



UNIVERSIDADE SANTO AMARO – UNISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Fernanda Rodrigues Monteiro

MODULAÇÃO DOS SUBTIPOS DE MONÓCITOS EM IDOSOS
SUBMETIDOS À VACINAÇÃO PARA COVID-19

São Paulo

2024

Fernanda Rodrigues Monteiro

**MODULAÇÃO DOS SUBTIPOS DE MONÓCITOS EM IDOSOS
SUBMETIDOS À VACINAÇÃO PARA COVID-19**

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 Luis Lacerda Bachi

Coorientadora: Prof. Dra. Carolina Nunes França

São Paulo

2024

M776m Monteiro, Fernanda Rodrigues.
Modulação dos subtipos de monócitos em idosos submetidos à
vacinação para covid-19 / Fernanda Rodrigues Monteiro. – São
Paulo, 2024.
57 p. : il., color.
Orientador: André Luis Lacerda Bachi.

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

1. Citocinas. 2. Inflamação. 3. Vacinas. I. Bachi, André Luis
Lacerda, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

CDD 613

Fernanda Rodrigues Monteiro

**MODULAÇÃO DOS SUBTIPOS DE MONÓCITOS EM IDOSOS
SUBMETIDOS À VACINAÇÃO PARA COVID-19**

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 Luis Lacerda Bachi
Coorientadora: Prof. Dra. Carolina Nunes França

São Paulo, 22 de janeiro de 2024

Banca Examinadora

Prof. Dr. André Luis Lacerda Bachi

Prof. Dra. Marina Tiemi Shio

Prof. Dra. Juliana de Melo Batista dos Santos

Conceito Final: _____

Dedico a você este trabalho.
Permitistes que fosse possível focar nos
meus estudos, nas minhas pesquisas, e
respirar.

AGRADECIMENTOS

Não acho que sou boa em me expressar em palavras, mas aqui fica uma tentativa afetuosa para aqueles que compartilham de ideias semelhantes e que da sua forma lutam por elas, aos meus camaradas.

A primeira linha de agradecimento é direcionada aos meus pais, Ana e Marcilio, por todo o afeto, apoio e incentivo. Vocês me mostraram que há muitas formas de lutar, mudar estratégias. Meus eternos companheiros.

Ao meu amor-camarada e companheiro, Fernando, que acompanhou de perto a loucura que foi trocar *posts* e campanhas por reagentes e pipetas. Você estava lá em todos os momentos, bons e ruins. E não posso esquecer da cachorra Larica, que muito me ouviu reclamar e me fez dar voltas para espairecer.

Ao meu orientador, André, com enorme afeto, pela confiança, por mais uma oportunidade e excelente orientação ao longo destes anos, sei que não foi e não é fácil, ainda mais com uma pessoa que entrega tudo com muita emoção nos últimos momentos, e nem sempre gosta de mostrar antes. Obrigado pelo tempo dedicado e por me permitir errar, acertar e encontrar um caminho.

Ao meu camarada e amigo de trabalho, Jônatas, que além de me guiar em afazeres de bancada, me acolheu nas horas de desespero sempre com boas palavras de lucidez e fez com que todos acreditassem que a minha verdadeira personalidade é divertidamente “alegria”.

À minha Coorientadora, Carolina, no começo confesso que eu não queria muito essa coisa de marcadores, fluorocromos, gráficos que mais pareciam um spray de tinta, mas agora vai um muito obrigado por me deixar tão encantada com o “universo” da citometria de fluxo. Quero mais!

À Anuska, Bruno e Elisabeth, pela valiosa colaboração e ensinamentos. Vocês são maravilhosos! Espero que a parceria siga no futuro.

Aos professores, Danielle e Edson Durigon, pelas inúmeras colaborações nesses anos de pesquisa.

Aos meus companheiros de ORL, em especial a Vitória, por tantas situações que passamos juntas, nestes anos tão difíceis e prazerosos, muita comunicação não

violenta, choro, risadas, cálculos errados, enfim, muita parceria. Uma verdadeira camarada.

Ao “matemágico” Marcelo, por me ensinar que estatística não é tão ruim assim, agradeço pela paciência que teve, e terá. Já fica o aviso.

Aos companheiros de sala que fizeram esses anos passarem de forma mais leve, com muitas risadas e trocas. Especialmente a Claudia e a Karin, pela grande força, pelas inúmeras conversas e sobretudo, pela valiosa amizade.

À Gislene e aos voluntários que participaram deste estudo, sem os quais não haveria razão para realizar este trabalho. Meu respeito e agradecimentos.

Aos meus amigos e camaradas que me aguentaram por ser monotemática, isso quando eu aparecia, obrigado Aline, Samantha, PH, Thulio, Brenda, Giovanna, Toni, Paulinha. E uma jornada em muitos momentos solitária, mas o incentivo de vocês foi muito importante.

Aos meus familiares, pelo carinho, apoio e torcida à distância! Amo todos vocês!

Por fim, agradeço a Universidade Santo Amaro pela bolsa de estudos e a toda a equipe multidisciplinar do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela sabedoria transmitida nessa jornada.

“Se os companheiros em quem você confia se juntam em sua volta, a esperança pode ganhar forma física e ficar visível. É nisso que eu acredito.”

(Kakashi Hatake)

RESUMO

Introdução: Infelizmente, a população idosa foi um dos grupos mais afetados pela COVID-19. Dentre alguns fatores, isso se deve às progressivas alterações do sistema imune evidenciadas durante o envelhecimento, ou imunossenescência, que acarreta a maior vulnerabilidade e alteração do funcionamento de várias células imunes. Neste contexto, os monócitos são células que tem papel fundamental nas respostas imunes e inflamatórias e podem ser moduladas de acordo como o estímulo/ambiente em que se encontram em monócitos clássicos, os quais correspondem a aproximadamente 90% do total de monócitos circulantes e são considerados células inflamatórias, além de poderem dar origem aos seus demais subtipos, ou seja, monócitos não clássicos e monócitos intermediários. Além destas características, os monócitos também apresentam a capacidade de produzir e responder a citocinas que podem atuar favorecendo ou não a resposta imune contra patógenos, como, por exemplo, na COVID-19. Diante desse cenário, propôs-se neste estudo investigar a possível modulação dos subtipos de monócitos, bem como sua relação com citocinas de perfil pró- e anti-inflamatórias em uma população de idosos submetidos à vacinação para COVID-19. **Métodos:** Foram convidados a participar deste projeto 66 idosos (74,74±5,9 anos), de ambos os sexos, que foram submetidos a vacinação para COVID-19. Amostras de sangue foram coletadas antes e 30 dias após a administração da segunda dose da vacina CoronaVac (n=48) ou ChAdOx-1 (n=18), para avaliar a concentração sérica do isotipo IgG específico para antígenos do SARS-CoV-2, bem como a porcentagem dos subtipos de monócitos: não clássicos (CD14+CD16++), intermediários (CD14++CD16+) e clássicos (CD14++CD16-), e os níveis sistêmicos de citocinas pró- e anti-inflamatórias. **Resultados:** Maiores níveis séricos de IgG foram observados nos 2 grupos de idosos participantes do estudo ($p < 0,0001$) pós-vacinação do que os valores pré-vacinação. Contudo, os valores de IgG observados no grupo ChAdOx-1 pós-vacinação mostraram-se maiores do que aqueles encontrados no grupo CoronaVac ($p < 0,0001$). Sobre os monócitos, o grupo ChAdOx-1 mostrou aumento de monócitos intermediários, clássicos e não clássicos quando comparado aos valores observados tanto pré-vacinação no mesmo grupo ($p < 0,0001$) quanto aqueles evidenciados no grupo CoronaVac pós-vacinação ($p < 0,0001$). Em relação as citocinas, foram observados menores níveis de IL-10, IL-13, IL-12p70 e IL-18 no grupo ChAdOx-1 pós-vacinação ($p = 0,0001$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$ e $p = 0,0061$, respectivamente), quanto aos valores observados no grupo vacinado com CoronaVac no mesmo momento ($p < 0,0001$). Entretanto, os níveis de IFN- γ mostraram-se significativamente aumentados no grupo CoronaVac pós-vacinação ($p = 0,0189$). Foi visto associações positivas entre monócitos intermediários e clássicos, nos momentos pré- e pós-vacinação ($p < 0,0001$), nos dois grupos de voluntários. No grupo ChAdOx-1 houve somente associação positiva entre monócitos não clássicos com a razão IL-6/IL-10 ($p = 0,0168$) e no momento pós-vacinação do grupo CoronaVac apresentou associações positivas entre todos os subtipos de monócitos e a razão IL-13/IL-10 ($p = 0,0230$). Vale ressaltar ainda que no momento pós-vacinação foi observado associações entre os níveis de IgG e todos os subtipos de monócitos em ambos os grupos. **Conclusão:** Os voluntários vacinados com ChAdOx-1 apresentaram tanto melhor resposta de anticorpos quanto uma significativa modulação na porcentagem dos perfis de monócitos.

Palavras-chave: citocinas, inflamação, CoronaVac, ChAdOx-1

ABSTRACT

Introduction: Unfortunately, the elderly population has been one of the most affected groups by COVID-19. Among several factors, this is due to the progressive alterations in the immune system observed during aging, known as immunosenescence, which leads to increased vulnerability and changes in the functioning of various immune cells. In this context, monocytes are cells that play a crucial role in immune and inflammatory responses and can be modulated according to the stimulus/environment they encounter, existing as classical monocytes, accounting for approximately 90% of circulating monocytes and considered inflammatory cells, capable of giving rise to their other subtypes—non-classical and intermediate monocytes. Besides these characteristics, monocytes also have the ability to produce and respond to cytokines that can either favor or hinder the immune response against pathogens, such as in COVID-19. Given this scenario, this study aimed to investigate the possible modulation of monocyte subtypes, as well as their relationship with pro- and anti-inflammatory cytokines in a population of elderly individuals undergoing vaccination for COVID-19.

Methods: 66 elderly individuals (74.74 ± 5.9 years old), of both sexes, who received COVID-19 vaccination, were invited to participate in this project. Blood samples were collected before and 30 days after the administration of the second dose of the CoronaVac vaccine ($n=48$) or ChAdOx-1 ($n=18$), to evaluate the serum concentration of IgG specific to SARS-CoV-2 antigens, as well as the percentage of monocyte subtypes: non-classical (CD14+CD16++), intermediate (CD14++CD16+), and classical (CD14++CD16-), and the systemic levels of pro- and anti-inflammatory cytokines. **Results:** Higher serum levels of IgG were observed in both groups of elderly participants in the study ($p < 0.0001$) post-vaccination compared to pre-vaccination values. However, the IgG values observed in the ChAdOx-1 group post-vaccination were higher than those found in the CoronaVac group ($p < 0.0001$). Regarding monocytes, the ChAdOx-1 group showed an increase in intermediate, classical, and non-classical monocytes when compared to both pre-vaccination values in the same group ($p < 0.0001$) and those observed in the CoronaVac group post-vaccination ($p < 0.0001$). Regarding cytokines, lower levels of IL-10, IL-13, IL-12p70, and IL-18 were observed in the ChAdOx-1 group post-vaccination ($p = 0.0001$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, and $p = 0.0061$, respectively) compared to values observed in the CoronaVac vaccinated group at the same time ($p < 0.0001$). However, IFN- γ levels were significantly increased in the CoronaVac group post-vaccination ($p = 0.0189$). Positive associations were observed between intermediate and classical monocytes pre- and post-vaccination ($p < 0.0001$) in both volunteer groups. In the ChAdOx-1 group, there was only a positive association between non-classical monocytes and the IL-6/IL-10 ratio ($p = 0.0168$), and in the post-vaccination moment of the CoronaVac group, positive associations were found between all monocyte subtypes and the IL-13/IL-10 ratio ($p = 0.0230$). It is also worth noting that post-vaccination, associations were observed between IgG levels and all monocyte subtypes in both groups. **Conclusion:** Volunteers vaccinated with ChAdOx-1 showed both a better antibody response and a significant modulation in the percentage of monocyte profiles.

Keywords: cytokines, inflammation, CoronaVac, ChAdOx-1

Lista de Figuras

Figura 1.	Linha do tempo	19
Figura 2.	Fluxograma do estudo	21
Figura 3.	Gráfico representativo de citometria de fluxo	24
Figura 4.	Concentração total de IgG	26
Figura 5.	Resultado dos subtipos de monócitos	27
Figura 6.	Avaliação dos níveis sistêmicos de IL-10	28
Figura 7.	Avaliação dos níveis sistêmicos de IL-16 e IL-13	28
Figura 8.	Avaliação dos níveis sistêmicos de IL-12p70, TNF- α e IL-18	29
Figura 9.	Avaliação dos níveis sistêmicos de Interferons	30
Figura 10.	Razão IL-6 e IL-13 pela IL-10	30
Figura 11.	Razão IL-12p70, TNF- α e IL-18 pela IL-10	31
Figura 12.	Razão Interferons pela IL-10	32

Lista de Abreviaturas

SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
MERS	Middleeast Respiratory Syndrome
COVID-19	Corona Virus Disease 2019
OMS	Organização Mundial da Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
IL	Interleucina
IGG	Imunoglobulina G
CCL	Ligante de Quimiocina
CD	Cluster of Differentiation
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Objetivos	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. Material e Métodos.....	19
3.1. População e <i>Design</i> do Estudo	19
3.2. Critérios de Seleção	20
3.3. Cálculo do Tamanho da Amostra e Grupos Experimentais.....	20
3.4. Vacinação.....	21
3.5. Coleta dos Materiais Biológicos	21
3.6. Determinação da imunoglobulina G (IgG) específica para SARS-CoV-2.....	22
3.7. Avaliação da imunofenotipagem dos subtipos de monócitos ..	23
3.8. Determinação de Citocinas	24
3.9. Análise Estatística	24
4. Resultados	25
5. Discussão	35
6. Conclusão	40
7. Referências Bibliográficas	41
ANEXO A.....	46
ANEXO B.....	51

1. Introdução

Em dezembro de 2019 começaram a ser noticiados casos de uma nova doença viral com sintomas respiratórios agudos associados à pneumonia, em Wuhan, China.¹ Além destes, outros sintomas como febre, tosse seca, calafrios, falta de ar e dores musculares foram relacionados a esta infecção, que posteriormente descobriu-se ser causada por um novo coronavírus, causador da doença do coronavírus-19 ou COVID-19, que se mostrou ser capaz de provocar uma síndrome respiratória aguda grave (SRAG) ou *severe acute respiratory syndrome* (SARS), sendo por isso denominado de SARS-CoV-2.^{2, 3}

O SARS-CoV-2, como o SARS-CoV, o MERS-CoV (*middleeast respiratory syndrome*) e o vírus *Influenza* são os principais patógenos indutores de manifestações graves no sistema respiratório humano. As doenças associadas às essas infecções variam de doença respiratória leve, que pode estar associada à presença de pneumonia aguda, chegando até a insuficiência respiratória grave.⁴ Nos últimos anos acreditava-se que os vírus respiratórios se espalhavam principalmente através de gotículas produzidas na tosse e espirros de indivíduos infectados, sendo posteriormente depositados diretamente nos olhos e/ou nas mucosas do nariz e boca de potenciais hospedeiros, bem como poderiam se depositar em superfícies inertes que seriam tocadas por potenciais hospedeiros e daí transferidas para as mucosas respiratórias.⁵ Contudo, apesar de ter sido considerada como uma via de transmissão menos comum, a inalação de aerossóis infecciosos tornou-se mais importante, pois os aerossóis respiratórios são produzidos durante todas as atividades expiratórias, incluindo respirar, falar, cantar, gritar, tossir e espirrar, tanto de indivíduos saudáveis quanto daqueles com infecções respiratórias.⁶

Conforme a literatura, a COVID-19 é uma doença heterogênea, pois estudos relataram que seu período de incubação pode variar entre o 1º até o 14º dia de contato com o vírus. Além disso, o curso da doença pode variar de quadros assintomáticos e leves a situações mais graves e críticas, sendo que 10% a 20% dos pacientes sintomáticos correm risco considerável de morte.⁷ Vale destacar que o vírus, o ambiente e o hospedeiro são fatores preponderantes que podem contribuir para a heterogeneidade desta doença.⁸

De acordo com projeções estatísticas da Organização Mundial da Saúde (OMS), entre os anos de 1950 e 2025 a população de idosos brasileira crescerá dezesseis

vezes contra cinco da população geral.⁹ Assim, estima-se que o Brasil contará com cerca de 34 milhões de pessoas com predominância na faixa etária até 80 anos; e em 2050 possuirá aproximadamente 65 milhões.¹⁰ Além disso, a expectativa média de vida do brasileiro deve aumentar dos atuais 75 anos para 81 anos, sendo que as mulheres continuarão vivendo mais do que os homens com expectativa de vida de 84,4 anos para as mulheres, contra 78,03 para os homens. Por volta da primeira década deste século, as mulheres viviam, em média, até os 78,5 anos, enquanto os homens até os 71,5 anos.¹⁰ Esses dados mostram que o ritmo de crescimento da população idosa no Brasil tem sido sistemático e consistente. De maneira semelhante, as projeções das Nações Unidas.¹¹ mostram que uma em cada nove pessoas no mundo tem 60 anos ou mais, e estima-se um crescimento para um em cada cinco por volta de 2050.

É amplamente conhecido que um dos problemas associados ao envelhecimento é a alteração de diversos sistemas corporais que, num âmbito geral, leva à redução de suas atividades. Dentre estes, o sistema imune é um dos mais pronunciadamente afetados pelo envelhecimento. O declínio das atividades imunes tanto relacionadas à imunidade inata quanto adaptativa associado ao envelhecimento é denominado imunossenescência e tende a levar à maior vulnerabilidade do indivíduo idoso a doenças, em especial infecciosas.¹²⁻¹⁴

Os mecanismos de resposta da imunidade inata e adaptativa são diferentes e dependentes. Enquanto, resumidamente, a primeira refere-se a barreiras anatômicas e bioquímicas, respostas celulares inespecíficas mediadas por monócitos, células *Natural Killer* (NK), macrófago e células dendríticas, a segunda refere-se a respostas a antígenos específicos e é mediada por linfócitos B e T.¹⁵

Uma das características mais marcantes do processo de imunossenescência é a presença de um estado pró-inflamatório crônico de baixo grau, onde há aumento de mediadores inflamatórios séricos, como interleucina-6(IL-6), IL-1RA, TNF- α , IL-1 e proteína C reativa (PCR), sendo este estado inflamatório conhecido como *inflammaging*. Particularmente, o *inflammaging* está associado à redução da incapacidade de gerar respostas imunes eficientes durante o processo de envelhecimento.^{16, 17}

O *inflammaging* é causado por um conjunto de fatores de caráter hormonal, metabólico e imunológico que constantemente geram estímulos que favorecem a

formação de um ambiente inflamatório. Além disso, células senescentes, por meio de inúmeros tipos de estresses, experimentam mudanças que levam à ativação de vias de sinalização, com consequente aumento da secreção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento.^{18, 19} O aumento do status inflamatório associado à idade também pode ser devido a uma falha na resolução da inflamação, uma vez que muitos fatores reguladores também se mostram deficientes em indivíduos mais velhos.²⁰

Em se tratando de COVID-19, foi observado que pacientes com quadros graves, principalmente aqueles que progridem para síndrome respiratória aguda grave (SRAG), apresentavam perfil sistêmico com aumento exacerbado de citocinas, uma situação conhecida como *cytokine storm*, que, de certa forma, poderia estar associada à ativação de macrófagos. Isso porque foi observado aumento da produção e secreção de citocinas, como a IL-6, IL-7, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), de quimiocinas inflamatórias, incluindo os ligantes 2 e 3 de quimiocinas CC (CCL2 e CCL3, respectivamente) e o ligante 10 de quimiocina CXC (CXCL10), bem como da forma solúvel da cadeia α do receptor de IL-2 pelos macrófagos. Isso levou à hipótese de que a ativação desregulada do compartimento dos fagócitos mononucleares poderia contribuir para a hiperinflamação associada ao COVID-19.^{21, 22}

Além dessas moléculas, foi também documentado que pacientes com SRAG apresentavam níveis plasmáticos aumentados da quimiocina conhecida como proteína quimioatraente de monócito/macrófago-1 (MCP-1).²³ Essa molécula pode atuar gerando um “*loop*” de feedback positivo em diversas células imunes, contribuindo para o recrutamento destas ao sítio de inflamação, o que promove um crescimento exponencial da resposta inflamatória que, por fim, poderá levar a danos em múltiplos órgãos.²⁴

De maneira semelhante ao observado nos casos mais graves da infecção por SARS-CoV-2, a desregulação de citocinas pode ser vista em outras doenças, como na sepse, uma síndrome inflamatória sistêmica que compartilha muitas características tanto fisiopatológicas como clínicas com a COVID-19.^{25, 26} Interessantemente, foram evidenciados níveis aumentados de citocinas como IL-13, IP-10 e MCP-1 em pacientes com sepse positivos quando comparados a pacientes com sepse negativos para COVID-19.²⁷

Além disso, foi visto que pacientes com COVID-19 em UTIs mostraram uma expansão significativa de populações de monócitos CD14⁺CD16⁺ (considerados como

inamatórios) produtores de IL-6 comparados com aqueles pacientes que não necessitaram de internação em UTI.^{28, 29}

Vale também destacar que foi demonstrado que pacientes com COVID-19 em situação grave apresentavam aumento do número circulatório de monócitos totais comparados com controles saudáveis,³⁰ um aspecto já previamente observado num estudo desenvolvido com a população do Leste asiático que identificou uma associação entre monócitos e casos mais graves de infecção por *Influenza*.³¹ Embora estes dados sejam interessantes, os fatores exatos da ativação de monócitos no caso da COVID-19 e a contribuição destas células para a fisiopatologia da doença ainda precisam de maiores esclarecimentos.

De acordo com a literatura, os monócitos são classificados em três subtipos, sendo que cada tipo pode exercer funções distintas durante o processo inflamatório. Neste sentido, monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), os quais correspondem a aproximadamente 90% do total de monócitos circulantes, são considerados células inflamatórias que podem, inclusive, dar origem aos demais subtipos.³²⁻³⁴ Já, os monócitos não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) possuem a capacidade de remover debris da vasculatura, apresentam fenótipo anti-inflamatório, representam cerca de 10% dos monócitos circulantes.^{35, 36} Não obstante, também tem sido abordado que este subtipo de monócito possivelmente contribua para o desenvolvimento de doenças virais, como, por exemplo, tendo um impacto negativo nos resultados clínicos em pacientes infectados com vírus da Dengue (DENV).³⁷ Além destes, os monócitos intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) correspondem até 5% dos monócitos em circulação, apresentam alta capacidade fagocítica, produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio.^{38, 39}

Reconhece-se 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 nítrico,⁴⁰ 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 (TCD4⁺).^{41, 42} 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 idosos.⁴³

No curso da pandemia pela COVID-19, a partir de 2021 houve a implementação de campanha de vacinação contra o SARS-CoV-2, o que impactou na desaceleração desta pandemia. Ainda sobre o curso da COVID-19, vale destacar que foi evidenciado o surgimento de variantes preocupantes, incluindo Alpha (conhecida como 501Y.V1 ou variante B.1.1.7), Beta (501Y.V2 ou B.1.351), Gamma (501Y.V3 ou P1), Delta (G/478K.V1 ou B.1.617.2) e Ômicron (B.1.1.529), que, em especial esta última e suas subvariantes, por conseguirem superar as demais cepas e se manter ainda hoje presente na sociedade, associaram-se a um aumento na transmissão e/ou mortalidade pela COVID-19.⁴⁴⁻⁴⁶

Em se tratando de seu diagnóstico, é possível verificar uma grande variedade de testes comerciais disponíveis no mercado que podem ser usados para detectar anticorpos contra COVID-19. No entanto, pelo fato da maioria dos testes não fornecerem informações sobre a funcionalidade dos anticorpos, o resultado obtido mostra apenas se a resposta imune foi ativada ou potencializada, particularmente em questão de quantidade de anticorpos, por meio da infecção natural ou pelas vacinas.⁴⁷ Contudo, devido às possíveis reações cruzadas de anticorpos de outros coronavírus sazonais e pelas variações observadas no SARS-CoV-2, um teste de neutralização de vírus (VNT) deve ser preconizado, pois testes deste tipo são considerados padrão-ouro para quantificação dos anticorpos neutralizantes, reconhecidamente os mais importantes na proteção antiviral contra uma determinada cepa ou variante do agente infeccioso viral.⁴⁸

Em nosso território, as vacinas para COVID-19 disponíveis para a população apresentam diferentes mecanismos de ação, como as vacinas mRNA da Pfizer/BioNTech (BNT16b2) e Moderna (mRNA-1273), outras usam vetor viral não recombinante, como ChAdOx-1/AstraZeneca (AZD1222) e Janssen-Cilag (Ad26.COV2.S). Outra tecnologia é o vírus inativado química ou fisicamente, como no caso da vacina da Sinovac (CoronaVac). Vale salientar que dentre estas, somente a CoronaVac não utiliza especificamente a glicoproteína do envelope viral denominada como *Spike* como alvo específico.^{49, 50}

Após inicial uso de estratégia de vacinação com vacina monovalente, mais recentemente foi elaborada uma dose de reforço com vacina bivalente, na qual foi introduzida junto à cepa original a variante Ômicron com intuito de induzir respostas

imunes mais protetoras, duráveis e potentes ao aumentar a quantidade de anticorpos neutralizantes contra estas diferentes cepas do SARS-CoV-2.⁵¹

Ao falarmos sobre vacinas, mesmo nas sociedades com melhor cobertura vacinal, é possível encontrar minorias populacionais vulneráveis, como as crianças, os idosos e os doentes, principalmente imunossuprimidos, cujo sistema imunológico por vezes não reage à dose da vacina. Com isso, a única linha de defesa deles será a proteção oriunda de outras pessoas vacinadas, pois por estar em maioria cria uma espécie de escudo protetor que impedirá os vulneráveis de entrar em contato com a doença.⁵² Li Hui-Jun *et al.*⁵³ apresentou em uma meta-análise de 33 estudos observacionais que, além de haver poucos estudos que avaliaram o impacto da vacinação contra COVID-19 em populações idosas, a soroconversão nessa população costuma ser menor comparada a saudáveis e finalizaram mostrando que indivíduos submetidos ao esquema de vacinação combinada apresentaram níveis de anticorpos mais elevados do que aqueles submetidos ao esquema de vacinação com um único tipo de vacina.

Em se tratando de resposta a vacinação, é sabido que a imunossenescência contribui para uma menor capacidade de idosos responderem a vacina contra o vírus respiratórios, como, por exemplo, o vírus *Influenza*,¹⁶ e já foi demonstrado que idosos que praticam regularmente programas de exercícios físicos, especialmente em intensidade moderada, apresentam maiores níveis de anticorpos do tipo IgM e IgG específicos para a vacina contra este vírus (*Influenza*) quando comparados a idosos sedentários.⁵⁴ Além disso, foi relatado que idosos que mantêm o estilo de vida com práticas regulares de exercícios físicos de longa duração apresentam melhor resposta imunológica, tendo redução de linfócitos T senescentes e um aumento no número de linfócitos T *naïve* e efetores.^{55, 56}

De fato, resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa corroboram os relatos anteriores, visto que fomos capazes de mostrar que idosos praticantes regulares de exercício físico combinado em intensidade moderada responderam melhor à vacinação contra o vírus *Influenza*, tanto sistemicamente como na mucosa das vias aéreas superiores, quando comparados a idosos não praticantes e sedentários, e que esta melhora estava associada à modulação dos números de linfócitos TCD4⁺⁵⁷⁻⁵⁹. Mais recentemente, também demonstramos que idosos que praticavam regularmente exercícios físicos combinados antes da pandemia tiveram relevante resposta humoral e celular a vacinação para COVID-19.^{60, 61}

Diante disso, o desenvolvimento deste estudo fornecerá resultados que irão contribuir para o entendimento da possível modulação dos subtipos de monócitos e da relação destas com o perfil de citocinas sistêmicas (tanto pró- quanto anti-inflamatórias) em uma população de idosos submetida à vacinação para COVID-19.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a modulação dos subtipos de monócitos e os níveis circulantes de citocinas em idosos submetidos à vacinação para a COVID-19.

2.2. Objetivos Específicos

Propõe-se avaliar antes e após a vacinação:

- A quantidade sérica de anticorpos IgG específicos para antígenos do SARS-CoV-2;
- A imunofenotipagem dos subtipos de monócitos (clássicos, intermediários e não clássicos);
- A quantidade circulante de citocinas pró- e anti-inflamatórias: IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α e MCP-1.

3. Material e Métodos

3.1. População e *Design* do Estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo e experimental com intervenção em dois momentos (pré- e pós-vacinação) envolvendo idosos, com idade entre 60 e 85 anos ($74,74 \pm 5,9$), de ambos os sexos, submetidos à vacinação para SARS-CoV-2. Todos os participantes voluntários foram recrutados junto ao Ambulatório de Promoção de Saúde do Idoso pertencente à Disciplina de Geriatria e Gerontologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), com auxílio do médico geriatra e colaborador do ambulatório. Aqueles que manifestaram interesse em participar do estudo foram orientados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNISA em 2021 (número 4.350.476 – Anexo A). Para desenvolvimento do presente estudo foram utilizados dados e amostras de plasma e células circulantes previamente coletados entre Janeiro e Fevereiro de 2021 (antes da administração da primeira dose da vacina para COVID-19) e entre Março e Abril de 2021, que corresponde por volta de 30 dias após administração da segunda dose da vacina CoronaVac, ou entre Julho e Agosto de 2021, que corresponde por volta de 30 dias após a administração da segunda dose da vacina ChAdOx-1. O presente estudo seguiu todas as orientações da Declaração de Helsinque e foi também aprovado pelo CEP da UNISA em 2023 (número 6.048.872 – Anexo B).

Na figura 1 é apresentado o *design* experimental do presente estudo em linha temporal.

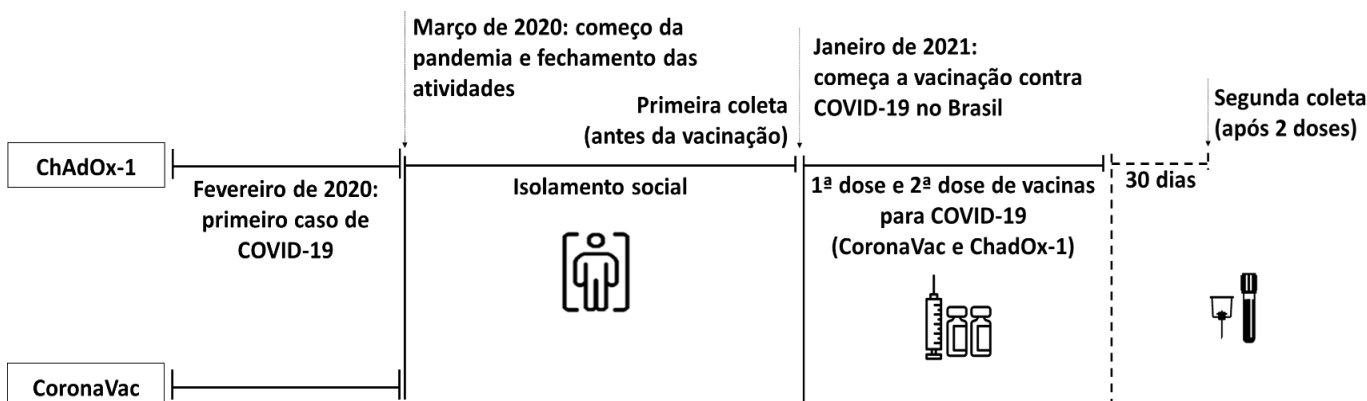


Figura 1. Linha do tempo mostrando o design do estudo, destacando as fases antes do começo da pandemia e isolamento social até a vacinação contra o vírus SARS-CoV-2.

3.2. Critérios de Seleção

- a) Ter idade entre 60 e 85 anos de idade no momento do recrutamento.
- b) Não apresentar diagnóstico de: sorologia positiva para o HIV, neoplasias, doenças neurológicas.
- c) Concordar em participar da pesquisa de forma voluntária através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- d) Não fazer uso de corticoterapia ou fazer uso de qualquer outro medicamento anti-inflamatório em alguma fase do estudo.
- e) Não fazer uso de terapia com plasma convalescente em alguma fase do estudo.
- f) Comparecer em todos as fases de coleta de amostras biológicas.

3.3. Cálculo do Tamanho da Amostra e Grupos Experimentais

Por se tratar de um estudo experimental e com características exploratórias, foi realizado o cálculo amostral para estabelecer um número mínimo de participantes para este estudo. Usando o programa de software *G*Power*, o tamanho da amostra e o poder estatístico foram estimados com base no teste T de *Student*, com tamanho do efeito em 0,30, nível α de 5% (0,05), poder estatístico de 0,80 e dois grupos com duas medidas (pré-vacinação e pós-vacinação), com base em estudo prévio de nosso grupo.^{54, 62} Considerando uma margem de 30% de perdas ou recusas, foi considerado um mínimo de 40 indivíduos para cada grupo. Conforme o fluxograma (Figura 1), inicialmente foram convidados a participar do estudo um total de 92 idosos que já participaram de estudos prévios do nosso grupo de pesquisa. Juntamente com a equipe médica e acadêmica, e guiados por critérios de seleção de participantes previamente apresentados, foi possível inicialmente contar com a participação de 81 voluntários, que foram submetidos a vacinação para COVID-19. Contudo, vale salientar que, de acordo com a disponibilidade de vacinas para COVID-19 no nosso país durante o período de desenvolvimento do presente estudo, foi possível obter amostras (pré-vacinação e pós-vacinação) de um grupo de idosos que foram vacinados com CoronaVac (n=48), e de outro grupo de idosos vacinados com ChAdOx-1 (n=18). Portanto, apesar de termos, no geral, atingido o número mínimo de voluntários necessários para realização do estudo, por questão da vacina, o número de voluntários por grupo ficou desigual.

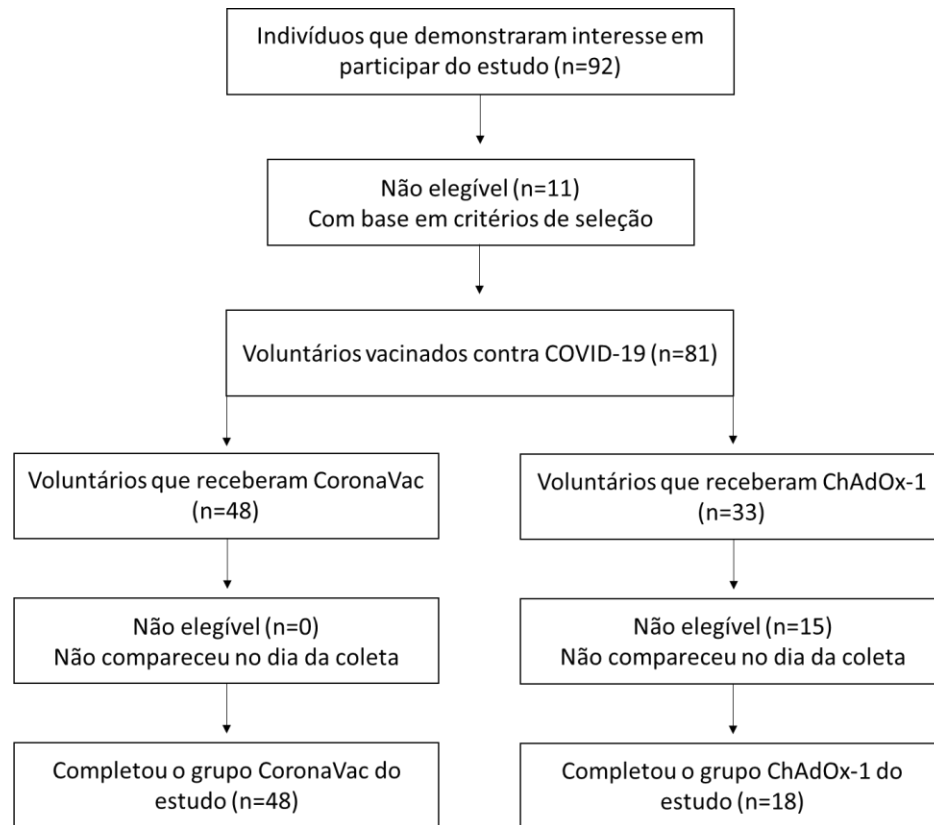


Figura 2. Fluxograma do desenho do estudo.

3.4. Vacinação

De acordo com o calendário vacinal inicialmente proposto para a população idosa pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em Janeiro e Fevereiro de 2021, essa população poderia ser imunizada exclusivamente com as vacinas CoronaVac ou ChAdOx-1 e, por isso, os voluntários participantes do presente estudo foram, então, separados em dois grupos com base no imunizante disponível pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no momento da vacinação. Além disso, é relevante esclarecer que, nesse momento, conforme descrito anteriormente, todos os voluntários foram submetidos a duas doses da mesma vacina, sendo que, para a CoronaVac o intervalo entre a primeira e a segunda dose foi em torno de 30 dias, e para a ChAdOx-1, foi em torno de 120 dias.

3.5. Coleta dos Materiais Biológicos

Amostras de sangue periférico foram obtidas em dois momentos: antes e 30 dias após a administração da segunda dose da vacina para COVID-19. As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo anticoagulante EDTA para obtenção de

células mononucleares do sangue periférico e plasma. Alíquotas de plasma (500µL) foram obtidas após centrifugação a 800g por 10 minutos a 4°C, sendo posteriormente congeladas a -80°C para posterior determinação das concentrações da imunoglobulina G (IgG) e das citocinas tanto pró- quanto anti-inflamatórias.

Estas mesmas amostras de sangue periférico foram utilizadas para obtenção das células mononucleares do sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells - PBMC*). Neste caso, o sangue restante foi diluído 1:1 em PBS (1x, pH=7,4), sendo a mistura adicionada a tubos contendo Histopaque (gradiente de densidade de 1.077, Sigma) e então submetida a centrifugação a 800g por 20 minutos a 4°. Após esta etapa, o *pool* de células obtido, correspondente à fração dos leucócitos, foi isolado, lavado em PBS (1x, pH=7,4) e novamente submetido a centrifugação a 4°C por 10 minutos. Em seguida, 1×10^6 células foram misturados com 1mL de meio de congelamento (90% de soro fetal bovino + 10% de DMSO) e então armazenados em nitrogênio líquido para determinação da imunofenotipagem dos subtipos de monócitos.

3.6. Determinação da imunoglobulina G (IgG) específica para SARS-CoV-2

A concentração sistêmica de IgG específica para antígenos do SARS-CoV-2 foi determinada por meio da técnica de ELISA em amostras de plasma obtidas antes e depois da vacinação. Para isso, a placa de reação de 96 poços foi inicialmente sensibilizada com 100µL de uma concentração de antígenos N, M e S do SARS-CoV-2 (0,12µg/mL), gentilmente cedidos pelo Laboratório de Virologia Clínica e Molecular - ICB-USP, e mantidas sob refrigeração a 4°C *overnight*. Após este período, os poços foram lavados 3X com tampão PBS-T (PBS - 1x, pH=7,4 + 0,1% de *Tween* 20), sendo a seguir submetidos ao bloqueio dos sítios inespecíficos por meio do uso de 100µL do tampão PBS-T-BSA [PBS - 1x, pH=7,4 + 0,1% de *Tween* 20 + 0,5% de albumina sérica bovina (*bovine serum albumin - BSA*)] a 37°C por 1 hora. Em seguida, realizou-se nova etapa de lavagem (3X com tampão PBS-T) e, na sequência, 100µL das amostras de cada voluntário, previamente diluídas 1:5.000 em tampão PBS-T-BSA foram adicionadas à placa e incubadas durante, pelo menos, 2 horas a 37°C. Após essa etapa de incubação e nova etapa de lavagem (3X com tampão PBS-T) da placa, 100µL do conjugado (anti-IgG humana ligado à enzima peroxidase) diluído 1:10.000 em tampão PBS-T-BSA foram adicionados à placa e a mesma mantida em incubação por 1 hora a 37°C. Após este tempo, realizou-se a última etapa de lavagem (3X com tampão PBS-

T) seguida da etapa de adição de 100µL da solução de substrato TMB (tetra-metil-benzidina) a cada poço da placa e incubação no escuro por até 15 minutos. Em seguida, a reação foi parada com a adição de 50µL da solução de H₂SO₄ 2N. A leitura da reação foi realizada a 450 nm em um leitor de microplaca (Labsystem Multiskan MS).

3.7. Avaliação da imunofenotipagem dos subtipos de monócitos

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC), previamente armazenadas conforme descrito no item 3.6, foram retiradas do nitrogênio líquido e imediatamente submetidas ao processo de descongelamento em banho-maria a 37°. Em seguida, a solução contendo as células descongeladas foi transferida para um tubo Falcon® de 15 mL contendo 9 mL de solução PBS-SFB 10% (PBS - 1x, pH=7,4 + 10% de soro fetal bovino – SFB), sendo, então, submetida a centrifugação a 800g por 8 minutos. Logo após, o sobrenadante foi descartado, sendo o *pellet* ressuspenso com 150µL de PBS-BSA 1% (PBS - 1x, pH=7,4 + 1% de albumina sérica bovina (*bovine serum albumin* – BSA) e submetida à incubação por 30 minutos, no escuro, com o *mix* de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos: CD14 conjugado com alofocianina—APC ou isotiocianato de fluoresceína—FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos), CD16 conjugado com FITC ou ficoeritrina—PE (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos).

Após incubação por 30 minutos, foram adicionados 200µL de PBS e as células submetidas à centrifugação a 800g por 8 minutos. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspenso em 200 µL de PBS e, por fim, as células foram submetidas à análise por citometria de fluxo.

A aquisição de pelo menos 10.000 eventos foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur (*Becton Dickinson Immunodiagnostic Systems*, San Jose, CA, EUA) e os dados gerados analisados no software *BD CellQuest Pro* (*Becton Dickinson Immunodiagnostic Systems*, San Jose, CA, EUA).

A Figura 3 apresenta um modelo da estratégia utilizada na definição, por citometria de fluxo, não somente da população geral de monócitos (Figura 3A), bem como dos monócitos não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺, Figura 3B) localizados no quadrante denominado de R2, dos monócitos intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) localizados no quadrante R3 e dos monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) localizados no quadrante R4.

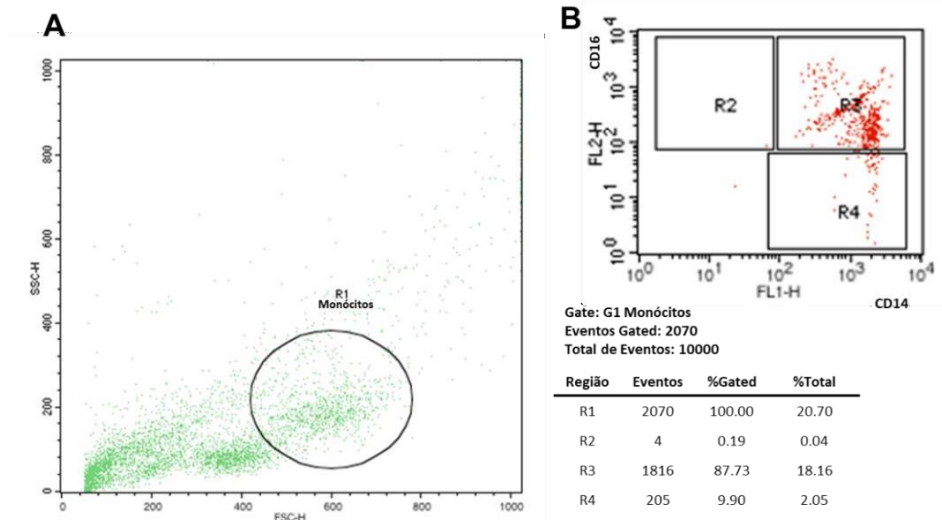


Figura 3. Gráfico representativo da estratégia aplicada na citometria de fluxo. (A) Gráfico de tamanho (FSC-H) e complexidade (SSC-H), mostrando as células mononucleares e o *gate* de monócitos (R1). (B) Gráfico de fluorescência mostrando os subtipos de monócitos: R2 - não clássicos (CD14+CD16++) e R3 - intermediários (CD14++CD16+) e R4 - clássicos (CD14++CD16-).

3.8. Determinação de Citocinas

As concentrações plasmáticas das citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α e MCP-1 foram determinadas por meio do ensaio multiplex baseado em esferas (*beads*) LEGENDplex™ (Biolegend, San Diego, CA, EUA). Todas as amostras de plasma foram inicialmente diluídas 2 vezes e 25 μ L da amostra diluída foi utilizada para realização deste ensaio. A concentração de cada citocina foi calculada com base em sua respectiva curva padrão, seguindo as instruções dos fabricantes. Ainda, a linearidade do ensaio multiplex estava dentro da faixa de 2,4 a 10.000 pg/mL, os coeficientes de correlação de todas as curvas padrão variaram de 0,95 a 0,99, enquanto os coeficientes de variância intraensaio foram de 3 a 5%, e os coeficientes de variância entre ensaios foram de 8 a 10%. A análise foi realizada no citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 Plus (BD Biosciences San Jose. CA. EUA) e os dados obtidos foram analisados com o software LEGENDPlex™ V8.0 (Biolegend).

3.9. Análise Estatística

Todos os dados coletados foram inicialmente comparados com a curva de Gauss e os testes estatísticos de Shapiro-Wilks e Bartlett foram empregados para a avaliação da normalidade e da homogeneidade da variância para cada variável. Assim, aquelas

que apresentaram comportamento não-paramétrico foram representadas por medianas e intervalos interquartis; sendo, em caso contrário, apresentadas por médias e desvio-padrão. Empregou-se o teste estatístico de Wilcoxon para comparações de independência intragrupos, e o teste estatístico de Kruskal-Wallis (combinado com o teste *posthoc* de Dunn) para avaliações intergrupos.

Para avaliação das correlações entre as variáveis de interesse, por serem não-paramétricas, empregou-se o coeficiente de correlação (*rho*) de *Spearman*, calculado com seu respectivo *p-valor*.

Todas as análises foram realizadas no software GraphPadPrism8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA), considerado o risco α de 5% ($p \leq 0,05$).

4. Resultados

Na tabela 1 são apresentados os dados antropométricos referentes aos grupos de voluntários separados pelo tipo de vacina recebida (CoronaVac ou ChAdOx-1). Pode-se observar que nenhum dos dois grupos apresentou diferença significativa. Embora o grupo ChAdOx-1 seja mais velho e mais pesado que o grupo CoronaVac.

Tabela 1. Dados antropométricos, apresentados em média e desvio padrão ($X \pm SD$) dos voluntários participantes do presente estudo.

Grupo de Voluntários			
Variáveis	CoronaVac (n=48)	ChAdOx-1 (n=18)	Valor de p
Idade (anos)	74,0±4,3	76,6±8,8	0,0966
Altura (m)	1,58±0,10	1,59±0,11	0,7490
Peso (kg)	63,75±12,36	70,15±16,66	0,0941
IMC (kg/m ²)	25,56±4,28	27,72±5,15	0,0894

Vale salientar que para as análises a seguir adotou-se a estratégia de avaliação das respostas preconizadas no presente estudo mantendo-se inicialmente todos os voluntários em um único grupo (momento pré-vacinação), com posterior separação dos mesmos conforme vacina recebida, ou seja, nos grupos CoronaVac e ChAdOx-1.

A Figura 4 mostra a resposta de anticorpos do tipo IgG específicos para antígenos do SARS-CoV-2, tanto antes (Pré) quanto 30 dias depois da administração da segunda dose da vacina para COVID-19 (Pós), nos grupos de voluntários deste estudo. É possível verificar que os voluntários submetidos à vacinação com CoronaVac

($p < 0.0001$), bem como os voluntários vacinados com ChAdOx-1 ($p < 0.0001$) apresentaram níveis mais elevados de IgG pós-vacinação em relação aos valores encontrados no momento pré-vacinação. Além disso, observou-se que os níveis sistêmicos de IgG evidenciados no grupo vacinado com ChAdOx-1 mostraram-se maiores do que os valores encontrados no grupo vacinado com CoronaVac ($p = 0.0001$).

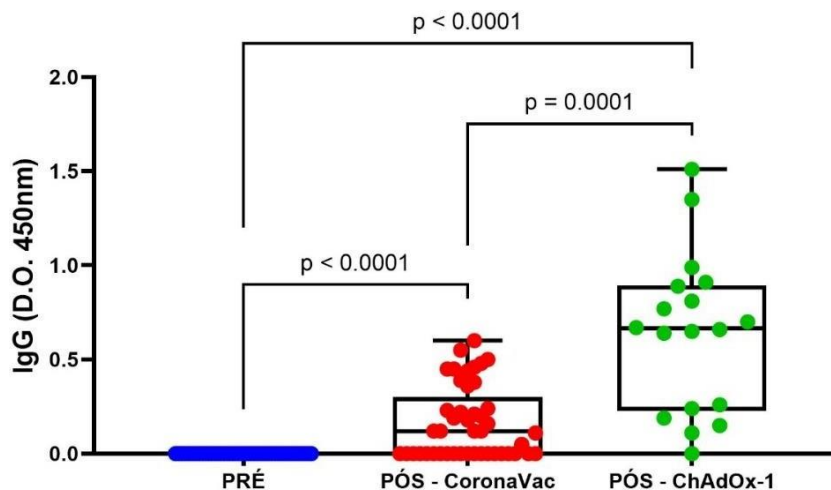


Figura 4. Concentração total de anticorpos do tipo IgG específicos para antígenos do SARS-CoV-2 nos grupos de voluntários submetidos a vacinação com CoronaVac ou ChAdOx-1. As concentrações foram determinadas em amostras de plasma obtidas antes (Pré) e após 30 dias (Pós) da administração da segunda dose da vacinação para COVID-19.

Além da avaliação da resposta de anticorpos a vacinação para COVID-19, um dos principais objetivos deste estudo foi verificar a modulação dos subtipos de monócitos antes e após a vacinação para COVID-19.

A Figura 5 mostra os resultados, em porcentagens, dos subtipos de monócitos: não clássicos (Figura 5A), intermediários (Figura 5B) e clássicos (Figura 5C) para os grupos de voluntários antes da primeira dose (Pré) e 30 dias após (Pós) a administração da segunda dose das vacinas CoronaVac ou ChAdOx-1. Em relação aos monócitos não clássicos (CD14+CD16++, Figura 5A), monócitos intermediários (CD14++CD16+, Figura 5B) e monócitos clássicos (CD14++CD16-, Figura 5C), foi possível verificar que, o grupo vacinado com CoronaVac não mostrou nenhuma alteração em relação ao momento pré-vacinação. Contudo o grupo submetido à vacinação com ChAdOx-1 mostrou aumento em todos os subtipos de monócitos no momento pós-vacinação ($p < 0.0001$) quando comparado aos valores obtidos pré-vacinação. Além disso, os valores observados pós-vacinação no grupo ChAdOx-1 também se mostraram maiores do que os valores encontrados no grupo CoronaVac no mesmo momento ($p < 0.0001$).

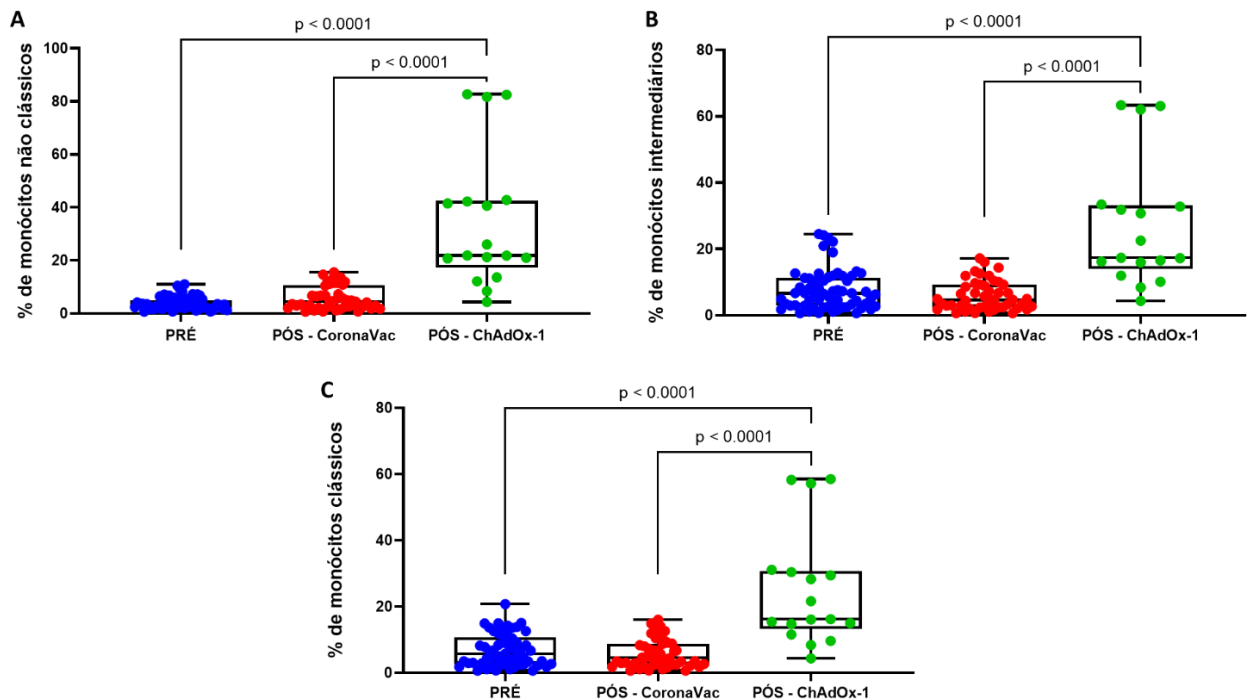


Figura 5. Resultados, em porcentagens, dos subtipos de monócitos não clássicos (A), intermediários (B) e clássicos (C) para os grupos de voluntários vacinados com CoronaVac ou ChAdOx-1 antes da primeira dose (pré) e após 30 dias da administração da segunda dose (pós) dessas vacinas.

Outro principal objetivo deste estudo foi avaliar a concentração sistêmica de citocinas de perfil pró- e anti-inflamatórias nos grupos de voluntários. Das 13 citocinas analisadas, cinco (IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A e MCP-1) não apresentaram diferença nos níveis de expressão após a vacinação.

Assim, na figura 6 é apresentado o resultado obtido na avaliação da IL-10, e foi possível observar que os voluntários submetidos à vacina ChAdOx-1 apresentaram menores níveis desta citocina no momento pós-vacinação do que no momento pré-vacinação ($p=0.0001$), bem como daqueles observados no grupo vacinado com CoronaVac no mesmo momento ($p<0.0001$). Nenhuma diferença significativa foi evidenciada com relação aos níveis desta citocina no grupo vacinado com CoronaVac.

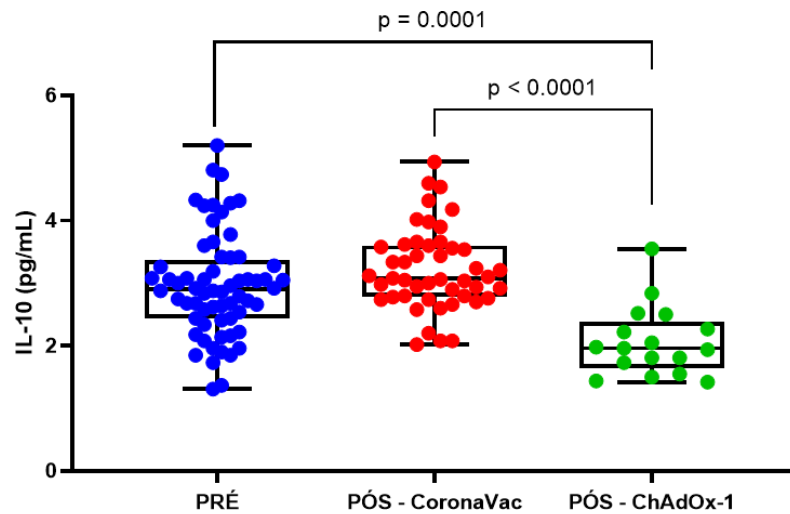


Figura 6. Avaliação dos níveis sistêmicos, em pg/mL, de IL-10 nos grupos de voluntários vacinados com CoronaVac ou ChAdOx-1 antes da primeira dose (pré) e após 30 dias da administração da segunda dose (pós) dessas vacinas.

A Figura 7 apresenta os níveis sistêmicos das citocinas de perfil Th2 (IL-6, 7A e IL-13, 7B) nos voluntários do estudo antes e depois da vacinação. Embora a análise da IL-6 mostrar que não houve nenhuma alteração estatisticamente significativa nos grupos de voluntários, os níveis da IL-13 no grupo vacinado com ChAdOx-1 mostraram diminuição significativa no momento pós-vacinação em relação tanto ao momento pré-vacinação ($p < 0.0001$), quanto aos valores observados no grupo vacinado com CoronaVac no mesmo momento ($p < 0.0001$).

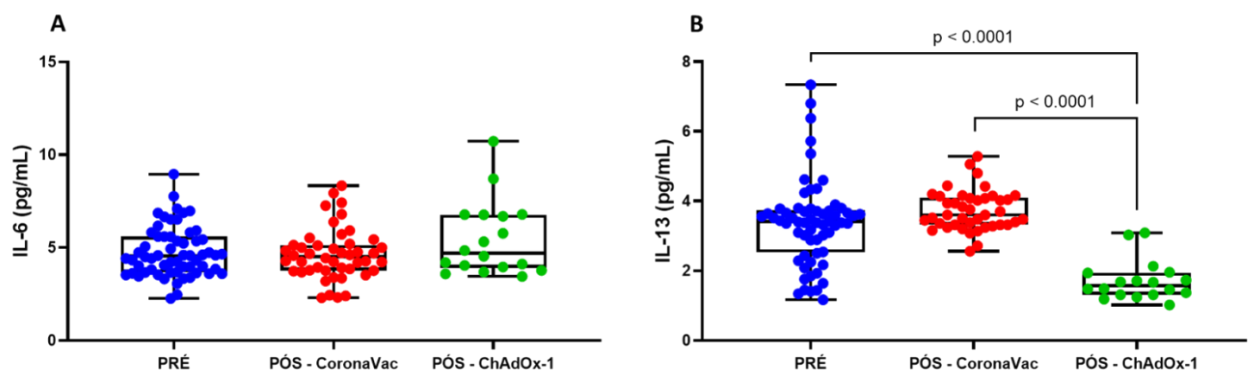


Figura 7. Avaliação dos níveis sistêmicos, em pg/mL, das citocinas IL-6 (A) e IL-13 (B) nos grupos de voluntários vacinados com CoronaVac ou ChAdOx-1 antes da primeira dose (pré) e após 30 dias da administração da segunda dose (pós) dessas vacinas.

Além destes, na Figura 8 são apresentados os níveis circulantes de citocinas associadas ao perfil Th1 (IL-12p70, 8A; TNF- α , 8B e IL-18, 8C). Em relação a IL-12p70 (Figura 8A) e IL-18 (Figura 8C), foi possível verificar níveis mais baixos destas citocinas no grupo vacinado com ChAdOx-1 no momento pós-vacinação do que no momento

pré-vacinação ($p < 0.0001$ e $p = 0.0061$, respectivamente), bem como quando comparados aos valores encontrados no grupo vacinado com CoronaVac no mesmo momento ($p < 0.0001$). Já, sobre os níveis sistêmicos de TNF- α , não foram evidenciadas mudanças em seus valores nos grupos de voluntários (Figura 8B).

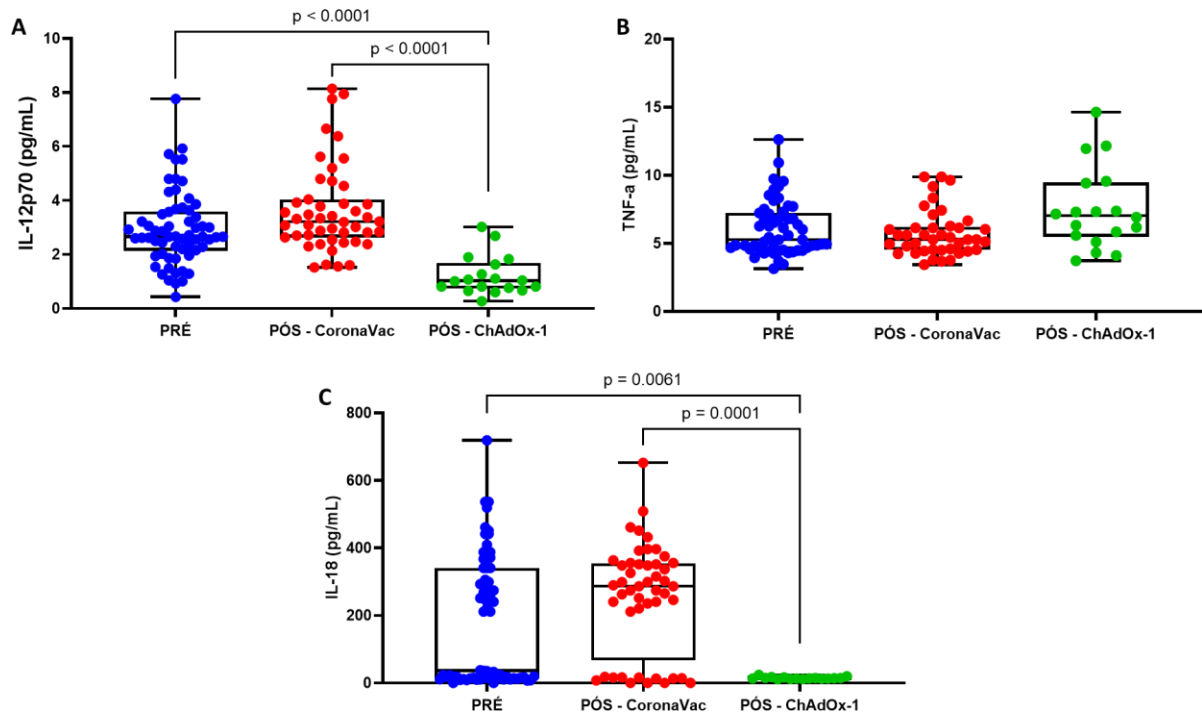


Figura 8. Avaliação dos níveis sistêmicos, em pg/mL, de IL-12p70 (A), TNF- α (pg/mL) (B) e IL-18 (pg/mL) (C) nos grupos de voluntários vacinados com CoronaVac ou ChAdOx-1 antes da primeira dose (pré) e após 30 dias da administração da segunda dose (pós) dessas vacinas.

Na Figura 9 são mostrados os resultados obtidos na avaliação das citocinas associadas aos tipos I (IFN- α , 9A e IFN- β , 9B) e II (IFN- γ , 9C) dos interferons. Neste sentido, evidenciou-se que o grupo de voluntários vacinado com ChAdOx-1 apresentou menores níveis de IFN- γ (Figura 9C) no momento pós-vacinação quando comparados não somente aos valores observados no momento pré-vacinação ($p = 0.0019$), bem como aos valores encontrados no grupo vacinado com CoronaVac no mesmo momento ($p < 0.0001$). Interessantemente, os níveis de IFN- γ observados no grupo CoronaVac no momento pós-vacinação mostraram-se significativamente aumentados em relação ao momento pré-vacinação ($p = 0.0189$). Já, os resultados acerca do IFN- β (Figura 9B) mostraram menores níveis desta citocina no grupo vacinado com ChAdOx-1 tanto em relação ao momento pré-vacinação ($p < 0.0001$), quanto aos valores observados no grupo vacinado com CoronaVac (< 0.0001). Por fim, os níveis de IFN- α (Figura 9A) não mostrou nenhuma alteração significativa em ambos os grupos.

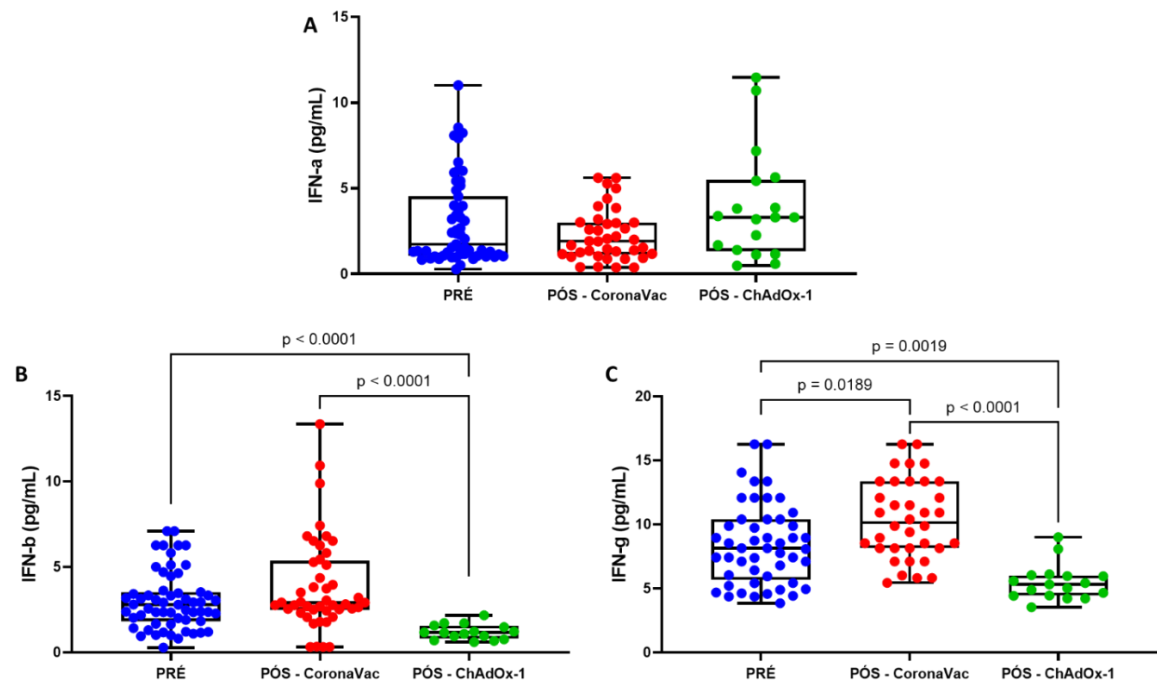


Figura 9. Avaliação dos níveis sistêmicos, em pg/mL, de IFN- α (A), IFN- β (B) e IFN- γ (C) nos grupos de voluntários vacinados com CoronaVac ou ChAdOx-1 antes da primeira dose (pré) e após 30 dias da administração da segunda dose (pós) dessas vacinas.

No intuito de ampliar o entendimento da modulação das citocinas neste estudo, foi realizada a razão entre as citocinas pró-inflamatórias pela clássica citocina anti-inflamatória IL-10.

Assim, na Figura 10A observa-se que o grupo vacinado com ChAdOx-1 mostrou maior razão IL-6/IL-10 no momento pós-vacinação tanto em relação ao momento pré-vacinação ($p=0.0002$) quanto aos valores observados no grupo vacinado com CoronaVac ($p<0.0001$). De maneira contrária, na análise da razão entre a IL-13 e IL-10 (Figura 11B) observa-se que o grupo ChAdOx-1 mostrou menores valores desta razão no momento pós-vacinação tanto em relação aos valores encontrados no momento pré-vacinação, quanto aqueles evidenciados no grupo vacinado com CoronaVac no mesmo momento ($p<0.0001$).

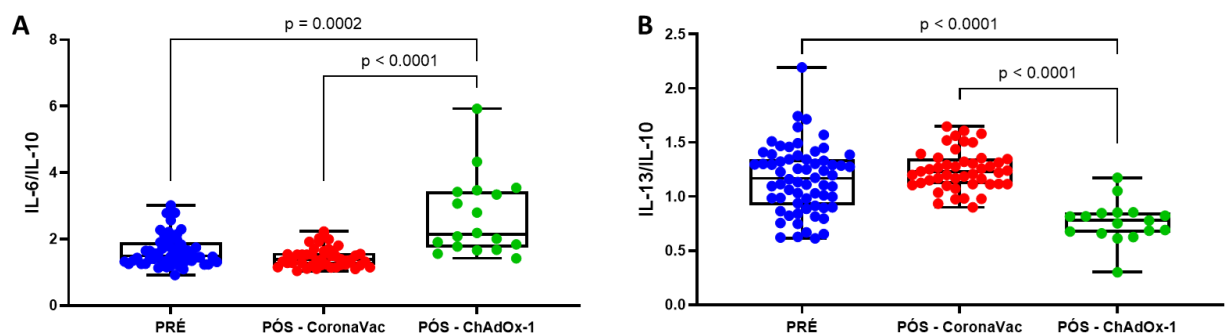


Figura 10. Razão entre os níveis sistêmicos das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (A) e IL-13 (B) pela citocina anti-inflamatória IL-10 nos grupos de voluntários vacinados com CoronaVac ou ChAdOx-1 antes da primeira dose (pré) e após 30 dias da administração da segunda dose (pós) dessas vacinas.

Além destas, a Figura 11A mostra menor razão entre os níveis de IL-12p70 pela IL-10 (IL-12p70/IL-10) no grupo vacinado com ChAdOx-1 no momento pós-vacinação do que os valores encontrados tanto no momento pré-vacinação ($p=0.0005$) quanto no grupo vacinado com CoronaVac no mesmo momento ($p=0.0002$). Por outro lado, a razão TNF- α /IL-10 (Figura 11B) mostrou que o grupo vacinado com ChAdOx-1 apresentou maior razão entre estas citocinas no momento pós-vacinação do que os valores encontrados tanto no momento pré-vacinação ($p<0.0001$) quanto aos valores observados no grupo vacinado com CoronaVac no mesmo momento ($p<0.0001$). Já, na Figura 11C é possível verificar que o grupo vacinado com ChAdOx-1 mostrou menor razão entre os níveis de IL-18 e IL-10 (IL-18/IL-10) no momento pós-vacinação do que os valores observados no grupo vacinado com CoronaVac ($p=0.0036$).

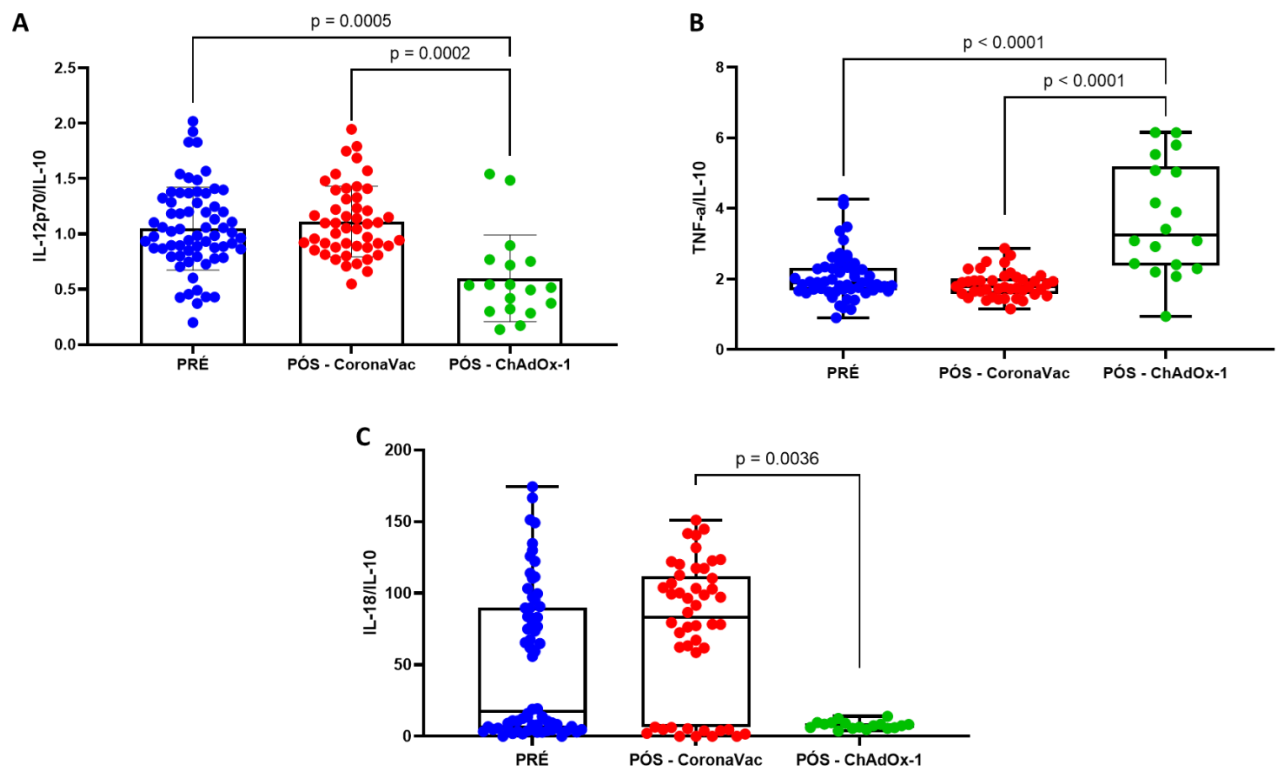


Figura 11. Razão entre os níveis sistêmicos das citocinas pró-inflamatórias IL-12p70 (A), TNF- α (B) e IL-18 (C) pela citocina anti-inflamatória IL-10 nos grupos de voluntários vacinados com CoronaVac ou ChAdOx-1 antes da primeira dose (pré) e após 30 dias da administração da segunda dose (pós) dessas vacinas.

Na Figura 12 são apresentados os resultados relacionados a avaliação da razão entre os níveis circulantes de IFN- α (Figura 12A), IFN- β (Figura 12B) e IFN- γ (Figura 12C) pela IL-10. Conforme pode ser evidenciado na Figura 12A, enquanto o grupo

vacinado com ChAdOx-1 mostrou maior razão IFN- α /IL-10 no momento pós-vacinação do que os valores observados no grupo vacinado com CoronaVac ($p=0.0051$), na Figura 12C é possível verificar que os valores da razão IFN- γ /IL-10 observados no grupo vacinado com ChAdOx-1 mostraram-se menores àqueles encontrados no grupo vacinado com CoronaVac ($p=0.0041$). Por fim, na razão IFN- β /IL-10 (Figura 12B) pode-se observar que o grupo vacinado com ChAdOx-1 mostrou valor menor desta razão quando comparados aos valores observados tanto no momento pós-vacinação ($p=0.0028$) quanto no grupo vacinado com CoronaVac ($p=0.0011$).

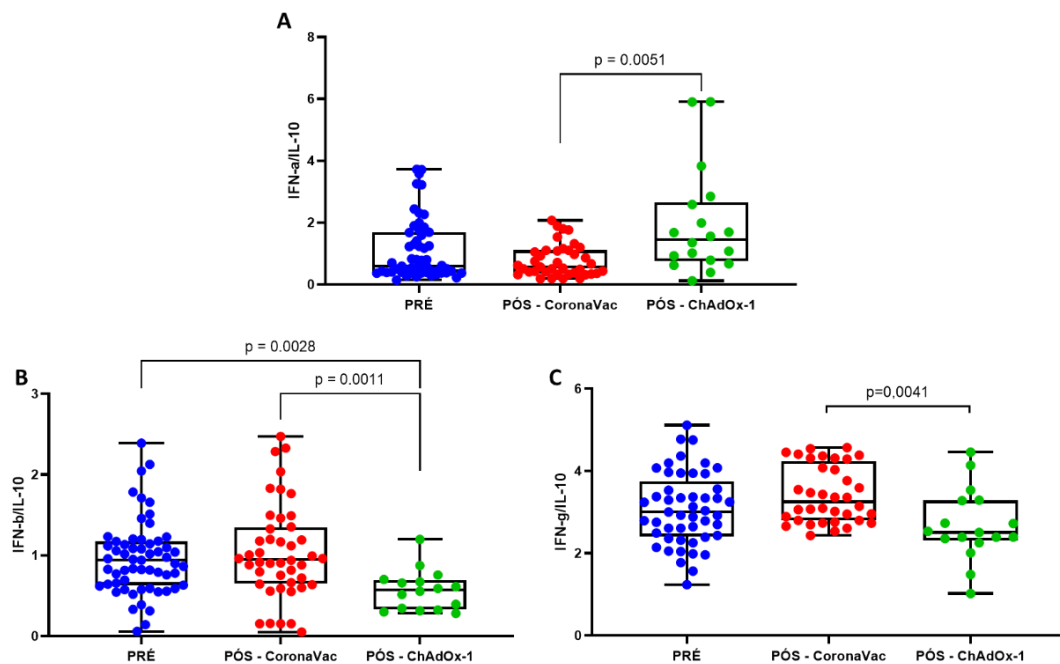


Figura 12. Razão entre os níveis sistêmicos das citocinas pró-inflamatórias IFN- α (A), IFN- β (B) e IFN- γ (C) pela citocina anti-inflamatória IL-10 nos grupos de voluntários vacinados com CoronaVac ou ChAdOx-1 antes da primeira dose (pré) e após 30 dias da administração da segunda dose (pós) dessas vacinas.

Além da avaliação da razão, também foram realizadas análises de correlações, através do Coeficiente de Correlação por postos de *Spearman*. Pode ser visto associações positivas entre monócitos intermediários e clássicos, nos momentos pré- ($p<0,0001$) e pós-vacinação ($p<0,0001$), em ambos os grupos de voluntários participantes do estudo. Além disso, associações positivas entre os monócitos não clássicos e clássicos ($p<0,0001$), e não clássicos e intermediários ($p<0,0001$) foram observados no momento pré-vacinação, bem como no grupo submetido à CoronaVac no momento pós-vacinação ($p<0,0001$). Outras associações positivas entre monócitos intermediários e clássicos com a razão IL-6/IL-10 ($p<0,0001$) foram observados no momento pré-vacinação, enquanto no momento pós-vacinação, o grupo ChAdOx-1

houve somente associação positiva entre monócitos não clássicos com a razão IL-6/IL-10 ($p=0,0168$). Além desta, no momento pós-vacinação, o grupo CoronaVac apresentou associações positivas entre todos os subtipos de monócitos e a razão IL-13/IL-10 ($p=0,0230$). Vale ressaltar ainda que no momento pós-vacinação, tanto no grupo vacinado com CoronaVac quanto o grupo ChAdOx-1, foi verificada associações positivas entre os níveis de IgG e todos os subtipos de monócitos. Por fim, exclusivamente no momento pré-vacinação foram evidenciadas correlações positivas entre os monócitos clássicos e IL-12p70 ($0,0438$), bem como entre os monócitos intermediários e clássicos com IFN- α ($p=0,0295$ e $p=0,0253$, respectivamente), além de associações negativas entre os monócitos intermediários e clássicos com IL-13 ($p=0,0237$ e $p=0,0135$, respectivamente), ou IL-10 ($p=0,0083$ e $p=0,0047$, respectivamente) ou ainda IFN- γ ($p=0,0205$ e $p=0,0183$, respectivamente).

Tabela 2. Análise do coeficiente de correlação de *Spearman* entre os subtipos de monócitos, níveis séricos totais de IgG específica para SARS-CoV-2 e citocinas pró- e anti-inflamatórias nos grupos de voluntários vacinados com CoronaVac ou ChAdOx-1 antes da primeira dose (pré) e após 30 dias da administração da segunda dose (pós) dessas vacinas.

Parâmetros PRÉ	Pré-vacinação		Parâmetros CoronaVac	Pós-vacinação		Parâmetros ChAdOx-1	Pós-vacinação	
	valor r	valor p		valor r	valor p		valor r	valor p
Não Clássico x Intermediário	0.5247	<0.0001	IgG x Não Clássico	0.3781	0.0080	IgG x Não Clássico	0.8493	<0.0001
Não Clássico x Clássico	0.4695	<0.0001	IgG x Intermediário	0.3557	0.0130	IgG x Intermediário	0.8493	<0.0001
Intermediário x Clássico	0.9954	<0.0001	IgG x Clássico	0.3517	0.0142	IgG x Clássico	0.8493	<0.0001
Intermediário x IL-13	- 0.2781	0.0237	Não Clássico x IL-13/IL-10	0.3277	0.0230	Não Clássico x IL-6/IL-10	0.5550	0.0168
Intermediário x IL-10	- 0.3220	0.0083	Intermediário x IL-13/IL-10	0.3277	0.0230	Intermediário x IL-6/IL-10	0.5550	0.0168
Intermediário x IFN- α	0.2680	0.0295	Clássico x IL-13/IL-10	0.3277	0.0230	Clássico x IL-6/IL-10	0.5550	0.0168
Intermediário x IFN- γ	- 0.2840	0.0208						
Intermediário x IL-6/IL-10	0.5139	<0.0001						
Intermediário x TNF- α /IL-10	0.3958	0.0010						
Intermediário x IFN- α /IL-10	0.3774	0.0017						
Clássico x IL-13	0.3026	0.0135						
Clássico x IL-10	- 0.3437	0.0047						
Clássico x TNF- α	0.2445	0.0478						
Clássico x IFN- α	0.2750	0.0253						
Clássico x IFN- γ	- 0.2896	0.0183						
Clássico x IL-6/IL-10	0.5253	<0.0001						
Clássico x TNF- α /IL-10	0.4161	0.0005						
Clássico x IFN- α /IL-10	0.3877	0.0012						

5. Discussão

De maneira geral, no presente estudo, o objetivo foi investigar a modulação dos subtipos de monócitos (clássicos, intermediários e não clássicos), bem como dos níveis circulantes de citocinas tanto pró- quanto anti-inflamatórias em idosos submetidos à vacinação contra a COVID-19. Além disso, para podermos responder a estes objetivos, também avaliamos a resposta de anticorpos específicos à vacinação. Neste sentido, nossos resultados demonstraram significativas diferenças entre à imunização com as vacinas ChAdOx-1 e CoronaVac. De fato, foi possível evidenciar que o grupo de idosos vacinado com ChAdOx-1 mostrou significativa redução nos níveis de determinadas citocinas, tanto de caráter pró- quanto anti-inflamatórias, como também aumento nas porcentagens de todos os subtipos de monócitos quando comparados ao grupo que vacinado com CoronaVac. Além destes resultados, foi observado que os voluntários do grupo ChAdOx-1 apresentaram maiores níveis de IgG específicos aos antígenos do SARS-CoV-2 do que o grupo CoronaVac.

De acordo com a literatura, infelizmente, a COVID-19 afetou de forma marcante a população idosa com uma taxa de mortalidade por volta de 3,6% na faixa etária dos 60-69 anos e, aumentando para, 18% aos 80 anos ou mais.⁶³ Além disso, é bem conhecido que a vacinação não somente é uma intervenção poderosa e eficaz para conter surtos sazonais de infecções particularmente relacionadas à vírus respiratórios, mas também é amplamente recomendada para determinados grupos de risco, como idosos, pois estes mostram resposta à vacinação inferior àquela encontrada em indivíduos adultos mais jovens.⁶⁴ Vale ainda salientar que a maioria das vacinas contra vírus respiratórios, como para COVID-19, são administradas, em geral, por via intramuscular, a fim de provocar uma resposta imune sistêmica robusta, a qual inclui aumento nos níveis de IgG.⁶⁰ Corroborando estas informações, nossos achados mostraram aumento dos níveis circulantes de IgG para COVID-19 em ambos os grupos de idosos vacinados tanto com ChAdOx-1 quanto CoronaVac.

Embora a resposta de anticorpos a vacinação para COVID-19 neste estudo tenha mostrado satisfatórios resultados em ambos os grupos de voluntários, os valores evidenciados no grupo ChAdOx-1 pós-vacinação foram significativamente maiores do que no grupo CoronaVac. Esse achado está em concordância com prévio estudo realizado no Chile, pois foi verificado que indivíduos com 60 anos ou mais vacinados com CoronaVac tiveram menor resposta de anticorpos quando comparados a

indivíduos mais jovens imunizados com a mesma vacina ou ainda a indivíduos da mesma faixa etária imunizados com vacina contendo mRNA para a proteína S (*spike*) do SARS-CoV-2.⁶⁵ Além disso, dados obtidos em um estudo não revisado por pares realizado durante um período de alta circulação da variante P.1 do SARS-CoV-2 no Brasil mostraram que, particularmente para CoronaVac, a eficácia da vacina 14 dias ou mais após a administração da segunda dose diminuiu com o aumento da idade, por exemplo, caindo de 61,8% entre indivíduos de 70 a 74 anos, para 48,9% entre indivíduos de 75 a 79 anos e para 28,0% entre indivíduos com idade ≥ 80 anos.⁶⁶ Nosso grupo também mostrou anteriormente que idosos imunizados com ChAdOx-1 apresentaram não só melhor resposta de anticorpos do que o grupo imunizado com CoronaVac, mas também que níveis mais baixos de IgG pós-vacinação foram estritamente associados à idade no grupo CoronaVac.⁶⁰

Além desses achados, curiosamente, também encontramos correlações positivas significativas entre os níveis sistêmicos de IgG e as porcentagens de todos os subtipos de monócitos em ambos os grupos de voluntários. Com base na literatura, os monócitos são importantes células do sistema imunológico inato envolvidas nas respostas às vacinas, incluindo a COVID-19.⁶⁷ De fato, foi relatado que a ativação de monócitos estava relacionada aos níveis de anticorpos neutralizantes em indivíduos adultos jovens e idosos submetidos à vacinação com ChAdOx-1.⁶⁸ Corroborando esses dados, também foi documentado que os monócitos apresentaram maior capacidade de apresentação de antígenos em conjunto com um perfil de citocinas que poderia favorecer o desenvolvimento da imunidade adaptativa a partir de uma dose única da vacina ChAdOx-1.⁶⁹ Em relação à vacina CoronaVac, foi relatado após duas doses desta vacina não apenas um aumento significativo na porcentagem de monócitos clássicos e intermediários, mas também uma diminuição proeminente na frequência de monócitos não clássicos, o que, segundo os autores, pode estar relacionado com notáveis respostas antivirais e adaptativas provocadas por esta vacina.⁷⁰ Embora esses dados possam corroborar a observação de que um aumento na porcentagem de todos os subtipos de monócitos após a vacinação para COVID-19 foi positivamente associado aos níveis sistêmicos de IgG em ambos os grupos de voluntários, diferentemente do mencionado anteriormente, apenas o grupo vacinado com a vacina ChAdOx-1 mostrou alteração na porcentagem de todos os subtipos de monócitos após duas doses desta vacina. Mesmo que não possamos afirmar, os diferentes resultados encontrados na frequência dessas células nos grupos de voluntários poderiam estar

supostamente associados à tecnologia/design utilizado para desenvolver as vacinas ChAdOx-1 e CoronaVac. A este respeito, enquanto ChAdOx-1 é uma vacina de vetor de adenovírus não replicante de chimpanzé que codifica a glicoproteína *spike* do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras, estimulando assim a resposta imune inata para preparar especialmente as células T CD4+ para se diferenciarem em efetoras e células de memória que ajudarão as células B a se diferenciarem em células plasmáticas secretoras de anticorpos⁷¹ a vacina CoronaVac foi projetada para conter o vírus SARS-CoV-2 inteiro inativado, que não é apenas um técnica amplamente utilizada desde os tempos antigos,⁷² mas também pode provocar imunidade protetora robusta.⁷³ Com base nessas informações, aparentemente, a vacina que utiliza um desenho de “administração intracelular”, como a ChAdOx-1, pode ser mais eficaz em provocar o aumento da porcentagem de todos os subtipos de monócitos em adultos mais velhos do que a CoronaVac.

É de extrema importância mencionar que o percentual de monócitos totais em idosos pode ser aumentado, bem como o processo de envelhecimento é capaz de promover uma alteração nos subconjuntos de monócitos para fenótipos intermediários e não clássicos, o que poderia se correlacionar com o aumento da produção de algumas citocinas, como TNF- α , IL-6 e IL-10 em idosos.⁷⁴ Esses dados podem corroborar os resultados observados no momento pré-vacinação, uma vez que foram observadas correlações positivas significativas entre a porcentagem de todos os subtipos de monócitos. Além disso, também foi verificado que os percentuais de monócitos clássicos correlacionaram-se positivamente com os níveis circulantes de IL-13, TNF- α e IFN- α , bem como com as relações IL-6/IL-10 e TNF- α /IL-10, em contraste com as correlações negativas com os níveis sistêmicos de IL-10 e IFN- γ . Da mesma forma, também foi evidenciado que as porcentagens de monócitos intermediários não se correlacionaram apenas positivamente com os níveis circulantes de IFN- α e com as relações IL-6/IL-10, TNF- α /IL-10 e IFN- α /IL-10, bem como negativamente correlacionado com níveis sistêmicos de IL-10, IL-13 e IFN- γ . Portanto, em geral, esses achados nos permitem sugerir que a frequência de subtipos de monócitos em idosos pode ser modulada por seu estado inflamatório sistêmico.

Da mesma forma, a frequência de subtipos de monócitos encontrados no momento pós-vacinação também apresentou correlações significativas com o estado inflamatório sistêmico. Entretanto, enquanto a porcentagem de todos os subtipos de

monócitos no grupo CoronaVac apresentou correlação positiva com a relação IL-13/IL-10, no grupo ChAdOx-1 essa correlação positiva foi com a relação IL-6/IL-10.

Com relação à tríade - citocinas/envelhecimento/vacinação - conforme mencionado anteriormente o desenvolvimento e progressão da imunossenescência e também da inflamação, que se caracteriza por um aumento gradual de um estado pró-inflamatório sistêmico durante o envelhecimento, pode prejudicar substancialmente as respostas vacinais⁷⁵ uma vez que foi relatado que a produção aberrante de citocinas está associada à redução da capacidade de processar e apresentar antígeno às células T, o que pode impactar negativamente na ativação das células B e, conseqüentemente, na produção de anticorpos.⁶⁸ Além disso, é amplamente conhecido que as citocinas pró-inflamatórias apresentam ação corolária na infecção por vírus.^{73, 76} Portanto, a avaliação do perfil de citocinas circulantes é fundamental para melhor caracterizar as respostas imunes/inflamatórias provocadas pela vacinação, principalmente em idosos. Vale ainda destacar que, apesar da análise isolada dos níveis sistêmicos de citocinas fornecer dados importantes, é fundamental ressaltar que a análise da razão pode fornecer uma medida precisa sobre o balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias em diversos contextos, inclusive no envelhecimento.⁷⁷ De fato, uma assinatura distinta e interessante do perfil de citocinas foi evidenciada nos grupos de voluntários após a vacinação para COVID-19.

É sábio que os níveis de citocinas fornecem importantes informações sobre processos fisiológicos e patológicos, agregando valor significativo na medicina clínica e na biologia, além de poderem auxiliar no diagnóstico e tratamento, bem como diferentes perfis de citocinas caracterizaram e ainda caracterizam condições clínicas relacionadas a COVID-19.^{78, 79} Ao avaliarmos as citocinas individualmente, dois aspectos despertaram interesse: (1) os idosos vacinados com ChAdOx-1 apresentaram níveis mais baixos de expressão em todas as citocinas, e (2) os idosos submetidos à CoronaVac apresentaram níveis mais elevados de uma única citocina, a IFN- γ .

Vale ressaltar que, embora o grupo ChAdOx-1 tenha apresentado menores níveis circulantes das citocinas aqui avaliadas de modo isolado, ao realizarmos a análise da razão entre as citocinas pró-inflamatórias, particularmente a IL-6, pela clássica citocina anti-inflamatória IL-10, foi notado que o grupo de idosos vacinados com ChAdOx-1 mostrou maior razão IL-6/IL-10 no momento pós-vacinação ($p=0.0002$). Em se tratando de IL-6 e COVID-19, foi documentado que durante a infecção por SARS-CoV-2 houve um aumento proeminente na secreção ou produção desta citocina em

pacientes com quadros graves. Diante disso, foi também proposto que o perfil de modulação desta citocina poderia representar uma estratégia eficaz para avaliar e, eventualmente, prevenir o agravamento do quadro respiratório e diminuir a mortalidade geral destes pacientes, inclusive no contexto vacinal.⁷³

Além deste achado, uma menor razão IL-13/IL-10 foi encontrada no momento pós-vacinação ($p < 0.0001$) no grupo vacinado com ChAdOx-1 em relação ao grupo CoronaVac. De maneira similar, os resultados isolados mostraram uma significativa redução nos níveis sistêmicos de IL-13 em idosos que receberam a vacina ChAdOx-1 ($p < 0.0001$), sem nenhuma alteração em seus níveis nos idosos vacinados com CoronaVac. No geral, estes resultados podem indicar um bom desfecho clínico, pois segundo a literatura, aumento dos níveis de IL-13 costumam associar-se a desfechos graves em diversas doenças,²⁷ embora haja evidências crescentes de que a IL-13 pode ter atividade protetora.⁸⁰

A via de sinalização do TNF- α desempenha um papel vital na síndrome de liberação de citocinas, o bloqueio da via de sinalização da morte celular inflamatória mediada por citocinas pode beneficiar pacientes com COVID-19 ou outras doenças infecciosas, limitando o dano tecidual.⁸¹ ou seja, o TNF- α é uma das citocinas pró-inflamatórias mais importantes da resposta imune inata e é sabido que um aumento no TNF- α pode resultar na facilitação de infecções virais e danos a órgão,⁸² em nossos resultados não observamos mudanças nos níveis de expressão desta citocina para ambas as vacinas utilizadas nesse estudo de modo isolado, contudo, ao analisarmos a razão de TNF- α /IL-10, esta apresentou níveis mais elevados no grupo submetido a vacina ChAdOx-1.

Para gerar imunidade adequada após a vacinação, as respostas imunes inatas precoces são cruciais para a sinalização subsequente para a ativação das células T e o desenvolvimento imunológico adaptativo. Quando falamos da resposta vacinal ChAdOx-1 ela contém propriedades *self-adjuvant* porque a própria proteína do vetor é um adjuvante intrínseco para estimular respostas imunes inatas.⁸³ Nas células apresentadoras de antígenos, esses estímulos imunes inatos desencadeiam a produção de interferon tipo I (IFN), múltiplas citocinas, principalmente, pró-inflamatórias.^{84, 85}

Avaliamos citocinas associadas aos tipos I (IFN- α e IFN- β) e II (IFN- γ) dos interferon, onde os níveis de IFN- α não foram alterados de modo significativo em ambos

os grupos aqui observados. Liwsrisakun *et al* (2023) observou que células T produziam IFN- γ tanto para a vacina ChAdOx-1 como para CoronaVac,⁸⁶ em nossos achados, observamos que os idosos vacinados com CoronaVac mostraram níveis significativamente aumentados ($p=0.0189$) comparados ao grupo vacinado com ChAdOx-1. Um estudo realizado na Turquia⁸⁷ avaliou o efeito da imunização com a vacina CoronaVac e liberação de IFN- γ por células NK, o que explicaria níveis mais elevados de IFN- γ neste grupo, assim como a razão vista aqui entre IFN- γ /IL-10 mostrou-se maior também no grupo vacinado com CoronaVac.

Foi observado que a ChAdOx-1 induz altos níveis de IFN- α , IL-6 e TNF- α em PBMC nos primeiros momentos de estimulação, enquanto a expressão de IFN- γ em momentos posteriores, sendo uma vacina que induz a expressão de monócitos, macrófagos e células dendríticas derivados de monócitos.⁸⁸

Por fim, destacam-se que algumas limitações desse estudo foram (1) O número discrepante de voluntários no grupo CoronaVac ($n=48$) em relação ao grupo ChAdOx-1 ($n=18$). A esse respeito, é importante mencionar que essa diferença pode ser atribuída ao fato de que (a) a primeira vacina para COVID-19 disponível no Brasil foi a CoronaVac, destinada principalmente à população idosa, levando a maioria dos voluntários inscritos neste estudo a serem imunizados com esta vacina, e também que, (b) o intervalo entre as doses da vacina e o período de coleta da ChAdOx-1 foram maiores em relação a CoronaVac e por isso uma maior evasão de voluntários. (2) Observar os níveis de ativação expressos nos subtipos de monócitos. (3) A falta de comparação da imunofenotipagem de linfócitos T e NK, o que poderia melhorar os achados do presente estudo, principalmente para relacionar com as citocinas.

6. Conclusão

Uma das melhores linhas de defesas populacional frente a algumas doenças é a vacinação, é uma espécie de escudo protetor que impedirá os vulneráveis, como no caso de pessoas idosas, de entrar em contato com doenças. Em nossos achados observamos que os idosos vacinados com ChAdOx-1 apresentaram melhores respostas tanto a anticorpos específicos, como não apresentaram em relação as citocinas, respostas desreguladas ou exacerbadas, assim como maior circulação de monócitos (células apresentadoras de antígenos) do que aqueles observados no grupo de idosos submetidos à vacinação com CoronaVac.

7. Referências Bibliográficas

1. The Lancet. Emerging understandings of 2019-nCoV. *Lancet*. 2020;395(10221):311.
2. Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. COVID-19 diagnosis -A review of current methods. *Biosens Bioelectron*. 2021;172:112752.
3. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, Sokolowska M, van de Veen W, Brügggen MC, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*. 2020;75(7):1564-81.
4. Peiris JS, Yuen KY, Osterhaus AD, Stöhr K. The severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*. 2003;349(25):2431-41.
5. Duguid JP. The size and the duration of air-carriage of respiratory droplets and droplet-nuclei. *J Hyg (Lond)*. 1946;44(6):471-9.
6. Scheuch G. Breathing Is Enough: For the Spread of Influenza Virus and SARS-CoV-2 by Breathing Only. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2020;33(4):230-4.
7. Gupta A, Madhavan MV, Sehgal K, Nair N, Mahajan S, Sehrawat TS, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(7):1017-32.
8. Morens DM, Fauci AS. Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19. *Cell*. 2020;182(5):1077-92.
9. WHO. WORLD HEALTH STATISTICS. 2008.
10. IBGE. Censo. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2010.
11. Brasil U. Situação da População Mundial 2010. 2010.
12. Boraschi D, Italiani P. Immunosenescence and vaccine failure in the elderly: strategies for improving response. *Immunol Lett*. 2014;162(1 Pt B):346-53.
13. Fulop T, Le Page A, Fortin C, Witkowski JM, Dupuis G, Larbi A. Cellular signaling in the aging immune system. *Curr Opin Immunol*. 2014;29:105-11.
14. Poland GA, Ovsyannikova IG, Kennedy RB, Lambert ND, Kirkland JL. A systems biology approach to the effect of aging, immunosenescence and vaccine response. *Curr Opin Immunol*. 2014;29:62-8.
15. Fuentes E, Fuentes M, Alarcón M, Palomo I. Immune System Dysfunction in the Elderly. *An Acad Bras Cienc*. 2017;89(1):285-99.
16. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*. 2020;395(10229):1033-4.
17. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014;69 Suppl 1:S4-9.
18. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;908:244-54.
19. Hearps AC, Martin GE, Angelovich TA, Cheng WJ, Maisa A, Landay AL, et al. Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function. *Aging Cell*. 2012;11(5):867-75.
20. Rodier F, Coppé JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Muñoz DP, Raza SR, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol*. 2009;11(8):973-9.
21. Chien Y, Scuoppo C, Wang X, Fang X, Balgley B, Bolden JE, et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-κB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev*. 2011;25(20):2125-36.
22. Aiello A, Farzaneh F, Candore G, Caruso C, Davinelli S, Gambino CM, et al. Immunosenescence and Its Hallmarks: How to Oppose Aging Strategically? A Review of Potential Options for Therapeutic Intervention. *Front Immunol*. 2019;10:2247.
23. Li Q, Wang Y, Sun Q, Knopf J, Herrmann M, Lin L, et al. Immune response in COVID-19: what is next? *Cell Death Differ*. 2022;29(6):1107-22.

24. Pan Y, Jiang X, Yang L, Chen L, Zeng X, Liu G, et al. SARS-CoV-2-specific immune response in COVID-19 convalescent individuals. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):256.
25. Bonaventura A, Vecchié A, Dagna L, Martinod K, Dixon DL, Van Tassell BW, et al. Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nat Rev Immunol.* 2021;21(5):319-29.
26. Eichhorn T, Huber S, Weiss R, Ebeyer-Masotta M, Lauková L, Emprechtinger R, et al. Infection with SARS-CoV-2 Is Associated with Elevated Levels of IP-10, MCP-1, and IL-13 in Sepsis Patients. *Diagnostics (Basel).* 2023;13(6).
27. Donlan AN, Sutherland TE, Marie C, Preissner S, Bradley BT, Carpenter RM, et al. IL-13 is a driver of COVID-19 severity. *JCI Insight.* 2021;6(15).
28. Song P, Li W, Xie J, Hou Y, You C. Cytokine storm induced by SARS-CoV-2. *Clin Chim Acta.* 2020;509:280-7.
29. Zhou Y, Fu B, Zheng X, Wang D, Zhao C, Qi Y, et al. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *Natl Sci Rev.* 2020;7(6):998-1002.
30. Ruenjaiman V, Sodsai P, Kueanjinda P, Bunrasmee W, Klinchanhom S, Reantragoon R, et al. Impact of SARS-CoV-2 infection on the profiles and responses of innate immune cells after recovery. *J Microbiol Immunol Infect.* 2022;55(6 Pt 1):993-1004.
31. Zou Y, Sun X, Wang Y, Ye X, Tu J, Yu R, et al. Integrating single-cell RNA sequencing data to genome-wide association analysis data identifies significant cell types in influenza A virus infection and COVID-19. *Brief Funct Genomics.* 2023.
32. D Z, Guo R, lei I, H L, Y W, H Q, et al. COVID-19 infection induces readily detectable morphological and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes, the severity of which correlate with patient outcome. 2020.
33. 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.
34. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003;19(1):71-82.
35. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, et al. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood.* 2011;118(12):e50-61.
36. Tahir S, Steffens S. Nonclassical monocytes in cardiovascular physiology and disease. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2021;320(5):C761-C70.
37. Naranjo-Gómez JS, Castillo JA, Rojas M, Restrepo BN, Diaz FJ, Velilla PA, et al. Different phenotypes of non-classical monocytes associated with systemic inflammation, endothelial alteration and hepatic compromise in patients with dengue. *Immunology.* 2019;156(2):147-63.
38. Timmerman KL, Flynn MG, Coen PM, Markofski MM, Pence BD. Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14⁺CD16⁺) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise? *J Leukoc Biol.* 2008;84(5):1271-8.
39. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 2007;317(5838):666-70.
40. 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.
41. 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.
42. Kovaïou RD, Herndler-Brandstetter D, Grubeck-Loebenstien B. Age-related changes in immunity: implications for vaccination in the elderly. *Expert Rev Mol Med.* 2007;9(3):1-17.
43. Plackett TP, Boehmer ED, Faunce DE, Kovacs EJ. Aging and innate immune cells. *J Leukoc Biol.* 2004;76(2):291-9.
44. Coutinho RM, Marquitti FMD, Ferreira LS, Borges ME, da Silva RLP, Canton O, et al. Model-based estimation of transmissibility and reinfection of SARS-CoV-2 P.1 variant. *Commun Med (Lond).* 2021;1:48.

45. Cao Y, Yisimayi A, Jian F, Song W, Xiao T, Wang L, et al. BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection. *Nature*. 2022;608(7923):593-602.
46. Volz E, Mishra S, Chand M, Barrett JC, Johnson R, Geidelberg L, et al. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature*2021.
47. Pieri M, Infantino M, Manfredi M, Nuccetelli M, Grossi V, Lari B, et al. Performance evaluation of four surrogate Virus Neutralization Tests (sVNTs) in comparison to the. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2022;27(2):74.
48. Perera RA, Mok CK, Tsang OT, Lv H, Ko RL, Wu NC, et al. Serological assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), March 2020. *Euro Surveill*. 2020;25(16).
49. Davies NG, Jarvis CI, Edmunds WJ, Jewell NP, Diaz-Ordaz K, Keogh RH, et al. Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7. *medRxiv*. 2021.
50. Thanh Le T, Andreadakis Z, Kumar A, Gómez Román R, Tollefsen S, Saville M, et al. The COVID-19 vaccine development landscape. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(5):305-6.
51. Chalkias S, Harper C, Vrbicky K, Walsh SR, Essink B, Brosz A, et al. A Bivalent Omicron- Containing Booster Vaccine against Covid-19. *N Engl J Med*. 2022;387(14):1279-91.
52. Libster R. The power of herd immunity. *TEDxRiodelaPlata*2014.
53. Li HJ, Yang QC, Yao YY, Huang CY, Yin FQ, Xian-Yu CY, et al. COVID-19 vaccination effectiveness and safety in vulnerable populations: a meta-analysis of 33 observational studies. *Front Pharmacol*. 2023;14:1144824.
54. 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.
55. Long JE, Ring C, Drayson M, Bosch J, Campbell JP, Bhabra J, et al. Vaccination response following aerobic exercise: can a brisk walk enhance antibody response to pneumococcal and influenza vaccinations? *Brain Behav Immun*. 2012;26(4):680-7.
56. Minuzzi LG, Rama L, Chupel MU, Rosado F, Dos Santos JV, Simpson R, et al. Effects of lifelong training on senescence and mobilization of T lymphocytes in response to acute exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2018;24:72-84.
57. Monteiro FR, Roseira T, Amaral JB, Paixão V, Almeida EB, Foster R, et al. Combined Exercise Training and L-Glutamine Supplementation Enhances Both Humoral and Cellular Immune Responses after Influenza Virus Vaccination in Elderly Subjects. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(4).
58. Paixão V, Almeida EB, Amaral JB, Roseira T, Monteiro FR, Foster R, et al. Elderly Subjects Supplemented with L-Glutamine Shows an Improvement of Mucosal Immunity in the Upper Airways in Response to Influenza Virus Vaccination. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(2).
59. Bachi ALL. Elderly people practitioners of a combined exercise training shows improvement of specific antibodies in response to influenza virus vaccination. *Annals of Research in Sport and Physical Activity*2018. p. 233-4.
60. Silva B, Monteiro F, Cezário K, Amaral J, Paixão V, Almeida E, et al. Older Adults Who Maintained a Regular Physical Exercise Routine before the Pandemic Show Better Immune Response to Vaccination for COVID-19. *International Journal of Environmental Research and Public Health*2023.
61. Furtado GE, Letieri RV, Caldo-Silva A, Sardão VA, Teixeira AM, de Barros MP, et al. Sustaining efficient immune functions with regular physical exercise in the COVID-19 era and beyond. *Eur J Clin Invest*. 2021;51(5):e13485.
62. 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.
63. S.A. Meo, A.M. Alhowikan, T. Al-khlaiwi, I.M. Meo DM, Halepoto, M. Iqbal, et al. Novel coronavirus 2019-nCoV: prevalence, biological and clinical characteristics comparison with SARS-CoV and MERS-CoV. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020.

64. Riese P, Trittel S, Manas K, Akmatov, Marcus May, Jana Prokein, Thomas Illig, et al. Distinct immunological and molecular signatures underpinning influenza vaccine responsiveness in the elderly. *Nat Commun*; 2022.
65. Sauré D, O’Ryan M, Torres JP, Zuniga M, Santelices E, Basso LJ. Dynamic IgG seropositivity after rollout of CoronaVac and BNT162b2 COVID-19 vaccines in Chile: a sentinel surveillance study. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(1):56-63.
66. Otavio T. Ranzani, Matt D.T. Hitchings, Murilo Dorion, Tatiana Lang D’Agostini, Regiane Cardoso de Paula, Olivia Ferreira Pereira de Paula, et al. Effectiveness of the CoronaVac vaccine in the elderly population during a Gamma variant-associated epidemic of COVID-19 in Brazil: A test-negative case-control study. *medRxiv*; 2021.
67. Vitallé J, Pérez-Gómez A, Ostos FJ, Gasca-Capote C, Jiménez-León MR, Bachiller S, et al. Immune defects associated with lower SARS-CoV-2 BNT162b2 mRNA vaccine response in aged people. *JCI Insight*. 2022;7(17).
68. Shen CF, Yen CL, Fu YC, Cheng CM, Shen TC, Chang PD, et al. Innate Immune Responses of Vaccinees Determine Early Neutralizing Antibody Production After ChAdOx1nCoV-19 Vaccination. *Front Immunol*. 2022;13:807454.
69. Murphy DM, Cox DJ, Connolly SA, Breen EP, Brugman AA, Phelan JJ, et al. Trained immunity is induced in humans after immunization with an adenoviral vector COVID-19 vaccine. *J Clin Invest*. 2023;133(2).
70. Cao C, Jiang J, Liu M, Dai Y, Chang T, Ji T, et al. Longitudinal evaluation of innate immune responses to three doses of CoronaVac vaccine. *Front Immunol*. 2023;14:1277831.
71. Teijaro J. R, Farber D. L. COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. *Nature Reviews Immunology*: 05 March; 2021. p. 195–7.
72. García-Montero C, Fraile-Martínez O, Bravo C, Torres-Carranza D, Sanchez-Trujillo L, Gómez-Lahoz AM, et al. An Updated Review of SARS-CoV-2 Vaccines and the Importance of Effective Vaccination Programs in Pandemic Times. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(5).
73. Wang C, Yang S, Duan L, Du X, Tao J, Wang Y, et al. Adaptive immune responses and cytokine immune profiles in humans following prime and boost vaccination with the SARS-CoV-2 CoronaVac vaccine. *Virol J*. 2022;19(1):223.
74. Cao Y, Fan Y, Li F, Hao Y, Kong Y, Chen C, et al. Phenotypic and functional alterations of monocyte subsets with aging. *Immun Ageing*. 2022;19(1):63.
75. Santoro A, Bientinesi E, Monti D. Immunosenescence and inflammaging in the aging process: age-related diseases or longevity? *Ageing Res Rev*. 2021;71:101422.
76. Mogensen TH, Paludan SR. Virus-cell interactions: impact on cytokine production, immune evasion and tumor growth. *Eur Cytokine Netw*. 2001;12(3):382-90.
77. Santos CAF, Amirato GR, Paixão V, Almeida EB, Do Amaral JB, Monteiro FR, et al. Association among inflammaging, body composition, physical activity, and physical function tests in physically active women. *Front Med (Lausanne)*. 2023;10:1206989.
78. Chao Liu , Dewei Chu , Kourosh Kalantar-Zadeh , Jacob George , Young HA, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. 15 ed. *Advanced science*2021.
79. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19.
80. Stokes PJR. IL-13 Protects against SARS-CoV-2? 2022;66:351-2.
81. Guo Y, Hu K, Li Y, Lu C, Ling K, Cai C, et al. Targeting TNF- α for COVID-19: Recent Advanced and Controversies. *Frontiers in Public Health*. 2022;10.
82. Ragab D, Salah Eldin H, Taeimah M, Khattab R, Salem R. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Front Immunol*. 2020;11:1446.
83. Hartman ZC, Appledorn DM, Amalfitano A. Adenovirus vector induced innate immune responses: impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Res*. 2008;132(1-2):1-14.
84. Teijaro JR, Farber DL. COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(4):195-197.
85. Shen CF, Yen CL, Fu YC, Cheng CM, Shen TC, Chang PD, Cheng KH, Liu CC, Chang YT, Chen PL, Ko WC, Shieh CC. Innate Immune Responses of Vaccinees Determine Early Neutralizing Antibody

Production After ChAdOx1nCoV-19 Vaccination. *Front Immunol.* 2022;13:807454.

86. Liwsrisakun C, Pata S, Laopajon W, Takheaw N, Chaiwong W, Duangjit P, et al. Humoral and cellular immune responses against SARS-CoV-2 variants of concern induced by heterologous CoronaVac/ChAdOx-1 versus homologous ChAdOx-1 vaccination in the elderly. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2023.

87. Bilgin H, Marku M, Yilmaz SS, Karahasan Yagci A, Sili U, Can B, et al. The effect of immunization with inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) and/or SARS-CoV-2 infection on antibody levels, plasmablasts, long-lived-plasma-cells, and IFN- γ release by natural killer cells. 2022;40(18):2619-25.

88. Jiang M, Väisänen E, Kolehmainen P, Huttunen M, Ylä-Herttua S, Meri S, et al. COVID-19 adenovirus vector vaccine induces higher interferon and pro-inflammatory responses than mRNA vaccines in human PBMCs, macrophages and moDCs. *Vaccine.* 2023;41(26):3813-23.

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NA RESPOSTA IMUNE/INFLAMATÓRIA SISTÊMICA E DE VIAS AÉREAS SUPERIORES EM PACIENTES IDOSOS CO-INFECTADOS PELO SARS-COV-2 E CITOMEGALOVÍRUS

Pesquisador: Andre Luis Lacerda Bachi

Área Temática: Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte;

Versão: 3

CAAE: 36011220.0.0000.0081

Instituição Proponente: OBRAS SOCIAIS E EDUCACIONAIS DE LUZ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.350.476

Apresentação do Projeto:

Atualmente o mundo está diante de uma pandemia originada pelo novo coronavírus SARS-CoV-2, causador da doença denominada como "doença de coronavírus-2019" ou COVID-19. Pacientes com COVID-19 podem ser assintomáticos, ou apresentar sintomas leves e moderados, os quais não necessitam de hospitalização, ou ainda graves, apresentados com ou sem pneumonia. Tem sido documentado que a população idosa se apresenta não apenas como a população mais afetada, mas também que esta contabiliza o maior número de mortes na COVID-19. Estudos sugerem que o aumento da taxa de infecção, gravidade e letalidade por SARS-CoV-2 em idosos está associada tanto a ocorrência da imunossenescência quanto do fenômeno "inflammaging". Enquanto a imunossenescência se traduz como o declínio acentuado das respostas imunes sistêmicas e das mucosas, em especial das vias aéreas, associadas ao envelhecimento, o "inflammaging" representa um estado inflamatório de baixo grau crônico e

sistêmico associado ao envelhecimento. 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".

Diante dessas informações, este estudo objetiva investigar o impacto da co-infecção pelo SARS-CoV-2 e CMV sobre as respostas

imunes/inflamatórias tanto sistêmica quanto das das vias aéreas superiores em indivíduos idosos. Para isso, serão convidados a participar deste

estudo 120 idosos de ambos os sexos, com idades entre 60 e 85 anos com confirmação da infecção pelo SARS-CoV-2 e CMV. Amostras de "swab"

nasofaríngea, saliva e sangue serão obtidas em dois momentos (fase aguda da doença e na cura) de diferentes grupos de voluntários: 30 amostras

de pacientes com sintomatologia leve; 30 amostras de pacientes com sintomatologia moderada; 30 amostras de pacientes com sintomatologia grave

da doença e 30 amostras de indivíduos idosos sem a manifestação de sintomas respiratórios e com diagnóstico negativo para COVID-19 e CMV. As

amostras serão utilizadas para confirmação da presença da infecção por SARS-CoV-2 e pelo CMV, além da avaliação da carga viral, das

concentrações de imunoglobulinas A, M e G específicas para o SARS-CoV-2, de IgG específicas para o CMV, das citocinas, dos peptídeos

antimicrobianos e dos leucócitos totais, bem como do perfil de ativação de linfócito T e B relacionados a COVID-19 e reativos para CMV, do perfil

lipídico e glicêmico e para genotipagem para o polimorfismo no gene IFN-lambda4.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o impacto da co-infecção pelo SARS-CoV-2 e citomegalovírus (CMV) sobre as respostas imunes/inflamatórias sistêmica e das vias aéreas superiores em indivíduos idosos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são mínimos, podendo haver pequeno desconforto no momento da coleta das amostras de

material biológico, como, por exemplo, formação de pequeno hematoma (mancha roxa) no momento de coleta de sangue. Além disso, a

Endereço: Rua Profº 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

manifestação de constrangimento ao se expor durante a realização da coleta de material biológico ou mesmo alterações na autoestima provocadas pela evocação de memórias sobre sua condição clínica podem configurar-se como menor risco. Será garantido sigilo a respeito dos nomes e dos resultados individuais de cada participante, sendo os dados obtidos neste estudo agrupados para confecção dos relatórios, trabalhos de conclusão de curso, dissertações e artigos científicos. Todos os voluntários terão acompanhamento clínico pelos médicos geriatras colaboradores do estudo, com total acesso aos respectivos resultados.

Benefícios:

A participação dos voluntários no estudo permitirá não apenas aumentar a compreensão de como se dão as alterações nas respostas imunes e inflamatórias do idoso infectado pelo CMV e acometido pela COVID-19, mas também poderá favorecer a implantação de novas estratégias de promoção de saúde para esta população.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para o desenvolvimento do projeto pretendemos convidar, por adesão voluntária, 120 pacientes idosos de ambos os sexos, com idades entre 60 e 85 anos que tenham confirmação da infecção tanto pelo SARS-CoV-2 quanto por CMV. Todos os participantes serão recrutados e selecionados junto a Disciplina de Geriatria e Gerontologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), com auxílio do médico geriatra e colaborador do estudo. Vale salientar que todas as informações relacionadas ao projeto serão discutidas com todos os pacientes e/ou seus representantes legais e aqueles que manifestarem interesse em participar do estudo serão orientados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Santo Amaro (UNISA). O estudo seguirá as orientações da Declaração de Helsinque. Amostras de "swab" nasofaríngea, saliva e sangue serão obtidas dos participantes do presente estudo em dois momentos: fase aguda da doença e na cura, de diferentes grupos de pacientes com COVID-19, ou seja: 30 amostras de pacientes com sintomatologia leve, 30 amostras de pacientes com sintomatologia moderada e outras 30 amostras de pacientes com sintomatologia

Endereço: Rua Profº 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

grave da doença. Como controle propõe-se utilizar 30 amostras de indivíduos idosos sem a manifestação de sintomas respiratórios e com diagnóstico negativo para COVID-19 e CMV. As amostras obtidas serão utilizadas para confirmação da presença da infecção por SARS-CoV-2 e pelo CMV, além da avaliação da carga viral através do método de Charité e sequenciamento viral. Já, a avaliação das concentrações das imunoglobulinas A, M e G específicas para o SARS-CoV-2, bem como de IgG específicas para o CMV se dará através de testes de ELISAs tanto por kits comerciais quanto por "in house". Para determinação dos níveis de citocinas será utilizado kits multiplex que serão analisados por citometria de fluxo. Os níveis dos peptídeos antimicrobianos serão determinados através de kits comerciais de ELISAs. A avaliação do hemograma será realizado através de sistema semi-automatizado com destaque para a contagem de leucócitos totais e subpopulações, sendo que a determinação da imunofenotipagem específica do perfil de ativação de linfócito T e B relacionados a COVID-19 e reativos para CMV será realizada por citometria de fluxo. Propõe-se avaliar também o perfil lipídico e glicêmico dos participantes por kits colorimétricos comerciais. Por fim será averiguado, por genotipagem, o polimorfismo no gene IFN-lambda4.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de rosto: adequada;
- Riscos e benefícios: adequados;
- Metodologia: adequada;
- TCLE: adequado;
- Carta de anuência: assinada;
- Instrumentos de coleta: adequados.
- Apreciação da CONEP: favorável ao CEP/UNISA.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Profº 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: 4.350.476

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1580030.pdf	01/10/2020 08:10:47		Aceito
Outros	Respostas_ao_assessor_CEP_UNSA_2.pdf	22/08/2020 14:49:44	Andre Luis Lacerda Bachi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_UNISA.pdf	22/08/2020 14:38:20	Andre Luis Lacerda Bachi	Aceito
Outros	Instrumento_AGA.pdf	30/07/2020 16:29:28	Andre Luis Lacerda Bachi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_COVID_CMV_UNISA.pdf	30/07/2020 16:23:59	Andre Luis Lacerda Bachi	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto_Andre.pdf	19/08/2020 21:07:57	Andre Luis Lacerda Bachi	Aceito
Outros	Cartas_Plataforma_Brasil.pdf	19/08/2020 17:11:25	Andre Luis Lacerda Bachi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 20 de Outubro de 2020

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

ANEXO B

UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: MODULAÇÃO DOS SUBTIPOS DE MONÓCITOS EM IDOSOS PRATICANTES REGULARES DE EXERCÍCIOS FÍSICOS PRÉ-PANDEMIA E SUBMETIDOS À VACINAÇÃO PARA COVID-19.

Pesquisador: FERNANDA RODRIGUES MONTEIRO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 69317523.5.0000.0081

Instituição Proponente: OBRAS SOCIAIS E EDUCACIONAIS DE LUZ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.048.872

Apresentação do Projeto:

A proposta da pesquisa é investigar a modulação dos subtipos de monócitos em uma população de idosos que participavam regularmente de um programa de exercícios físicos combinados antes da pandemia que foram submetidos à vacinação para COVID-19. Para realização deste estudo, serão utilizadas amostras previamente coletadas em estudo anterior (CEP: 4.350.476) de 80 idosos de ambos os sexos, com idades entre 60 e 85 anos, que mantiveram uma rotina regular de prática de exercícios físicos combinados por, pelo menos 12 meses, antes do início da quarentena. Todos os voluntários foram submetidos à vacinação contra o SARS-CoV-2 em 2021 e amostras de sangue foram obtidas antes e 30 dias após a administração da segunda dose da vacina CoronaVac (n=55) ou AstraZenica/Oxford (ChadOx-1, n=25). Alíquotas de plasma, previamente armazenadas, serão utilizadas para avaliação das concentrações sistêmicas de citocinas pró e anti-inflamatórias, bem como as células mononucleares do sangue periférico, também previamente armazenadas, serão utilizadas para imunofenotipagem de monócitos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a modulação dos subtipos de monócitos e de citocinas em idosos que participavam regularmente um programa de exercício físico combinado anterior à pandemia e foram submetidos à vacinação para a COVID-19.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são mínimos, podendo haver pequeno desconforto no momento da coleta das amostras de material biológico, como, por exemplo, formação de pequeno hematoma (mancha roxa) no momento de coleta de sangue. Além disso, a manifestação de constrangimento ao se expor durante a realização da coleta de material biológico ou mesmo alterações na autoestima provocadas pela evocação de memórias sobre sua condição clínica podem configurar-se como menor risco. Será garantido sigilo a respeito dos nomes e dos resultados individuais de cada participante, sendo os dados obtidos neste estudo agrupados para confecção dos relatórios, trabalhos de conclusão de curso, dissertações e artigos científicos. Todos os voluntários terão acompanhamento clínico pelos médicos geriatras colaboradores do estudo, com total acesso aos respectivos resultados.

Benefícios:

A participação dos voluntários no estudo permitirá não apenas compreender melhor como a prática regular de exercícios físicos durante anos antes da pandemia pode impactar nas alterações das respostas imunes em idosos vacinados contra a COVID-19, mas também poderá permitir a implantação de novas estratégias de promoção de saúde para esta população.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Iniciamos a apresentação de item esclarecendo que, para o desenvolvimento deste estudo, iremos utilizar amostras de plasma e de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) previamente armazenadas nos laboratórios de pesquisa da UNISA e da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Ambas as amostras de plasma e células foram obtidas no ano de 2021, durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa previamente aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UNISA sob número 4.350.476. Contaremos com um total de 80 amostras de idosos, de ambos os sexos e com idades entre 60 e 85 anos, que participaram, por adesão voluntária, do

Endereço: Rua Prof ^o 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

projeto de estudo em 2021 acima descrito. Os idosos participantes eram praticantes regulares de exercícios físicos combinados antes da pandemia por, por pelo menos, 12 meses antes do isolamento social imposto pela COVID-19. Vale ressaltar que todos foram vacinados contra o SARS-CoV-2, com duas doses da vacina CoronaVac (n=55) ou ChadOx-1 (n=25). Os voluntários 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, Dr. Carlos André Freitas dos Santos. Aqueles que manifestaram interesse em participar do estudo foram orientados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNISA em 2021 (número 4.350.476). O estudo seguiu todas as orientações da Declaração de Helsinque.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Folha de rosto: adequada e assinada;
- Metodologia: adequada;
- TCLE: adequado;
- Cronograma: adequado;
- Orçamento: adequado.

Recomendações:

- Retirar parecer consubstanciado de projeto aprovado diferente do atual estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- Aprovado.

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_2098705.pdf	02/05/2023 17:34:06		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MESTRADO_FERNANDA_MONTEIRO.pdf	02/05/2023 17:32:40	FERNANDA RODRIGUES MONTEIRO	Aceito
Outros	Formulario_Fernanda.pdf	07/03/2023	FERNANDA	Aceito

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: 6.048.872

Outros	Formulario_Fernanda.pdf	12:43:38	RODRIGUES MONTEIRO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto_Fernanda.pdf	07/03/2023 11:26:55	FERNANDA RODRIGUES MONTEIRO	Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_cep_4350476.pdf	01/03/2023 20:44:32	FERNANDA RODRIGUES MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CMV.pdf	01/03/2023 20:30:27	FERNANDA RODRIGUES MONTEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 09 de Maio de 2023

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