

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Curso de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde

Angélica Rodrigues Botelho

**IMPACTO DA SOROPOSITIVIDADE PARA CITOMEGALOVÍRUS (CMV)
NA RESPOSTA IMUNE/INFLAMATÓRIA SISTÊMICA DE INDIVÍDUOS
JOVENS-ADULTOS E IDOSOS VACINADOS PARA GRIPE**

São Paulo

2024

Angélica Rodrigues Botelho

**IMPACTO DA SOROPOSITIVIDADE PARA CITOMEGALOVÍRUS (CMV)
NA RESPOSTA IMUNE/INFLAMATÓRIA SISTÊMICA DE INDIVÍDUOS
JOVENS-ADULTOS E IDOSOS VACINADOS PARA GRIPE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Orientador: Prof. Dr. André Luís Lacerda Bachi e Coorientadora a Profa. Dra. Patrícia Colombo.

São Paulo

2024

B76i

Botelho, Angélica Rodrigues.

Impacto da soropositividade para citomegalovírus (CMV) na resposta imune/inflamatória sistêmica de indivíduos jovens-adultos e idosos vacinados para gripe / Angélica Rodrigues Botelho. – São Paulo, 2024.

46 p. : il., P&B.

Orientador: André Luís Lacerda Bachi.

Dissertação. (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Santo Amaro, 2024.

Bibliografia incluída.

1. Imunossenescência. 2. Inflammaging. 3. Influenza. I. Bachi, André Luís Lacerda, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

CDD 579.2

RESUMO

Introdução: Dentre vários aspectos, é sabido que a população idosa se apresenta não apenas como a população mais afetada, mas também que esta contabiliza o maior número de mortes pela gripe. Estudos sugerem que o aumento da taxa de infecção, gravidade e letalidade pelo vírus *Influenza*, agente causador da gripe, em idosos está associada tanto à ocorrência da imunossenescência quanto do fenômeno “*inflammaging*”. Neste sentido, tem sido proposto que a reativação da infecção pelo citomegalovírus (CMV), um herpes vírus, pode favorecer o desenvolvimento da imunossenescência, pelo fato deste poder ser um importante fator desencadeante do “*inflammaging*”. Vale destacar que é sabido que a imunossenescência e o “*inflammaging*” impactam de forma negativa nas respostas vacinais dos idosos. Em contrapartida, outros estudos mostram que a presença do CMV pode potencializar a resposta imune em pessoas jovens-adultas. **Objetivo:** Este estudo objetiva investigar o impacto da soropositividade para CMV sobre as respostas imunes/inflamatórias em jovens-adultos idosos vacinados para a gripe. **Métodos:** Para isso, foram convidados a participar deste estudo 109 pessoas soropositivas para CMV, tanto jovens-adultos (GJA, n=42, média de idade 31,13±9,33 anos), quanto idosos (GI, n=67, média de idade 71,22±11,11 anos), saudáveis, de ambos os sexos, todos vacinados contra a gripe. Amostras de sangue foram obtidas em dois momentos: antes e 30 dias após a vacinação e foram utilizadas para confirmação da soropositividade para CMV, além da avaliação das concentrações sistêmicas de IgA, IgM e IgG específicas para antígenos da vacina contra a gripe, bem como das citocinas pró e anti-inflamatórias. **Resultados:** Enquanto o GJA mostrou aumento significativo de IgA e IgG, o GI apresentou maiores níveis de IgM e IgA, bem como de IgG para CMV, no momento pós-vacinação quando comparado ao momento pré-vacinação. Na avaliação intergrupos, o GJA mostrou maior nível de IgM no momento pré-vacinação do que no GI. Já, no momento pós-vacinação, enquanto o GI mostrou maiores níveis de IgM do que no GJA, os níveis de IgG no GJA foram maiores do que no GI. Interessantemente, não somente os níveis de IgA, mas também de IgG para CMV, observados no GI foram maiores do que no GJA, tanto pré- quanto pós-vacinação. Além destes, vale ressaltar que significativas correlações positivas e negativas foram observadas entre as concentrações séricas das imunoglobulinas e citocinas nos grupos estudados tanto pré- quanto pós-vacinação. **Conclusão:** De maneira geral, o GJA mostrou melhor resposta a vacinação para gripe do que o GI e a soropositividade para CMV aparentemente mostrou um papel importante na resposta de anticorpos à vacinação particularmente no GJA.

Palavras-chave: imunossenescência, *inflammaging*, anticorpos, *Influenza*.

ABSTRACT

Introduction: Studies suggest that the increased infection rate, severity, and lethality of the Influenza virus in the elderly are associated with both immunosenescence and the "inflammaging" phenomenon. In this context, it has been proposed that the reactivation of cytomegalovirus (CMV), a herpes virus, may contribute to the development of immunosenescence, as it can be a significant trigger of "inflammaging." It is noteworthy that both phenomena negatively impact the vaccine responses of the elderly. Conversely, other studies show that the presence of CMV can enhance the immune response in young-adult individuals. **Objective:** This study aims to investigate the impact of CMV seropositivity on antibody responses in young-adult elderly individuals vaccinated against influenza. **Methods:** For this purpose, 109 CMV seropositive individuals were invited to participate in this study, including both young-adults (GJA, n=42, mean age 31.13±9.33 years) and elderly (GI, n=67, mean age 71.22±11.11 years), of both genders, all vaccinated against influenza. Blood samples were collected at two time points: before and 30 days after vaccination, and were used to confirm CMV seropositivity, as well as to assess systemic concentrations of specific IgA, IgM, and IgG for influenza vaccine antigens through the ELISA test, as well as neutralizing antibodies through the hemagglutination inhibition assay. **Results:** Whereas GJA showed a significant increase in IgA and IgG, GI exhibited higher levels of IgM and IgA, as well as IgG for CMV, in the post-vaccination period compared to the pre-vaccination period. In the intergroup analysis, GJA showed higher levels of IgM before vaccination than GI. However, post vaccination, while GI showed higher levels of IgM than GJA, IgG levels in GJA were higher than in GI. Interestingly, not only the levels of IgA but also IgG for CMV in GI were higher than in GJA, both pre- and post-vaccination. Both volunteer groups showed an increase in neutralizing antibody titers post-vaccination as compared to pre-vaccination values. Besides, whereas GJA showed significant negative correlations between neutralizing antibody titers and serum levels of IgA and IgG at the pre-vaccination, as well as significant positive correlations between circulating levels of IgM for the flu vaccine and IgG for CMV and between serum levels of IgA and IgG for the vaccine postvaccination, the GI group showed a significant positive correlation between prevaccination IgM and IgG levels, in addition to a negative correlation between serum levels of IgA and IgG for post-vaccination vaccine. **Conclusion:** In general, GJA showed a better response to influenza vaccination than GI, and seropositivity for CMV apparently showed an important role in the antibody response to vaccination, particularly in GJA.

Keywords: immunosenescence, inflammaging, antibodies, Influenza.

Lista de tabelas

Tabela 1 – Análise do coeficiente de correlação de Spearman entre os níveis circulantes dos anticorpos IgA, IgM e IgG específicos para os antígenos da vacina contra o vírus Influenza, IgG para CMV e HIA nos momentos pré- (V1) e pós- (V2) vacinação para o vírus Influenza nos grupos de indivíduos jovens-adultos e idosos.....	16
--	----

Lista de figuras

Figura 1 – Concentração sérica dos anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) específicos aos antígenos presentes na vacina contra o vírus Influenza no grupo de voluntários jovem-adultos, nos momentos pré (V1) e pós (V2) vacinação. Além disso, também são apresentados os dados referentes a imunogenicidade obtida para IgG (D), IgM (E) e IgA (F). * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$ 11

Figura 2 – Concentração sérica dos anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) específicos aos antígenos presentes na vacina contra o vírus Influenza no grupo de voluntários idosos, nos momentos pré (V1) e pós (V2) vacinação. Além disso, também são apresentados os dados referentes a imunogenicidade obtida para IgG (D), IgM (E) e IgA (F). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ 12

Figura 3 – Concentração sérica dos anticorpos do isotipo IgG para CMV no grupo de voluntários jovem-adultos (A) e idosos (B), nos momentos pré (V1) e pós (V2) vacinação. * $p < 0,05$ 13

Figura 4 – Comparação das concentrações séricas dos anticorpos IgM (A), IgG (B) e IgA (C) específicos aos antígenos presentes na vacina contra o vírus Influenza, bem como de IgG para CMV (D) nos grupos de voluntários jovem-adultos e idosos, nos momentos pré (V1) e pós (V2) vacinação. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,00001$ 14

Figura 5 – . Comparação dos títulos de anticorpos neutralizantes nos grupos de voluntários jovem-adultos e idosos, nos momentos pré (V1) e pós (V2) vacinação. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,00001$ 15

Lista de abreviaturas e siglas

CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CMV	Citomegalovírus
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
H1N1	<i>Influenza A</i> subtipo H1N1
HIA	Ensaio de inibição da Hemaglutinação
HAU	Unidades hemaglutinadoras
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
MDCK	Células renais caninas de Madin-Darby
MHC	Major histocompatibility complex
NK	<i>Natural Killer</i>
RSV	<i>Respiratory syncytial vírus</i>
SARS	<i>Severe acute respiratory syndrome</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	T reguladoras
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UNISA	Universidade Santo Amaro

SUMÁRIO

RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	6
2.1. Objetivos Específicos.....	6
3. Materiais e Métodos.....	6
3.1. População do estudo.....	7
3.2. Critérios de inclusão.....	8
3.3. Critérios de exclusão.....	8
3.4. Coleta dos materiais biológicos.....	8
3.5. Determinação da soropositividade para CMV.....	9
3.6 Determinação de IgA, IgM e IgG específicas para o vírus Influenza.....	9
3.7 Ensaio de Inibição da Hemaglutinação (HIA).....	9
3.8 . Análise estatística.....	10
4. Resultados.....	11
5. Discussão.....	16
6. Conclusão.....	26
7. Referências.....	27
8. Anexos.....	36

1. INTRODUÇÃO

A imunossenescência é um fenômeno relacionado ao declínio da função imune associado ao envelhecimento, que se caracteriza dentre outros aspectos à maior suscetibilidade de ocorrência de infecções principalmente respiratórias^{1, 2}.

Corroborando estas informações, foi relatado que episódios de gripes, relacionadas ao vírus *Influenza* e complicações secundárias, representavam a quarta causa de morte em pessoas com mais de 65 anos de idade nos países desenvolvidos, e estimava-se que dentre 1000 a 6000 pessoas que morriam durante uma epidemia de *Influenza*, as pessoas imunocomprometidas e os idosos seriam os grupos de maior risco³⁻⁵, em especial pelo fato de apresentarem significativa redução das atividades imunes.

Dentre as alterações nas células do sistema imune inato associadas à imunossenescência, destacam-se: a redução da produção e liberação de ânion superóxido em resposta a bactérias Gram-positivas pelos granulócitos (em especial os neutrófilos), mudanças na fluidez da membrana, na quimiotaxia e, mudanças nas vias de transdução de sinais intracelulares têm sido observadas nestas células. Entretanto, o número total dessas células não se mostra reduzido⁶. Outro aspecto relevante a ser destacado é a possível modulação fenotípica dos monócitos durante o envelhecimento. É sabido que monócitos podem se diferenciar em macrófagos nos tecidos e estes em indivíduos idosos, apresentam uma redução no seu potencial oxidativo, com capacidade reduzida de produzir o ânion superóxido e o óxido nítrico⁷, além de se mostrarem incapazes de expressar moléculas de MHC classe II, deste modo prejudicando sua capacidade de apresentar antígenos e desencadear uma eficiente resposta de linfócitos auxiliares (CD4+)^{8, 9}. Apesar de ainda não estar completamente elucidado se o processo de envelhecimento afeta as células dendríticas, estudos em modelos animais mostram que a expressão de moléculas de superfície essenciais para uma eficiente apresentação do antígeno, como o MHC classe II e coestimuladores, mostra-se reduzida em células dendríticas da pele de camundongos idosos¹⁰.

Com relação às células *Natural Killers* (células NK), estas são consideradas como as principais células imunes inatas especializadas na destruição de células infectadas

por vírus e em idosos saudáveis, embora sua atividade citotóxica e capacidade de produção de citocinas mostrem-se reduzida no nível de uma única célula, o aumento do número dessas células permite que tanto a citotoxicidade como a resposta de citocinas no total sejam preservadas. No entanto, idosos com doenças crônicas e frágeis apresentam menor citotoxicidade mediada por essas células o que está associada a maior suscetibilidade a infecções e aumento da mortalidade^{11, 12}.

Em se tratando especificamente de imunossenescência relacionada à imunidade adaptativa, uma das mais pronunciadas mudanças presentes no processo de imunossenescência é a involução do timo, com evidente declínio da produção de linfócitos T “naive”. Em decorrência dessa redução é observada importante limitação da habilidade de gerar a resposta imune específica a novos antígenos^{9, 13}. Isso é particularmente preocupante quando o indivíduo idoso tem contato com um novo patógeno, especialmente em situações de endemias ou epidemias emergentes, como pôde ser observado em 2002 com a síndrome respiratória aguda severa ou SARS (*severe acute respiratory syndrome*) causada por um tipo de coronavírus, que, em Beijing, China, foi responsável pela morte de aproximadamente 43% das pessoas infectadas com mais de 70 anos de idade¹⁴.

É interessante notar que ao mesmo tempo que se observa uma significativa redução dos linfócitos T “naive”, seja pela involução do timo ou ainda pela indução de apoptose destas células pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, o número de linfócitos TCD4+ e TCD8+ efetores ou de memória está aumentado. Tem sido sugerido que o acúmulo dessas células T diferenciadas direcionaria a expansão de poucos clones restritos a poucos epítomos, o que levaria a uma redução do repertório imunológico¹⁵. Além disso, mudanças no fenótipo das células circulantes para estágios mais diferenciados pelo aumento da expressão do marcador de senescência CD57, associada com limitada capacidade proliferativa, por exemplo, pela perda da expressão de moléculas coestimuladoras, como o CD28^{9, 16}, são frequentemente correlacionados com a reduzida resposta imune à vacinação contra o vírus Influenza em indivíduos idosos¹⁷.

Neste sentido, tem sido observado que linfócitos TCD4+ e, principalmente, TCD8+ com perda da expressão do CD28 apresentam não apenas expressiva redução dos telômeros e da sua capacidade proliferativa induzida por antígeno, bem como aumento

da produção de moléculas pró-inflamatórias¹⁵. Particularmente em idosos, a presença de linfócitos TCD8+CD28- se mostrou associada à diminuição da resposta imune contra patógenos e à vacinação, além do aumento da mortalidade desta população¹⁸.

Por mais interessante que estas informações sejam, vale também destacar que em conjunto com a regulação negativa da molécula CD28, os linfócitos TCD4+ e TCD8+ apresentam a expressão do CD57, um marcador de diferenciação terminal¹⁹. Segundo a literatura, linfócitos TCD8+CD28+CD57- repetidamente ativados por antígenos, podem inicialmente reduzir a expressão do CD28, tornando-se então linfócitos TCD4+ e TCD8+CD28-CD57- e, logo em seguida, expressar o CD57, adquirindo assim o fenótipo de células terminalmente diferenciado, sendo consideradas células senescentes²⁰.

Além destas informações, é importante salientar que quando ocorre a ativação da célula T “naive”, dependendo das citocinas que estão presentes no momento da sua ativação, estas células irão adquirir um perfil de ativação conhecido como “*helper*”, podendo ser do tipo 1 (Th1), 2 (Th2), 17 (Th17) ou ainda um perfil regulador (Treg)²¹. Além destes perfis de ativação, outro aspecto observado durante o envelhecimento é o aumento do número de linfócitos T de perfil regulador (CD4+CD25+FoxP3+), na periferia²².

Assim como os linfócitos T, o repertório de linfócitos B na periferia parece estar restrito a células de memória, com número reduzido de células “naive”, além da expansão clonal restrita e resposta diminuída ao processo de apoptose²³. As mudanças observadas nos linfócitos B também estão associadas ao prejuízo da imunidade de mucosa em indivíduos idosos, pois, uma eficiente proteção da mucosa contra a invasão de patógenos é garantida pela imunoglobulina A secretora (IgAs)²⁴ e com a redução da capacidade de resposta por esses linfócitos, a produção desse tipo de anticorpo em idosos diminui, favorecendo o aumento da susceptibilidade a infecções, como pelo vírus *Influenza*⁹. Com relação à resposta de anticorpos neutralizantes (IgM e IgG) presentes no soro produzidos após a vacinação contra o vírus *Influenza*, indivíduos idosos apresentam uma evidente redução, pois, além da diminuída produção, estes anticorpos apresentam meia-vida mais curta e baixa afinidade aos antígenos⁹. Assim, a prevalência de infecções nas vias aéreas superiores tende a aumentar com a idade e uma das explicações para esta constatação deriva do fato de que muitos idosos por não

desenvolverem evidentes títulos de anticorpos após a imunização, como, por exemplo, contra a vacina da gripe, tornam-se mais vulneráveis a infecções pelo vírus *Influenza*²⁵,²⁶.

Outro aspecto importante evidenciado em estudos que envolvem a resposta imune/inflamatória em idosos diz respeito ao fato do aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias pode responder pela maior parte das alterações da resposta imune decorrentes do envelhecimento. Neste sentido, tem sido demonstrado que durante o envelhecimento, em conjunto com a imunossenescência, também pode ser evidenciada a ocorrência de um fenômeno chamado de “*inflammaging*”, que segundo Franceschi e colaboradores se traduz em uma inflamação crônica, sistêmica, estéril de baixo grau associada ao envelhecimento²⁷, sendo que essa “desregulação” da inflamação prejudica as respostas imunes a patógenos e vacinas^{4, 28}.

Dentre os fatores que podem associar-se ao desenvolvimento do “*inflammaging*”, tem sido proposto que a elevação das concentrações sistêmicas de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina (IL)-6, pode ser decorrente da reativação da infecção pelo citomegalovírus (CMV), um herpes vírus, o que favorece o desencadeamento da imunossenescência, pelo fato deste poder ser outro fator desencadeante do “*inflammaging*”. Neste sentido, foi observado que a presença deste vírus está associada à mortalidade prematura e é um componente do fenótipo de risco imunológico para predição da longevidade das pessoas idosas^{29, 30}. O CMV está ligado ao seu hospedeiro, também, através do sistema imune, pois o vírus utiliza células mielóides como seu principal reservatório e utiliza a resposta inflamatória do hospedeiro para perpetuar seu ciclo de vida, além de evitar sua eliminação. Vale ressaltar que citocinas pró-inflamatórias podem atuar reativando o vírus do seu estado de latência para uma situação de ativa replicação viral. Assim, os repetidos ciclos de reativação assintomática e replicação do CMV amplificam o estado pró-inflamatório sistêmico dos indivíduos³¹, em especial nos idosos. Em relação, especificamente às doenças respiratórias e a infecção por CMV, o estudo de Johnstone et al.³², mostrou que os idosos, residentes em casas de repouso, com elevado número de células TCD4+ reativas a CMV apresentaram maior risco de desenvolver doença respiratória viral. Ainda sobre este trabalho, vale destacar que dentre os 1072 idosos que participaram deste

estudo, com idade média de 86 anos, a positividade para vírus respiratórios foi de: influenza (24%), RSV (14%), coronavírus (32%), rinovírus (17%), metapneumovírus humano (9%) e parainfluenza (5%).

Em se tratando de prevenção a infecções respiratórias, é amplamente aceito que as vacinas constituem uma medida efetiva na prevenção de algumas doenças, particularmente respiratórias, tendo como intuito o desenvolvimento de uma proteção imunológica de longo prazo. Para isso, é fundamental que a pessoa vacinada apresente uma eficiente resposta imunológica com produção de anticorpos e formação da memória imunológica. Mundialmente são desenvolvidos diversos programas de vacinação em massa baseado no conceito de que a prevenção é mais eficaz e menos onerosa do que o tratamento de uma doença estabelecida, tanto para o indivíduo como para a sociedade. Deste modo, a intenção é diminuir ou erradicar várias doenças associadas com significativa mortalidade e morbidade⁹.

No caso da vacinação para o vírus *Influenza*, esta tem se mostrado de grande valia para sua prevenção e suas complicações, tendo sido demonstrado que quando a composição da vacina coincide com a cepa de vírus circulante, sua eficácia em adultos saudáveis é de 70 a 90%, porém cai para 30 a 50% em indivíduos com mais de 60 anos³³,³⁴ pelas alterações que o sistema imune destes indivíduos sofre. Assim, a vacinação em crianças pequenas, que estão desenvolvendo seu repertório imunológico, em imunocomprometidos e nos idosos, pela queda da competência imunológica que estes grupos apresentam muitas vezes é menos eficaz e apresentam-se como grande desafio para a manutenção da saúde⁹.

Ao se referir ao CMV, deve-se notar que as citocinas pró-inflamatórias podem desencadear a reativação do vírus de um estado latente para replicação viral ativa. Assim, ciclos repetidos de reativação e replicação podem não somente amplificar um estado pró-inflamatório sistêmico como também favorecer a detecção de níveis de DNA deste vírus em amostras sanguíneas, especialmente em idosos. De forma interessante, foi demonstrado que os títulos de anticorpos contra CMV se correlacionam positivamente com citocinas pró-inflamatórias sistêmicas e inversamente com respostas de anticorpos pós-vacinação para o vírus *Influenza*, particularmente em idosos^{35, 36}.

Outra marcante característica diz respeito ao fato da prevalência de infecção pelo CMV aumentar à medida que as pessoas envelhecem, passando de 30% em crianças para mais de 90% em indivíduos com 80 anos ou mais. Embora tanto a infecção primária quanto a reativação do CMV, em geral, não causem problemas em pessoas saudáveis, quando isso ocorre em pessoas com sistema imunológico comprometido ou imaturo, verifica-se a manifestação de significativos problemas³⁷.

Além desta breve descrição sobre a resposta imune ao vírus Influenza com destaque aos aspectos relacionados ao envelhecimento, vale salientar que recentemente nosso grupo mostrou que o “status” sorológico para CMV em idosos se traduz como um fator determinante na resposta a vacinação para o vírus *Influenza* em idosos³⁵. Assim, fica evidente que a ampliação do conhecimento das respostas imunes/inflamatórias em jovens-adultos e idosos vacinados contra a gripe é essencial para podermos avançar no entendimento de como gerar uma eficiente proteção à infecção pelos vírus Influenza.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da soropositividade para o citomegalovírus (CMV) sobre a resposta sistêmica de anticorpos em indivíduos jovens-adultos e idosos vacinados contra o vírus *Influenza*.

2.1. Objetivos Específicos

Propôs-se avaliar antes e após a vacinação:

- A soroconversão para a vacinação através da quantificação de IgA, IgM e IgG;
- Os títulos de anticorpos neutralizantes para o vírus *Influenza* (H1N1)
- A quantificação dos níveis séricos de IgG específicos para CMV;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo configura-se do tipo prospectivo longitudinal, com dois tempos (pré-pós) e análise cega de desfechos. Vale ressaltar que os dados utilizados no

presente estudo foram obtidos em dois momentos distintos: até 24 horas antes e 30 dias após a vacinação para o vírus *Influenza*.

Este estudo foi aprovado pelo Comitês de Ética e Pesquisa da Universidade Santo Amaro sob número 6.523.745. Todos os participantes receberam todas as informações acerca do estudo e aqueles que atenderam aos quesitos de recrutamento e que concordaram em participar foram orientados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Também é importante salientar que todos os experimentos realizados estavam de acordo com a Declaração de Helsinque.

3.1. População do estudo

Foram convidados a participar deste estudo, por adesão voluntária, 145 indivíduos jovens-adultos e idosos, de ambos os sexos, imunizados contra o vírus *Influenza* e que apresentem soropositividade para infecção pelo CMV. Para poder responder aos objetivos deste estudo, foi proposto separar os voluntários em dois grupos: soropositivos jovens-adultos (GJA, n=40) e soropositivos idosos (GID, n=55) para infecção pelo CMV. O número da amostra preconizada para o estudo foi determinado através do cálculo amostral utilizando o programa G*Power, considerando as informações obtidas anteriormente por nosso grupo em termos da resposta de anticorpos específicos (IgG) para vacina da gripe em idosos soropositivos para CMV³⁵. O cálculo mostrou a necessidade de 40 voluntários para grupo o grupo jovem-adulto (desvio do valor médio em função do nível de confiança de 90%; margem de erro máximo admissível = 10%; e poder de amostra de 0,95). Assim, dentre os voluntários que inicialmente aceitaram participar voluntariamente da pesquisa, ou seja, 93 idosos e 52 jovens-adultos, neste estudo foi possível contar com a participação efetiva de 67 indivíduos para o grupo de indivíduos idosos e 42 indivíduos para o grupo de indivíduos jovens-adultos, o que está de acordo com o “n” preconizado para cada grupo pelo cálculo amostral.

Os voluntários de ambos os grupos foram submetidos à mesma vacina disponibilizada na Campanha Nacional de Vacinação para Gripe em 2022. Vale destacar que todos os participantes idosos foram recrutados e selecionados junto à Disciplina de Geriatria e Gerontologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), com auxílio

do médico geriatra e colaborador do estudo, e que a média de idade deste grupo foi de $71,22 \pm 11,11$ anos.

Já os participantes do grupo jovem-adulto foram selecionados e recrutados junto ao Comando da 2ª Região Militar do Exército Brasileiro e a média de idade deste grupo foi de $31,13 \pm 9,33$ anos.

Vale ressaltar que os idosos recrutados junto à Disciplina de Geriatria e Gerontologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e os jovens-adultos recrutados junto ao Comando da 2ª Região Militar do Exército Brasileiro eram indivíduos fisicamente ativos, conforme autorrelato.

3.2. Critérios de inclusão

Como critério de inclusão tivemos: ter idade entre 18 e 39 anos (grupo jovem-adulto) e entre 60 e 85 anos de idade (grupo idoso) no momento do recrutamento; não apresentar sintomas que indicam estar infectado pelos vírus SARS-CoV-2 e/ou *Influenza* no momento da coleta; não ser soropositivo para o HIV, não ter doenças neurológicas ou câncer; ter sido vacinado para o vírus *Influenza*; concordar em participar da pesquisa.

3.3. Critérios de Exclusão

Como critérios de exclusão tivemos: estar submetido à corticoterapia ou fazer uso de qualquer outro medicamento anti-inflamatório não-esteróide há, pelo menos, um mês anterior a coleta; ou ainda não comparecer a alguma fase do estudo.

3.4. Coleta dos materiais biológicos

As amostras de sangue periférico foram coletadas em dois momentos distintos: até 24 antes e 30 dias depois da vacinação para o vírus *Influenza*.

Essas amostras foram coletadas em tubos apropriados para obtenção de alíquotas de soro e/ou plasma (mínimo de $500\mu\text{L}$) a partir da coagulação ou não do sangue no próprio tubo de coleta e após centrifugação a 2500rpm por 10 minutos a 4°C , sendo as mesmas posteriormente congeladas a -80°C para posterior análises preconizadas no estudo e descritas a seguir.

3.5. Determinação da soropositividade para CMV

A soropositividade para CMV foi avaliada por meio da análise dos níveis plasmáticos específicos de IgG para CMV, utilizando kits de teste ELISA comerciais (BioClin, MG, Brasil), segundo as orientações e recomendações do fabricante. A soropositividade para CMV dos voluntários foi definida como uma concentração de IgG $\geq 1,32$ IU/mL, respectivamente, conforme a informação do fabricante.

3.6. Determinação de IgA, IgM e IgG específicas para o vírus Influenza

A concentração sérica dos anticorpos específicos (IgA, IgM e IgG) para a vacina contra o vírus da *Influenza* foi avaliada por meio de um teste ELISA "in house", seguindo o protocolo previamente descrito por nosso grupo em Bachi *et al.*³⁸. Resumidamente, em todas as reações, os soros foram diluídos em PBS + 0,1% Tween (PBS-T) contendo 0,25% de BSA (PBS-T-BSA), sendo utilizada a diluição 1:4000 nas avaliações de IgA e IgM, e 1:10.000 na avaliação de IgG. Os anticorpos secundários (anti-humanos conjugados à peroxidase) IgA, IgM e IgG (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foram diluídos em 1:5000 em PBS-T-BSA para as avaliações de de IgA e IgM, e 1:10.000 para a avaliação de IgG. A absorbância foi lida em 450nm em um leitor de microplacas (Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer, ThermoFisher, Waltham, MA, EUA).

3.7. Ensaio de Inibição da Hemaglutinação (HIA)

O ensaio HIA foi realizado seguindo o protocolo previamente descrito por nosso grupo em Monteiro *et al.*³⁹. Resumidamente, o procedimento teve início a partir da preparação de uma solução contendo o vírus *Influenza A* (H1N1), que foi obtido após o seu cultivo em células MDCK e criopreservação a -80°C . A concentração do vírus foi ajustada para 4 HAU (unidades hemoaglutinadoras) em 50 μL de PBS. O teste consistiu em diluir os soros, de forma seriada, até o valor máximo de 1:2048 e adicionar a solução do vírus, previamente diluído, a cada poço da microplaca com 96 poços, exceto nos controles. Após a incubação de 30 minutos, a mistura (soro e vírus) foi adicionada uma solução de hemácias (hemácias e PBS), e após 30 minutos a aglutinação foi observada a olho nu, onde inclina-se a placa e observando a presença (positivo) ou ausência (negativo) da inibição da hemaglutinação ("lágrima" escorrendo). Vale informar que os

resultados deste teste, ou seja, os títulos de HIA correspondem ao valor do último ponto da diluição sérica sem aglutinação.

3.8. Análise estatística

Os dados contínuos e semicontínuos foram inicialmente comparados com a curva de Gauss e determinado a normalidade para cada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. A homogeneidade da variância foi verificada pelo teste de Levene.

Pelo fato de que todos os dados possuíam comportamento não paramétrico, estes foram representados por mediana e quartis, e as comparações Intragrupo e Intergrupo foram realizadas através Teste de Wilcoxon e Kruskal-Wallis com pós-teste de Müller-Dunn.

Utilizando o teste de *Spearman* foi avaliada a correlação entre as variáveis estudadas.

Para todas as análises foi considerado o risco $\alpha \leq 0,05$ ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

A Figura 1 apresenta os resultados obtidos na avaliação da concentração sérica dos anticorpos IgG (Figura 1A), IgM (Figura 1B) e IgA (Figura 1C), nos momentos pré- e pós-vacinação contra o vírus Influenza, no grupo jovem-adulto. Foi possível evidenciar um aumento significativo dos níveis de IgG ($p < 0,0001$) e IgA ($p = 0,0253$) no momento pós-vacinação quando comparados aos valores obtidos no momento pré-vacinação. Além disso, também foi possível obter dados acerca da imunogenicidade à vacinação nos voluntários deste grupo. Neste sentido, enquanto a imunogenicidade para IgG foi de 78,37% (Figura 1D), para IgM foi 62,16% (Figura 1E) e para IgA foi 67,57% (Figura 1F).

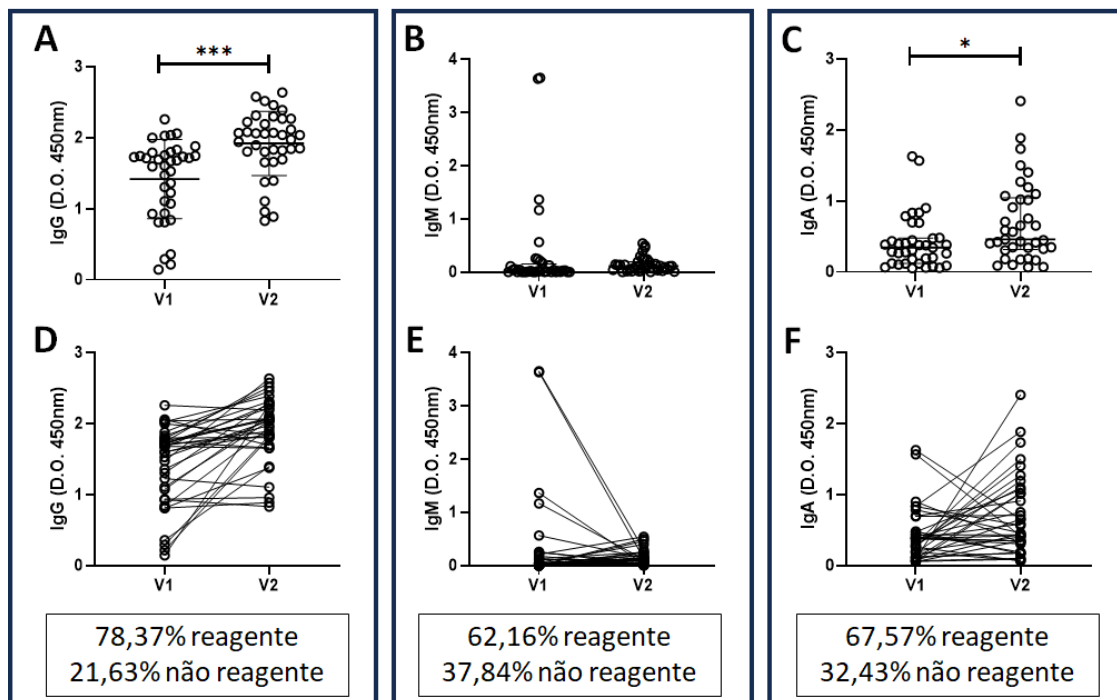


Figura 1. Concentração sérica dos anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) específicos aos antígenos presentes na vacina contra o vírus *Influenza* no grupo de voluntários jovem-adultos, nos momentos pré (V1) e pós (V2) vacinação. Além disso, também são apresentados os dados referentes a imunogenicidade obtida para IgG (D), IgM (E) e IgA (F). * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$.

Na Figura 2 são apresentados os resultados referentes as análises das concentrações séricas dos anticorpos IgG (Figura 2A), IgM (Figura 2B) e IgA (Figura 2C), nos momentos pré- e pós-vacinação contra o vírus Influenza no grupo de voluntários idosos. Interessantemente, enquanto não houve diferença nos níveis de IgG, pode-se verificar maiores níveis tanto da IgM ($p = < 0,0001$) quanto da IgA ($p = 0,0044$) no momento pós-vacinação do que os valores no momento pré-vacinação. Além disso, na avaliação da imunogenicidade à vacinação nos voluntários deste grupo, obteve-se um valor de 46,27% para IgG (Figura 2D), 85,07% para IgM (Figura 2E) e 64,15% para IgA (Figura 2F).

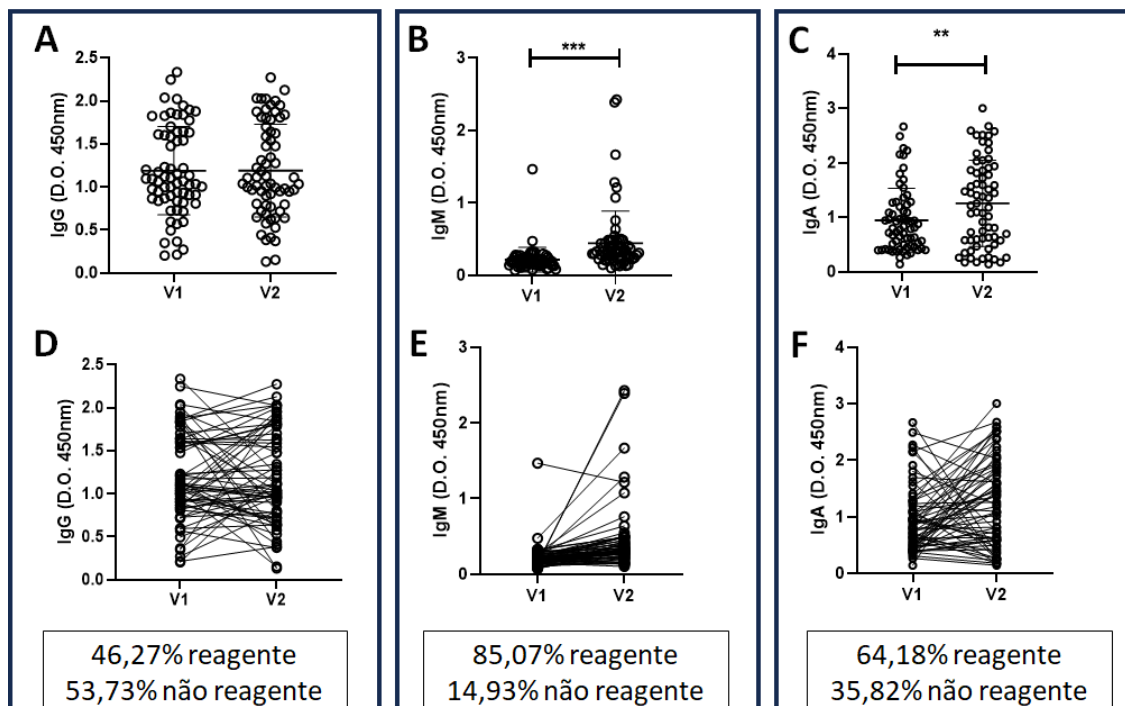


Figura 2. Concentração sérica dos anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) específicos aos antígenos presentes na vacina contra o vírus *Influenza* no grupo de voluntários idosos, nos momentos pré (V1) e pós (V2) vacinação. Além disso, também são apresentados os dados referentes a imunogenicidade obtida para IgG (D), IgM (E) e IgA (F). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

A Figura 3 apresenta os resultados obtidos na avaliação da concentração sérica dos anticorpos do isotipo IgG para CMV nos momentos pré- e pós-vacinação nos grupos de voluntários jovem-adultos (Figura 3A) quanto idosos (Figura 3B). Pode-se verificar que somente no grupo de idosos houve aumento significativo dos níveis deste anticorpo no momento pós-vacinação quando comparados com os valores pré-vacinação ($p = 0,0113$, Figura 3B).

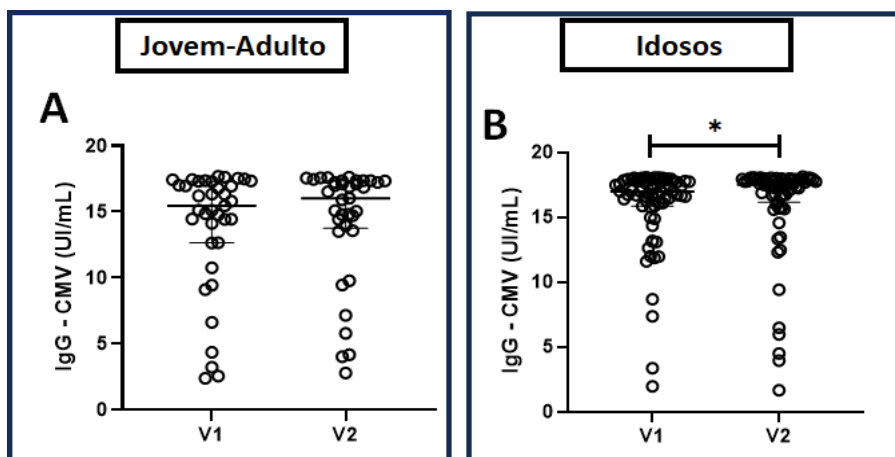


Figura 3. Concentração sérica dos anticorpos do isotipo IgG para CMV no grupo de voluntários jovem-adultos (A) e idosos (B), nos momentos pré (V1) e pós (V2) vacinação. * $p < 0,05$.

Na Figura 4 são apresentados os dados obtidos na avaliação intergrupos. Pode-se evidenciar que no momento pré-vacinação os níveis séricos de IgM (Figura 4A) no grupo jovem-adulto mostraram-se maiores do que os valores observados no grupo idoso ($p = 0,0007$), enquanto no momento pós-vacinação o grupo idoso mostrou maiores níveis deste tipo de anticorpo do que o grupo jovem-adulto ($p = < 0,0001$). Já na análise dos níveis circulantes de IgG (Figura 4B), o grupo jovem-adulto mostrou-se aumento significativo de seus níveis no momento pós-vacinação quando comparados aos valores encontrados no grupo de voluntários idosos ($p = < 0,0001$). Com relação a concentração sérica de IgA, pode-se verificar que os níveis obtidos tanto no momento pré- quanto pós-vacinação no grupo idoso foram maiores do que no grupo jovem-adulto ($p = < 0,0001$ e $p = 0,0017$, respectivamente). De maneira similar aos achados para IgA, maiores concentrações séricas de IgG para CMV foram também encontradas no grupo idoso, tanto no momento pré- quanto pós-vacinação, em comparação aos valores observados no grupo jovem-adulto ($p = 0,0108$ e $p = 0,0009$, respectivamente).

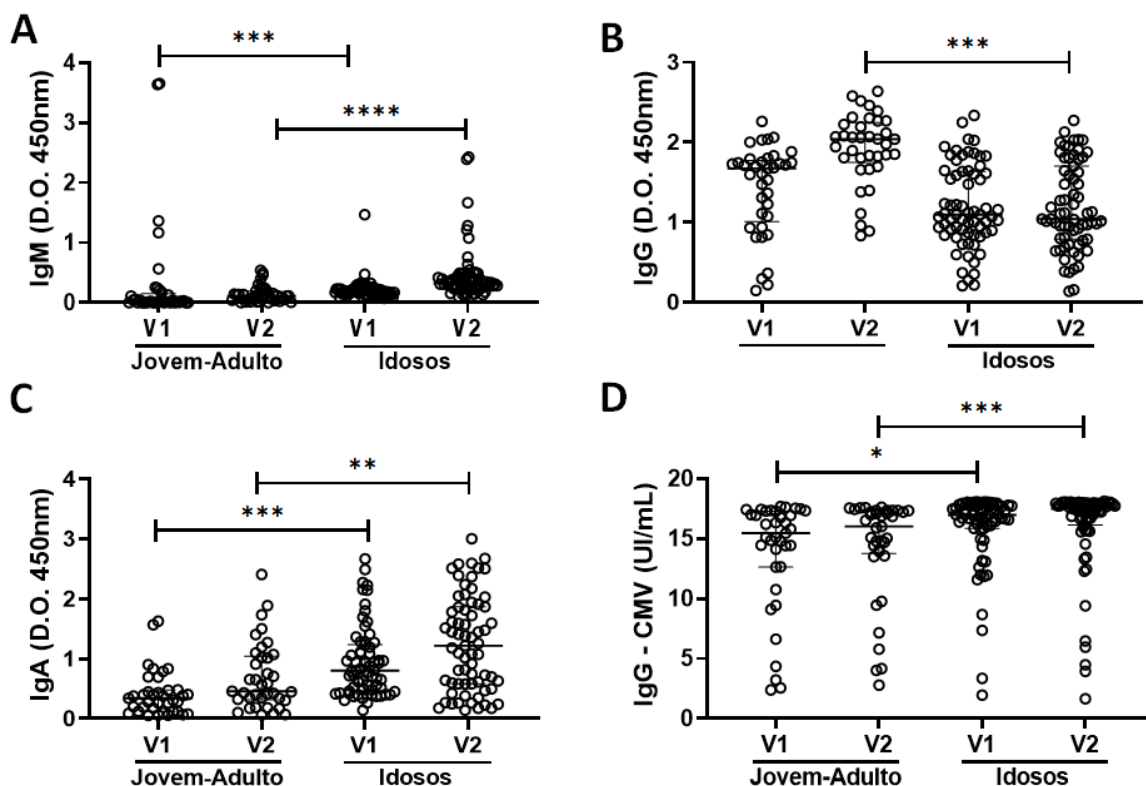


Figura 4. Comparação das concentrações séricas dos anticorpos IgM (A), IgG (B) e IgA (C) específicos aos antígenos presentes na vacina contra o vírus *Influenza*, bem como de IgG para CMV (D) nos grupos de voluntários jovem-adultos e idosos, nos momentos pré (V1) e pós (V2) vacinação. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,00001$.

Além das avaliações acima apresentadas, também analisamos a capacidade dos anticorpos específicos, particularmente do tipo IgG, em neutralizar o vírus *Influenza* H1N1 através do ensaio de inibição da hemaglutinação (HIA). Como mostrado na Figura 5, de maneira geral, ambos os grupos de voluntários participantes do estudo apresentaram aumento dos títulos de anticorpos neutralizantes. Contudo, mais especificamente, pôde-se evidenciar que o grupo jovem-adulto teve um aumento mais significativo dos títulos desses anticorpos ($p = 0,0023$) do que o grupo idoso ($p = 0,0137$), quando se compara os valores obtidos no momento pós-vacinação aos valores pré-vacinação.

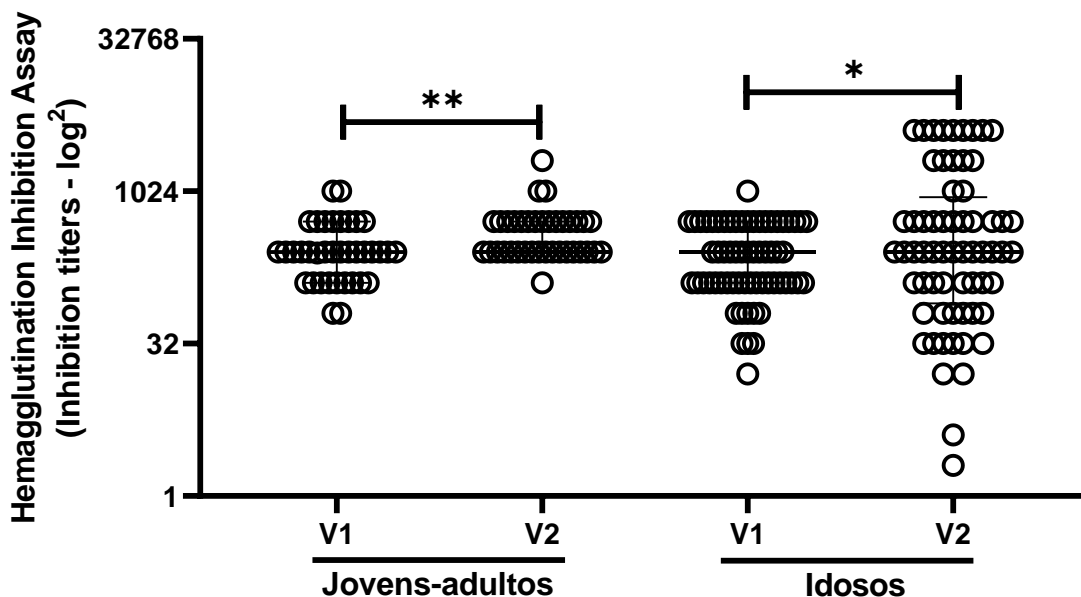


Figura 5. Comparação dos títulos de anticorpos neutralizantes nos grupos de voluntários jovem-adultos e idosos, nos momentos pré (V1) e pós (V2) vacinação. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; **** $p < 0,00001$.

Além dos resultados previamente mencionados, na Tabela 1 são apresentados os dados obtidos na análise do coeficiente de correlação de *Spearman* em cada grupo participante do estudo nos dois momentos avaliados.

Os dados apresentados na Tabela 1 particularmente relacionados ao grupo de indivíduos idosos responsivos, foi possível observar significativas correlações positivas entre os níveis circulantes de IgG-CMV-V2, IgG-V2 e IgG-CMV-v1. De forma interessante, no grupo de jovens adultos responsivos, além da manutenção das significativas correlações positivas entre os níveis sistêmicos de IgG para CMV nos momentos pré e pós vacinação, outras significativas correlações positivas entre os níveis sistêmicos de IgG para CMV – V2 e IgG, IgA e IgM foram encontradas. Além destas, significativas correlações também positivas foram encontradas nos subgrupos não responsivos dos grupos de jovens adultos e idosos na correlação IgG para CMV e nos momentos pré e pós vacinação.

Tabela 1. Análise do coeficiente de correlação de *Spearman* entre os níveis circulantes dos anticorpos IgA, IgM e IgG específicos para os antígenos da vacina contra o vírus *Influenza*, IgG para CMV e HIA nos momentos pré- (V1) e pós- (V2) vacinação para o vírus *Influenza* nos grupos de indivíduos jovens-adultos e idosos.

Grupo Jovem-Adulto					
Parâmetros	Pré-vacinação (V1)		Parâmetros	Pós-vacinação (V2)	
	Valor de rho	Valor de p		Valor de rho	Valor de p
HIA X IgG	- 0,361	0,027	IgG X IgA	0,407	0,012
HIA X IgA	-0,332	0,044	IgM X IgG-CMV	0,353	0,032

Grupo Idosos					
Parâmetros	Pré-vacinação (V1)		Parâmetros	Pós-vacinação (V2)	
	Valor de rho	Valor de p		Valor de rho	Valor de p
IgG X IgM	0,272	0,029	IgA X IgG	- 0,293	0,018

5. Discussão

Conforme previamente apresentado, no presente estudo objetivamos investigar o impacto da soropositividade para CMV na resposta sistêmica de anticorpos de indivíduos jovens-adultos e idosos vacinados para o vírus *Influenza*. No geral, nossos resultados mostraram aumento significativo nos níveis séricos de IgG e IgA, bem como nos títulos de anticorpos neutralizantes pós-vacinação no grupo jovem-adulto, com uma imunogenicidade de 78,37%, 62,16% e 67,57% para IgG, IgM e IgA, respectivamente. Já, com relação ao grupo idoso, embora os níveis de IgG não tenham se alterado, maiores níveis séricos de IgM e IgA, bem como de anticorpos neutralizantes foram encontrados pós-vacinação, além de uma imunogenicidade foi de 46,27%, 85,07% e 64,15% para IgG, IgM e IgA, respectivamente. Vale ainda ressaltar que os níveis de anticorpos IgG específicos para CMV mostraram-se significativamente aumentados apenas no grupo de voluntários idosos pós-vacinação. Além destes achados, não somente as comparações intergrupos mostraram interessantes e significativas diferenças nos níveis séricos de IgM, IgG e IgA entre os grupos de voluntários tanto antes quanto após a vacinação, como também a avaliação das correlações mostraram

significativas associações positivas e negativas entre os parâmetros avaliados neste estudo em ambos os grupos de voluntários.

Em se tratando de vacinação, é de amplo conhecimento que vacinas, por exemplo, contra a gripe, reduzem substancialmente a probabilidade de infecção por *Influenza* e seus efeitos adversos na saúde da população em geral⁴⁰. No entanto, diversos estudos indicam que as respostas à vacinação contra a gripe são frequentemente menos robustas em indivíduos mais velhos em comparação com seus homólogos mais jovens, resultando em respostas de anticorpos mais atenuadas, taxas de soroconversão inferiores e eficácia reduzida. De fato, estes dados corroboram nossos achados, uma vez que foi possível verificar que o grupo jovem-adulto mostrou maiores níveis séricos de IgG pós-vacinação, não somente quando comparados aos valores observados no momento pré-vacinação, mas também aos valores encontrados no grupo idoso no mesmo momento, bem como o maior aumento dos títulos de anticorpos neutralizantes foi visto nos indivíduos jovens-adultos.

De acordo com a literatura, dentre todos os isotipos de imunoglobulinas humanas, a IgA, IgM e IgG tem os papéis mais importantes na imunidade contra os vírus influenza. Particularmente em aspectos sistêmicos, a IgG constitui aproximadamente 75% do anticorpo encontrado no soro, sendo a maioria da IgG direcionada ao vírus *Influenza* do subtipo IgG1, que não somente tem uma meia-vida sérica longa (~21 dias), como também interage fortemente com os receptores Fc (FcR), o que torna este subtipo altamente eficaz na inibição direta do vírus, bem como nas funções efetoras mediadas pelo FcR⁴¹. Diante disso, fica evidente que o aumento dos níveis de IgG pós-vacinação pode levar a uma proeminente melhora da proteção, preferencialmente sistêmica, contra o vírus *Influenza*. Assim, tomando por base estas informações, podemos sugerir que, enquanto o grupo idoso aparentemente não teve a uma resposta favorável, o grupo jovem-adulto foi capaz de ativar eficazmente a resposta imune frente ao desafio da vacinação, devido não somente ao aumento dos níveis circulantes de IgG específicos a vacinação para gripe, como também a imunogenicidade de 78.37% para este anticorpo, que esteve dentro dos níveis esperados para esta população saudável⁴².

Embora seja esperado que pós-vacinação para o vírus *Influenza* ocorra aumento dos níveis circulantes de IgG para garantir/aumentar a proteção contra a infecção por este vírus⁴¹, segundo a literatura, a repetida imunização sazonal/anual para a gripe aparentemente pode influenciar negativamente na resposta imune da população, particularmente a idosa, e, com isso, a desejada elevação dos níveis séricos de IgG específicos para esta vacinação pode não ser evidenciada^{39, 43}. Essas informações corroboram nossos achados, visto que nenhuma significativa alteração nos níveis séricos de IgG específicos a vacina para Influenza foi evidenciada no grupo idoso 30 dias após a vacinação para gripe. Além disso, vale enfatizar que o valor da imunogenicidade à vacinação para IgG encontrada neste grupo (46,27%) esteve dentro do esperado, pois é amplamente aceito na literatura que este parâmetro de avaliação da resposta vacinal é significativamente influenciado de forma negativa pela idade, uma vez que indivíduos com idade entre 50 e 54 anos apresentam imunogenicidade de cerca de 50-55% contra apenas 30-49% em idosos com idade acima de 65 anos^{44, 45}.

Apesar da avaliação dos níveis circulantes de IgG se destacar no contexto da resposta vacinal, vale mencionar que, além disso, a avaliar da eficácia da vacinação também pode concentrar-se na análise da resposta sérica de anticorpos específicos do isotipo IgM a vacina administrada⁴⁶. Partindo deste pressuposto, o aumento significativo dos níveis séricos de IgM no grupo de voluntários idosos nos permite sugerir que a vacinação para o vírus *Influenza* também teve um impacto positivo em ativar a resposta imune nestes indivíduos. Corroborando esta proposição, a imunogenicidade de 85,07% para IgM encontrada neste grupo alinha-se ao marcante aumento nos níveis séricos desse tipo de anticorpo no grupo idoso. Vale ainda destacar que a significativa correlação positiva observada entre os níveis séricos de IgM e IgG no momento pré-vacinação no grupo idoso reforça a literatura que indica íntima relação entre a produção destes anticorpos em resposta a vacinação, inclusive na população idosa⁴⁷.

De acordo com a literatura, um dos efeitos negativos da imunossenescência é a redução da capacidade de ativar a resposta imune a novos antígenos, sejam oriundos de desafios naturais ou vacinais. Interessantemente, em contraste a esta marcante redução da geração de respostas imunes a novos desafios antigênicos, tem sido

documentado a manutenção do repertório imune já formado³⁵. Vale enfatizar que, pelo fato da produção de IgM estar intimamente associada a conhecida resposta imune primária, o aumento dos níveis séricos deste isotipo de anticorpo revela que a presença de novos antígenos foi capaz de ativar a resposta imune, inclusive no contexto de resposta ao vírus *Influenza*. Mesmo que a IgM corresponda a apenas 10% do total de anticorpos séricos e tenham geralmente menor afinidade que os anticorpos do isotipo IgG, este tipo de anticorpo, por formarem estruturas pentaméricas, apresentam evidente maior avidéz quando comparado aos demais tipos de anticorpos⁴¹. Assim, o aumento dos níveis circulantes de IgM no grupo idoso nos permite sugerir que os efeitos negativos da imunossenescência ainda não impactaram de forma marcante na capacidade de responder a novos desafios antigênicos por estes indivíduos, o que já foi inclusive observado em estudos anteriores de nosso grupo^{35, 36, 39}.

Além destes achados, um outro interessante dado observado neste estudo diz respeito a diferença significativa nos níveis séricos de IgM específicos a vacina para o vírus *Influenza* entre os grupos de voluntários. A este respeito, foi possível evidenciar que o aumento dos níveis deste anticorpo observado pós-vacinação no grupo idoso também se mostrou maior aos valores encontrados no grupo jovem-adulto no mesmo momento, já, em contraste, os níveis séricos de IgM verificados no grupo jovem-adulto pré-vacinação foram maiores do que os valores evidenciados no grupo idoso no mesmo momento. Embora nenhum dos voluntários tenham relatado ter sido infectado ou terem manifestado algum sintoma relacionado a gripe ou doença respiratória previamente a vacinação, a detecção de IgM em certos indivíduos jovens-adultos pré-vacinação pode supostamente indicar que estes tenham tido contato com o vírus *Influenza*, mas não manifestaram nenhum sintoma referente a esta infecção. Não obstante, a ativação da resposta imune frente a esta suposta infecção prévia ao vírus pode subsequentemente ter auxiliado no aumento dos níveis séricos de IgG observado neste no momento pós-vacinação.

Neste sentido, vale mencionar que alguns estudos apontaram para o fato de que adultos mais velhos vacinados podem manifestar menores níveis circulantes de IgG e IgA do que indivíduos de outras faixas etárias, pois atingem o pico de anticorpos de forma

mais tardia, além de manterem esses níveis por um período mais breve em comparação com os adultos jovens. Embora estas informações possam ser aplicadas particularmente a resposta de anticorpos do isotipo IgG em nossos voluntários idosos, ou seja, possivelmente uma elevação dos seus níveis poderia ter ocorrido em um período maior do que 30 dias após a vacinação, inclusive em decorrência do “switch” de classe de IgM para IgG, uma característica clássica da resposta imune humoral, a resposta do isotipo IgA não mostrou a mesma tendência, pois houve aumento significativo de seus níveis circulantes em ambos os grupos de voluntários pós-vacinação para gripe.

Em se tratando de IgA, este tipo de anticorpo corresponde a cerca de 15% do total de anticorpos séricos e são conhecidos dois principais subtipos (IgA1 e IgA2). De acordo com a literatura, enquanto a IgA1 é responsável pela principalmente fração monomérica de IgA no soro e também é secretada como um dímero nas superfícies mucosas do trato respiratório superior, a IgA2 é encontrada principalmente na forma dímica nas superfícies mucosas do trato gastrointestinal. Interessantemente, frações triméricas e tetraméricas de IgA específica para o vírus *Influenza* também foram detectadas em superfícies das mucosas. Outro fato marcante sobre a IgA diz respeito ao fato de que o maior número de locais de glicosilação neste anticorpo do que nos demais isotipos de anticorpos pode aumentar a afinidade da IgA pela hemaglutinina (HA) presente no envelope do vírus *Influenza*, através de interações entre HA e ácido siálico, bem como a IgA também pode ligar-se ao FcR presente nas células mieloides. Dentre outros aspectos, vale salientar que o trato respiratório superior é principalmente protegido pela IgA, enquanto IgG é o principal isotipo de anticorpo no trato respiratório inferior³⁹.

É muito importante esclarecer que, de acordo com a literatura, a produção de IgA circulante e na mucosa é diferente, pois os componentes imunes presentes nas mucosas garantem a oportunidade de produção da IgA, neste caso chamada de secretora, de forma mais rápida que a imunidade sistêmica. Além disso, embora seja consenso que uma menor quantidade de IgA sistêmica possa ser alocada nas mucosas⁴⁸, o aumento dos níveis circulantes de IgA supostamente podem aumentar a proteção das mucosas⁴⁹,⁵⁰, primordialmente das vias aéreas contra infecções, particularmente virais, como o vírus *Influenza*. Tomando por base nossos achados, o aumento dos níveis séricos de IgA em

ambos os grupos de voluntários, em conjunto com a similar imunogenicidade observada nestes grupos (67,57% para o grupo jovem-adulto e 64,15% para o grupo idoso), pode ter supostamente impactado na melhoria das defesas imunes de mucosas, bem como o maior nível sistêmico deste isotipo de anticorpo no grupo idoso, evidenciado tanto antes quanto depois da vacinação para gripe, nos permite sugerir que a repetida exposição ao vírus, ou, no nosso caso a vacina, pode atuar na manutenção do estímulo necessário para que células B de memória mantenham a secreção deste tipo de anticorpo ao longo do tempo⁵¹.

Além destas importantes considerações, o contraste de resultados evidenciados na análise de correlações entre os grupos de voluntários em termos dos níveis circulantes de IgA e IgG específicos para vacina da gripe nos chama a atenção, uma vez que, no momento pós-vacinação, o grupo jovem-adulto apresentou correlação positiva entre os níveis destes anticorpos, enquanto o grupo idoso mostrou correlação negativa.

De acordo com a literatura, o aumento concomitante, com correlação positiva, entre os níveis sistêmicos de IgA e IgG no contexto da resposta a vacinação para gripe tem sido documentado, e sugere-se que isso traz não somente maior proteção, mas também leva a desfechos mais favoráveis frente a infecção pelo vírus *Influenza*^{52, 53}. Além destes dados, vale destacar que, segundo a literatura, em situações em que uma deficiência na produção de IgA foi verificada, houve um significativo desequilíbrio das concentrações séricas da subclasse de IgG caracterizada por concentrações subnormais de IgG2 e/ou IgG4 e concentrações elevadas de IgG1 e IgG3⁵⁴. Embora não seja possível afirmar que os voluntários idosos participantes deste estudo tenham alguma deficiência na produção de IgA, o que a correlação negativa encontrada nos revela que os indivíduos com menor resposta específica de IgA teve os maiores níveis séricos de IgG, e vice-versa. Assim, supostamente aqueles com maior proteção sistêmica devido aos maiores níveis de IgG poderiam ter um prejuízo da resposta de mucosa, enquanto aqueles com melhor resposta de mucosa devido aos maiores níveis de IgA poderiam ter menor resposta sistêmica. Vale esclarecer que todas estas suposições estão relacionadas especificamente atreladas a estes achados, e, com isso, podemos ainda sugerir que o

grupo jovem-adulto teve melhor resposta a vacinação do que o grupo idoso, pois a associação positiva destes anticorpos garantiria ampla proteção deste indivíduo.

Em termos de resposta de anticorpos, além da avaliação da concentração total dessas moléculas, a análise dos níveis de anticorpos neutralizantes também se mostra importante, pois são estes que garantem melhor proteção imunológica ao apresentarem não apenas alta afinidade, mas também marcante avidéz ao específico antígeno que induziu sua produção, garantindo com isso melhor bloqueio da infecção, principalmente viral. Vale mencionar que apenas um pequeno subconjunto dos muitos anticorpos que se ligam a um vírus terá capacidade de neutralização e, após uma infecção, mesmo que haja algum tempo para que o hospedeiro produza anticorpos neutralizantes altamente eficazes, estes persistem para proteger contra futuras infecções pelo mesmo agente infeccioso^{39, 55}.

Conforme já citado, foi evidenciado que idosos apresentam uma evidente redução da resposta de anticorpos neutralizantes à vacinação contra o vírus *Influenza*, pois, em conjunto com sua menor produção, estes anticorpos apresentaram meia-vida mais curta e baixa afinidade aos antígenos⁹. Em consequência disso, um aumento da prevalência de infecções e menor resposta protetora à vacinação para gripe tende a ocorrer com o avanço da idade, tornando, assim, a população idosa a ser mais vulneráveis a infecções pelo vírus *Influenza*^{25, 26}. A partir disso, nossos achados de certa forma corroboram estas informações, uma vez que o grupo jovem-adulto apresentou o maior aumento, estatisticamente falando, dos títulos dos anticorpos neutralizantes em relação ao aumento dos títulos destes anticorpos no grupo idoso, que mostraram menor valor estatístico. Estes achados reforçam nossa prévia sugestão de que o grupo jovem-adulto teve melhor resposta após 30 dias da vacinação para gripe do que o grupo idoso.

Ainda se tratando dos resultados associados aos anticorpos neutralizantes, um fato interessante que despertou atenção foram as significativas correlações negativas entre os títulos destes anticorpos e os níveis séricos de IgA e IgG no grupo jovem-adulto antes da vacinação. Embora seja esperado que o aumento dos níveis de anticorpos esteja positivamente correlacionado com elevação das concentrações de anticorpos neutralizantes, vale mencionar que esta expectativa num contexto geral se baseia nos

relatos apresentados em diversos estudos que mostraram essa associação após um desafio imunológico, como a vacinação⁵⁶⁻⁵⁸. Diferentemente do relatado acima, as negativas correlações aqui evidenciadas não somente foram observadas antes da vacinação, ou seja, num momento em que a resposta imune encontra-se num estado chamado basal, como também nos permite supostamente sugerir que os indivíduos com maiores títulos de anticorpos neutralizantes, por estarem “mais protegidos”, podem abdicar da produção de maiores quantidades totais de IgA e IgG circulantes, enquanto aqueles “menos protegidos”, numa tentativa de compensação, produzem maiores quantidades destes anticorpos no intuito de garantir uma proteção contra uma possível exposição ao vírus *Influenza*.

Além destes interessantes achados, no presente estudo tivemos como principal objetivo verificar o impacto da soropositividade para CMV nas respostas de anticorpos à vacinação para o vírus *Influenza*, tanto em jovem-adultos quanto idosos, visto que ainda hoje não existe consenso na literatura.

Á este respeito, é fundamental ressaltar que todos os voluntários deste estudo apresentaram soropositividade para CMV. A partir dessa avaliação, foi possível verificar que, de maneira análoga aos resultados obtidos nos níveis séricos de IgA, as concentrações sistêmicas mais elevadas de IgG específicas para CMV foram encontradas no grupo idoso, tanto antes quanto após a vacinação, em comparação aos valores observados no grupo jovem-adulto. Além disso, os níveis séricos deste anticorpo para CMV encontrados pós-vacinação no grupo idoso também foram maiores do que os níveis pré-vacinação no mesmo grupo.

Segundo a literatura, não somente a seroprevalência, determinada pela presença de IgG específicos para CMV, aumenta com a idade, atingindo níveis superiores a 70% em muitas populações idosas⁵⁹, como também a constante presença de reativação deste vírus, após períodos de latência, induz o gradativo aumento dos níveis séricos desses anticorpos ao avançar da idade^{60, 61}. De fato, uma vez infectado pelo CMV, pelo fato do sistema imunológico não ser capaz de eliminar este vírus, esta infecção torna-se latente, sendo intercalada com momentos em que ocorre reativação do vírus, o que favorece a constante ativação da resposta imune frente a presença do CMV⁶². Portanto, nossos

resultados corroboram estas informações e reforçam a premissa que a cronicidade da presença do CMV gera um “looping” de ativação imune que gradativamente aumenta os níveis sistêmicos de IgG anti-CMV, particularmente em idosos.

Embora estes aspectos possam levar a ideia de que a “constante” ativação da resposta imune ao CMV ao longo da vida possa ser benéfica para o hospedeiro, vale lembrar a reativação da infecção pelo CMV favorece o desencadeamento da imunossenescência e foi associada à mortalidade prematura, por ser um dos principais componentes do conhecido fenótipo de risco imunológico^{29, 30}.

Interessantemente, foi demonstrado que a magnitude da resposta imune específica para CMV também pode influenciar os resultados clínicos em indivíduos soropositivos para CMV. Sobre isso, a revisão sistemática e meta-análise desenvolvida por den Berg e colaboradores³⁶ mostra que elevados títulos de IgG anti-CMV associados a presença de números aumentados de células TCD8+ tardiamente diferenciadas que produzem citocinas pró-inflamatórias e, desse modo, têm potencial papel no desenvolvimento de patologias imunológicas relacionadas ao envelhecimento, foram associados a respostas mais baixas de anticorpos à vacinação para o vírus *Influenza* em idosos⁶³⁻⁶⁸. Importante ressaltar que nosso grupo também mostrou mesma influência negativa da soropositividade para CMV e das células TCD8 à vacinação para gripe em idosos³⁵. Voltando a citar os dados apresentados por den Berg e colaboradores³⁶, em contraste aos efeitos negativos mencionados acima para a população idosa, tanto a infecção quanto o sorostatus para CMV não mostraram qualquer impacto sobre as respostas de anticorpos à vacinação contra a gripe em outros estudos⁶⁹⁻⁷⁶, enquanto um mostrou efeito positivo da infecção pelo CMV na resposta vacinal para gripe em idosos⁷⁷.

Diante dessas informações, fica evidente que as reais consequências da infecção crônica pelo CMV ainda são desconhecidas e, por vezes, controversas no que tange sua associação a resposta de anticorpos à vacinação para *Influenza* em idosos. Em nosso estudo, podemos evidenciar que aparentemente a elevação dos níveis de IgG para CMV pós-vacinação para gripe no grupo idoso não influenciou de forma decisiva na resposta de anticorpos à vacinação para o vírus *Influenza*, pois nenhuma correlação foi encontrada tanto antes quanto depois da vacinação.

Já, em relação aos dados obtidos no grupo jovem-adulto, uma significativa correlação positiva entre os níveis séricos de IgM específicos para vacina da gripe e de IgG para CMV foi evidenciada no momento pós-vacinação. Isso mostra que os maiores níveis de IgG para CMV foram encontrados naqueles com maiores níveis de IgM para vacina da gripe e, por isso, podemos supostamente sugerir que a presença do CMV foi importante para potencializar a resposta a vacina da gripe.

Dentre os estudos que demonstram uma associação da infecção por CMV e o aumento a resposta à vacina para o vírus *Influenza* em indivíduos jovens-adultos, foram também observadas aumento nos níveis de citocinas de perfil Th1 e Th2, bem como de respostas de linfócitos TCD8+ mais fortes em comparação com indivíduos soronegativos para CMV⁶³. Vale ainda citar que foi proposto que a infecção por CMV é capaz de melhorar a resposta imune de indivíduos jovens- adultos, conferindo assim a característica de um agente mutualista que confere benefícios ao hospedeiro nesta fase da vida do hospedeiro⁷⁸.

No entanto, vale salientar que, segundo den Berg e colaboradores³⁶, dentre os estudo que avaliaram a relação entre CMV e resposta vacinal a gripe em indivíduos jovens-adultos, enquanto dois estudos não relataram nenhum efeito^{64, 73}, três um efeito negativo^{59, 64, 78}, enquanto outros mostraram um efeito positivo da soropositividade para CMV^{61, 70, 72}.

Diante das nossas evidências, é de se esperar um aumento de interesse na identificação de biomarcadores imunológicos capazes de prever uma resposta imune humoral protetora à vacinação para o vírus *Influenza* ganhe cada dia mais espaço e interesse. Embora, o CMV possa ser visto como um potencial biomarcador preditivo para as respostas à vacinação para gripe⁷⁹, mais estudos devem ser desenvolvidos para que se confirme o verdadeiro papel da cronicidade desta infecção para as respostas imunes do hospedeiro.

Por fim, os dados obtidos nesse estudo não somente adicionam substanciais informações acerca das diferenças nas respostas de anticorpos à vacinação para o vírus *Influenza* em indivíduos jovens-adultos e idosos, como também dá mais um passo no entendimento da relação entre a soropositividade para o CMV sobre o contexto vacinal

nestas populações, o que, inclusive, pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de vacinação mais eficazes e direcionadas para cada faixa etária.

6. Conclusão

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa, podemos concluir que: (1) de maneira geral, o grupo jovem-adulto mostrou melhor resposta a vacinação para gripe do que o grupo de voluntários idosos, (2) embora o grupo idoso também tenha mostrado resultados favoráveis a vacinação para gripe, e (3) a soropositividade para CMV pode ter desempenhado um papel importante na resposta de anticorpos à vacinação exclusivamente no grupo jovem-adulto, o que sugere uma possível interação positiva entre esses dois agentes, levando a potencializar a proteção imune nesta população.

Em suma, aprofundar nossa compreensão sobre essas interações complexas no contexto da imunidade é essencial para nortear futuras pesquisas e intervenções clínicas direcionadas, visando a melhoria dos cuidados de saúde, em especial a população idosa.

7. Referências

1. Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Autoimmun.* 2020; 109:102433.
2. Zhavoronkov A. Geroprotective and senoremediative strategies to reduce the comorbidity, infection rates, severity, and lethality in gerophilic and gerolavic infections. *Aging (Albany NY).* 2020;12(8):6492-510.
4. Herndler-Brandstetter D, Cioca DP, Grubeck-Loebenstein B. Immunizations in the elderly: do they live up to their promise? *Wien Med Wochenschr.* 2006; 156(5-6):130-41.
5. Gardner EM, Gonzalez EW, Nogusa S, Murasko DM. Age-related changes in the immune response to influenza vaccination in a racially diverse, healthy elderly population. *Vaccine.* 2006; 24(10):1609-14.
6. Tamas Fulop, Anis Larbi, Nadine Douziech, Carl Fortin, Kal-Philippe Guérard, Olivier Lesur, et al. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. 4 ed. *Aging Cell:* 2004; 2004.
7. Tasat DR, Mancuso R, O'Connor S, Molinari B. Age-dependent change in reactive oxygen species and nitric oxide generation by rat alveolar macrophages. *Aging Cell.* 2003; 2(3):159-64.
8. Villanueva JL, Solana R, Alonso MC, Peña J. Changes in the expression of HLA-class II antigens on peripheral blood monocytes from aged humans. *Dis Markers.* 1990; 8(2):85-91.
9. Kovaïou RD, Herndler-Brandstetter D, Grubeck-Loebenstein B. Age-related changes in immunity: implications for vaccination in the elderly. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* 2007; 9(3):1-17.
10. Plackett TP, Boehmer ED, Faunce DE, Kovacs EJ. Aging and innate immune cells. *J Leukoc Biol.* 2004; 76(2):291-9.
11. Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R, Cipriano C, Gasparini N, Franceschi C, et al. Metallothioneins/PARP-1/IL-6 interplay on natural killer cell activity in elderly: parallelism with nonagenarians and old infected humans. Effect of zinc supply. *Mech Ageing Dev.* 2003; 124(4):459-68.

12. Pera A, Campos C, López N, Hassouneh F, Alonso C, Tarazona R, et al. Immunosenescence: Implications for response to infection and vaccination in older people. *Maturitas*. 2015; 82(1):50-5.
13. Naylor K, Li G, Vallejo AN, Lee WW, Koetz K, Bryl E, et al. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol*. 2005; 174(11):7446-52.
14. Chen Q, Liang WN, Liu GF, Liu M, Xie XQ, Wu J, et al. Case fatality rate of severe acute respiratory syndromes in Beijing. *Biomed Environ Sci*. 2005; 18(4):220-6.
15. Weng NP, Akbar AN, Goronzy J. CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol*. 2009; 30(7):306-12.
16. Snyder MR, Muegge LO, Offord C, O'Fallon WM, Bajzer Z, Weyand CM, et al. Formation of the killer Ig-like receptor repertoire on CD4+CD28null T cells. *J Immunol*. 2002;168(8):3839-46.
17. Goronzy JJ, Fulbright JW, Crowson CS, Poland GA, O'Fallon WM, Weyand CM. Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals. *J Virol*. 2001; 75(24):12182-7.
18. Saurwein-Teissl M, Lung TL, Marx F, Gschösser C, Asch E, Blasko I, et al. Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)/CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines. *J Immunol*. 2002; 168(11):5893-9.
19. Pangrazzi L, Reidla J, Carmona Arana JA, Naismith E, Miggitsch C, Meryk A, et al. CD28 and CD57 define four populations with distinct phenotypic properties within human CD8. *Eur J Immunol*. 2020; 50(3):363-79.
20. Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology*. 2011; 134(1):17-32.
21. Sun B, Zhang Y. Overview of orchestration of CD4+ T cell subsets in immune responses. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 841:1-13.
22. Bauer ME, Jeckel CM, Luz C. The role of stress factors during aging of the immune system. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1153:139-52.
23. Chong Y, Ikematsu H, Yamaji K, Nishimura M, Nabeshima S, Kashiwagi S, et al. CD27(+) (memory) B cell decrease and apoptosis-resistant CD27(-) (naive) B cell

- increase in aged humans: implications for age-related peripheral B cell developmental disturbances. *Int Immunol.* 2005; 17(4):383-90.
24. Shimizu K, Kimura F, Akimoto T, Akama T, Otsuki T, Nishijima T, et al. Effects of exercise, age and gender on salivary secretory immunoglobulin A in elderly individuals. *Exerc Immunol Rev.* 2007; 13:55-66.
 25. Keren G, Segev S, Morag A, Zakay-Rones Z, Barzilai A, Rubinstein E. Failure of influenza vaccination in the aged. *J Med Virol.* 1988;25(1):85-9.
 26. Keren G, Segev S, Morag A, Zakay-Rones Z, Barzilai A, Rubinstein E. Failure of influenza vaccination in the aged. *J Med Virol.* 1988; 25(1):85-9.
 27. Franceschi C, Zaikin A, Gordleeva S, Ivanchenko M, Bonifazi F, Storci G, et al. Inflammaging 2018: An update and a model. *Semin Immunol.* 2018; 40:1-5.
 28. Zapata HJ, Quagliarello VJ. The microbiota and microbiome in aging: potential implications in health and age-related diseases. *J Am Geriatr Soc.* 2015; 63(4):776-81.
 29. Pawelec G. Immunosenescence: role of cytomegalovirus. *Exp Gerontol.* 2014; 54:1-5.
 30. Pawelec G, Derhovanessian E, Larbi A, Strindhall J, Wikby A. Cytomegalovirus and human immunosenescence. *Rev Med Virol.* 2009; 19(1):47-56.
 31. Schmaltz HN, Fried LP, Xue QL, Walston J, Leng SX, Semba RD. Chronic cytomegalovirus infection and inflammation are associated with prevalent frailty in community-dwelling older women. *J Am Geriatr Soc.* 2005; 53(5):747-54.
 32. Johnstone J, Parsons R, Botelho F, Millar J, McNeil S, Fulop T, et al. Immune biomarkers predictive of respiratory viral infection in elderly nursing home residents. *PLoS One.* 2014; 9(9):e108481.
 33. Govaert TM, Thijs CT, Masurel N, Sprenger MJ, Dinant GJ, Knottnerus JA. The efficacy of influenza vaccination in elderly individuals. A randomized double-blind placebo-controlled trial. *JAMA.* 1994; 272(21):1661-5.
 34. Muszkat M, Yehuda AB, Schein MH, Friedlander Y, Naveh P, Greenbaum E, et al. Local and systemic immune response in community-dwelling elderly after intranasal or intramuscular immunization with inactivated influenza vaccine. *J Med Virol.* 2000; 61(1):100-6.

35. Felismino ES, Santos JMB, Rossi M, Santos CAF, Durigon EL, Oliveira DBL, et al. Better Response to Influenza Virus Vaccination in Physically Trained Older Adults Is Associated With Reductions of Cytomegalovirus-Specific Immunoglobulins as Well as Improvements in the Inflammatory and CD8. *Front Immunol.* 2021; 12:713763.
36. van den Berg SPH, Warmink K, Borghans JAM, Knol MJ, van Baarle D. Effect of latent cytomegalovirus infection on the antibody response to influenza vaccination: a systematic review and meta-analysis. *Med Microbiol Immunol.* 2019; 208(3-4):305-321.
37. Gautier EL, Jakubzick C, Randolph GJ. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(10):1412-8.
38. Bachi AL, Suguri VM, Ramos LR, Mariano M, Vaisberg M, Lopes JD. Increased production of autoantibodies and specific antibodies in response to influenza virus vaccination in physically active older individuals. *Results Immunol.* 2013; 3:10-6.
39. Monteiro, F.R.; Roseira, T.; Amaral, J.B.; Paixão, V.; Almeida, E.B.; Foster, R.; Sperandio, A.; Rossi, M.; Amirato, G.R.; Apostólico, J.S.; et al. Combined Exercise Training and L-Glutamine Supplementation Enhances Both Humoral and Cellular Immune Responses after Influenza Virus Vaccination in Elderly Subjects. *Vaccines* 2020, 8, 685.
40. Shapiro, J.R., Li, H., Morgan, R. et al. Sex-specific effects of aging on humoral immune responses to repeated influenza vaccination in older adults. *NPI Vaccines* 2021; 6, 147.
41. Krammer F. The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. *Nat Rev Immunol.* 2019; 19(6):383-397.
42. Goodwin, K., Viboud, C.G., & Simonsen, L. Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review. *Vaccine*, 2006; 24(8),1159-69.
43. Michael A. Carlock, John G. Ingram, Emily F. Clutter, Noah C. Cecil, Moti Ramgopal, Richard K, Zimmerman, William Warren, Harry Kleanthous, Ted M. Ross. Impacto da idade e imunidade pré-existente na indução de respostas de anticorpos

- humanos contra vírus influenza B, *Vacinas Humanas e Imunoterápicos*, 2019; 15:9, 2030-2043,
44. Bendavid E, Oh C, Bhattacharya J, Ioannidis JPA. Assessing mandatory stay-at-home and business closure effects on the spread of COVID-19. *Eur J Clin Invest*. 2021; 51:e13484.
 45. McLean HQ, Thompson MG, Sundaram ME, Kieke BA, Gaglani M, Murthy K, Piedra PA, Zimmerman RK, Nowalk MP, Raviotta JM, Jackson ML, Jackson L, Ohmit SE, Petrie JG, Monto AS, Meece JK, Thaker SN, Clippard JR, Spencer SM, Fry AM, Belongia EA. Influenza vaccine effectiveness in the United States during 2012-2013: variable protection by age and virus type. *J Infect Dis*. 2015; 15;211(10):1529-40.
 46. Webster RG. Immunity to influenza in the elderly. *Vaccine*. 2000; 18(16):1686-9.
 47. Qiu C, Tian D, Wan Y, Zhang W, Qiu C, Zhu Z, Ye R, Song Z, Zhou M, Yuan S, Shi B. Early adaptive humoral immune responses and virus clearance in humans recently infected with pandemic 2009 H1N1 influenza virus. *PLoS one*. 2011; 6(8):e22603.
 48. Smith, P., Blumberg, R., MacDonald, T., & Society for Mucosal Immunology, (Eds.). (2020). *Principles of Mucosal Immunology* (2nd ed.). Garland Science.
 48. Romero-Pinedo S, Quesada M, Horndler L, Álvarez-Fernández S, Olmo A, Abia D, Alarcón B and Delgado P. Vaccine Type-, Age- and Past Infection-Dependence of the Humoral Response to SARS-CoV-2 Spike S Protein. *Front. Immunol*. 2022; 13:809285.
 50. Neu KE, Guthmiller JJ, Huang M, La J, Vieira MC, Kim K, Zheng NY, Cortese M, Tepora ME, Hamel NJ, Rojas KT, Henry C, Shaw D, Dulberger CL, Pulendran B, Cobey S, Khan AA, Wilson PC. Spec-seq unveils transcriptional subpopulations of antibody-secreting cells following influenza vaccination. *J Clin Invest*. 2019; 129(1):93-105.
 51. Ascough S, Paterson S, Chiu C. Indução e Subversão da Imunidade Protetora Humana: Influenza Contrastante e Vírus Sincicial Respiratório. *Imunol frontal*. 2018; 9:323.

52. Abreu RB, Clutter EF, Attari S, Sautto GA, Ross TM. Respostas IgA após vacinação recorrente contra o vírus influenza. *Imunol frontal*. 2020; 11:902.
53. van den Dobbelsteen GPJM, Faé KC, Serroyen J, van den Nieuwenhof IM, Braun M, Haeuptle MA, Sirena D, Schneider J, Alaimo C, Lipowsky G, Gambillara-Fonck V, Wacker M, Poolman JT. Immunogenicity and safety of a tetravalent E. coli O-antigen bioconjugate vaccine in animal models. *Vaccine*. 2016; 34(35):4152-4160.
54. French MA, Denis KA, Dawkins R, Peter JB. Severity of infections in IgA deficiency: correlation with decreased serum antibodies to pneumococcal polysaccharides and decreased serum IgG2 and/or IgG4. *Clin Exp Immunol*. 1995; 100(1):47-53.
55. Payne S. Introduction to RNA Viruses. *Viruses*. 2017: 97–105.
56. He W, Mullarkey CE, Duty JA, Moran TM, Palese P, Miller MS. Broadly neutralizing anti-influenza virus antibodies: enhancement of neutralizing potency in polyclonal mixtures and IgA backbones. *J Virol*. 2015; 89(7):3610-8.
57. Loeb N, Andrew MK, Loeb M, Kuchel GA, Haynes L, McElhaney JE, Verschoor CP. Frailty Is Associated With Increased Hemagglutination-Inhibition Titers in a 4-Year Randomized Trial Comparing Standard- and High-Dose Influenza Vaccination. *Open Forum Infect Dis*. 2020; 7(5):ofaa148.
58. Nachbagauer R, Choi A, Izikson R, Cox MM, Palese P, Krammer F. Age Dependence and Isotype Specificity of Influenza Virus Hemagglutinin Stalk-Reactive Antibodies in Humans. *mBio*. 2016; 7(1):e01996-15.
59. Staras SA, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis*. 2006; 43(9):1143-51.
60. Turner JE, Campbell JP, Edwards KM, Howarth LJ, Pawelec G, Aldred S, Moss P, Drayson MT, Burns VE, Bosch JA. Rudimentary signs of immunosenescence in Cytomegalovirus-seropositive healthy young adults. *Age (Dordr)*. 2014; 36(1):287-97.
61. Janssen N, Derhovanessian E, Demuth I, Arnaut F, Steinhagen-Thiessen E, Pawelec G. Responses of Dendritic Cells to TLR-4 Stimulation Are Maintained in the Elderly and Resist the Effects of CMV Infection Seen in the Young. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2016; 71(9):1117-23.

62. Pawelec G, McElhaney JE, Aiello AE, Derhovanessian E. The impact of CMV infection on survival in older humans. *Curr Opin Immunol.* 2012; 24(4):507-11.
63. Trzonkowski P, Mysliwska J, Szmit E, Wieckiewicz J, Lukaszuk K, Brydak LB, Machala M, Mysliwski A. Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination—an impact of immunosenescence. *Vaccine* 20023; 21(25–26):3826–3836.
64. Braikat M, Barkia A, El Mdaghri N, Rainey JJ, Cohen AL, Teleb N. Vaccination with *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine reduces bacterial meningitis in Morocco. *Vaccine.* 2012; 30(15):2594-9.
65. Andrade AL, Minamisava R, Policena G, Cristo EB, Domingues CM, de Cunto Brandileone MC, Almeida SC, Toscano CM, Bierrenbach AL. Evaluating the impact of PCV-10 on invasive pneumococcal disease in Brazil: A time-series analysis. *Hum Vaccin Immunother.* 2016; 12(2):285-92.
66. Rose DR, Yang H, Serena G, Sturgeon C, Ma B, Careaga M, Hughes HK, Angkustsiri K, Rose M, Hertz-Picciotto I, Van de Water J, Hansen RL, Ravel J, Fasano A, Ashwood P. Differential immune responses and microbiota profiles in children with autism spectrum disorders and co-morbid gastrointestinal symptoms. *Brain Behav Immun.* 2018; 70:354-368.
67. Ren Y, Huang SH, Macedo AB, Ward AR, Alberto WDC, Klevorn T, Leyre L, Copertino DC, Mota TM, Chan D, Truong R, Rohwetter T, Zumbo P, Dündar F, Betel D, Kovacs C, Benko E, Bosque A, Jones RB. Selective BCL-X Antagonists Eliminate Infected Cells from a Primary-Cell Model of HIV Latency but Not from Ex Vivo Reservoirs. *J Virol.* 2021; 95(15):e0242520..
68. Moro-García MA, Alonso-Arias R, López-Vázquez A, Suárez-García FM, Solano-Jaurrieta JJ, Baltar J, López-Larrea C. Relationship between functional ability in older people, immune system status, and intensity of response to CMV. *Age (Dordr).* 2012; 34(2):479-95.
69. Seanehia J, Treibich C, Holmberg C, Müller-Nordhorn J, Casin V, Raude J, Mueller JE. Quantifying population preferences around vaccination against severe but rare

- diseases: A conjoint analysis among French university students, 2016. *Vaccine*. 2017; 35(20):2676-2684.
70. Furman D, Jovic V, Sharma S, Shen-Orr SS, Angel CJ, Onengut-Gumuscu S, Kidd BA, Maecker HT, Concannon P, Dekker CL, Thomas PG, Davis MM. Cytomegalovirus infection enhances the immune response to influenza. *Sci Transl Med*. 2015; 7(281):281ra43.
 71. Haq K, Fulop T, Tedder G, Gentleman B, Garneau H, Meneilly GS, Kleppinger A, Pawelec G, McElhaney JE. Cytomegalovirus Seropositivity Predicts a Decline in the T Cell But Not the Antibody Response to Influenza in Vaccinated Older Adults Independent of Type 2 Diabetes Status. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017; 72(9):1163-1170.
 72. Wald A, Selke S, Magaret A, Boeckh M. Impact of human cytomegalovirus (CMV) infection on immune response to pandemic 2009 H1N1 influenza vaccine in healthy adults. *J Med Virol*. 2013; 85(9):1557-60.
 73. Nielsen CM, White MJ, Bottomley C, Lusa C, Rodríguez-Galán A, Turner SE, Goodier MR, Riley EM. Impaired NK Cell Responses to Pertussis and H1N1 Influenza Vaccine Antigens in Human Cytomegalovirus-Infected Individuals. *J Immunol*. 2015;194(10):4657-67.
 74. L. Guidi, G. Andrisani, D. Frasca, P. Cattani, M. Marzo, C. Felice, D. Pugliese, A. Papa, G.L. Rapaccini, B.B. Blomberg, A. Armuzzi, P521 Cytomegalovirus infection and response to influenza vaccination in inflammatory bowel disease patients on anti-TNF therapy, *Journal of Crohn's and Colitis*, Volume 8, Issue Supplement_1, February 2014, Page S285,
 75. Den Elzen WP, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T, Westendorp RG, Kirkwood TB, Gussekloo J. Telomere length and anaemia in old age: results from the Newcastle 85-plus Study and the Leiden 85-plus Study. *Age Ageing*. 2011; 40(4):494-500.
 76. Strindhall J, Ernerudh J, Mörner A, Waalen K, Löfgren S, Matussek A, Bengner M. Humoral response to influenza vaccination in relation to pre-vaccination antibody titers, vaccination history, cytomegalovirus serostatus and CD4/CD8 ratio. *Infect Dis (Lond)*. 2016; 48(6):436-42.

77. McElhaney JE, Garneau H, Camous X, Dupuis G, Pawelec G, Baehl S, Tessier D, Frost EH, Frasca D, Larbi A, Fulop T. Predictors of the antibody response to influenza vaccination in older adults with type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2015; 3(1):e000140.
78. Frasca D, Blomberg BB. Aging, cytomegalovirus (CMV) and influenza vaccine responses. *Hum Vaccin Immunother*. 2016; 12(3):682-90.
79. Frasca D, Diaz A, Romero M, Landin AM, Blomberg BB. Cytomegalovirus (CMV) seropositivity decreases B cell responses to the influenza vaccine. *Vaccine*. 2015; 33(12):1433-9.

8. Anexos

UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMPACTO DA SOROPOSITIVIDADE PARA CITOMEGALOVÍRUS (CMV) NA RESPOSTA IMUNE/INFLAMATÓRIA SISTÊMICA DE INDIVÍDUOS JOVENS-ADULTOS E IDOSOS VACINADOS PARA GRIPE.

Pesquisador: ANGÉLICA RODRIGUES BOTELHO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 73194023.0.0000.0081

Instituição Proponente: OBRAS SOCIAIS E EDUCACIONAIS DE LUZ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.523.745

Apresentação do Projeto:

Idem relatoria anterior

Objetivo da Pesquisa:

Idem relatoria anterior

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Idem relatoria anterior

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Idem relatoria anterior

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Pendências:

Metodologia - Foi atualizada

Termo de confidencialidade - Apresentado

TCLE - Apresentado

Cronograma - Atualizado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Endereço: Rua Profª Enéas de Siqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbuías

CEP: 02.450-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaunisa@unisa.br

**UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA**



Continuação do Parecer: 6.523.745

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2140018.pdf	27/10/2023 16:45:55		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermoConsentimentoLivreEsclarecido_UNISA.pdf	27/10/2023 16:42:39	ANGÉLICA RODRIGUES BOTELHO	Aceito
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_E_CONFIDENCIALIDADE_FINAL.pdf	27/10/2023 16:33:57	ANGÉLICA RODRIGUES BOTELHO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Proposta_projeto_ANGELICA.pdf	27/10/2023 16:09:37	ANGÉLICA RODRIGUES BOTELHO	Aceito
Outros	Formulario_UNISA.pdf	31/05/2023 15:06:31	ANGÉLICA RODRIGUES BOTELHO	Aceito
Outros	TERMO_DE_CONCESSAO.pdf	31/05/2023 14:58:16	ANGÉLICA RODRIGUES BOTELHO	Aceito
Outros	CARTA_DE_ANUENCIA.pdf	31/05/2023 14:55:04	ANGÉLICA RODRIGUES BOTELHO	Aceito
Folha de Rosto	FRAngelicaRodrigues.pdf	31/05/2023 14:48:54	ANGÉLICA RODRIGUES BOTELHO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 22 de Novembro de 2023

Assinado por:
Ana Paula Ribeiro
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Prof Enéas de Siqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbuías

CEP: 02.450-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaunisa@unisa.br

TERMO DE COMPROMISSO E CONFIDENCIALIDADE
(Elaborado de acordo com a Resolução 466/2012-CNS/CONEP)

Em referência a pesquisa intitulada "IMPACTO DA SOROPOSITIVIDADE PARA CITOMEGALOVÍRUS (CMV) NA RESPOSTA IMUNE/INFLAMATÓRIA SISTÊMICA DE INDIVÍDUOS JOVENS-ADULTOS E IDOSOS VACINADOS PARA GRIPE", eu **Angélica Rodrigues Botelho** e a equipe envolvida neste estudo, composta pelo Prof. Dr. André Luis Lacerda Bachi e o Prof. Ms. Carlos André Freitas dos Santos, comprometemo-nos a manter em anonimato, sob sigilo absoluto, durante e após o término do estudo, todos os dados que identifiquem o sujeito da pesquisa, usando apenas para divulgação os dados inerentes ao desenvolvimento do estudo.

Asseguo o compromisso com a privacidade e a confidencialidade dos dados utilizados, preservando integralmente o anonimato e a imagem do participante, bem como a sua não estigmatização.

Asseguo também, a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou da comunidade, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou econômico financeiro.

Comprometemo-nos também com a destruição, após o término da pesquisa, de todo e qualquer tipo de mídia que possa vir a identificá-lo tais como filmagens, fotos, gravações, questionários, formulários e outros.

São Paulo, 19 de abril de 2023

Pesquisador Responsável:

Assinatura e carimbo

Assinatura de todos os membros da equipe


Dr. Carlos André Freitas dos Santos
CRM 75.246



Prof. Dr. ANDRÉ LUIS LACERDA BACHI



Prof. Dra. Patrícia Colombo de Souza

Angélica Rodrigues Botelho - mestranda