-Rodrigues, N.; Lima, T. M.; Alvim, R. G. F.; Marsili, F. F.; Caldeira, M. M. et al., 2021: Polyclonal F(ab')₂ fragments of equine antibodies raised against the spike protein neutralize SARS-CoV-2 variants with high potency. *iScience.*, **24**.

Dai, L.; Gao, G. F., 2021: Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nature Reviews Immunology.*, **21**, 73–82.

Dan, J. M.; Mateus, J.; Kato, Y.; Hastie, K. M.; Yu, E. D.; Faliti, C. E.; Grifoni, A.; Ramirez, S. I.; Haupt, S.; Frazier, A.; Nakao, C.; Rayaprolu, V.; Rawlings, S. A.; Peters, B.; Krammer, F.; Simon, V.; Saphire, E. O.; Smith, D. M.; Weiskopf, D. et al., 2021: Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science.*, **371**.

Danese, E.; Montagnana, M.; Salvagno, G. L.; Peserico, D.; Pighi, L.; De Nitto, S.; Henry, B. M.; Porru, S.; Lippi, G., 2021: Comprehensive assessment of humoral response after Pfizer BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccination: a three-case series. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.*, **59**, 1585–1591.

Das, A.; Ahmed, R.; Akhtar, S.; Begum, K.; Banu, S., 2021: An overview of basic molecular biology of SARS-CoV-2 and current COVID-19 prevention strategies. *Gene Reports.*, **23**.

Delrue, I.; Verzele, D.; Madder, A.; Nauwynck, H. J., 2012: Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: Merits, risks and challenges. *Expert Review of Vaccines.*, **11**, 695–719.

Deming, M. E.; Lyke, K. E., 2021: A 'mix and match' approach to SARS-CoV-2 vaccination. *Nature Medicine.*, **27**, 1510–1511.

Demonbreun, A. R.; Sancilio, A.; Velez, M. P.; Ryan, D. T.; Saber, R.; Vaught, L. A.; Reiser, N. L.; Hsieh, R. R.; D'Aquila, R. T.; Mustanski, B.; McNally, E. M.; McDade, T. W., 2021: Comparison of IgG and neutralizing antibody responses after one or two doses of COVID-19 mRNA vaccine in previously infected and uninfected individuals. *EClinicalMedicine.*, **38**, 101018.

Dietz, L. L.; Juhl, A. K.; Sjøgaard, O. S.; Reekie, J.; Nielsen, H.; Johansen, I. S.;

Benfield, T.; Wiese, L.; Stærke, N. B.; Jensen, T. Ø.; Jakobsen, S. F.; Olesen, R.; Iversen, K.; Fogh, K.; Bodilsen, J.; Petersen, K. T.; Larsen, L.; Madsen, L. W.; Lindvig, S. O. et al., 2023: Impact of age and comorbidities on SARS-CoV-2 vaccine-induced T cell immunity. *Communications Medicine.*, **3**, 58.

Doria-Rose, N.; Suthar, M. S.; Makowski, M.; O’Connell, S., 2021: Antibody Persistence through 6 Months after the Second Dose of mRNA-1273 Vaccine for Covid-19. *New England Journal of Medicine.*, **384**, 2257–2259.

Falahi, S.; Kenarkoohi, A., 2021: Sex and gender differences in the outcome of patients with COVID-19. *Journal of Medical Virology.*, **93**, 151–152.

Fehr, A. R.; Perlman, S., 2015: Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronaviruses: Methods and Protocols.*, **1282**, 1–23.

Fernandes, M. da C. R.; Vasconcelos, G. S.; de Melo, A. C. L.; Matsui, T. C.; Caetano, L. F.; de Carvalho Araújo, F. M.; Fonseca, M. H. G., 2023, April 1: Influence of age, gender, previous SARS-CoV-2 infection, and pre-existing diseases in antibody response after COVID-19 vaccination: A review. *Molecular Immunology.*

Filardi, B. A.; Monteiro, V. S.; Schwartzmann, P. V.; Martins, V. do P.; Zucca, L. E. R.; Baiocchi, G. C.; Malik, A. A.; Silva, J.; Hahn, A. M.; Chen, N. F. G.; Pham, K.; Pérez-Then, E.; Miric, M.; Brache, V.; Cochon, L.; Larocca, R. A.; Mendez, R. D. R.; Silveira, D. B.; Pinto, A. R. et al., 2023: *Age-dependent impairment in antibody responses elicited by a homologous CoronaVac booster dose.*

Frasca, D.; Diaz, A.; Romero, M.; Landin, A. M.; Blomberg, B. B., 2011, July: Age effects on B cells and humoral immunity in humans. *Ageing Research Reviews.*

Frenck, R. W.; Klein, N. P.; Kitchin, N.; Gurtman, A.; Absalon, J.; Lockhart, S.; Perez, J. L.; Walter, E. B.; Senders, S.; Bailey, R.; Swanson, K. A.; Ma, H.; Xu, X.; Koury, K.; Kalina, W. V; Cooper, D.; Jennings, T.; Brandon, D. M.; Thomas, S. J. et al., 2021: Safety, Immunogenicity, and Efficacy of the BNT162b2 Covid-19 Vaccine in Adolescents. *The New England journal of medicine.*, 1–12.

Fujigaki, H.; Yamamoto, Y.; Koseki, T.; Banno, S.; Ando, T.; Ito, H.; Fujita, T.; Naruse, H.; Hata, T.; Moriyama, S.; Takahashi, Y.; Suzuki, T.; Murakami, T.; Yoshida, Y.; Yagura, Y.; Oyamada, T.; Takemura, M.; Kondo, M.; Iwata, M. et al., 2022: *Antibody Responses to BNT162b2 Vaccination in Japan: Monitoring Vaccine Efficacy by Measuring IgG Antibodies against the Receptor-Binding Domain of SARS-CoV-2.*

Gao, Y.; Li, T.; Han, M.; Li, X.; Wu, D.; Xu, Y.; Zhu, Y.; Liu, Y.; Wang, X.; Wang,

L., 2020: Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. *Journal of Medical Virology*.

Garcia-Beltran, W. F.; Lam, E. C.; St. Denis, K.; Nitido, A. D.; Garcia, Z. H.; Hauser, B. M.; Feldman, J.; Pavlovic, M. N.; Gregory, D. J.; Poznansky, M. C.; Sigal, A.; Schmidt, A. G.; Iafrate, A. J.; Naranbhai, V.; Balazs, A. B., 2021: Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell*, **184**, 2372-2383.e9.

Geers, D.; Shamier, M. C.; Bogers, S.; den Hartog, G.; Gommers, L.; Nieuwkoop, N. N.; Schmitz, K. S.; Rijsbergen, L. C.; van Osch, J. A. T.; Dijkhuizen, E.; Smits, G.; Comvalius, A.; van Mourik, D.; Caniels, T. G.; van Gils, M. J.; Sanders, R. W.; Oude Munnink, B. B.; Molenkamp, R.; de Jager, H. J. et al., 2021: SARS-CoV-2 variants of concern partially escape humoral but not T-cell responses in COVID-19 convalescent donors and vaccine recipients. *Science Immunology*, **6**, 1–15.

GISAID, 2023: covSPECTRUM.

Glowacka, I.; Bertram, S.; Müller, M. A.; Allen, P.; Soilleux, E.; Pfefferle, S.; Steffen, I.; Tsegaye, T. S.; He, Y.; Gnirss, K.; Niemeyer, D.; Schneider, H.; Drosten, C.; Pöhlmann, S., 2011: Evidence that TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Membrane Fusion and Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response. *Journal of Virology*, **85**, 4122–4134.

Goh, Y. S.; Chavatte, J. M.; Lim Jieling, A.; Lee, B.; Hor, P. X.; Amrun, S. N.; Lee, C. Y. P.; Chee, R. S. L.; Wang, B.; Lee, C. Y.; Ngoh, E. Z. X.; Wang, C. I.; Young, B. E.; Tambyah, P. A.; Kalimuddin, S.; Pada, S.; Tan, S. Y.; Sun, L. J.; Chen, M. I. C. et al., 2021: Sensitive detection of total anti-Spike antibodies and isotype switching in asymptomatic and symptomatic individuals with COVID-19. *Cell Reports Medicine*, **2**, 100193.

Grifoni, A.; Weiskopf, D.; Ramirez, S. I.; Mateus, J.; Dan, J. M.; Moderbacher, C. R.; Rawlings, S. A.; Sutherland, A.; Premkumar, L.; Jadi, R. S.; Marrama, D.; de Silva, A. M.; Frazier, A.; Carlin, A. F.; Greenbaum, J. A.; Peters, B.; Krammer, F.; Smith, D. M.; Crotty, S. et al., 2020: Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*, **181**, 1489–1501.

Gupta, S. L.; Jaiswal, R. K., 2023: An Assessment of the Bivalent Vaccine as a Second Booster for COVID-19. *Vaccines*, **11**, 11–13.

Hadjadj, J.; Yatim, N.; Barnabei, L.; Corneau, A.; Boussier, J., 2020: Impaired type I

interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science.*, **369**, 718–724.

Han, X.; Ye, Q., 2022: The variants of SARS-CoV-2 and the challenges of vaccines. *Journal of Medical Virology.*

Harvey, W. T.; Carabelli, A. M.; Jackson, B.; Gupta, R. K.; Thomson, E. C.; Harrison, E. M.; Ludden, C.; Reeve, R.; Rambaut, A.; Peacock, S. J.; Robertson, D. L., 2021: SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nature Reviews Microbiology.*, **19**, 409–424.

Hashem, A. M.; Algaissi, A.; Almahboub, S. A.; Alfaleh, M. A.; Abujamel, T. S.; Alamri, S. S.; Alluhaybi, K. A.; Hobani, H. I.; Alharbi, R. H.; Alsulaiman, R. M.; Ellassouli, M. Z.; Hala, S.; Alharbi, N. K.; Alhabbab, R. Y.; Alsaieedi, A. A.; Abdulaal, W. H.; Bukhari, A.; Al-Somali, A. A.; Alofi, F. S. et al., 2020: Early humoral response correlates with disease severity and outcomes in covid-19 patients. *Viruses.*, **12**, 1–13.

Hayashi, J. Y.; Simizo, A.; Miyamoto, J. G.; Costa, L. V. S.; Souza, O. F.; Chiarelli, T.; Bacarov, N. B. S.; Hidalgo, R.; Garcia, L. D.; Soane, M. M.; Braconi, C. T.; Maricato, J. T.; Janini, L. M.; Salomão, R.; Popi, A. F.; Glezer, I.; Bonetti, T.; Tashima, A. K., 2022: Humoral and cellular responses to vaccination with homologous CoronaVac or ChAdOx1 and heterologous third dose with BNT162b2. *Journal of Infection.*, 1–3.

Hodcroft, E.; Aksamentov, I.; Neher, R.; Bedford, T.; Hadfield, J.; Zuber, M.; Scott-Brown, J.; Sanderson, T.; Bloom, J.; Roemer, C.; Goater, R.; Shah, R., 2023: CoVariants.

Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Pöhlmann, S., 2020: A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Molecular Cell.*, **78**, 779–784.

Hoffmann, M.; Krüger, N.; Schulz, S.; Cossmann, A.; Rocha, C.; Kempf, A.; Nehlmeier, I.; Graichen, L.; Moldenhauer, A. S.; Winkler, M. S.; Lier, M.; Dopfer-Jablonka, A.; Jäck, H. M.; Behrens, G. M. N.; Pöhlmann, S., 2022: The Omicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: Implications for control of the COVID-19 pandemic. *Cell.*, **185**, 447-456.e11.

Holm, M. R.; Poland, G. A., 2021: Critical aspects of packaging, storage, preparation, and administration of mRNA and adenovirus-vectored COVID-19 vaccines for optimal efficacy. *Vaccine.*, **39**, 457–459.

Huang, C.; Wang, Y.; Li, X.; Ren, L.; Zhao, J.; Hu, Y.; Zhang, L.; Fan, G.; Xu, J.; Gu,

X.; Cheng, Z.; Yu, T.; Xia, J.; Wei, Y.; Wu, W.; Xie, X.; Yin, W.; Li, H.; Liu, M. et al., 2020: Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet.*, **395**, 497–506.

IDT, (n.d.) RT-PCR SARS-CoV-2 coronavirus detection. <https://www.idtdna.com/pages/landing/coronavirus-research-reagents/cdc-assays>.

Jackson, C. B.; Farzan, M.; Chen, B.; Choe, H., 2022: Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.*, **23**, 3–20.

Jacob-dolan, C.; Barouch, D. H., 2022: COVID-19 Vaccines : Adenoviral Vectors. *Annual Review of Medicine.*, **73**, 41–54.

Jalkanen, P.; Kolehmainen, P.; Häkkinen, H. K.; Huttunen, M.; Tähtinen, P. A.; Lundberg, R.; Maljanen, S.; Reinholm, A.; Tauriainen, S.; Pakkanen, S. H.; Levonen, I.; Nousiainen, A.; Miller, T.; Välimaa, H.; Ivaska, L.; Pasternack, A.; Naves, R.; Ritvos, O.; Österlund, P. et al., 2021: COVID-19 mRNA vaccine induced antibody responses against three SARS-CoV-2 variants. *Nature Communications.*, **12**, 1–11.

Jara, A.; Undurraga, E. A.; Zubizarreta, J. R.; Gonzalez, C.; Pizarro, A.; Acevedo, J.; Leo, K.; Paredes, F.; Bralic, T.; Vergara, V.; Mosso, M.; Leon, F.; Parot, I.; Leighton, P.; Suarez, P.; Rios, J. C.; García-Escorza, H.; Araos, R., 2022: Effectiveness of homologous and heterologous booster doses for an inactivated SARS-CoV-2 vaccine: a large-scale prospective cohort study. *SSRN Electronic Journal.*, 1–9.

Kageyama, Y.; Katayama, N., 2020: Ontogeny of human B1 cells. *International Journal of Hematology.*, **111**, 628–633.

Kaur, M.; Sharma, A.; Kumar, S.; Singh, G.; Barnwal, R. P., 2021: SARS-CoV-2: Insights into its structural intricacies and functional aspects for drug and vaccine development. *International Journal of Biological Macromolecules.*, **179**, 45–60.

Kim, M. K.; Lee, B.; Choi, Y. Y.; Um, J.; Lee, K. S.; Sung, H. K.; Kim, Y.; Park, J. S.; Lee, M.; Jang, H. C.; Bang, J. H.; Chung, K. hyun; Jeon, J., 2022: Clinical Characteristics of 40 Patients Infected With the SARS-CoV-2 Omicron Variant in Korea. *Journal of Korean Medical Science.*, **37**, 6–10.

Krammer, F., 2020: SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature.*, **586**, 516–527.

Krammer, F.; Srivastava, K.; Alshammary, H.; Amoako, A. A.; Awawda, M. H.; Beach, K. F.; Bermúdez-González, M. C.; Bielak, D. A.; Carreño, J. M.; Chernet, R. L.; Eaker, L. Q.; Ferreri, E. D.; Floda, D. L.; Gleason, C. R.; Hamburger, J. Z.; Jiang, K.; Kleiner, G.; Jurczynszak, D.; Matthews, J. C. et al., 2021: Antibody Responses in Seropositive Persons after a Single Dose of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine. *New*

England Journal of Medicine., **384**, 1372–1374.

Kurup, D.; Schnell, M. J., 2021: SARS-CoV-2 vaccines — the biggest medical research project of the 21st century. *Current Opinion in Virology.*, **49**, 52–57.

Lamers, M. M.; Mykytyn, A. Z.; Breugem, T. I.; Groen, N.; Knoops, K.; Schipper, D.; Acker, R. van; van den Doel, P. B.; Bestebroer, T.; Koopman, C. D.; Reusken, C.; Muraro, M. J.; GeurtsvanKessel, C. H.; van Royen, M. E.; Peters, P. J.; Zhang, J.; Haagmans, B. L., 2022: *SARS-CoV-2 Omicron efficiently infects human airway, but not alveolar epithelium.*

Lasaro, M. O.; Ertl, H. C. J., 2009: New insights on adenovirus as vaccine vectors. *Molecular Therapy.*, **17**, 1333–1339.

Le Bert, N.; Tan, A. T.; Kunasegaran, K.; Tham, C. Y. L.; Hafezi, M.; Chia, A.; Chng, M. H. Y.; Lin, M.; Tan, N.; Linster, M.; Chia, W. N.; Chen, M. I. C.; Wang, L. F.; Ooi, E. E.; Kalimuddin, S.; Tambyah, P. A.; Low, J. G. H.; Tan, Y. J.; Bertoletti, A., 2020: SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature.*, **584**, 457–462.

Lebien, T. W.; Tedder, T. F., 2008: B lymphocytes: How they develop and function. *Blood.*, **112**, 1570–1580.

Li, H.; Liu, L.; Zhang, D.; Xu, J.; Dai, H.; Tang, N.; Su, X.; Cao, B., 2020: SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *The Lancet.*, **395**, 1517–1520.

Liao, M.; Liu, Y.; Yuan, J.; Wen, Y.; Xu, G.; Zhao, J.; Cheng, L.; Li, J.; Wang, X.; Wang, F.; Liu, L.; Amit, I.; Zhang, S.; Zhang, Z., 2020: Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nature Medicine.*, **26**, 842–844.

Liu, J.; Zheng, X.; Tong, Q.; Li, W.; Wang, B.; Sutter, K.; Trilling, M.; Lu, M.; Dittmer, U.; Yang, D., 2020a: Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV. *Journal of Medical Virology.*

Liu, L.; Wang, P.; Nair, M. S.; Yu, J.; Rapp, M.; Wang, Q.; Luo, Y.; Chan, J. F. W.; Sahi, V.; Figueroa, A.; Guo, X. V.; Cerutti, G.; Bimela, J.; Gorman, J.; Zhou, T.; Chen, Z.; Yuen, K. Y.; Kwong, P. D.; Sodroski, J. G. et al., 2020b: Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature.*, **584**, 450–456.

Liu, S.; Jiang, C.; Wang, J.; Liu, Y., 2023: The factors correlated with COVID-19 vaccination coverage in Chinese hypertensive patients managed by community general practitioner. *Human Vaccines and Immunotherapeutics.*, **19**.

Logunov, D. Y.; Dolzhikova, I. V.; Shcheblyakov, D. V.; Tukhvatulin, A. I.; Zubkova, O. V.; Dzharullaeva, A. S.; Kovyrshina, A. V.; Lubenets, N. L.; Grousova, D. M.; Erokhova, A. S.; Botikov, A. G.; Izhaeva, F. M.; Popova, O.; Ozharovskaya, T. A.; Esmagambetov, I. B.; Favorskaya, I. A.; Zrelkin, D. I.; Voronina, D. V.; Shcherbinin, D. N. et al., 2021: Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *The Lancet.*, **397**, 671–681.

Long, Q. X.; Liu, B. Z.; Deng, H. J.; Wu, G. C.; Deng, K.; Chen, Y. K.; Liao, P.; Qiu, J. F.; Lin, Y.; Cai, X. F.; Wang, D. Q.; Hu, Y.; Ren, J. H.; Tang, N.; Xu, Y. Y.; Yu, L. H.; Mo, Z.; Gong, F.; Zhang, X. L. et al., 2020: Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nature Medicine.*, **26**, 845–848.

Lou, B.; Li, T. D.; Zheng, S. F.; Su, Y. Y.; Li, Z. Y.; Liu, W.; Yu, F.; Ge, S. X.; Zou, Q. Da; Yuan, Q.; Lin, S.; Hong, C. M.; Yao, X. Y.; Zhang, X. J.; Wu, D. H.; Zhou, G. L.; Hou, W. H.; Li, T. T.; Zhang, Y. L. et al., 2020: Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since exposure and post symptom onset. *European Respiratory Journal.*, **56**.

Lu, R.; Zhao, X.; Li, J.; Niu, P.; Yang, B.; Wu, H.; Wang, W.; Song, H.; Huang, B.; Zhu, N.; Bi, Y.; Ma, X.; Zhan, F.; Wang, L.; Hu, T.; Zhou, H.; Hu, Z.; Zhou, W.; Zhao, L. et al., 2020: Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet.*, **395**, 565–574.

Ma, H.; Zeng, W.; He, H.; Zhao, D.; Jiang, D.; Zhou, P.; Cheng, L.; Li, Y.; Ma, X.; Jin, T., 2020: Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19. *Cellular and Molecular Immunology.*, **17**, 773–775.

Magen, O.; Waxman, J. G.; Makov-Assif, M.; Vered, R.; Dicker, D.; Hernán, M. A.; Lipsitch, M.; Reis, B. Y.; Balicer, R. D.; Dagan, N., 2022: Fourth Dose of BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Setting. *New England Journal of Medicine.*, **386**, 1603–1614.

Majumdar, S.; Sarkar, R., 2022: Mutational and phylogenetic analyses of the two lineages of the Omicron variant. *Journal of Medical Virology.*, **94**, 1777–1779.

Martinon, F.; Krishnan, S.; Lenzen, G.; Magné, R.; Gomard, E.; Guillet, J. -G; Lévy, J. -P; Meulien, P., 1993: Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *European Journal of Immunology.*, **23**, 1719–1722.

Masopust, D.; Soerens, A. G., 2019: Tissue-Resident T Cells and Other Resident Leukocytes. *Annu Rev Immunol.*, **37**, 521–546.

Mateus, J.; Grifoni, A.; Tarke, A.; Sidney, J.; Ramirez, S. I.; Dan, J. M.; Burger, Z. C.; Rawlings, S. A.; Smith, D. M.; Phillips, E.; Mallal, S.; Lammers, M.; Rubiro, P.; Quiambao, L.; Sutherland, A.; Yu, E. D.; Da Silva Antunes, R.; Greenbaum, J.; Frazier, A. et al., 2020: Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science.*, **370**, 89–94.

Mathew, D.; Giles, J. R.; Baxter, A. E.; Oldridge, D. A.; Greenplate, A. R.; Wu, J. E.; Alanio, C.; Kuri-Cervantes, L.; Pampena, M. B.; D’Andrea, K.; Manne, S.; Chen, Z.; Huang, Y. J.; Reilly, J. P.; Weisman, A. R.; Ittner, C. A. G.; Kuthuru, O.; Dougherty, J.; Nzingha, K. et al., 2020: Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science.*, **369**.

Mazzini, L.; Martinuzzi, D.; Hyseni, I.; Benincasa, L.; Molesti, E.; Casa, E.; Lapini, G.; Piu, P.; Trombetta, C. M.; Marchi, S.; Razzano, I.; Manenti, A.; Montomoli, E., 2021: Comparative analyses of SARS-CoV-2 binding (IgG, IgM, IgA) and neutralizing antibodies from human serum samples. *Journal of Immunological Methods.*, **489**, 112937.

Medeiros, G. X.; Sasahara, G. L.; Magawa, J. Y.; Nunes, J. P. S.; Bruno, F. R.; Kuramoto, A. C.; Almeida, R. R.; Ferreira, M. A.; Scagion, G. P.; Candido, É. D.; Leal, F. B.; Oliveira, D. B. L.; Durigon, E. L.; Silva, R. C. V.; Rosa, D. S.; Boscardin, S. B.; Coelho, V.; Kalil, J.; Santos, K. S. et al., 2022: Reduced T Cell and Antibody Responses to Inactivated Coronavirus Vaccine Among Individuals Above 55 Years Old. *Frontiers in Immunology.*, **13**.

Mendonça, S. A.; Lorincz, R.; Boucher, P.; Curiel, D. T., 2021: Adenoviral vector vaccine platforms in the SARS-CoV-2 pandemic. *npj Vaccines.*, **6**.

Mistry, P.; Barmania, F.; Mellet, J.; Peta, K.; Strydom, A.; Viljoen, I. M.; James, W.; Gordon, S.; Pepper, M. S., 2022: SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Frontiers in Immunology.*, **12**, 1–21.

Mkaddem, S. Ben; Benhamou, M.; Monteiro, R. C., 2019: Understanding Fc receptor involvement in inflammatory diseases: From mechanisms to new therapeutic tools. *Frontiers in Immunology.*, **10**.

Moderbacher, C. R.; Ramirez, S. I.; Dan, J. M.; Grifoni, A.; Hastie, K. M.; Weiskopf, D.; Belanger, S.; Abbott, R. K.; Kim, C.; Choi, J.; Kato, Y.; Crotty, E. G.; Kim, C.; Rawlings, S. A.; Mateus, J.; Tse, L. P. V.; Frazier, A.; Baric, R.; Peters, B. et al., 2020: Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell.*, **183**, 996–1012.

Mojadadi, M. S.; Javadinia, S. A.; Attarian, F.; Samami, E.; Sobhani, M., 2023: Anti-SARS-CoV-2 spike IgG following injection of the third dose vaccine: A systematic review with meta-analysis of heterologous versus homologous vaccination. *Frontiers in Public Health.*, **10**.

Morell, A.; Terry, W. D.; Waldmann, T. A., 1970: Metabolic properties of IgG subclasses in man. *The Journal of clinical investigation.*, **49**, 673–680.

Naqvi, A. A. T.; Fatima, K.; Mohammad, T.; Fatima, U.; Singh, I. K.; Singh, A.; Atif, S. M.; Hariprasad, G.; Hasan, G. M.; Hassan, M. I., 2020: Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease.*, **1866**, 165878.

Newton, A. H.; Cardani, A.; Braciale, T. J., 2016: The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. *Seminars in Immunopathology.*, **38**, 471–482.

NIH, 2022: Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines.

Nimmerjahn, F.; Ravetch, J. V., 2008: Fc γ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology.*

Novavax, 2021: Press releases & statements.

Nutt, S. L.; Hodgkin, P. D.; Tarlinton, D. M.; Corcoran, L. M., 2015: The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology.*, **15**, 160–171.

Oliveira, J. R.; Ruiz, C. M. R.; Machado, R. R. G.; Magawa, J. Y.; Daher, I. P.; Urbanski, A. H.; Schmitz, G. J. H.; Arcuri, H. A.; Ferreira, M. A.; Sasahara, G. L.; de Medeiros, G. X.; Júnior, R. C. V. S.; Durigon, E. L.; Boscardin, S. B.; Rosa, D. S.; Schechtman, D.; Nakaya, H. I.; Cunha-Neto, E.; Gadermaier, G. et al., 2023: Immunodominant antibody responses directed to SARS-CoV-2 hotspot mutation sites and risk of immune escape. *Frontiers in Immunology.*, **13**.

Padoan, A.; Sciacovelli, L.; Basso, D.; Negrini, D.; Zuin, S.; Cosma, C.; Faggian, D.; Matricardi, P.; Plebani, M., 2020: IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study. *Clinica Chimica Acta.*, **507**, 164–166.

Padoan, A.; Dall’Olmo, L.; Rocca, F. della; Barbaro, F.; Cosma, C.; Basso, D.; Cattelan, A.; Cianci, V.; Plebani, M., 2021: Antibody response to first and second dose of BNT162b2 in a cohort of characterized healthcare workers. *Clinica Chimica Acta.*, **519**, 60–63.

Pardi, N.; Hogan, M. J.; Porter, F. W.; Weissman, D., 2018: mRNA vaccines-a new

era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery.*, **17**, 261–279.

Pegu, A.; O’Connell, S. E.; Schmidt, S. D.; O’Dell, S.; Talana, C. A.; Lai, L.; Albert, J.; Anderson, E.; Bennett, H.; Corbett, K. S.; Flach, B.; Jackson, L.; Leav, B.; Ledgerwood, J. E.; Luke, C. J.; Makowski, M.; Nason, M. C.; Roberts, P. C.; Roederer, M. et al., 2021: Durability of mRNA-1273 vaccine-induced antibodies against SARS-CoV-2 variants. *Science.*, **373**, 1372–1377.

Pfizer, 2021: Pfizer and BioNTech Submit COVID-19 Vaccine Stability Data at Standard Freezer Temperature to the U.S. FDA.

Piccoli, L.; Park, Y. J.; Tortorici, M. A.; Czudnochowski, N.; Walls, A. C.; Beltramello, M.; Silacci-Fregni, C.; Pinto, D.; Rosen, L. E.; Bowen, J. E.; Acton, O. J.; Jaconi, S.; Guarino, B.; Minola, A.; Zatta, F.; Sprugasci, N.; Bassi, J.; Peter, A.; De Marco, A. et al., 2020: Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell.*, **183**, 1024-1042.e21.

Pichla-Gollon, S. L.; Lin, S. W.; Hensley, S. E.; Lasaro, M. O.; Herkenhoff-Haut, L.; Drinker, M.; Tatsis, N.; Gao, G. P.; Wilson, J. M.; Ertl, H. C. J.; Bergelson, J. M., 2009: Effect of Preexisting Immunity on an Adenovirus Vaccine Vector: In Vitro Neutralization Assays Fail To Predict Inhibition by Antiviral Antibody In Vivo. *Journal of Virology.*, **83**, 5567–5573.

Pio Conti, Ronconi G, Caraffa A, Gallenga CE, Ross R, F. I. and K. S., 2020: Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (CoV-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents.*, **34**.

Polack, F. P.; Thomas, S. J.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, J. L.; Pérez Marc, G.; Moreira, E. D.; Zerbini, C.; Bailey, R.; Swanson, K. A.; Roychoudhury, S.; Koury, K.; Li, P.; Kalina, W. V.; Cooper, D.; Frenck, R. W.; Hammitt, L. L. et al., 2020: Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine.*, **383**, 2603–2615.

Poland, G. A.; Ovsyannikova, I. G.; Kennedy, R. B., 2018: Personalized vaccinology: A review. *Vaccine.*, **36**, 5350–5357.

Poland, G. A.; Ovsyannikova, I. G.; Kennedy, R. B., 2020: SARS-CoV-2 immunity: review and applications to phase 3 vaccine candidates. *The Lancet.*, **396**, 1595–1606.

Prevention, C. for D. C. and, 2022: SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions.

Purtha, W. E.; Tedder, T. F.; Johnson, S.; Bhattacharya, D.; Diamond, M. S., 2011: Memory B cells, but not long-lived plasma cells, possess antigen specificities for viral escape mutants. *Journal of Experimental Medicine.*, **208**, 2599–2606.

Qin, C.; Zhou, L.; Hu, Z.; Zhang, S.; Yang, S.; Tao, Y.; Xie, C.; Ma, K.; Shang, K.; Wang, W.; Tian, D. S., 2020: Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clinical Infectious Diseases.*, **71**, 762–768.

Reichert, J. M., 2017: Antibodies to watch in 2017. *mAbs.*, **9**, 167–181.

Reynolds, J. M.; Dong, C., 2013: Toll-like receptor regulation of effector T lymphocyte function. *Trends in Immunology.*, **34**, 511–519.

Ritchie, Hannah; Mathieu, Edouard; Rodés-Guirao, Lucas; Appel, Cameron; Giattino, Charlie; Ortiz-Ospina, Esteban; Hasell, Joe; Macdonald, Bobbie; Beltekian, Diana and Roser, M., 2020: Coronavirus Pandemic (COVID-19). *Our World in Data*.

Sahin, U.; Muik, A.; Vogler, I.; Derhovanessian, E.; Kranz, L. M.; Vormehr, M.; Quandt, J.; Bidmon, N.; Ulges, A.; Baum, A.; Pascal, K. E.; Maurus, D.; Brachtendorf, S.; Lörks, V.; Sikorski, J.; Koch, P.; Hilker, R.; Becker, D.; Eller, A. K. et al., 2021: BNT162b2 vaccine induces neutralizing antibodies and poly-specific T cells in humans. *Nature.*, **595**, 572–577.

Sayedahmed, E. E.; Elkashif, A.; Alhashimi, M.; Sambhara, S.; Mittal, S. K., 2020: Adenoviral vector-based vaccine platforms for developing the next generation of influenza vaccines. *Vaccines.*, **8**, 1–19.

Schmidt, T.; Klemis, V.; Schub, D.; Mihm, J.; Hielscher, F.; Marx, S.; Abu-Omar, A.; Ziegler, L.; Guckelmuß, C.; Urschel, R.; Schneitler, S.; Becker, S. L.; Gärtner, B. C.; Sester, U.; Sester, M., 2021: Immunogenicity and reactogenicity of heterologous ChAdOx1 nCoV-19/mRNA vaccination. *Nature Medicine.*, **27**, 1530–1535.

Schroeder, H. W.; Cavacini, L., 2010: Structure and Function of Immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.*, **125**, S41–S52.

Schulte-Schrepping, J.; Reusch, N.; Paclik, D.; Baßler, K.; Schlickeiser, S.; Zhang, B.; Krämer, B.; Krammer, T.; Brumhard, S.; Bonaguro, L.; De Domenico, E.; Wendisch, D.; Grasshoff, M.; Kapellos, T. S.; Beckstette, M.; Pecht, T.; Saglam, A.; Dietrich, O.; Mei, H. E. et al., 2020: Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell.*, **182**, 1419-1440.e23.

Schultze, J. L.; Aschenbrenner, A. C., 2021: COVID-19 and the human innate immune system. *Cell.*, **184**, 1671–1692.

Sette, A.; Crotty, S., 2021: Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell.*, **184**, 861–880.

Shang, J.; Wan, Y.; Luo, C.; Ye, G.; Geng, Q.; Auerbach, A.; Li, F., 2020: Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **117**, 11727–11734.

Shulla, A.; Heald-Sargent, T.; Subramanya, G.; Zhao, J.; Perlman, S.; Gallagher, T., 2011: A Transmembrane Serine Protease Is Linked to the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Receptor and Activates Virus Entry. *Journal of Virology.*, **85**, 873–882.

Sigal, L. H., 2012: Basic science for the clinician 58 IgG subclasses. *Journal of Clinical Rheumatology.*, **18**, 316–318.

Simmons, G.; Gosalia, D. N.; Rennekamp, A. J.; Reeves, J. D.; Diamond, S. L.; Bates, P., 2005: Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, **102**, 11876–11881.

Sterlin, D.; Malaussena, A.; Gorochoy, G., 2021: IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2 virus. *Medecine/Sciences.*, **37**, 968–970.

Suah, J. L.; Husin, M.; Tok, P. S. K.; Tng, B. H.; Thevananthan, T.; Low, E. V.; Appannan, M. R.; Muhamad Zin, F.; Mohd Zin, S.; Yahaya, H.; Peariasamy, K. M.; Sivasampu, S., 2022: Waning COVID-19 Vaccine Effectiveness for BNT162b2 and CoronaVac in Malaysia: An Observational Study. *International Journal of Infectious Diseases.*, **119**, 69–76.

Sugiyama, A.; Kurisu, A.; Nagashima, S.; Hando, K.; Saipova, K.; Akhmedova, S.; Abe, K.; Imada, H.; Hussain, M. R. A.; Ouoba, S.; Bunthen, E.; Ko, K.; Akita, T.; Yamazaki, S.; Yokozaki, M.; Tanaka, J., 2022: Seroepidemiological study of factors affecting anti-spike IgG antibody titers after a two-dose mRNA COVID-19 vaccination in 3744 healthy Japanese volunteers. *Scientific Reports.*, **12**, 1–9.

Tao, K.; Tzou, P. L.; Nouhin, J.; Gupta, R. K.; de Oliveira, T.; Kosakovsky Pond, S. L.; Fera, D.; Shafer, R. W., 2021: The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nature Reviews Genetics.*, **22**, 757–773.

Tarke, A.; Sidney, J.; Methot, N.; Yu, E. D.; Zhang, Y.; Dan, J. M.; Goodwin, B.; Rubiro, P.; Sutherland, A.; Wang, E.; Frazier, A.; Ramirez, S. I.; Rawlings, S. A.; Smith, D. M.; da Silva Antunes, R.; Peters, B.; Scheuermann, R. H.; Weiskopf, D.; Crotty, S. et al., 2021: Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4+ and CD8+

T cell reactivity in infected or vaccinated individuals. *Cell Reports Medicine.*, **2**, 100355.

Tartof, S. Y.; Slezak, J. M.; Fischer, H.; Hong, V.; Ackerson, B. K.; Ranasinghe, O. N.; Frankland, T. B.; Ogun, O. A.; Zamparo, J. M.; Gray, S.; Valluri, S. R.; Pan, K.; Angulo, F. J.; Jodar, L.; McLaughlin, J. M., 2021: Effectiveness of mRNA BNT162b2 COVID-19 vaccine up to 6 months in a large integrated health system in the USA: a retrospective cohort study. *The Lancet.*, **398**, 1407–1416.

UCSF, 2023: COVID-19 Vaccines.

Vale, A. M.; Kearney, J. F.; Nobrega, A.; Schroeder, H. W., 2015: Development and Function of B Cell Subsets. *Molecular Biology of B Cells.*, 99–119.

van Doremalen, N.; Lambe, T.; Spencer, A.; Belij-Rammerstorfer, S.; Purushotham, J. N.; Port, J. R.; Avanzato, V. A.; Bushmaker, T.; Flaxman, A.; Ulaszewska, M.; Feldmann, F.; Allen, E. R.; Sharpe, H.; Schulz, J.; Holbrook, M.; Okumura, A.; Meade-White, K.; Pérez-Pérez, L.; Edwards, N. J. et al., 2020: ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *Nature.*, **586**, 578–582.

Vidarsson, G.; Dekkers, G.; Rispens, T., 2014: IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Frontiers in Immunology.*, **5**, 1–17.

Voysey, M.; Costa Clemens, S. A.; Madhi, S. A.; Weckx, L. Y.; Folegatti, P. M.; Aley, P. K.; Angus, B.; Baillie, V. L.; Barnabas, S. L.; Bhorat, Q. E.; Bibi, S.; Briner, C.; Cicconi, P.; Clutterbuck, E. A.; Collins, A. M.; Cutland, C. L.; Darton, T. C.; Dheda, K.; Dold, C. et al., 2021: Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: a pooled analysis of four randomised trials. *The Lancet.*, **397**, 881–891.

Wagenhäuser, I.; Reusch, J.; Gabel, A.; Krone, L. B.; Kurzai, O.; Petri, N.; Krone, M., 2023: Bivalent BNT162b2 mRNA original/omicron BA.4-5 booster vaccination: adverse reactions and inability to work compared with the monovalent COVID-19 booster. *Clinical Microbiology and Infection.*, **29**, 554–556.

Wang, D.; Hu, B.; Hu, C.; Zhu, F.; Liu, X.; Zhang, J.; Wang, B.; Xiang, H.; Cheng, Z.; Xiong, Y.; Zhao, Y.; Li, Y.; Wang, X.; Peng, Z., 2020a: Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - Journal of the American Medical Association.*, **323**, 1061–1069.

Wang, L.; Wang, Y.; Ye, D.; Liu, Q., 2020b: Review of the 2019 novel coronavirus

(SARS-CoV-2) based on current evidence. *International Journal of Antimicrobial Agents.*, **55**.

Wang, Z.; Schmidt, F.; Weisblum, Y.; Muecksch, F.; Barnes, C. O.; Finkin, S.; Schaefer-Babajew, D.; Cipolla, M.; Gaebler, C.; Lieberman, J. A.; Oliveira, T. Y.; Yang, Z.; Abernathy, M. E.; Huey-Tubman, K. E.; Hurley, A.; Turroja, M.; West, K. A.; Gordon, K.; Millard, K. G. et al., 2021: mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature.*, **592**, 616–622.

Wei, Y.; Jia, K. M.; Zhao, S.; Hung, C. T.; Mok, C. K. P.; Poon, P. K. M.; Man Leung, E. Y.; Wang, M. H.; Yam, C. H. K.; Chow, T. Y.; Guo, Z.; Yeoh, E. K.; Chong, K. C., 2023: Estimation of Vaccine Effectiveness of CoronaVac and BNT162b2 Against Severe Outcomes Over Time Among Patients With SARS-CoV-2 Omicron. *JAMA Network Open.*, **6**.

WHO, 2021: Interim recommendations for use of the inactivated COVID-19 vaccine, CoronaVac, developed by Sinovac, 1–9.

WHO, 2022: World Health Organization Therapeutics and COVID-19: living guideline.

WHO, 2023a: WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard.

WHO, 2023b: WHO Health Emergency Dashboard.

Williams, T. C.; Burgers, W. A., 2021: SARS-CoV-2 evolution and vaccines: cause for concern? *The Lancet Respiratory Medicine.*, **9**, 333–335.

Wolter, N.; Jassat, W.; Walaza, S.; Welch, R.; Moultrie, H.; Groome, M.; Amoako, D. G.; Everatt, J.; Bhiman, J. N.; Scheepers, C.; Tebeila, N.; Chiwandire, N.; du Plessis, M.; Govender, N.; Ismail, A.; Glass, A.; Mlisana, K.; Stevens, W.; Treurnicht, F. K. et al., 2022: Early assessment of the clinical severity of the SARS-CoV-2 omicron variant in South Africa: a data linkage study. *The Lancet.*, **399**, 437–446.

Wong, C. K.; Lam, C. W. K.; Wu, A. K. L.; Ip, W. K.; Lee, N. L. S.; Chan, I. H. S.; Lit, L. C. W.; Hui, D. S. C.; Chan, M. H. M.; Chung, S. S. C.; Sung, J. J. Y., 2004: Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clinical and Experimental Immunology.*, **136**, 95–103.

Wong, M. C.; Cregeen, S. J. J.; Ajami, N. J.; Petrosino, J. F., 2020: Evidence of recombination in coronaviruses implicating pangolin origins of nCoV-2019. *bioRxiv.*, **2013**, 2020.02.07.939207.

Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y. M.; Wang, W.; Song, Z. G.; Hu, Y.; Tao, Z. W.; Tian, J. H.; Pei, Y. Y.; Yuan, M. L.; Zhang, Y. L.; Dai, F. H.; Liu, Y.; Wang, Q. M.;

Zheng, J. J.; Xu, L.; Holmes, E. C.; Zhang, Y. Z., 2020: A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.*, **579**, 265–269.

Xu, Z.; Shi, L.; Wang, Y.; Zhang, J.; Huang, L.; Zhang, C.; Liu, S.; Zhao, P.; Liu, H.; Zhu, L.; Tai, Y.; Bai, C.; Gao, T.; Song, J.; Xia, P.; Dong, J.; Zhao, J.; Wang, F. S., 2020: Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med.*, **8**, 420–422.

Yang, H.; Zima, B., 2021: Sinovac Announces Phase III Results of Its COVID-19 Vaccine.

Yang, J.; Zheng, Y.; Gou, X.; Pu, K.; Chen, Z.; Guo, Q.; Ji, R.; Wang, H.; Wang, Y.; Zhou, Y., 2020a: Prevalence of comorbidities and its effects in coronavirus disease 2019 patients: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases.*, **94**, 91–95.

Yang, Y.; Peng, F.; Wang, R.; Guan, K.; Jiang, T.; Xu, G.; Sun, J.; Chang, C., 2020b: The Deadly Coronaviruses: The 2003 SARS Pandemic and The 2020 Novel Coronavirus Epidemic in China. *Journal of Autoimmunity.*, **109**, 102487.

Zhang, H.; Hu, Y.; Jiang, Z.; Shi, N.; Lin, H.; Liu, Y.; Wang, H.; Feng, Y.; Meng, X.; Zhang, S.; Su, L.; Zheng, Z.; Dong, L.; Gao, Q.; Xia, Q., 2021: Single-cell sequencing and immune function assays of peripheral blood samples demonstrate positive responses of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine. *preprint*.

Zhao, J.; Zhao, J.; Mangalam, A. K.; Channappanavar, R.; Fett, C.; Meyerholz, D. K.; Agnihothram, S.; Baric, R. S.; David, C. S.; Perlman, S., 2016: Airway Memory CD4+ T Cells Mediate Protective Immunity against Emerging Respiratory Coronaviruses. *Immunity.*, **44**, 1379–1391.

Zhao, J.; Yuan, Q.; Wang, H.; Liu, W.; Liao, X.; Su, Y.; Wang, X.; Yuan, J.; Li, T.; Li, J.; Qian, S.; Hong, C.; Wang, F.; Liu, Y.; Wang, Z.; He, Q.; Li, Z.; He, B.; Zhang, T. et al., 2020: Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients with Novel Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases.*, **71**, 2027–2034.

Zheng, M.; Gao, Y.; Wang, G.; Song, G.; Liu, S.; Sun, D.; Xu, Y.; Tian, Z., 2020: Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cellular and Molecular Immunology.*, **17**, 533–535.

Zimmermann, P.; Curtis, N., 2019: Factors That Influence the Immune Response to Vaccination. *Clinical Microbiology Reviews.*, **32**.

Zou, J.; Kurhade, C.; Patel, S.; Kitchin, N.; Tompkins, K.; Cutler, M.; Cooper, D.; Yang, Q.; Cai, H.; Muik, A.; Zhang, Y.; Lee, D. Y.; Sahin, U.; Anderson, A. S.;

Gruber, W. C.; Xie, X.; Swanson, K. A.; Shi, P. Y., 2022: *Improved Neutralization of Omicron BA.4/5, BA.4.6, BA.2.75.2, BQ.1.1, and XBB.1 with Bivalent BA.4/5 Vaccine.*

Zuo, F.; Abolhassani, H.; Du, L.; Piralla, A.; Bertoglio, F.; de Campos-Mata, L.; Wan, H.; Schubert, M.; Cassaniti, I.; Wang, Y.; Sammartino, J. C.; Sun, R.; Vlachiotis, S.; Bergami, F.; Kumagai-Braesch, M.; Andréll, J.; Zhang, Z.; Xue, Y.; Wenzel, E. V. et al., 2022: Heterologous immunization with inactivated vaccine followed by mRNA-booster elicits strong immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant. *Nature Communications.*, **13**, 1–8.

ANEXOS –TCLE, Parecer do Comitê de Ética



Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) – Maior

Título do projeto de pesquisa: Investigação do perfil virológico, imunológico e clínico no contexto da pandemia COVID-19 em Goiânia – Goiás

Nome do participante de Pesquisa:.....

Você está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) do projeto “Investigação do perfil virológico, imunológico e clínico no contexto da pandemia COVID-19 em Goiânia – Goiás”. Meu nome é Fabíola Souza Fiaccadori, pesquisadora responsável pelo projeto, sou pesquisadora e professora do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG) no Setor de Microbiologia e área de atuação em Virologia.

Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, se você concordar em participar, para registrar sua concordância será realizada uma gravação de áudio. Uma via deste documento será entregue a você. Esclareço que em caso de recusa na autorização, você não será penalizado(a) de forma alguma. Mas se concordar com a participação, as dúvidas *sobre a pesquisa* poderão ser esclarecidas, via e-mail pesquisa.covid-19@gmail.com ou sob forma de ligação a cobrar, através do seguinte contato telefônico (62) 3209-6122. Ao persistirem as dúvidas *sobre os direitos* da sua participação, você também poderá fazer contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** (órgão criado para proteger o bem estar dos participantes de pesquisa, em sua integridade e dignidade, visando contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos vigentes) da Universidade Federal de Goiás, pelo telefone (62) 3521-1215.

Informações sobre a Pesquisa:

Essa pesquisa tem por objetivo investigar a ocorrência de diferentes vírus causadores de infecções respiratórias e gastroentéricas, assim como o novo coronavírus associado a pandemia COVID-19. Diferentes aspectos serão estudados e assim, os dados obtidos poderão melhorar as ações de tratamento e prevenção destas doenças em nossa comunidade. Como esta é uma infecção nova e que vem causando um grave problema para toda a comunidade, este estudo torna-se muito importante.

Procedimentos:

Ao aceitar participar do estudo, você será avaliado(a) pela equipe de saúde da pesquisa, e os dados clínico/laboratoriais serão analisados na pesquisa. Também será necessário coletar amostras clínicas (secreção nasal, sangue, urina e fezes). Adicionalmente, serão coletadas as amostras de forma seriada (a cada 3-5 dias), por até duas semanas, respeitando a sua vontade particular e concordância com o momento.

Todos os procedimentos serão realizados por membros da equipe de pesquisadores devidamente capacitados, no próprio ambiente de atendimento nas respectivas unidades, sem a necessidade de comparecimento ou retorno ao hospital por motivo relacionado à pesquisa. Serão utilizados apenas material de coleta adequado, estéril e de qualidade, garantindo a sua prevenção, o cuidado e a sua proteção, minimizando os danos e riscos.

A coleta de swab nasofaríngeo será realizada utilizando swabs de Rayon, seguindo o protocolo recomendado. Este constitui procedimento geralmente indolor e não provoca sangramento, entretanto, o procedimento pode gerar um leve desconforto. Na ocorrência desse fato, o pesquisador avaliará o tempo para o término do procedimento e a coleta poderá ser interrompida.

A coleta de sangue vai ser feita usando agulha e tubo de coleta descartáveis. Serão coletados de 10 a 20 mL (que corresponde a uma ou duas colheres de sopa) de sangue e até 5 mL para crianças. Esse procedimento pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada (hematoma). Em um coletor estéril será coletada cerca de 20 mL de urina de forma espontânea e em outro coletor estéril será feita a coleta de fezes espontânea, não sendo utilizada a administração de qualquer medicamento ou instrumento. As coletas de urina e fezes não causam nenhuma dor ou desconforto, havendo apenas o risco de constrangimento.

Os exames que serão realizados na pesquisa não substituem os exames regularmente realizados no hospital como parte do seguimento médico dos pacientes e, o atendimento na unidade de saúde seguirá por meio dos protocolos estabelecidos pela unidade. A sua participação na pesquisa não terá interferência neste atendimento.

Ao participar da pesquisa, você tem garantido os seguintes direitos:

1. De ter resposta a qualquer dúvida sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados com a pesquisa.
2. De que a sua participação na pesquisa é realizada de forma voluntária, ou seja, não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação em adesão à mesma.
3. De retirar o consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, e isso não vai implicar em prejuízo de qualquer natureza;
4. Da segurança de que você não será identificado de nenhuma forma, sendo garantindo o sigilo e a privacidade. Todas as informações serão confidenciais.
5. De ter as entrevistas realizadas por pessoal treinado, em local privativo, com perguntas feitas de modo a não causar constrangimento.
6. De não assumir qualquer despesa ao participar da pesquisa.
7. De pleitear indenização diante de eventuais danos decorrentes da participação na pesquisa.

Assim, após receber os esclarecimentos e as informações, solicitamos sua autorização para que os dados clínico/laboratoriais façam parte do banco de dados da pesquisa e que as amostras biológicas possam ser estocadas no banco de amostras, sob a nossa guarda e que possam ser utilizadas em estudos de pesquisa médica ou educacional futuros, respeitando as mesmas garantias acima.

No caso de novos estudos serem planejados com a utilização do material biológico armazenado, a sua escolha é:

Solicito novo contato para autorizar

Autorizo a utilização do material guardado em outras pesquisa, sem necessidade de novo consentimento.

Consentimento da sua participação na pesquisa

Eu, _____,
RG ou CPF _____, abaixo assinado concordo em participar do estudo **“Investigação do perfil virológico, imunológico e clínico no contexto da pandemia COVID-19 em Goiânia – Goiás”**, como participante de pesquisa. Informo ser maior de 18 anos de idade, e destaco que minha participação nesta pesquisa é de caráter voluntário.

Fui devidamente informado e esclarecido por _____ sobre a pesquisa, os procedimentos envolvidos, assim com os possíveis riscos e benefícios decorrentes da minha participação no estudo.

Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do seu acompanhamento assistência/tratamento e que todas as informações pessoais obtidas serão mantidas em sigilo. Declaro, portanto, que autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos no projeto acima descrito.

Goiânia, de de

Assinatura por extenso do participante

Assinatura por extenso do pesquisador responsável

Assinatura Datiloscópica:



Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos e aceite.

Nome: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Assinatura: _____

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação do perfil virológico, imunológico e clínico no contexto da pandemia COVID-19 em Goiânia - Goiás

Pesquisador: Fabíola Souza Fiaccadori

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30804220.2.0000.5078

Instituição Proponente: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.018.693

Apresentação do Projeto:

A pandemia atual designada “doença por coronavírus em 2019” (COVID-19) é causada pelo agente inicialmente descrito como 2019 novel CoV (2019-nCoV) em 12 de janeiro de 2020 pela Organização Mundial de Saúde (O.M.S) e, posteriormente, denominado SARS-CoV-2 pelo Grupo de Estudos em Coronavírus do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (Gorbalenya et al., 2020). Teve seu epicentro na província de Hubei, na China e, desde então, tem se disseminado para muitos outros países. No dia 30 de janeiro de 2020, a O.M.S declarou emergência global, em razão do número crescente de taxas de notificação de casos na China e em outros países (WHO,2020).

O mapeamento da evolução clínica dos pacientes infectados por agentes virais e tratamento empregado, a determinação da frequência dos vírus e de características moleculares e fenotípicas das amostras virais identificadas (em diferentes espécimes clínicos); além da modelagem bioinformática de ligações entre proteínas virais e moléculas das células do hospedeiro, constituem aspectos fundamentais na obtenção de informações relevantes para o melhor entendimento de fatores de susceptibilidade/resistência do hospedeiro, de aspectos da patogênese viral, bem como da epidemiologia molecular e evolução desses agentes. Ainda, a avaliação fenotípica de células envolvidas na resposta imune, citocinas e quimiocinas envolvidas, bem como a determinação dos correlatos da resposta imune e sua interação com a resposta imune celular e humoral são importantes para o delineamento da imunopatogênese da doença e determinação dos fatores protetores, sendo imprescindível no contexto de um vírus

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Hospital das Clínicas/UFG - 1º Andar - Unidade de Pesquisa Clínica

Bairro: St. Leste Universitário

CEP: 74.605-020

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3269-8338

Fax: (62)3269-8426

E-mail: cephcufig@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 4.018.693

pandêmico.

METODOLOGIA

Delineamento e Local do Estudo

Este projeto constitui um estudo de corte que será desenvolvido no período de cinco (5) anos, sendo considerados oito meses como período de coleta de dados e amostras, com data de início prevista para logo após aprovação pelo Sistema CONEP/CEP em atendimento a decisão da Plenária de 31 de janeiro de 2020 ao item 2 das recomendações: “Tramitação prioritária por solicitação da Conep - 2019-nCoV”. Para realização do estudo, foram selecionados três hospitais vinculados ao Sistema Único de Saúde (SUS) no Estado de Goiás e que foram estabelecidos como referência no atendimento à população no contexto da pandemia COVID-19: Hospital das Clínicas (HC/UFG) e Hospital de Campanha do estado de Goiás (HCAMP), que, portanto representarão uma amostra significativa da população acometida neste cenário, na cidade de Goiânia e região. Para o estudo serão recrutados pacientes atendidos nas unidades e também profissionais envolvidos no processo de atendimento destes indivíduos.

Para avaliação de dados clínicos, serão utilizadas informações coletadas através da análise de fichas de investigação clínica e prontuários médicos. Nesta etapa, estarão envolvidos membros da equipe de pesquisa que atuam nestas unidades. Para realização das investigações de aspectos virológicos e imunológicos, será ainda realizada coleta de diferentes espécimes clínicos (swab nasofaríngeo, sangue/soro, urina e fezes) por pessoal da equipe médica participante do estudo, a qual ainda poderá ser realizada de forma seriada. Estas análises serão desenvolvidas pela equipe de pesquisadores do Instituto de Patologia Tropic e Saúde Pública da UFG (IPTSP/UFG), pelas equipes dos Laboratórios: Laboratório de Virologia e Cultivo Celular (LabViCC); Laboratório de Biologia Molecular e Tecnologias Aplicadas ao Diagnóstico (BIOTECFF/UFG); Laboratório de Imunorregulação (LIR) e Laboratório de Imunologia de Mucosas (LIM).

População do Estudo e Recrutamento

A população será constituída por dois grupos de indivíduos, com uma amostragem de 139 participantes, considerando um nível de significância de 95% e um erro de 5% para a uma prevalência estimada de 10% na população de Goiânia-GO. Para o grupo 1 (g1) serão selecionados aproximadamente 100 pacientes, que estiverem em atendimento, por suspeita ou confirmação de infecção pelo SARS-CoV-2, em pronto-socorro, enfermaria ou unidade de terapia intensiva dos

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Hospital das Clínicas/UFG - 1º Andar - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitario **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcufig@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 4.018.693

hospitais onde o estudo estará sendo realizado (HC e HCAMP). O grupo 2 (g2) será composto por aproximadamente 40 profissionais (equipe de saúde, de limpeza e administrativa) que estejam em desenvolvimento de suas atividades nos hospitais, durante a etapa de coleta.

Considerando a relevância do potencial impacto da COVID-19 para a sociedade brasileira, sendo questão de emergência global e o fato de que a CONEP instituiu caráter de excepcionalidade para pesquisas no contexto do novo coronavírus, propomos que a seleção dos casos, bem como a coleta de dados e amostras dos participantes da pesquisa, terá início imediato após aprovação CONEP/CEP, ocorrendo no período de oito meses. Os indivíduos serão convidados a participar do estudo por um membro da equipe de pesquisa, o qual apresentará os detalhes da pesquisa, esclarecendo dúvidas e questionamentos. Em seguida, será feita a leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para maiores de 18 anos e, no caso de menores ou pacientes que não estejam em condições de dar seu próprio consentimento, para seus responsáveis legais. Nestas situações, caso o responsável legal não esteja presencialmente na unidade de saúde, será realizado contato telefônico (por meio de informações do prontuário) e após consulta prévia, agendado o melhor horário para apresentação e gravação por áudio do consentimento (Resolução 510/2016). Para menores de 18 anos, será utilizado Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE), com linguagem adequada ao entendimento dos diferentes grupos etários participantes (adolescentes e crianças). Após novos esclarecimentos conforme necessidade, será solicitada a autorização para participação no estudo. Entretanto, considerando os riscos de transmissão de SARS-CoV-2 por compartilhamento de objetos, esta etapa deverá ser por meio de gravação de áudio (Resolução 510/2016), sendo respeitada a distância de segurança entre pesquisador e o indivíduo recrutado.

Critérios de Inclusão

Serão inclusos no grupo 1 da pesquisa, indivíduos de ambos os sexos, das diferentes faixas etárias, que tenham sido atendidos nos hospitais durante o período de coleta estabelecido, apresentando um dos critérios definidos pela OMS (avaliação clínica), para classificação das síndromes clínicas associadas à infecção por SARS-CoV2 (WHO, 2020):

Nível 1 - Doença não complicada - sinais e sintomas compatíveis com quadro viral agudo de vias aéreas superiores, sem sinais de desidratação, dispepsia, sepse ou disfunção de órgãos.

Nível 2 - Pneumonia sem complicações: sinais e sintomas de comprometimento de vias aéreas inferiores (tosse e aumento da frequência respiratória) sem sinais de gravidade.

Nível 3 - Pneumonia grave: sinais e sintomas de pneumonia com sinais de gravidade, como uso de

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Hospital das Clínicas/UFG - 1º Andar - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcufig@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 4.018.693

musculatura acessória.

Nível 4 - Síndrome da Angústia Respiratória Aguda: febre e/ou tosse associada a sinais e sintomas de desconforto respiratório como taquipneia, uso de musculatura acessória ou batimento de aletos nasais, cianose ou saturação periférica de oxigênio 95%.

Nível 5 e 6 - Seps e Choque séptico.

Serão inclusos no grupo 2 da pesquisa, indivíduos de ambos os sexos, das diferentes faixas etárias, que estejam desenvolvendo suas atividades profissionais (seleção pela equipe clínica), que não relatem fator de comprometimento de qualquer ordem, durante o período de coleta estabelecido. Poderão ser inclusos os profissionais que estejam assintomáticos ou mesmo aqueles apresentando alguma sintomatologia, seguindo a mesma classificação com critérios estabelecidos pela OMS (WHO, 2020).

Critérios de Exclusão

Serão excluídos de ambos os grupos (1 e 2) da pesquisa, indivíduos que após avaliação clínica, sejam caracterizados com alguma outra condição clínica que não corresponda aos critérios de classificação das síndromes clínicas associadas à infecção por SARS-CoV-2 (WHO, 2020), ou que comprometam o acompanhamento durante a realização do estudo.

Coleta de Dados e Amostras

O formulário contendo dados clínicos será preenchido por um entrevistador (médico, enfermeira, técnico/bolsista) previamente treinado. Os demais dados clínicos como o desfecho da doença serão coletados do prontuário médico. Os prontuários médicos serão revisados por médico responsável, para a obtenção de informações clínicas (doença de base, intervenções terapêuticas passadas e atuais, medicação utilizada), bem como de dados laboratoriais.

Coleta de Amostras

Após esclarecimentos e assinatura do TCLE/TALE se procederá a coleta das amostras clínicas (swab nasofaríngeo, e/ou aspirado traqueal, saliva, sangue/soro, urina e fezes), sendo realizada por um membro treinado da equipe de pesquisadores, no ambiente de atendimento nas respectivas unidades do Hospital. As coletas serão realizadas no momento de recrutamento do indivíduo e posteriormente, de forma seriada para os casos internados, seguindo critérios descritos abaixo. Esses critérios foram discutidos pela equipe clínica envolvida na proposta e foram assim estabelecidos, considerando procedimentos que assegurem a saúde dos indivíduos

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Hospital das Clínicas/UFG - 1º Andar - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cepcufg@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 4.018.693

envolvidos na pesquisa. Desta forma, as coletas serão realizadas seguindo o protocolo de rotina de exames estabelecidos para a conduta clínica dos pacientes. Ressaltando que, a equipe clínica acompanhará o processo e, conforme o estado clínico do paciente, as coletas para a pesquisa poderão ser encerradas, ou mesmo o paciente ou seu responsável solicitarem este encerramento, sem que isso altere qualquer protocolo de atendimento do mesmo.

- Grupo 1 (população criança menores de 12 anos de idade): é proposta a realização de três (3) momentos de coletas (swab nasofaríngeo, saliva, sangue/soro, urina e fezes). A primeira no momento do recrutamento, a segunda com quatro ou cinco dias (4 ou 5) e a terceira com 14 ou 15 dias.

- Grupo 1 (indivíduos entre 12 e 18 anos e para maiores de 18 anos): é proposta a primeira coleta no momento do recrutamento e, em seguida, uma coleta seriada a cada dois ou três dias (2 ou 3), conforme conduta clínica estabelecida para o indivíduo, para os espécimes swab nasofaríngeo, saliva, sangue/soro, urina e fezes, pelo período de até 15 dias. Para casos que a internação se prolongue, é proposta coleta de sangue no dia 21 de internação. Adicionalmente, para indivíduos maiores de 18 anos que estejam intubados, é proposta a coleta de aspirado traqueal, por ser mais adequado.

- Grupo 2 (profissionais): os profissionais serão convidados a participar da pesquisa em seu ambiente de trabalho, entretanto, após primeira consulta será agendado horário e local de escolha e definição do profissional (ambiente de trabalho, domiciliar ou outro de escolha), para que o membro da equipe faça a apresentação detalhada da pesquisa. Para os casos de consentimento, será realizada a primeira coleta no momento do recrutamento e posteriormente a cada dois ou três dias (2 ou 3), por período de até 15 dias, também em local e horário definido pelo participante (swab nasofaríngeo, saliva, sangue/soro, urina e fezes). Após 21 dias da primeira coleta, é proposta uma coleta sanguínea. Será disponibilizado um contato da equipe de coleta, que estará destinada para se locomover e realizar esta atividade visando minimizar constrangimento, qualquer outro dano ou risco ao participante.

Todos os procedimentos serão realizados utilizando todo o material de coleta adequado, estéril e de qualidade, garantindo prevenção, cuidado e proteção dos participantes da pesquisa, minimizando danos e riscos. Serão também utilizados os Equipamentos de Proteção Individual apropriados para prevenção de contaminação por aerossóis, gotículas e contato. Para tal serão utilizadas máscaras N95 ou PFF3, gorro, óculos, avental e luvas. Para a coleta de swab nasofaríngeo serão utilizados swabs de Rayon, seguindo o protocolo

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Hospital das Clínicas/UFG - 1º Andar - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitario **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcufig@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 4.018.693

recomendado pelo CDC. O material será acondicionado dentro de um tubo plástico contendo meio de transporte (solução de fosfato-salina com 0,5% de gelatina), em um container com gelo, para manter a temperatura em 4°C e transportado ao Laboratório de Virologia e Cultivo Celular do IPTSP, em prazo não superior a 4 horas, sendo imediatamente processada e estocada em temperatura de -70°C, até a realização dos ensaios moleculares.

A coleta de sangue será realizada utilizando agulha e tubo de coleta descartáveis.

Serão coletados entre 10 e 20 mL de sangue (para paciente adulto e conforme orientação clínica) e até 5 mL de sangue para crianças. Para coleta de urina será fornecido recipiente específico estéril com capacidade de coleta de 20mL. As coletas de fezes também serão realizadas em recipientes estéreis entregues ao indivíduo. A coleta de fezes e urina poderá ser realizada com auxílio de membro da equipe indicado, apenas na ocasião de solicitação pelo indivíduo ou seu responsável legal. Todas as medidas que visem minimizar constrangimento ou qualquer dano serão empregadas.

Preparo das Amostras Clínicas

As secreções nasofaríngeas/aspirado coletadas serão processadas a fim de obter uma solução homogênea sem células. Brevemente, já em meio essencial mínimo, a amostra é homogeneizada em vórtex com o objetivo de liberar qualquer partícula viral para o meio. Em seguida, é centrifugado à 1300 rpm (rotação por minuto), 10°C por dez minutos. O sobrenadante é separado do sedimento celular e armazenado adequadamente em criotubo à -80°C até a realização dos ensaios moleculares.

As amostras de sangue total serão deixadas a temperatura ambiente até completa coagulação (período de até 24 horas) com posterior centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos para a obtenção do soro. As amostras de soro serão então aliqüotadas em frascos apropriados e armazenadas a -20°C e -80°C até o momento do uso. As amostras de sangue total-EDTA serão processadas, dentro de 4 horas após a coleta, para o isolamento das células mononucleares de sangue periférico (CMSP) por gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (d=1.077). Em seguida serão criopreservadas em solução constituída de 90% de soro fetal bovino inativado (Sigma) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) na concentração de 5 a 10 x 10⁶ células/ criotubo e mantidas em nitrogênio líquido.

O processamento das amostras de urina será realizado a partir de uma centrifugação a 4.000 rpm por quatro minutos, em seguida, o sobrenadante será aliqüotado, aproximadamente 1 mL, e armazenado em criotubos à -80°C até a realização dos ensaios laboratoriais.

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Hospital das Clínicas/UFG - 1º Andar - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcufig@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 4.018.693

As amostras de fezes, serão coletadas em frascos coletores estéreis e estocadas no laboratório de Virologia/IPTSP/UFG a -20°C até o preparo das suspensões fecais. As amostras fecais serão inicialmente processadas para a obtenção de uma suspensão fecal a 20% em tampão salina fosfato (PBS) pH 7,4. As suspensões serão homogeneizadas e clarificadas por centrifugação a 4.200 x g 10 minutos. Os sobrenadantes serão colhidos e estocados a -20°C até o uso.

O material genético viral (RNA ou DNA) será extraído a partir de 200µL da amostra processada utilizando Kit comercial e seguindo as instruções do fabricante. O procedimento é realizado de forma a evitar possíveis contaminações, além da adição de um controle negativo (tubo contendo água MiliQ) em cada extração realizada.

Alternativamente poderá ser realizada extração utilizando método a partir do reagente trizol.

As etapas referentes ao recebimento, processamento e diagnóstico laboratorial seguirão as práticas e procedimentos definidos em biossegurança para amostras clínicas de pacientes com suspeita ou com confirmação de infecção pelo COVID-19, seguindo práticas de contenção NB2 (OPAS, Orientações em Biossegurança Laboratorial, 2020).

Triagem Molecular

As amostras obtidas a partir dos diferentes espécimes clínicos coletados serão todas submetidas a ensaios de detecção molecular para o painel de agentes virais respiratórios e gastroentéricos, seguindo monitoramento destes agentes já estabelecido no LabViCC/IPSP/UFG e, usando protocolos e metodologias padronizados. Para a detecção de SARS-CoV-2, será padronizada a metodologia, seguindo recomendações e protocolo CDC.

Extração de Material Genético Viral

O material genético viral (RNA ou DNA) será extraído a partir de 200µL da amostra processada utilizando Kit comercial e seguindo as instruções do fabricante. O procedimento é realizado de forma a evitar possíveis contaminações, além da adição de um controle negativo (tubo contendo água MiliQ) em cada extração realizada.

Alternativamente poderá ser realizada extração utilizando método a partir do reagente trizol.

4.6.2. Detecção de Genoma Viral

Para os vírus DNA, a pesquisa de ácido nucléico viral será realizada diretamente, a partir dos produtos de extração, sendo utilizada a metodologia de PCR (Reação em

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Hospital das Clínicas/UFG - 1º Andar - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitario **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcufig@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 4.018.693

Cadeia pela Polimerase) ou qPCR (Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real). Utilizando pares de iniciadores (e sondas para qPCR) específicos, seguindo protocolos previamente estabelecidos. Para alguns vírus RNA, a metodologia disponível é a RT-PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase Pós Transcrição Reversa). Para esses, o produto da extração deverá ser submetido à reação de transcrição para síntese do cDNA, utilizando iniciadores randômico. O produto obtido será então submetido à reação de amplificação utilizando os pares de iniciadores específicos e protocolos previamente estabelecidos. Para a pesquisa de alguns vírus RNA, a metodologia de RT-qPCR (Reação em Cadeia pela Polimerase Pós Transcrição Reversa em Tempo Real) está estabelecida, nestes casos, o produto de extração será diretamente submetido à reação, utilizando pares de iniciadores, sondas e protocolos estabelecidos e padronizados. Em específico, para a pesquisa do genoma viral de SARS-CoV-2, o produto de extração obtido será submetido à reação de RT-qPCR seguindo o protocolo descrito por Corman et al. 2020. A técnica utiliza três pares de iniciadores e sondas paradiferentes regiões do genoma do SARS-CoV-2: gene RdRp, gene E e gene N. Para a reação será utilizado Kit comercial e a reação será processada em aparelho Rotor – Gene Q (Qiagen®), seguindo ciclagem proposta no protocolo.

Caracterização Molecular

As amostras positivas para algum dos vírus pesquisados, serão submetidas à caracterização molecular. Assim, se procederá uma RT-PCR convencional para amplificação dos fragmentos a serem sequenciados, utilizando protocolos descritos previamente a partir de iniciadores específicos.

Os produtos obtidos nas reações de amplificação serão purificados utilizando o sistema comercial QIAquick PCR Purification (QIAGEN, Valencia EUA), seguindo instruções do fabricante. A reação de seqüenciamento genômico será realizada diretamente, a partir do produto de purificação, em ambas as direções, utilizando o seqüenciador automático de DNA (MegaBACE ABI 3130/Applied Biosystems), segundo procedimento descrito por Sanger et al. (1977). A reação será realizada utilizando o Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction (Applied Biosystems). A qualidade dos eletroferogramas gerados e a formação das seqüências consenso (contig) serão realizadas utilizando os programas Phred/Phrap implementados no programa CodonCodeAligner 3.7.1 (Sequence Assembly and Alignment Software - CodonCode Corporation) (Ewing & Green, 1998). A identidade das seqüências será confirmada por alinhamento simples local com seqüências de referência depositadas no National Center for Biotechnology Information Database (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html),

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Hospital das Clínicas/UFG - 1º Andar - Unidade de Pesquisa Clínica

Bairro: St. Leste Universitario

CEP: 74.605-020

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3269-8338

Fax: (62)3269-8426

E-mail: cephcufig@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 4.018.693

utilizando o algoritmo BLASTn (nucleotide blast) (Altschul et al., 1990), alinhadas usando o programa Mega 5.0 (Thompson et al., 1997) e editadas usando o Jalview. As sequências únicas, alinhadas e editadas serão utilizadas para a análise filogenética.

O melhor modelo de substituição de nucleotídeos será selecionado pelo programa jModelTest (versão 2.1). A partir do modelo selecionado no jModelTest (versão 2.1) serão empregadas três metodologias para a inferência filogenética: máxima verossimilhança por meio do programa PhyML 3.0, análise bayesiana com o Mr. Bayes versão 3.2.1 e distância com o MEGA 7. Os três resultados serão comparados para comprovar a robustez das árvores filogenéticas.

Sequenciamento NGS

Para o sequenciamento viral visando avaliar mutações intra e entre hospedeiros será utilizada metodologia de sequenciamento de nova geração (NGS). Para tal, o rRNA do hospedeiro será removido das amostras de RNA extraídas positivas como descrito anteriormente (Matranga et al., 2014), usando o NEBNext rRNA Depletion Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). O ssRNA viral livre de rRNA será utilizado para a síntese de cDNA utilizando o kit SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Life Technologies, Carlsbad, California, EUA) com a preparação da biblioteca Illumina descrita previamente (Matranga et al., 2014). O double-stranded cDNA (dscDNA) será fragmentado com o Nextera DNA Sample Preparation kit (Illumina). As bibliotecas serão preparadas utilizando o MiSeq Reagent Nano Kit v2 (Illumina). Brevemente, cada amostra será quantificada utilizando o Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher). Após esta etapa, será utilizado cinco nanogramas (ng) de cada amostra e estas serão fragmentadas por reação enzimática em placa. Em seguida, será adiciona assequências de adaptadores nas extremidades dos fragmentos, permitindo que esses possam ser amplificados por PCR nos passos subsequentes.

Na amplificação será realizada a ciclagem padrão estabelecida pelo fabricante, onde um par de índice (barcodes) será adicionado a cada amostra, permitindo a identificação dos resultados posteriormente. Após a etapa de amplificação a biblioteca será purificada para retirar excessos de sais, enzimas, adaptadores e outros reagentes. Na próxima etapa, será realizada a normalização, amplificação e o sequenciamento. As sequências de DNA da biblioteca de cada amostra serão hibridizadas com sondas na flow cells a partir do terminal 3' e da extremidade 5'. Para o processamento e a montagem das leituras obtidas pelo sequenciamento no HISEQ/Illumina em reads, serão utilizados dois softwares CLCgenomics (CLCBio, Qiagen) e Bowtie. Ensaio de ELISA "in house" A fim de se estimar a soroprevalência nos grupos sintomático e assintomático do

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Hospital das Clínicas/UFG - 1º Andar - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcufig@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 4.018.693

estudo, será utilizado um ensaio de ELISA "in house" para a pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG no soro dos pacientes. O ensaio será composto de antígenos do SARS-CoV-2 (glicoproteína S recombinante) e soro hiperimune (insumos serão gentilmente cedidos por Dr. Marli Azevedo do "Food and Drug Administration" -FDA,EUA).

Determinação de sTREM-1 e CD147

A partir de amostras de soro/plasma dos indivíduos envolvidos no presente estudo, será realizada a determinação dos níveis de sTREM-1 e CD147 por ensaio imunoenzimático (ELISA) seguindo as especificações do fabricante (R&D Systems, Mienapolis, MN, EUA).

Seleção de Peptídeos Epítomos CD8 e CD4 serão selecionados com base na probabilidade de ligação às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I e II humanas, utilizando seqüências do genoma do SARS-CoV-2 circulante no Brasil disponíveis em bancos de dados. Serão utilizadas plataformas como IEDB Immune Epitope Database

And Analysis Resource - <http://www.iedb.org/#>) e Proped. Resposta Imune Específica de Células T 2x10⁶ PBMC/ml serão estimuladas com 5 µg/ml de pool de peptídeos de SARSCoV-2, controle positivo (SEB), por 5h ou 12h e produção de citocinas tais como IFNgama, IL-2, TNF-alfa, IL-17, IL-4, IL-10 detectada por citometria de fluxo. Para detecção

de citocinas nos sobrenadantes as células serão deixadas em cultura por 24 ou 48h. A proliferação celular será feita utilizando CFSE por Citometria de fluxo.

Perfil de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento

Serão determinadas no soro ou plasma ou em outros flúidos biológicos coletados dos indivíduos utilizando um painel de 27 citocinas anti-nflamatórias e inflamatórias por Luminex (kit de Bio – Plex, BioRad) conforme descrito em Barros et al., 2018 ou por kits de ELISA, conforme instruções do fabricante.

Citometria de fluxo

Caracterização das subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ (naive, efetoras ou subpopulações de memória), monócitos, linfócitos B, demais células no sangue periférico e secreções. Th1 (T-bet e CXCR3), Th2 (Gata-3, CCR4), Th17 (RORgt e CCR7/ CCR6), Tfh (Bcl6, CXCR5) e Treg pelo Foxp3. PBMC serão descongeladas e marcadas com anticorpos para live/dead, CD3, CD4, CXCR3, CCR4, CCR6, CCR7, CXCR5 com distintos fluorocromos. Células serão permeabilizadas e incubadas com anticorpos para T-bet, Gata3, RORgt, Bcl6 e Foxp3 marcados. Para linfócitos B naive e de memória, PBMC serão marcadas com antiCD3, antiCD19 e antiCD27. E monócitos serão utilizados CD14 e CD16. E marcadores de ativação (CD38, CD69, CD25, HLA-DR) e regulação (PD-1, Tim-3, Lag-3, CTLA-4) e células T de memória (CD45RA, CCR7, CD27, CD95).

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Hospital das Clínicas/UFG - 1º Andar - Unidade de Pesquisa Clínica

Bairro: St. Leste Universitário

CEP: 74.605-020

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3269-8338

Fax: (62)3269-8426

E-mail: cephcufig@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 4.018.693

Para marcadores de imunidade inata serão utilizados anticorpos anti-TLR, RIG, NOD (inflamassoma), entre outros. Será utilizada marcação para excluir células mortas (live/dead, Invitrogen). Células serão adquiridas em FACSCANTO ou Fortessa (BD) e analisadas no software FlowJo.

Transcriptoma (RNAseq) e Metabolômica

A extração de RNA de células ou sangue total será realizada utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). A análise do transcriptoma será realizada utilizando mRNA-Seq (Illumina 1x50pb sequenciamento). Para identificar genes diferencialmente expressos entre diferentes grupos serão utilizados pacotes DESeq2 (Nakaya et al., 2016). Assinaturas associadas com a evolução clínica serão identificadas. As amostras coletadas serão utilizadas para identificação de metabólitos diferencialmente expressos por UHPLC- MS/MS e IM-MS (Gardinassi et al., 2017).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

Investigar o perfil virológico, imunológico e clínico em população sintomática atendida em hospitais de Goiânia (Hospital das Clínicas - HC/EPSE/UFMG e Hospital de Campanha do estado de Goiás - HCAMP) e profissionais dessas instituições.

Objetivos Específicos

Realizar o acompanhamento clínico e laboratorial de pacientes em atendimento e profissionais selecionados, de modo a avaliar a evolução clínica e aspectos laboratoriais relevantes dos participantes do estudo;

Determinar a frequência dos vírus respiratórios e gastroentéricos pesquisados na população de estudo e a ocorrência de coinfeção por esses agentes;

Estimar a soroprevalência para o SARS-CoV-2 nos grupos de sintomáticos e assintomáticos da população de estudo através da pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG;

Relacionar as características clínicas/laboratoriais identificadas nos diferentes grupos estudados com a positividade para os vírus investigados;

Relacionar os desfechos dos quadros clínicos observados à positividade para os vírus investigados;

Identificar a presença de genomas virais, estimar a carga viral e avaliar o tempo de excreção viral nas diferentes amostras clínicas coletadas (swab nasofaríngeo, sangue/soro, urina, fezes);

Caracterizar molecularmente as amostras virais identificadas, procurando identificar possíveis mutações intra- e inter- hospedeiros, além de avaliar aspectos da evolução viral, relógio molecular

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Hospital das Clínicas/UFMG - 1º Andar - Unidade de Pesquisa Clínica

Bairro: St. Leste Universitario

CEP: 74.605-020

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3269-8338

Fax: (62)3269-8426

E-mail: cephcufig@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 4.018.693

dos vírus e perfil filogeográfico;

Identificar a ocorrência de recombinantes dos vírus nos espécimes clínicos da população de estudo;
Determinar a produção no soro/plasma do sTREM-1 e CD147 e estabelecer correlações com sintomas clínicos dos indivíduos envolvidos nesse estudo;

Avaliar os papéis do sTREM-1 e CD147 como fatores prognósticos clínicos e/ou de resposta terapêutica;
Avaliar a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no plasma ou soro frente a infecções virais, investigando a frequência de subpopulações de células T e B, naive e de memória no sangue periférico dos participantes;

Avaliar a resposta inata e imune específica aos vírus identificados após estimulação in vitro das células mononucleares do sangue periférico com antígenos virais (que serão selecionados ao longo do estudo e sintetizados) e investigar a produção de citocinas e/ou ganczimas e perforinas por linfócitos T CD4 e T CD8;
Caracterizar os perfis transcriptômicos no sangue periférico ou células do sangue e os perfis metabolômicos no plasma, urina ou outros fluidos corporais de indivíduos infectados e controles não infectados;
Correlacionar os dados virológicos e imunológicos identificados aos fatores epidemiológicos avaliados, bem como às características clínicas na população investigada.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: Todos os procedimentos de abordagem e coleta serão realizados por membros da equipe devidamente treinados e capacitados, e sempre após explicação dos procedimentos. A coleta de fezes e urina será realizada pelo próprio indivíduo e apenas, em caso de necessidade, auxiliados por membro da equipe. Estes procedimentos são indolores e todas as medidas para minimizar qualquer possível constrangimento serão aplicadas. A coleta de swab nasofaríngeo constitui procedimento geralmente indolor e não provoca sangramento, entretanto, o procedimento pode gerar um leve desconforto.

Na ocorrência desse fato, o pesquisador avaliará o tempo para o término do procedimento e a coleta poderá ser interrompida. O procedimento de coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e podendo levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada (hematoma). Será realizado utilizando material de coleta adequado de qualidade, estéril e descartável e equipamentos de proteção individual pelo coletador, sendo garantida prevenção, cuidado e proteção dos participantes da pesquisa. Serão tomadas todas as

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Hospital das Clínicas/UFG - 1º Andar - Unidade de Pesquisa Clínica

Bairro: St. Leste Universitário

CEP: 74.605-020

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3269-8338

Fax: (62)3269-8426

E-mail: cephcufig@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 4.018.693

medidas

possíveis visando minimizar constrangimento, dor, desconforto ou qualquer outro dano ou risco ao indivíduo.

BENEFÍCIOS: Os participantes da pesquisa ou seus responsáveis legais também serão esclarecidos sobre a importância de sua participação neste estudo, visando aumentar o conhecimento a respeito da COVID-19, doença ocasionada pela infecção pelo SARS-CoV-2, demais aspectos envolvidos neste processo, bem como de outros agentes virais potencialmente associados. Serão informados, de que as informações obtidas a partir dos resultados da pesquisa, auxiliarão na elaboração, ampliação e direcionamento de medidas mais eficientes de tratamento e controle para estas infecções.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores responderam às pendências:

As solicitações do Comitê de Ética em Pesquisa foram atendidas conforme enumeradas abaixo.

1. Informar como profissionais de saúde assintomáticos, que podem estar sobrecarregados no trabalho neste momento pandêmico, serão convidados a participar sem que haja comprometimento de suas tarefas (horários alternativos, coleta domiciliar, etc).

No item 4.4.2, 4o. parágrafo, página 17 da proposta, foi detalhado o procedimento para abordagem e coleta dos profissionais participantes da pesquisa. Adequações também foram realizadas no documento do TCLE.

2. Apresentar a estratégia realizada para a coleta seriada (a cada 3-5 dias) de amostras biológicas, por até duas semanas. A frase "respeitando as características particulares de cada indivíduo e apenas, se estiverem aptos para novas coletas" deve ser esclarecida: poderão ser coletadas 4 amostras de sangue, por exemplo? Em que circunstâncias serão coletadas mais ou menos amostras. Os participantes devem ser completamente esclarecidos sobre essas circunstâncias, número de amostras coletadas e quando - e da possibilidade de desistir em qualquer momento, mesmo já tendo realizado uma coleta de amostra.

No item 4.4.2, do 1o. ao 3o. parágrafo, páginas 16 e 17 da proposta, foi detalhado o procedimento para abordagem e coleta, considerando diferentes aspectos para coleta seriada nos participantes da pesquisa. Adequações também foram realizadas nos documentos do TCLE.

3. Informar como será o processo de TCLE para participantes que estejam graves ou sedados, considerando que não haverá visitas pelos familiares?

No item 4.2, no 2o. parágrafo, página 12, linhas 11 a 14, foi detalhado o procedimento para

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Hospital das Clínicas/UFG - 1º Andar - Unidade de Pesquisa Clínica

Bairro: St. Leste Universitário

CEP: 74.605-020

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3269-8338

Fax: (62)3269-8426

E-mail: cephcfg@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 4.018.693

realização do contato com a família do paciente e aplicação do TCLE.

4. Apresentar a estratégia para informar os resultados de exames aos participantes com a agilidade e rapidez necessárias ao momento pandêmico. Essa informação também deve ser registrada no TCLE que deve detalhar como (e quando) serão informados os resultados de exames a cada participante, sintomático ou não.

A realização da pesquisa não irá interferir na rotina de avaliação laboratorial e diagnóstica estabelecida pela unidade. Entretanto, a equipe de pesquisa está comprometida com o encaminhamento dos resultados o mais breve possível sejam obtidos. Esta proposta uma rotina de processamento semanal para obtenção dos resultados.

5. No TCLE apresentado foi solicitado CPF, o que não deve ocorrer. Também não deverá haver campo para assinaturas dos participantes, uma vez que não serão coletadas (bem como assinatura dactiloscópica). Deve ser mantido campo para a assinatura (e data) do pesquisador que realizou o processo de informação e coleta do consentimento verbal gravado. Todo esse processo deve ser registrado nos documentos fontes do estudo -na ficha de cada participante.

Agradecemos todas as correções e informamos que os documentos foram adequados conforme todas as observações.

6. Os TCLES deverão ser revisados para adequação da linguagem para cada tipo de convidado a participar, usando linguagem apropriada, evitando o excesso de termos técnicos.

Concordamos com todas as observações, as quais foram consideradas e adequadas, conforme orientação para distinção dos TCLES.

7. Deverá ser excluído, de todos os termos, o questionamento sobre a possibilidade de não assinatura de novo TCLE para uso futuro de amostras.

Concordamos totalmente, o questionamento foi retirado de todos os documentos.

8. Apresentar, nos termos, os dados do CEP do HC UFG Ebserh que realiza apreciação ética deste estudo (e não do CEP da UFG).

Nos desculpamos pelo ocorrido e informamos que foi realizada a correção em todos os documentos.

9. Não foi encontrado o termo de anuência do Hospital HUGOL. Solicitamos a postagem do mesmo.

Estávamos no aguardo do hospital (HUGOL) sobre o termo de anuência, como ainda não foi possível receber, optamos por dar prosseguimento retirando ele da proposta.

Análise: todas as pendências foram atendidas.

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Hospital das Clínicas/UFG - 1º Andar - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcufig@yahoo.com.br

Continuação do Parecer: 4.018.693

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos adequadamente apresentados

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Este estudo não apresenta óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este Protocolo de Pesquisa foi APROVADO na sua totalidade, de acordo com as Resoluções 466/12 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os aspectos que foram considerados para que esta decisão fosse tomada constam no parecer. A pesquisa poderá ser iniciada e toda e qualquer alteração no protocolo deverá ser comunicada ao CEP/HC/UFG, assim como relatórios semestrais e finais, notificação de eventos adversos e eventuais emendas ou modificações no protocolo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1536681.pdf	01/05/2020 19:52:46		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CONEP_2aVersao.pdf	01/05/2020 19:52:26	Fabiola Souza Fiaccadori	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Profissional.pdf	01/05/2020 19:50:37	Fabiola Souza Fiaccadori	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsavel.pdf	01/05/2020 19:50:25	Fabiola Souza Fiaccadori	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_Menor.pdf	01/05/2020 19:50:12	Fabiola Souza Fiaccadori	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Paciente.pdf	01/05/2020 19:49:36	Fabiola Souza Fiaccadori	Aceito
Outros	Resposta_Pendencia.pdf	01/05/2020 19:47:21	Fabiola Souza Fiaccadori	Aceito

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Hospital das Clínicas/UFG - 1º Andar - Unidade de Pesquisa Clínica

Bairro: St. Leste Universitario

CEP: 74.605-020

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3269-8338

Fax: (62)3269-8426

E-mail: cephcfg@yahoo.com.br

UFG - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS



Continuação do Parecer: 4.018.693

Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_HCAMP.pdf	16/04/2020 18:53:00	Fabiola Souza Fiaccadori	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_DivisaoMedica.pdf	16/04/2020 18:52:41	Fabiola Souza Fiaccadori	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_GEP_HC.pdf	16/04/2020 18:52:27	Fabiola Souza Fiaccadori	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_Pesquisadores.pdf	16/04/2020 18:19:57	Fabiola Souza Fiaccadori	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	14/04/2020 20:56:04	Fabiola Souza Fiaccadori	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf	14/04/2020 16:26:19	Fabiola Souza Fiaccadori	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GOIANIA, 11 de Maio de 2020

Assinado por:
JOSE MARIO COELHO MORAES
(Coordenador(a))

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Hospital das Clínicas/UFG - 1º Andar - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitario **CEP:** 74.605-020
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 **Fax:** (62)3269-8426 **E-mail:** cephcufig@yahoo.com.br