



UNIVERSIDADE SANTO AMARO

**Pós-graduação *Stricto Sensu* de Mestrado em Ciências
da Saúde**

Ariane Nardy

**IMPACTO DO POLIMORFISMO PARA INTERFERON-LAMBDA
SOBRE A RESPOSTA IMUNE/INFLAMATÓRIA DE IDOSOS
SOROPOSITIVOS PARA CMV VACINADOS COM CORONAVAC**

São Paulo

2024

Ariane Nardy

**IMPACTO DO POLIMORFISMO PARA INTERFERON-LAMBDA
SOBRE A RESPOSTA IMUNE/INFLAMATÓRIA DE IDOSOS
SOROPOSITIVOS PARA CMV VACINADOS COM CORONAVAC**

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.^a Dra. Carolina Nunes França

São Paulo

2024

Ariane Nardy

**IMPACTO DO POLIMORFISMO PARA INTERFERON-LAMBDA
SOBRE A RESPOSTA IMUNE/INFLAMATÓRIA DE IDOSOS
SOROPOSITIVOS PARA CMV VACINADOS COM CORONAVAC**

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.^a Dra. Carolina Nunes França

São Paulo, 12 de dezembro de 2024

Banca Examinadora

Prof. Dr. Jônatas Bussador do Amaral

Prof. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali

Conceito Final: _____

Dedico este trabalho à minha mãe, Iolanda. Sua força, sua resiliência e amor incondicional foram a base para todas as minhas conquistas. Agradeço por sempre acreditar em mim e por ser a maior de todas as minhas razões.

Agradeço à Deus, fonte de toda sabedoria e amor, por me permitir realizar este trabalho. A Ele devo a força e a perseverança necessárias para superar os desafios encontrados ao longo desta jornada.

Aos meus pais Iolanda e Romildo pelo amor, pelo apoio incondicional e por serem meu refúgio, meu alicerce e minha maior inspiração. Esta dissertação é a prova de que seus esforços pela minha educação valeram a pena.

Ao meu amor e companheiro Mauricio por estar ao meu lado em todos os momentos e por escolher partilhar a vida, as lutas e os sonhos, inclusive este que agora se concretiza.

Ao meu padrinho e pai espiritual Padre Jorge pelas palavras de sabedoria, pelas orações e pelo amparo nos momentos de aflição.

A todos os meus amigos, pelo carinho, pelos incentivos, pelos conselhos e por dividirem comigo os momentos, as alegrias e os fardos dessa jornada.

Aos meus professores da Escola Estadual Santo Dias da Silva, por lutarem bravamente pelo ensino público de qualidade, por incentivarem meus estudos, por despertarem meu amor pela ciência, por me apresentarem a Universidade como um caminho possível e a educação como um instrumento de transformação social.

Ao meu Orientador André por me conceder a honra de ser sua aluna e orientanda. A excelência de seu trabalho como orientador, professor e pesquisador marcaram minha vida para sempre, assim como todos os aprendizados, orientações e conselhos adquiridos até aqui. Sem sua paciência, apoio e dedicação, nada disso seria possível.

A minha Coorientadora Carolina por suas valiosas contribuições para esta dissertação e pelo primoroso trabalho frente a Coordenação de nosso Programa.

Ao professor Luiz por me apresentar as técnicas, os desafios e os encantos da Biologia Molecular.

Ao professor Jônatas grande amigo e mentor por sua parceria em tantas atividades de bancada e por sua gentileza e atenção desde o meu primeiro dia em um laboratório de pesquisa.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Ciências da Saúde. Seus ensinamentos me inspiraram a buscar excelência e construir uma jornada acadêmica sólida, ética e frutuosa.

Aos voluntários, por sua confiança, disposição e colaboração. Sem vocês, este trabalho não seria possível.

Por fim, agradeço a Universidade Santo Amaro, minha segunda casa e berço de tantos aprendizados, conquistas e incontáveis momentos de superação, alegrias e crescimento.

“O melhor que podemos fazer da nossa vida é empregá-la em algo que seja mais duradouro que a própria vida.”

(William James)

RESUMO

Introdução: A população idosa configurou-se como uma das mais afetadas pela COVID-19, particularmente devido a ocorrência dos fenômenos conhecidos como imunossenescência e “inflammaging”. Tem sido proposto que a infecção crônica pelo citomegalovírus (CMV), um vírus β -herpes humano altamente prevalente na população, não somente favorece o desenvolvimento desses fenômenos, bem como pode impactar negativamente a resposta a vacinação. Ademais, nosso grupo mostrou que o polimorfismo para o gene do interferon (IFN)-lambda também influencia na resposta imune tanto à infecção pelo SARS-CoV-2 quanto à imunização com a vacina AstraZeneca/Oxford (ChadOx-1) para COVID-19 em idosos. **Objetivo:** Diante disso, neste estudo foi avaliado o impacto do polimorfismo para IFN-lambda (gene *il28B* - rs12979860) sobre a resposta imune/inflamatória à vacinação com CoronaVac para COVID-19 em idosos soropositivos para CMV. **Métodos:** Amostras de sangue de 42 voluntários, de ambos os sexos, com idade entre 60 e 85 anos, foram obtidas antes e 30 dias após a administração da segunda dose da vacina CoronaVac para análise dos níveis circulantes de IgG específicas para SARS-CoV-2 e CMV, do perfil de citocinas (IL-6, IL-10, IL-17, IFN- α , IFN- β , IFN- γ e TNF- α), imunofenotipagem de subtipos de monócitos (clássicos, intermediários e não clássicos) e linfócitos T (CD4+ e CD8+) “naive” e senescente, bem como para genotipagem para o polimorfismo (gene *il28b* - rs12979860) para IFN-lambda. **Resultados:** De acordo com a genotipagem, 20 voluntários apresentaram homozigose para os alelos C/C (grupo Alelo-1), enquanto 5 voluntários apresentaram homozigose para os alelos T/T (grupo Alelo-2), e 17 voluntários apresentaram heterozigose (C/T, grupo Alelos-1/2). Com base nesta separação, valores similares não somente de imunogenicidade foram observados nos grupos de voluntários (35% para o grupo Alelo-1, 40% para o grupo Alelo-2 e 35% para o grupo Alelos-1/2), bem como dos níveis de anticorpos neutralizantes. Interessantemente, o grupo Alelo-1 apresentou maiores níveis séricos de IgG específicos para SARS-CoV-2 ($p=0,0269$) e das porcentagens de monócitos intermediários ($p=0,017$), em contraste as menores porcentagens de monócitos não clássicos ($p=0,0141$) no momento pós-vacinação do que momento pré-vacinação. Já, o grupo Alelo-2 apresentou níveis circulantes mais elevados de

IFN- β no momento pré ($p=0,0248$; $p=0,0206$) e pós-vacinação ($p=0,0305$; $p=0,0338$) quando comparado aos valores observados tanto no grupo Alelo-1 quanto no grupo Alelos-1/2, respectivamente. Adicionalmente, a análise do coeficiente de correlação e regressão linear multivariada mostrou que, no geral, o grupo Alelo-1 mostrou níveis séricos de IgG específicos para antígenos de CMV positivamente associados a um estado pró-inflamatório sistêmico e à presença de linfócitos T senescentes. Em contraste, o grupo Alelos-1/2 e, com maior ênfase o grupo Alelo-2, mostraram níveis séricos de IgG específicos para antígenos de SARS-CoV-2 positivamente associados a um estado inflamatório sistêmico regulado. **Conclusão:** Embora o grupo Alelo-1 (C/C) tenha apresentado maiores níveis séricos de IgG específicos para SARS-CoV-2 pós-vacinação, a imunogenicidade e a avaliação dos anticorpos neutralizantes mostraram resultados similares entre os grupos. Além disso, o grupo Alelo-1 mostrou significativa associação com a presença de um estado pró-inflamatório sistêmico e a soropositividade para CMV. Em conjunto, estes achados corroboram não somente nossa prévia observação que indivíduos Alelo 1 para o gene do IFN-lambda podem apresentar um atraso na resposta imune ao vírus e/ou vacinação, mas também a literatura ao indicar que o status sistêmico pró-inflamatório pode ser decorrente do menor controle da infecção pelo CMV, o qual tem sido descrito nos indivíduos que apresentam esta discriminação alélica.

Palavras-Chave: SARS-CoV-2; envelhecimento; imunossenescência, “inflammaging”, imunoglobulinas; citocinas.

ABSTRACT

Introduction: Older population was one of the most affected by COVID-19, particularly due to the occurrence of phenomena known as immunosenescence and “inflammaging”. It has been proposed that chronic infection with cytomegalovirus (CMV) not only favors the development of these phenomena but can also negatively impact the vaccination responses. Furthermore, our group showed that the polymorphism for the interferon (IFN)-lambda gene also interferes in the immune response to COVID-19 in the older adults. **Objective:** To evaluate the impact of the polymorphism for IFN-lambda (il28B gene - rs12979860) on the immune/inflammatory response to vaccination with CoronaVac for COVID-19 in aged CMV-seropositive. **Methods:** Blood samples from 42 volunteers, of both sexes, aged between 60 and 85 years, were obtained before and 30 days after administration of the second dose of the CoronaVac vaccine for analysis of circulating levels of IgG specific for SARS-CoV-2 and CMV, cytokine profile (IL-6, IL-10, IL-17, IFN- α , IFN- β , IFN- γ and TNF- α), immunophenotyping of monocyte subtypes (classical, intermediate and non-classical) and also “naive” and senescent T cells (CD4+ and CD8+), as well as for genotyping for the IFN-lambda polymorphism. **Results:** According to genotyping, 20 volunteers presented homozygosity for the C/C alleles (Allele-1 group), 5 volunteers presented homozygosity for the T/T alleles (Allele-2 group), and 17 volunteers presented heterozygosity (C/T, Alleles-1/2 group). Allele-1 group presented higher serum levels of specific IgG for SARS-CoV-2 ($p=0.0269$) and percentages of intermediate monocytes ($p=0.017$), in contrast to the lower percentages of non-classical monocytes ($p=0.0141$) at the post-vaccination occasion than at the pre-vaccination. On the other hand, the Allele-2 group presented higher circulating levels of IFN- β at the pre- ($p=0.0248$; $p=0.0206$) and post-vaccination occasions ($p=0.0305$; $p=0.0338$) than to the values observed in both the Allele-1 and Alleles-1/2 groups, respectively. Additionally, correlation coefficient and multivariate linear regression analysis showed that, overall, the Allele 1 group presented serum levels of specific IgG for CMV antigens positively associated with a systemic pro-inflammatory state and the presence of senescent T cells. In contrast, the Allele-2 and Alleles-1/2 groups showed that serum levels of specific IgG for SARS-CoV-2 antigens were positively associated with a

regulated systemic inflammatory state. **Conclusion:** Although the Allele-1 group presented higher serum levels of specific IgG for SARS-CoV-2 post-vaccination, the groups' immunogenicity and neutralizing antibody levels were similar. Additionally, the Alelo-1 group showed a significant association with the presence of a systemic pro-inflammatory state and CMV seropositivity. Together, these findings corroborate not only our previous observation that individuals with Allele 1 for the IFN-lambda gene can present a delayed immune response to the virus and/or vaccination, but also the literature indicating that the pro-inflammatory systemic status may be due to the lower control of CMV infection, which has been described in individuals who present this allelic discrimination.

Keywords: SARS-CoV-2, aging, immunosenescence, inflammaging, immunoglobulins, cytokines, immunophenotyping.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Número total e separados por grupos, bem como dados demográficos e antropométricos dos voluntários participantes do presente estudo.....	29
Tabela 2. Análise do coeficiente de correlação de <i>Spearman</i> nos grupos de voluntários separados de acordo com o polimorfismo do gene IFN-lambda 3/4 e imunizados com a vacina CoronaVac.....	37
Tabela 3. Análise de regressão multivariada com ajuste para níveis séricos IgG específicos para antígenos SARS-CoV-2, nos grupos de voluntários separados de acordo com o polimorfismo do gene IFN-lambda 3/4 e imunizados com a vacina CoronaVac.....	38

Lista de Figuras

- Figura 1.** Estratégia utilizada na análise por citometria de fluxo da imunofenotipagem dos subtipos de monócitos não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), bem como das células T CD4⁺ “naive” (CD28⁺CD57⁻), duplo positivas (CD28⁺CD57⁺) e senescentes (CD28⁻CD57⁺).....25
- Figura 2.** Discriminação alélica obtida após o ensaio de genotipagem para polimorfismo no gene il28b (rs12979860) nos idosos que participaram do estudo.....28
- Figura 3.** Níveis séricos totais de IgG específicos para antígenos do SARS-CoV-2 e CMV, bem como a dinâmica dos níveis séricos de IgG para SARS-CoV-2 nos voluntários idosos agrupados de acordo com o polimorfismo do gene IFN-lambda 3/4 e imunizados com a vacina CoronaVac.....30
- Figura 4.** Níveis séricos totais de IgG específicos para antígenos do SARS-CoV-2 e CMV, nos voluntários idosos imunizados com a vacina CoronaVac inicialmente agrupados segundo o polimorfismo do gene IFN-lambda 3/4, e posteriormente separados de acordo com a presença (respondedores - RE) ou ausência (não respondedores - NRE) de anticorpos neutralizantes.....31
- Figura 5.** Imunofenotipagem dos linfócitos T “naive” (CD28⁺CD57⁻), duplamente positivas (CD28⁺CD57⁺) e senescentes (CD28⁻CD57⁺) para os fenótipos CD4⁺ e CD8⁺ nos voluntários idosos agrupados de acordo com o polimorfismo no gene IFN-lambda 3/4 e imunizados com a vacina CoronaVac.....32
- Figura 6.** imunofenotipagem dos subtipos de monócitos não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻) nos voluntários idosos agrupados de acordo com o polimorfismo no gene IFN-lambda 3/4 e imunizados com a vacina CoronaVac.....33

Figura 7. Avaliação da concentração sistêmica de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-17, IFN- α , IFN- β , IFN - γ , TNF- α e da anti-inflamatória IL-10, nos voluntários idosos agrupados de acordo com o polimorfismo em IFN-lambda 3/4 e imunizados com a vacina CoronaVac.....34

Figura 8. Análise da razão entre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6/IL-10, IL-17/IL-10, IFN- α /IL-10, IFN- β /IL-10 e IFN- γ /IL-10 e TNF- α /IL -10), nos voluntários idosos agrupados de acordo com o polimorfismo em IFN-lambda 3/4 e imunizados com a vacina CoronaVac.....36

Lista de Abreviaturas

Alelo-1	Homozigose para o alelo 1 (C) no polimorfismo genético IL28b
Alelo-1/2	Heterozigose para os alelos 1 (Citosina) e 2 (Timina) no polimorfismo IL28b
Alelo-2	Homozigose para o alelo 2 (T) no polimorfismo genético IL28b
ANOVA	Análise de Variância
APC	Aloficocianina
BSL3	Biossegurança Nível 3
BSA	Albumina Sérica Bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CD14	Marcador fenotípico de monócitos
CD16	Marcador fenotípico de monócitos
CD28	Molécula coestimuladora presente em linfócitos T, envolvida na ativação celular (CD28+)
CD4+	Linfócitos T CD4+ (Células T auxiliares)
CD57	Marcador de senescência celular, encontrado em linfócitos T senescentes (CD57+)
CD86	Molécula coestimuladora encontrada em células dendríticas, monócitos, macrófagos e células B
CD8+	Linfócitos T CD8+ (Células T citotóxicas)
C6 Plus	Citômetro de Fluxo BD Accuri™ C6 Plus
CPE	Efeito Citopático (<i>Cytopathic Effect</i>)
CMV	Citomegalovírus
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019
DNAemia	Presença de DNA viral no sangue
DMSO	Dimetilsulfóxido (dimethyl sulfoxide)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína

IFN	Interferon
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IFN- β /IL-10	Razão entre Interferon beta e Interleucina 10
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-6	Interleucina 6
IL28b	Gene que codifica a citocina IFN-lambda-like (rs12979860 C>T)
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MHC classe II	Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II
NK	Células <i>Natural Killers</i> (Células assassinas naturais)
PBS	Solução Salina Fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PE	Ficoeritrina
PercP	Clorofila Peridinina
PBMCs	Células Mononucleares do Sangue Periférico (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (<i>Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino
SNPs	Polimorfismos de Nucleotídeo Único
TaqMan	Sistema de PCR em Tempo
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
Th17	Células T <i>helper</i> 17

TLR	Receptores Tipo Toll (<i>Toll-Like Receptors</i>)
UNISA	Universidade de Santo Amaro (UNISA)
Vero	Linha celular de macrófagos originária de rim de macaco
VNT	Teste de Neutralização Viral (<i>Virus Neutralization Test</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	19
2.1	Geral	19
2.2	Específicos	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	População	20
3.2	Desenho do Estudo	20
3.3	Recrutamento dos Participantes	20
3.4	Critérios de Seleção	20
3.5	Cálculo do Tamanho da Amostra	20
3.6	Procedimentos Éticos	21
3.7	Coleta e Análise de Amostras Sanguíneas	21
3.8	Determinação da IgG específicas para o vírus SARS-CoV-2	22
3.9	Determinação da IgG específica para o vírus CMV	22
3.10	Análise dos anticorpos neutralizantes (<i>Virus Neutralization Test</i> - VNT) para o vírus SARS-CoV-2	22
3.11	Determinação das concentrações séricas das citocinas IL-6, IL-10, IL-17, IFN- α , IFN- β , IFN- γ e TNF- α	23
3.12	Caracterização Imunofenotípica dos Subtipos de Monócitos e Linfócitos T	24
3.12	Genotipagem para o Polimorfismo no Gene Il28b	25
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5	RESULTADOS	28
5.1	Caracterização dos grupos de voluntários participantes do estudo	28
5.2	Análise de IgG específica para os antígenos de SARS-CoV-2 e CMV nos voluntários agrupados com base na discriminação alélica	29
5.3	Análise de anticorpos neutralizantes para os antígenos de SARS-CoV-2 e CMV nos voluntários agrupados com base na discriminação alélica	30

5.4	Análise da imunofenotipagem de células T CD4+ e CD8+.....	31
5.5	Análise da imunofenotipagem dos subtipos de monócitos.....	32
5.6	Análise da concentração sérica e modulação de citocinas pró e anti-inflamatórias.....	33
5.7	Análise da modulação entre as citocinas pró e anti-inflamatórias.....	35
5.8	Análise do coeficiente de correlação entre os parâmetros avaliados.....	36
5.9	Análise de regressão linear multivariada.....	38
6	DISCUSSÃO.....	399
7	LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	455
8	CONCLUSÃO.....	466
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	477
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA.....	60

1 INTRODUÇÃO

A doença do coronavírus 2019 ou COVID-19, originada pelo novo coronavírus 2, causador da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), foi identificada pela primeira vez em Wuhan, China, em dezembro de 2019 e rapidamente se espalhou pelo mundo, tornando-se uma emergência de saúde Global.¹ Vale destacar que, até 15 de setembro de 2024, mais de 776 milhões de casos confirmados e mais de 7 milhões de mortes foram relatados globalmente desde o início da pandemia.²

A experiência clínica indica que a COVID-19 é altamente heterogênea, variando de casos assintomáticos e leves até graves, podendo causar morte. Dentre várias características, fatores do hospedeiro são determinantes-chave da gravidade e progressão da doença comum, por exemplo, a idade, a qual tem sido apontada como um fator corolário para a gravidade da doença.³

Neste sentido, com o objetivo de entender com maior exatidão porque a população idosa se configura como uma das mais afetadas na COVID-19, alguns estudos e revisões postularam que certas características do envelhecimento poderiam estar envolvidas, entre elas, a imunossenescência.⁴

De fato, a imunossenescência consiste em um fenômeno multifatorial e dinâmico que afeta de forma negativa tanto a imunidade natural (inata) quanto a imunidade adquirida e, por isso, desempenha um papel crítico para o desenvolvimento e progressão da maioria das doenças crônicas evidenciadas em idosos.⁵⁻⁸ Entre as principais características da imunossenescência, destaca-se: (i) a diminuição da resposta imunológica contra novos antígenos, particularmente a vacinas; (ii) o acúmulo de células T de memória e/ou senescentes devido a infecções repetidas; e (iii) a presença de uma inflamação sistêmica, estéril, crônica de baixo-grau conhecida como “Inflammaging”.⁹

Este fenômeno (“Inflammaging”) vem sendo apontado como um fator crucial que aumenta o risco de morbidade e mortalidade em idosos,¹⁰ pelo fato desta condição de inflamação crônica provocar uma redução progressiva na capacidade de desencadear respostas imunes celulares e de anticorpos eficazes contra infecções e vacinações.¹¹

Como já mencionado, o declínio da função imune observado em indivíduos idosos afeta tanto o sistema imune inato como o adaptativo.¹² Especificamente sobre a imunidade inata, evidências cumulativas indicam que o envelhecimento exerce efeitos significativos em todas as células envolvidas nesta etapa da resposta imune, incluindo os monócitos, os quais representam um importante componente fagocítico deste sistema.¹³ Vale salientar que monócitos são um tipo heterogêneo de leucócitos com características fenotípicas e funcionais distintas, sendo por isso classificados em três subconjuntos: monócitos clássicos, os quais apresentam na sua superfície celular os marcadores CD14⁺⁺/CD16⁻; os monócitos intermediários que apresentam CD14⁺⁺/CD16⁺, e os monócitos não clássicos que apresentam CD14⁺/CD16⁺⁺.^{14,15}

De acordo com a literatura, cada subconjunto de monócitos pode exercer funções específicas durante o processo inflamatório. Neste contexto, os monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), que constituem aproximadamente 90% do total de monócitos circulantes, são considerados células inflamatórias que têm potencial para gerar os outros subtipos.¹⁶⁻¹⁸ Por outro lado, os monócitos não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺), responsáveis pela remoção de detritos vasculares e com um perfil anti-inflamatório, representam cerca de 10% dos monócitos circulantes.¹⁹⁻²¹ Já, os monócitos intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) constituem até 5% dos monócitos em circulação e se caracterizam pela elevada capacidade fagocítica e produção significativa de espécies reativas de oxigênio.^{22,23} Curiosamente, esses subtipos podem alterar seus fenótipos para um estado inflamatório de acordo com o estímulo recebido²⁴ e, durante o envelhecimento, apresentam alterada produção de citocinas e expressão de receptores do tipo *Toll* (*Toll-like receptors* - TLR), bem como redução da atividade fagocítica e diminuição da expressão do complexo de histocompatibilidade principal (*Major Histocompatibility Complex* – MHC) classe II, o que, em conjunto, potencialmente leva a uma diminuição da eficácia das respostas à vacinação em indivíduos idosos.²⁵

Além da imunidade inata, o sistema imune adaptativo também sofre alterações com a progressão da idade, pois tem sido visto que as respostas das células T e B tendem a diferir quantitativa e qualitativamente, o que pode ter

significativa consequência na eficácia da resposta imune contra novos antígenos, bem como a vacinação.⁹ Neste contexto, uma das mais pronunciadas mudanças presentes no processo de imunossenescência é a involução do timo, com evidente declínio da produção de linfócitos T “naive”. Em decorrência dessa redução é observada importante limitação da habilidade de gerar a resposta imune específica a novos antígenos.²⁶ Associado a isto, a manutenção de linfócitos T por décadas na periferia, onde são expostos a uma série de fatores de impacto negativo, como aqueles relacionados ao estresse oxidativo e inflamação, os impõem a limitação de fatores de sobrevivência e proliferação quando ativadas.^{27,28}

É interessante notar que ao mesmo tempo que se observa uma significativa redução dos linfócitos T “naive”, seja pela involução do timo ou ainda pela limitação de sobrevivência e proliferação, assim favorecendo a indução de apoptose destas células pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, o número de linfócitos efetores ou de memória está aumentado.^{12,29} Além disso, mudanças no fenótipo das células circulantes para estágios mais diferenciados e com limitada capacidade proliferativa, por exemplo, pela perda da expressão de moléculas coestimuladoras, como o CD28 (linfócitos T CD28),³⁰ são frequentemente correlacionados com a reduzida resposta imune de mucosa à vacinação em indivíduos idosos.³¹

Ainda se tratando da imunossenescência, um fator ambiental comum que é reconhecido por acelerar o envelhecimento do sistema imunológico é a infecção crônica pelo citomegalovírus (CMV), um vírus β -herpes humano altamente presente na população.³² Embora o CMV geralmente permaneça latente e assintomático ao longo do tempo, uma parcela significativa de idosos infectados por CMV desenvolve expansões anormais de células TCD8+ reativas contra este vírus. Isso resulta em um perfil imunológico característico, conhecido como perfil de risco imunológico, que inclui aumento na frequência de células T terminalmente diferenciadas e/ou senescentes (CD57+), proporções inversas de células TCD4+/TCD8+ (<1,0) e redução no número de células B.³³

É importante destacar que citocinas pró-inflamatórias têm potencial de reativar o CMV do seu estado latente para uma fase de replicação ativa. Conseqüentemente, os ciclos repetidos de reativação assintomática e replicação

deste vírus contribuem para aumentar o estado pró-inflamatório sistêmico, que por sua vez, pode ser responsável pelo aumento da morbidade e mortalidade em pacientes idosos com infecções coexistentes.^{34,35}

No que se refere a regulação do CMV, sabe-se que a coordenação entre a resposta imune inata e adaptativa desempenha um papel crucial. Enquanto as respostas imunes inatas, que incluem o interferon (IFN) e as células *Natural Killers* (NK), são fundamentais para o controle imediato da infecção por CMV, as respostas adaptativas das células T são essenciais tanto durante a fase ativa da infecção quanto no controle da reativação subsequente.³⁶

Particularmente, os IFNs do tipo I e do tipo III são responsáveis por induzir um estado intracelular de resistência viral, mediante a ativação de múltiplos efetores antivirais e a estimulação das respostas imunes adaptativas. Estudos em modelos animais, principalmente em camundongos, demonstraram redução na replicação viral do SARS-CoV-2 após a administração de IFN tipo III, também conhecido como IFN-lambda.³⁷ Não obstante, em pacientes afetados pela COVID-19, observou-se frequentemente uma falta de resposta aos IFNs, apesar da presença de elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, particularmente entre os idosos.³⁸ Adicionalmente, notou-se que, de maneira análoga ao observado para o SARS-CoV-2, o IFN-lambda desempenha um papel relevante na modulação da infecção pelo CMV, visto que evidências sugerem que polimorfismos na região genômica do IFN-lambda 3/4 estão correlacionados com uma maior suscetibilidade à replicação deste vírus, o que implica que essa classe de IFNs pode exercer um controle significativo sobre a latência e replicação do CMV.³⁹

Vale destacar que estudos relacionados à análise de polimorfismos genéticos de citocinas têm demonstrado que variações nas frequências alélicas na região promotora dos genes das citocinas podem ser relacionadas com sua produção e liberação. Os polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs) na região promotora dos genes de determinadas citocinas vêm sendo associados com maior suscetibilidade a doenças de caráter inflamatório. Assim, polimorfismos na região promotora do gene de citocinas são responsáveis por influenciar a atividade e interferir nas ações biológicas delas, o que sugere que essas variações alélicas possam, ao menos em parte, explicar

a suscetibilidade às doenças, uma vez que podem vir acompanhadas pelo aumento dos níveis séricos correspondentes.³⁹

Em se tratando do polimorfismo genético no IFN-lambda do tipo 3/4 (rs12979860 C>T), os resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa, ao avaliar o impacto deste polimorfismo nas respostas específicas de IgG para COVID-19 em idosos soropositivos para CMV, presumivelmente sugeriram que a homozigose para alelo 2 (T/T) promove uma ação mais protetora contra a infecção por CMV, enquanto a homozigose para o alelo 1 (C/C) pode gerar um ambiente mais favorável ao CMV, o qual interfere na resposta imune contra o SARS-CoV-2.⁴⁰

Assim, estes achados sugerem que polimorfismo no IFN-lambda-3/4 pode impactar negativamente na resposta imune à infecção viral e à vacinação em idosos e evidenciam a importância de compreender os fatores que podem interferir na indução de uma resposta imune eficiente nesta população.

Em relação a vacinação em nosso país, a campanha de imunização contra a COVID-19 teve início em 17 de janeiro de 2021, no estado de São Paulo. A primeira vacina a ser administrada foi a CoronaVac.⁴¹ desenvolvida pelo laboratório chinês SINOVAC LIFE SCIENCES em parceria com o INSTITUTO BUTANTAN. A CoronaVac consistiu em uma vacina adsorvida COVID-19, utilizando o vírus inteiro e inativado que foi administrada por via intramuscular e cujo esquema vacinal foi inicialmente composto por duas doses com intervalo de 2-4 semanas entre elas.⁴² A CoronaVac utiliza uma tecnologia molecular amplamente empregada em outros imunizantes e se mostrou ser capaz de ser reconhecida e induzir ativação do sistema imune, porém isenta da possibilidade de replicação após a administração.⁴²

Vale reforçar que, segundo a literatura, o declínio na produção de anticorpos após a vacinação em idosos pode estar associada à redução da expansão e diferenciação das células B específicas do antígeno, levando à produção de títulos reduzidos de IgG específica para o antígeno vacinal. Além disso, os anticorpos produzidos são de baixa qualidade devido à redução da mudança de classe e mutação somática nos genes da região variável, resultando em afinidade reduzida. Desta forma, os anticorpos produzidos por indivíduos

mais velhos têm capacidade diminuída de neutralizar e opsonizar patógenos, resultando em menor proteção contra infecções.^{43,44}

Diante desta breve descrição sobre os aspectos relacionados ao envelhecimento frente à COVID-19 e infecção prévia pelo CMV, acredita-se que o desenvolvimento deste estudo fornecerá informações importantes para o entendimento do possível impacto do polimorfismo do IFN-lambda sobre as repostas imunes/inflamatórias em idosos soropositivos para CMV que foram imunizados com CoronaVac para COVID-19. Além disso, poderemos contribuir com o avanço do entendimento, de abordagens de vacinação e/ou tratamento dessa população, implicando diretamente no aprimoramento da assistência, na saúde e no bem-estar dos idosos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a influência do polimorfismo para IFN-lambda sobre as respostas imune/inflamatórias em idosos soropositivos para CMV vacinados com CoronaVac para COVID-19.

2.2 Específicos

Propõe-se avaliar, antes e após a vacinação com CoronaVac:

- a concentração sérica de IgG específicas para o SARS-CoV-2;
- a concentração sérica de IgG específica para o CMV;
- a concentração sistêmica de citocinas de perfil pró (IL-6, IL-17, IFN- α , IFN- β , IFN- γ e TNF- α) e anti-inflamatório (IL-10);
- a homozigose e/ou heterozigose para o polimorfismo no gene *il28b* (IFN-lambda-like, rs12979860),
- a caracterização fenotípica dos subtipos de monócitos;
- a caracterização fenotípica dos linfócitos TCD4+ e TCD8+ (“naive” e senescentes).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População

Para a realização do presente estudo, participaram 42 idosos com idade entre 60 e 85 anos, de ambos os sexos (30 mulheres e 12 homens), soropositivos para CMV e que foram submetidos a imunização para a COVID-19 com duas doses da vacina CoronaVac em 2021.

3.2 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo observacional, exploratório, prospectivo, com análise de desfecho pré e pós, seguindo as diretrizes *Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology* (STROBE) para garantir o rigor metodológico.

3.3 Recrutamento dos Participantes

Todos os participantes foram recrutados e selecionados junto a Disciplina de Geriatria e Gerontologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), com o auxílio de um médico geriatra colaborador do estudo.

3.4 Critérios de Seleção

Os voluntários elegíveis foram convidados a participar do estudo, tendo os critérios de inclusão e exclusão cuidadosamente definidos e avaliados por um único médico geriatra. Neste sentido, os critérios de inclusão foram: (i) idade entre 60 e 85 anos no momento do recrutamento; (ii) não apresentar soropositividade para o HIV; (iii) não ter doenças neurológicas ou câncer, (iv) não ter apresentado sintomas gripais durante o período de participação no estudo; (v) e concordar em participar da pesquisa. Já, os critérios de exclusão foram: (i) estar submetido à corticoterapia ou fazer uso de qualquer outro medicamento anti-inflamatório durante, pelo menos, 2 meses em alguma fase do estudo; (ii) estar submetido à terapia com plasma convalescente em alguma fase do estudo; (iii) e não comparecer a uma etapa de coleta de amostras biológicas.

3.5 Cálculo do Tamanho da Amostra

Para desenvolvimento do presente estudo, foi realizado um cálculo amostral no intuito de estabelecer um número mínimo de participantes utilizando o programa *G*Power*.⁴⁵ O tamanho da amostra e o poder estatístico foram

estimados com base no teste ANOVA com tamanho de efeito de 0,30, nível α de 0,05 (5%) e poder estatístico de 0,95. Além disso, com base em nosso estudo anterior,⁴⁰ um mínimo de 41 indivíduos era suficiente. Vale salientar que, dentre os 68 idosos inicialmente convidados a participar voluntariamente do estudo, 25 foram excluídos por terem sido submetidos à imunização contra a COVID-19 com outras vacinas. Sendo assim, o número de 42 idosos imunizados com a vacina CoronaVac atingiu o tamanho amostral estimado.

3.6 Procedimentos Éticos

Todos os procedimentos do estudo foram esclarecidos detalhadamente aos voluntários e aqueles que concordaram em participar deram seu consentimento através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Santo Amaro (UNISA), sob número 4.350.476. O estudo foi desenvolvido em conformidade com a Declaração de Helsinki.⁴⁶ e Resolução Brasileira 466/12.⁴⁷

3.7 Coleta e Análise de Amostras Sanguíneas

Amostras de sangue periférico foram coletadas em jejum e em tubos apropriados para obtenção do soro em dois momentos: antes e 30 dias depois da administração da segunda dose da vacina CoronaVac para a COVID-19. Alíquotas de soro (mínimo de 500 μ L) foram obtidas após coagulação do sangue no próprio tubo de coleta e centrifugação a 2000g por 10 minutos a 4°C, sendo posteriormente congeladas a -80°C para posterior determinação das concentrações das IgG específicos para a SARS-Cov-2 e da IgG específicas para o CMV, bem como das citocinas, descritas a seguir.

Outras amostras de sangue periférico foram coletadas em tubo com anticoagulante EDTA para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells* - PBMCs), as quais foram utilizadas tanto na análise de genotipagem quanto imunofenotipagem dos subtipos de monócitos e linfócitos T, descritos a seguir. Para isso, primeiramente o sangue total 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 4°C por 30 minutos a 2000rpm. Após esta etapa, o

pool de células obtido, correspondente a fração dos leucócitos, foi isolado, lavado em PBS (1x, pH=7,4) e novamente submetido a centrifugação a 4°C por 10 minutos a 2000rpm. Em seguida, 5×10^5 células foram misturados com 1mL de meio de congelamento (90% de soro fetal bovino + 10% de dimetilsulfóxido - DMSO) e então armazenados em nitrogênio líquido até serem utilizadas no ensaio de genotipagem e imunofenotipagem.

3.8 Determinação da IgG específicas para o vírus SARS-CoV-2

A concentração sérica de IgG específicas para o SARS-CoV-2 foi determinada através da técnica de ELISA “in house”. Resumidamente, as placas de reação foram sensibilizadas com a concentração de 0,12mg/mL de nCoV-PS-Ag7 (Fapon Biotech Inc., Dongguan, China), o qual continha os antígenos - nucleoproteína (N), membrana (M) e espícula (S). Após etapa de bloqueio dos sítios inespecíficos, o soro de cada voluntário foi diluído em tampão PBS-*Tween* 0,1% contendo 1M NaCl, numa razão 1:5.000 para IgG, e adicionadas a placa, deixando-se incubar durante pelo menos 2 horas a 37°C. Após essa etapa de incubação e lavagem de cada poço da placa, o conjugado com anti-IgG humana ligada a enzima peroxidase (1:10.000) foi adicionado à placa e a mesma mantida por pelo menos 1 hora a 37°C. Após última etapa de lavagem, a reação foi avaliada pela adição de uma solução com substrato cromogênico (TMB - 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina), seguida pela adição da solução de parada. A leitura da reação foi realizada a 450nm em um leitor de microplaca (Multiskan Sky, Thermo).

3.9 Determinação da IgG específica para o vírus CMV

A concentração sérica de IgG específicos para o CMV foi determinada através do kit comercial de imunoenensaio indireto (ELISA) para amostras biológicas (BioClin, Brasil), segundo as orientações fornecidas pelo fabricante. Padrões e controles positivos e negativos foram preparados conforme descrição fornecida pelo fabricante.

3.10 Análise dos anticorpos neutralizantes (*Virus Neutralization Test* - VNT) para o vírus SARS-CoV-2

Para realização do teste de neutralização viral (VNT), foi utilizado o SARS-CoV-2 (GenBank: MT MT350282), devido a seu efeito citopático (CPE) *in vitro*,

conforme descrito anteriormente.⁴⁸ sendo ainda suas propriedades descritas anteriormente em Araujo et al.⁴⁹ Inicialmente 5×10^4 células Vero (ATCC CCL-81) por mililitro (mL) foram adicionadas a placas de cultura com 96 poços. Em paralelo, uma série de diluições do soro (1:20 a 1:2.560) foi preparada para o ensaio, sendo, em seguida, misturadas em volumes iguais com o vírus (100 doses infecciosas para cultura de tecidos com ponto final de 100% por poço - VNT100). As misturas (de soro e vírus) foram pré-incubadas durante 1h a 37°C. Após este tempo, as misturas foram transferidas para a monocamada de células confluentes e então incubadas a 5% de CO₂ por três dias a 37°C. Após as 72h, as placas foram analisadas por microscopia óptica, utilizando como referência um CPE bruto para garantir plena distinção da presença/ausência de CPE-VNT contra a cepa de referência Wuhan ou a variante Delta, as quais eram prevalentes no Brasil no momento da amostragem. Para determinação dos títulos de anticorpos neutralizantes foi considerada a maior diluição sérica capaz de neutralizar o CPE. Como controle positivo foi utilizado um soro de referência de um indivíduo positivo para COVID-19, avaliado por RT-qPCR, e uma redução de placa no teste de neutralização >640 foi utilizado em cada ensaio. Por fim, vale ressaltar que todos os procedimentos foram realizados em laboratório de Biossegurança nível três (BSL3).

3.11 Determinação das concentrações séricas das citocinas IL-6, IL-10, IL-17, IFN- α , IFN- β , IFN- γ e TNF- α

As concentrações séricas das citocinas IL-6, IL-10, IL-17, IFN- α , IFN- β , IFN- γ e TNF- α foram determinadas por meio do ensaio multiplex baseado em esferas (*beads*) *LEGENDplex*TM (Biolegend, San Diego, CA, EUA). Todas as amostras séricas foram inicialmente diluídas 2 vezes e o volume de 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 AccuriTM C6 Plus

(BD Biosciences San Jose. CA. EUA) e os dados obtidos foram analisados com o software LEGENDPlex™ V8.0 (Biolegend).

3.12 Caracterização Imunofenotípica dos Subtipos de Monócitos e Linfócitos T

Outra alíquota de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), previamente armazenadas, foram retiradas do nitrogênio líquido e imediatamente submetidas ao processo de descongelamento em banho-maria a 37°C. Em seguida, a solução contendo as células descongeladas foi transferida para um tubo Falcon® de 15mL contendo 9mL de solução PBS-SFB 10% (PBS - 1x, pH=7,4 + 10% de soro fetal bovino – SFB), sendo, então, submetida a centrifugação a 4°C por 10 minutos a 2000rpm. 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, do inglês *bovine serum albumin*, - BSA) e submetida à incubação por 30 minutos a 4°C, com o *mix* de anticorpos monoclonais para avaliação de monócitos: CD14 conjugado com alofococianina - APC ou isotiocianato de fluoresceína - FITC; CD16 conjugado com FITC ou ficoeritrina - PE. Já, para avaliação dos linfócitos T, utilizou-se o seguinte *mix* de anticorpos monoclonais: CD4 conjugado com FITC, CD8 conjugado com APC, CD57 conjugado com PE e CD28 conjugado com clorofila peridinina - PercP. Todos os anticorpos foram adquiridos junto a empresa BD *Biosciences* (Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos). Após este período de incubação, foram adicionados 200µL de PBS e as células submetidas à centrifugação a 4°C por 10 minutos a 2000rpm. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspenso em 200µL de PBS e, por fim, as células foram submetidas à análise por citometria de fluxo (FACSCalibur - BD *Biosciences*, San Jose, Estados Unidos), sendo adquiridos, no mínimo, 10.000 eventos em cada amostra. A análise foi realizada utilizando software *Cell Quest Pro*. Um exemplo da análise tanto dos subtipos de monócitos (A) quanto dos linfócitos T (B) é mostrado na Figura 1.

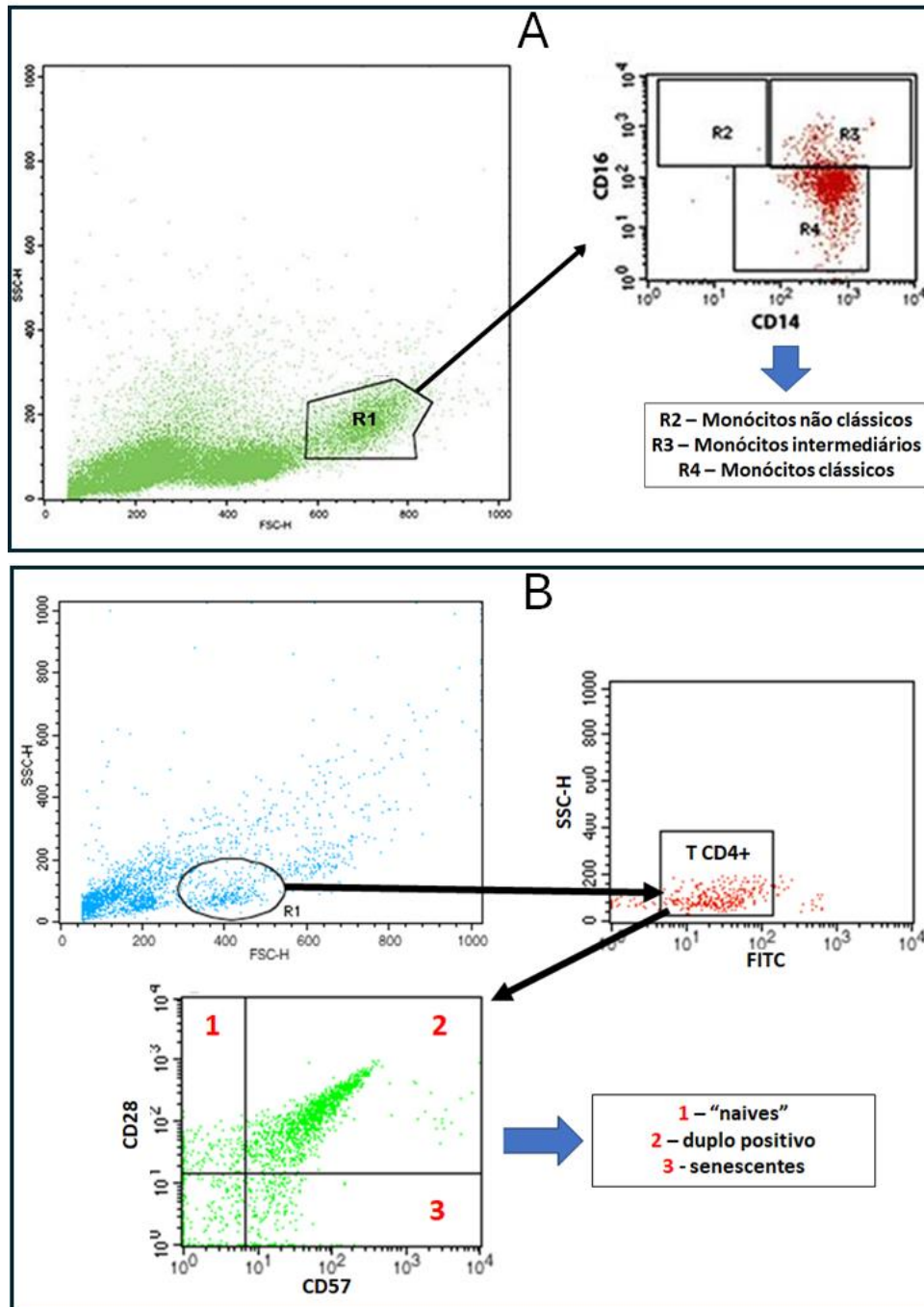


Figura 1. Em **A** é apresentada a estratégia utilizada na análise por citometria de fluxo da imunofenotipagem dos subtipos de monócitos não clássicos ($CD14^+CD16^{++}$), R3 intermediários ($CD14^{++}CD16^+$) e R4 clássicos ($CD14^{++}CD16^-$). Em **B** é apresentada a estratégia utilizada na análise por citometria de fluxo da imunofenotipagem das células T $CD4^+$ “naive” ($CD28^+CD57^-$), duplo positivas ($CD28^+CD57^+$) e senescentes ($CD28^-CD57^+$).

3.12 Genotipagem para o Polimorfismo no Gene *IL28b*

A genotipagem do polimorfismo no gene *il28b*, que é conhecida como uma citocina IFN-lambda-like (*rs12979860 C>T*) foi determinada através do método

TaqMan de discriminação alélica para a genotipagem de polimorfismo de nucleotídeo único (Applied Biosystems, Invitrogen) seguido o descrito por Prokunina-Olsson e colaboradores.⁵⁰

Inicialmente as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), previamente armazenadas conforme descrito acima, foram retiradas do nitrogênio líquido e após seu descongelamento, a mistura de células e solução de congelamento foi adicionada a tubos Falcon® de 15mL contendo, no mínimo, 9mL de PBS (1x, pH=7,4). Logo após, os tubos foram submetidos a centrifugação a 4°C por 10 minutos a 2000rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet, correspondente as células, foi submetido à extração de DNA com auxílio do PureLink® Genomic DNA Mini Kit, de acordo com as orientações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis, a fim de averiguar a eficácia da extração e estimar a qualidade do DNA obtido. Em seguida, cerca de 4ng de DNA, de cada amostra, foram utilizados para amplificação em RT-PCR através do sistema TaqMan com sondas, *primers* e condições de ciclagem seguindo protocolo previamente publicado (48). Basicamente, esse sistema utiliza sondas alelo específicas com marcadores fluorescentes distintos para cada uma. Isso possibilitou a amplificação e detecção específica de cada alelo e, baseando-se nos níveis de fluorescências obtidos nas amostras, foi possível determinar a frequência de cada polimorfismo. A reação foi realizada na Plataforma StepOnePlus™ Real-Time PCR System com computador acoplado.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram avaliadas usando os testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene*, respectivamente. De acordo com isso, os dados demográficos e antropométricos, por serem paramétricos, foram representados em média e desvio padrão, e as diferenças avaliadas através do teste ANOVA com fator único e pós-teste de *Tukey*. Já, os demais parâmetros, por apresentarem-se como variáveis não paramétricas, foram representados como mediana e intervalos interquartis e as diferenças

avaliadas através dos testes de *Wilcoxon* (análise intragrupo) e *Kruskall-Wallis* com pós-teste de *Müller-Dunn* (análise intergrupo).

Além disso, o número absoluto, bem como a razão entre homens e mulheres, foi avaliado através do teste Qui-quadrado. Ademais, tanto o teste de coeficiente de correlação de *Spearman*, bem como a análise de regressão linear multivariada ajustada para os níveis séricos de IgG específicos para SARS-CoV-2 também foram aplicados.

Para todas as análises foi considerado o risco $\alpha \leq 0,05$ ($p \leq 0,05$), utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 8.0.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos grupos de voluntários participantes do estudo

Na figura 2 são apresentados os resultados da análise de discriminação alélica obtidos na genotipagem para o polimorfismo no gene *il28b* (rs12979860) dos voluntários participantes deste estudo. De acordo com o obtido, 20 voluntários apresentaram a homozigose C/C (grupo Alelo-1, cor vermelha), enquanto 5 apresentaram homozigose T/T (grupo Alelo-2, cor azul) e 17 apresentaram heterozigose C/T (grupo Alelo-1/2, cor verde).

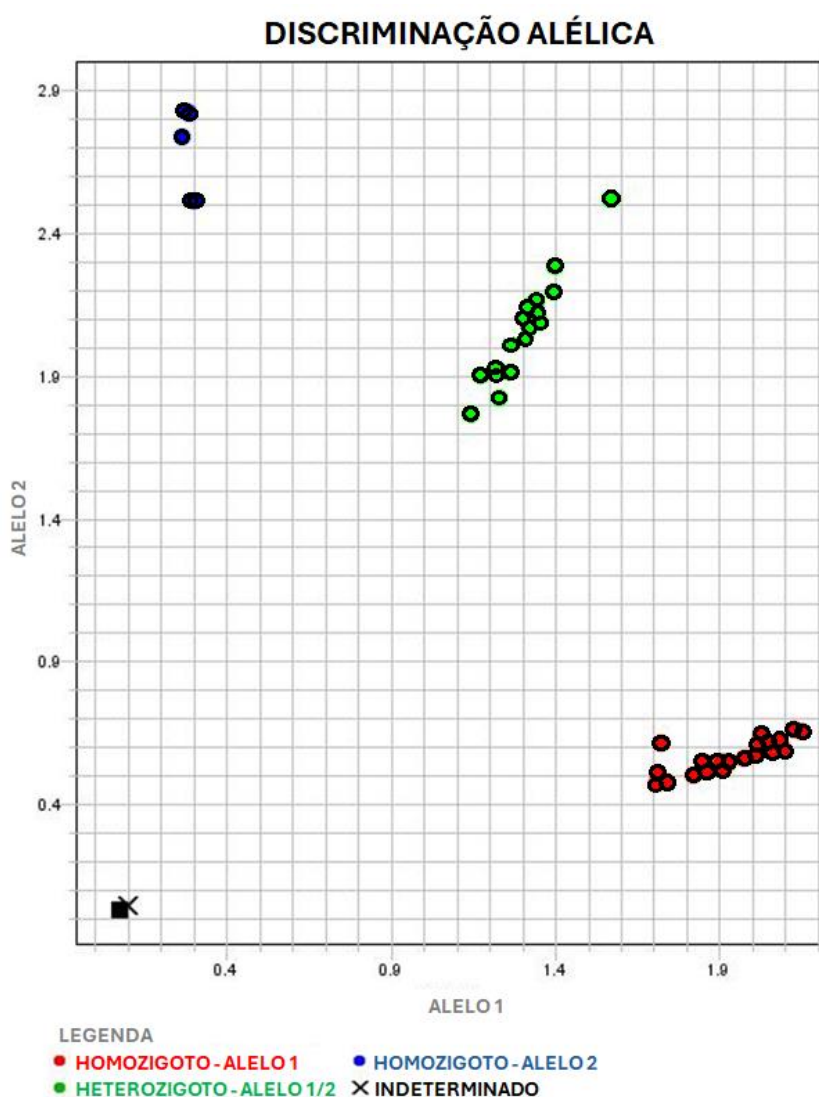


Figura 2. Gráfico representativo da discriminação alélica obtida após o ensaio de genotipagem para polimorfismo no gene *il28b* (rs12979860) nos idosos que participaram do estudo. Na cor vermelha estão apresentados os voluntários homozigotos para o alelo 1, que corresponde à base nitrogenada citosina. Na cor azul estão apresentados os voluntários homozigotos para o alelo 2, correspondente à base nitrogenada timina. Na cor verde estão apresentados os voluntários heterozigotos.

A partir desta observação, na Tabela 1 são apresentados o número de voluntários (total e separados por sexo) que participaram do presente estudo, bem como dados referentes a idade e antropometria deles, tanto no total quanto agrupados de acordo com a discriminação alélica. Com base nestes dados, não foram encontradas diferenças significativas nesses parâmetros entre os grupos de voluntários.

Tabela 1. Número total e separados por grupos, bem como dados demográficos e antropométricos, apresentados em média e desvio padrão ($\bar{X} \pm DP$), dos voluntários participantes do presente estudo, tanto no total quanto agrupados por discriminação alélica, que foram imunizados com duas doses da vacina CoronaVac para COVID-19.

Variáveis	Voluntários				Valor de <i>p</i>
	Total (n=42)	Alelo-1 (C/C) (n=20)	Alelo-2 (T/T) (n=05)	Alelos-1/2 (C/T) (n=17)	
Idade (anos)	73,7±4,5	73,9±4,9	72,2±4,4	74,0±4,0	0,722
Homens (n)	12	4	2	6	0,439
Mulheres (n)	30	16	3	11	
Proporção H:M	1:2,58	1:4,25	1:1,5	1:1,83	
Altura (m)	1,58±0,10	1,56±0,10	1,61±0,10	1,59±0,12	0,488
Peso (kg)	64,4±12,7	63,6±12,0	62,9±14,3	65,8±13,6	0,839
IMC* (kg/m ²)	25,7±4,4	26,1±5,0	23,8±3,7	25,7±3,8	0,579

*IMC – índice de massa corporal

5.2 Análise de IgG específica para os antígenos de SARS-CoV-2 e CMV nos voluntários agrupados com base na discriminação alélica

A Figura 3 apresenta os resultados obtidos na avaliação dos níveis séricos de IgG específica tanto para antígenos de SARS-Cov-2 (Figuras 3A e 3B) quanto de CMV (Figuras 3C) conforme a discriminação alélica em: Alelo-1 (C/C), Alelo-2 (T/T) e Alelos-1/2 (C/T).

A este respeito, foram encontrados maiores níveis séricos de IgG específicos para SARS-CoV-2 no momento pós-vacinação do que no momento pré-vacinação especificamente no grupo Alelo-1 (Figura 3A, $p=0,0269$). Nenhuma outra diferença estatisticamente significativa foi encontrada.

Vale ressaltar que a Figura 3B mostra a dinâmica da resposta de anticorpos para antígenos do SARS-CoV-2 nos voluntários agrupados de acordo com a discriminação alélica. Em cada figura, o percentual relatado corresponde aos voluntários que apresentaram níveis aumentados de IgG pós-vacinação, ou seja, os valores da imunogenicidade.

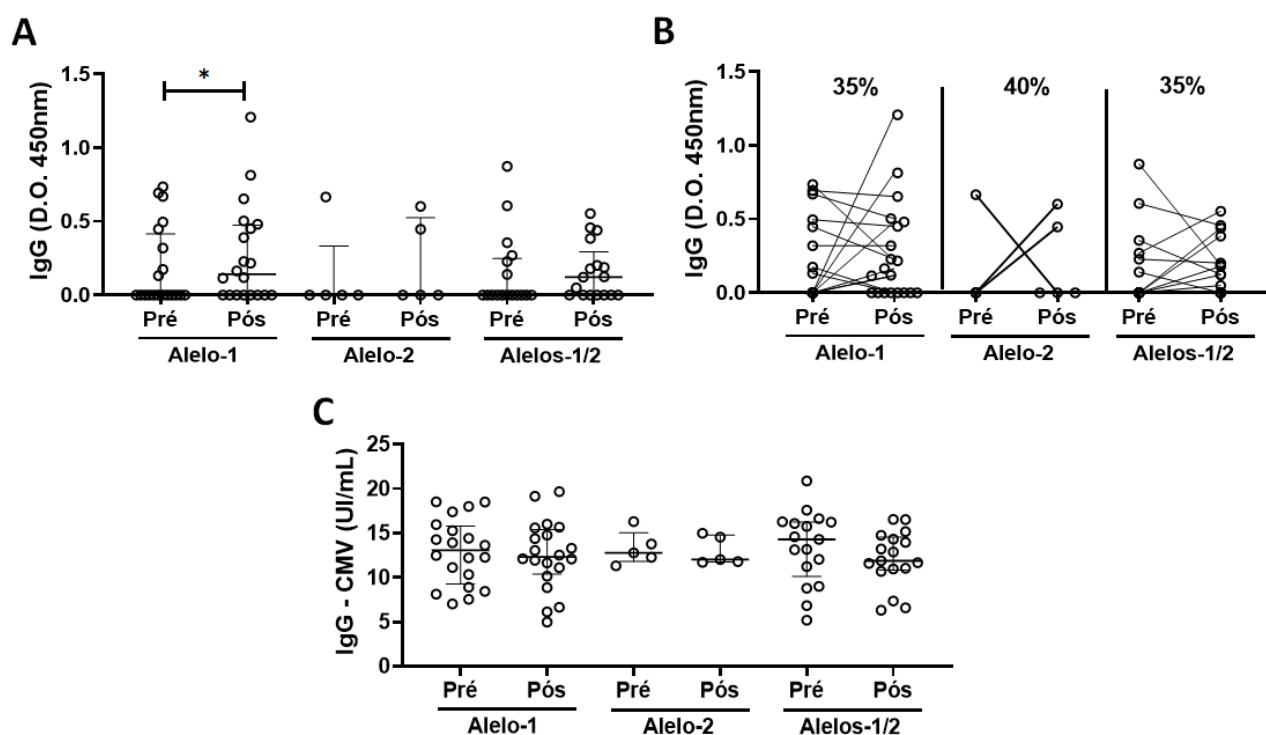


Figura 3. Níveis séricos totais de IgG específicos para antígenos SARS-CoV-2 [D.O. 450nm (A)] e CMV [UI/mL (C)], bem como a dinâmica dos níveis séricos de IgG para SARS-CoV-2 (B), antes e 30 dias após a imunização com duas doses da vacina CoronaVac para COVID-19, nos voluntários idosos agrupados de acordo com o polimorfismo do gene IFN-lambda 3/4 [Alelo-1 (C/C), Alelo-2 (T/T) e Alelos-1/2 (heterozigoto, C/T)]. * $p < 0,05$

5.3 Análise de anticorpos neutralizantes para os antígenos de SARS-CoV-2 e CMV nos voluntários agrupados com base na discriminação alélica

A Figura 4 mostra os resultados obtidos na avaliação dos níveis séricos de IgG específicos tanto para antígenos de SARS-Cov-2 (Figura 4A) quanto de CMV (Figura 4B), nos grupos de voluntários agrupados de acordo com a discriminação alélica em: Alelo-1 (C/C), Alelo-2 (T/T) e Alelos-1/2 (C/T) separados em não respondedores (NRE) e respondedores (RE) de acordo com os dados obtidos no teste VNT. Conforme pode ser observado, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Diante disso, vale

esclarecer que a apresentação dos próximos resultados não contará com a separação dos voluntários nestes subgrupos.

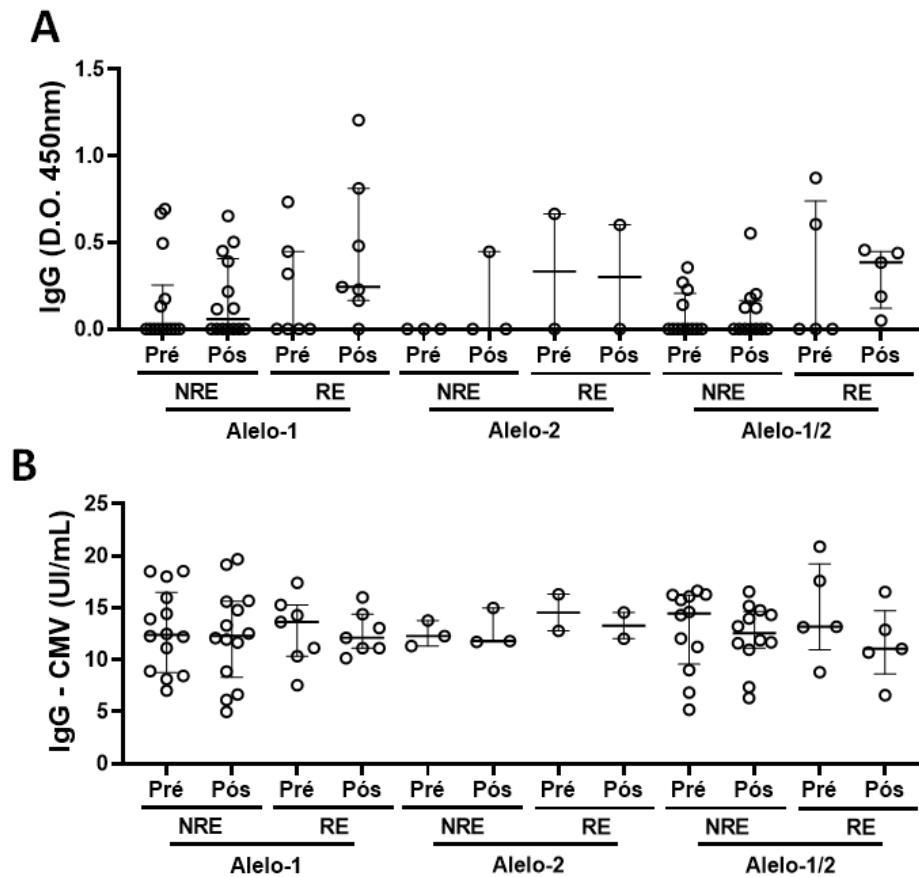


Figura 4. Níveis séricos totais de IgG específicos para antígenos SARS-CoV-2 [D.O. 450nm (A)] e CMV [UI/mL (B)], antes e 30 dias após a imunização com duas doses da vacina CoronaVac para COVID-19, nos voluntários idosos agrupados segundo o polimorfismo do gene IFN-lambda 3/4 [Alelo-1 (C/C), Alelo-2 (T/T) e Alelos-1/2 (heterozigoto, C/T), quando separados de acordo com a presença (respondedores - RE) ou ausência (não respondedores - NRE) de anticorpos neutralizantes.

5.4 Análise da imunofenotipagem de células T CD4+ e CD8+

A Figura 5 mostra as porcentagens de células T CD4+ e T CD8+ tanto “naive” (CD28+CD57-, Figura 5A e 5B), quanto duplamente positivas (CD28+CD57+, Figura 5C e 5D) e senescentes (CD28-CD57+, Figura 5E e 5F), respectivamente, antes e após a administração da segunda dose da vacina CoronaVac nos voluntários agrupados de acordo com a discriminação alélica em: Alelo-1 (C/C), Alelo-2 (T/T) e Alelos 1/2 (C/ T). Nenhuma diferença significativa foi encontrada nestas avaliações.

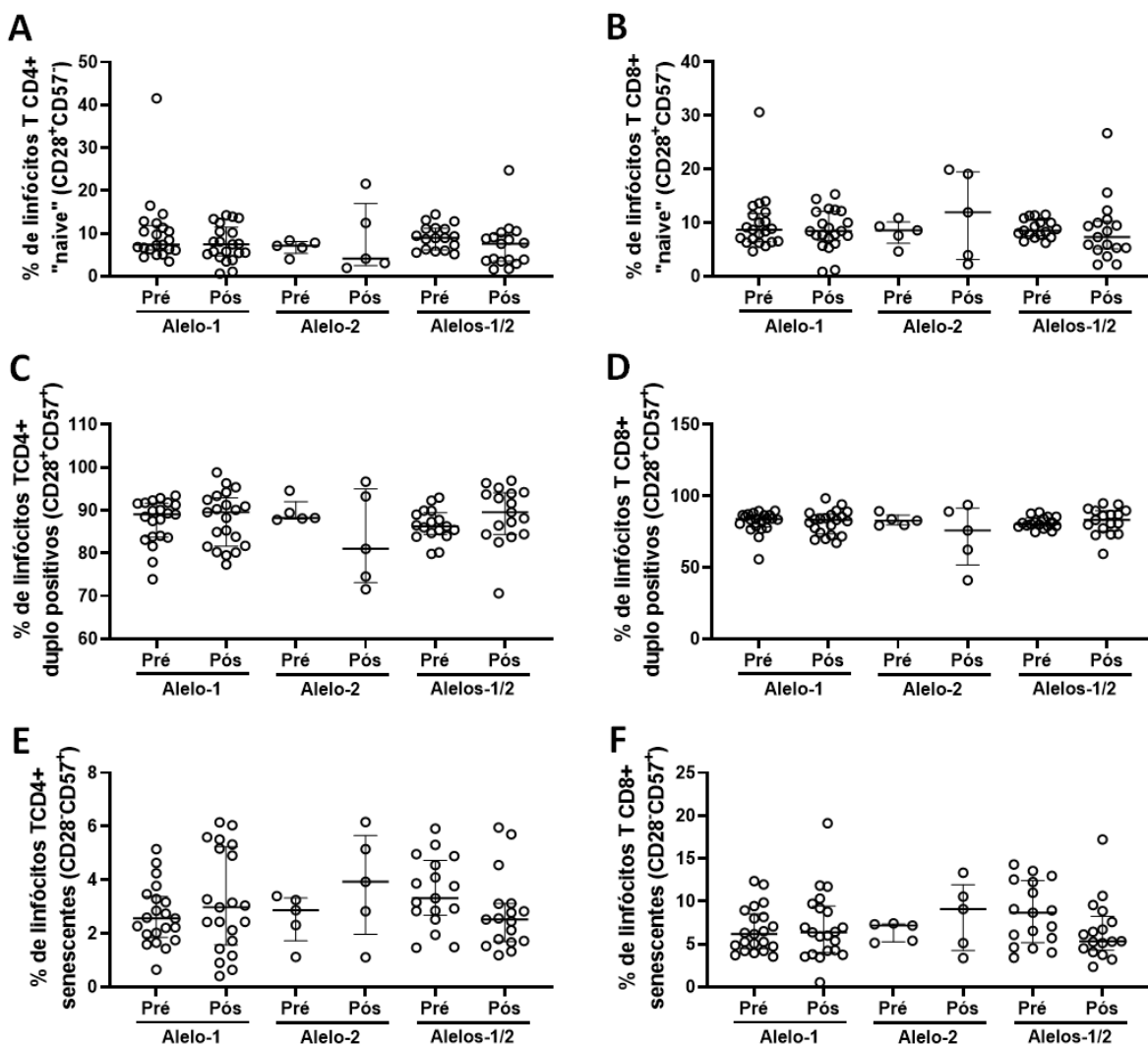


Figura 5. Porcentagens de linfócitos T "naive" (CD28⁺CD57⁻), duplamente positivas (CD28⁺CD57⁺) e senescentes (CD28⁻CD57⁺) para o fenótipo CD4⁺ (A, C e E, respectivamente) e CD8⁺ (B, D e F, respectivamente), antes e 30 dias após a imunização com duas doses da vacina CoronaVac para COVID-19, nos voluntários idosos agrupados de acordo com o polimorfismo no gene IFN-lambda 3/4 [Alelo-1 (C/C), Alelo-2 (T/T) e Alelos-1/2 (heterozigoto, C/T)].

5.5 Análise da imunofenotipagem dos subtipos de monócitos

A Figura 6 mostra as porcentagens dos subtipos de monócitos [não clássico (CD14⁺CD16⁺⁺, Figura 6A), intermediário (CD14⁺⁺CD16⁺, Figura 6B) e clássico (CD14⁺⁺CD16⁻, Figura 6C), antes e após a administração da segunda dose da vacina CoronaVac nos voluntários agrupados de acordo com a discriminação alélica em: Alelo-1 (C/C), Alelo-2 (T/T) e Alelos-1/2 (C/T). Foram observadas menores porcentagens de monócitos não clássicos (Figura 6A) no momento pós-vacinação, tanto no grupo homocigoto para o Alelo-1 ($p=0,0141$)

quanto no grupo Alelos-1/2 ($p=0,007$), do que os valores no momento pré-vacinação. Interessantemente, foi encontrado um aumento nas porcentagens de monócitos intermediários no momento pós-vacinação exclusivamente nos voluntários com homozigose para o Alelo-1 em comparação aos valores pré-vacinação ($p=0,017$, Figura 6B). Nenhuma outra diferença significativa foi encontrada.

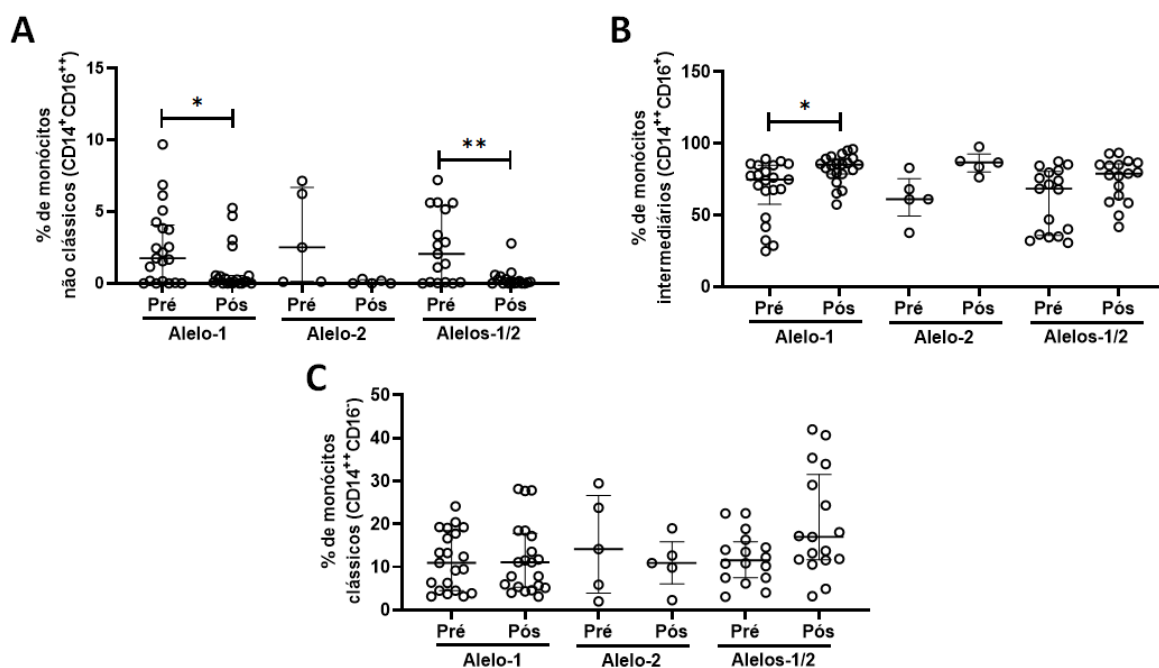


Figura 6. Porcentagens de subtipos de monócitos não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺, A), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺, B) e clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻, C), antes e 30 dias após a imunização com duas doses da vacina CoronaVac para COVID-19, nos voluntários idosos agrupados de acordo com o polimorfismo no gene IFN- λ 3/4 [Alelo-1 (C/C), Alelo-2 (T/T) e Alelos-1/2 (heterozigoto, C/T)]. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$.

5.6 Análise da concentração sérica e modulação de citocinas pró e anti-inflamatórias

Na Figura 7 são apresentados os resultados obtidos na avaliação das concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias IL-6 (Figura 7A), IL-17 (Figura 7B), IFN- α (Figura 7C), IFN- β (Figura 7D), IFN- γ (Figura 7E) e TNF- α (Figura 7F) e a anti-inflamatória IL-10 (Figuras 7G) antes e 30 dias após a administração da segunda dose da vacina CoronaVac nos voluntários agrupados de acordo com a

Figura 7. Comparação dos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (A) IL-17 (B), IFN- α (C) IFN- β (D), IFN - γ (E), TNF- α (F) e a anti-inflamatória IL-10 (G), antes e 30 dias após a imunização com duas doses da vacina CoronaVac para COVID-19, nos voluntários idosos agrupados de acordo com o polimorfismo em IFN-lambda 3/4 [Alelo 1 (C/C), Alelo 2 (T/T) e Alelos 1 e 2 (heterozigoto, C/T)]. Os valores são apresentados como mediana e intervalo interquartil. O nível de significância foi fixado em 5% (* $p < 0,05$).

5.7 Análise da modulação entre as citocinas pró e anti-inflamatórias

Na Figura 8 são apresentados os resultados obtidos na avaliação da razão entre as citocinas pró-inflamatórias e a citocina anti-inflamatória IL-10 [IL-6/IL-10 (Figura 8A), IL-17/IL-10 (Figura 8B), IFN- α /IL-10 (Figura 8C), IFN- β /IL-10 (Figura 8D), IFN- γ /IL-10 (Figura 8E) e TNF- α /IL-10 (Figura 8F), antes e 30 dias após a administração da segunda dose da vacina CoronaVac nos voluntários agrupados de acordo com a discriminação alélica em Alelo 1 (C/C), Alelo 2 (T/T) e Alelos 1 e 2 [heterozigotos (C/T)].

Da mesma forma que os resultados observados no item anterior, valores mais elevados da relação IFN- β /IL-10 (Figura 4D) foram encontrados nos voluntários do grupo Alelo-2 (T/T), tanto nos momentos pré quanto pós-vacinação, do que nos voluntários dos grupos Alelo-1 (C/C, $p=0,0050$ e $p=0,0009$, respectivamente) e Alelos-1/2 (C/T, $p=0,0020$ e $p < 0,0017$, respectivamente). Além disso, também foi encontrada uma redução significativa nos valores da razão IL-6/IL-10 (Figura 4A, $p=0,0214$) no momento pós-vacinação nos voluntários do grupo Alelo-2 (T/T) em comparação aos valores observados nos momentos pré-vacinação.

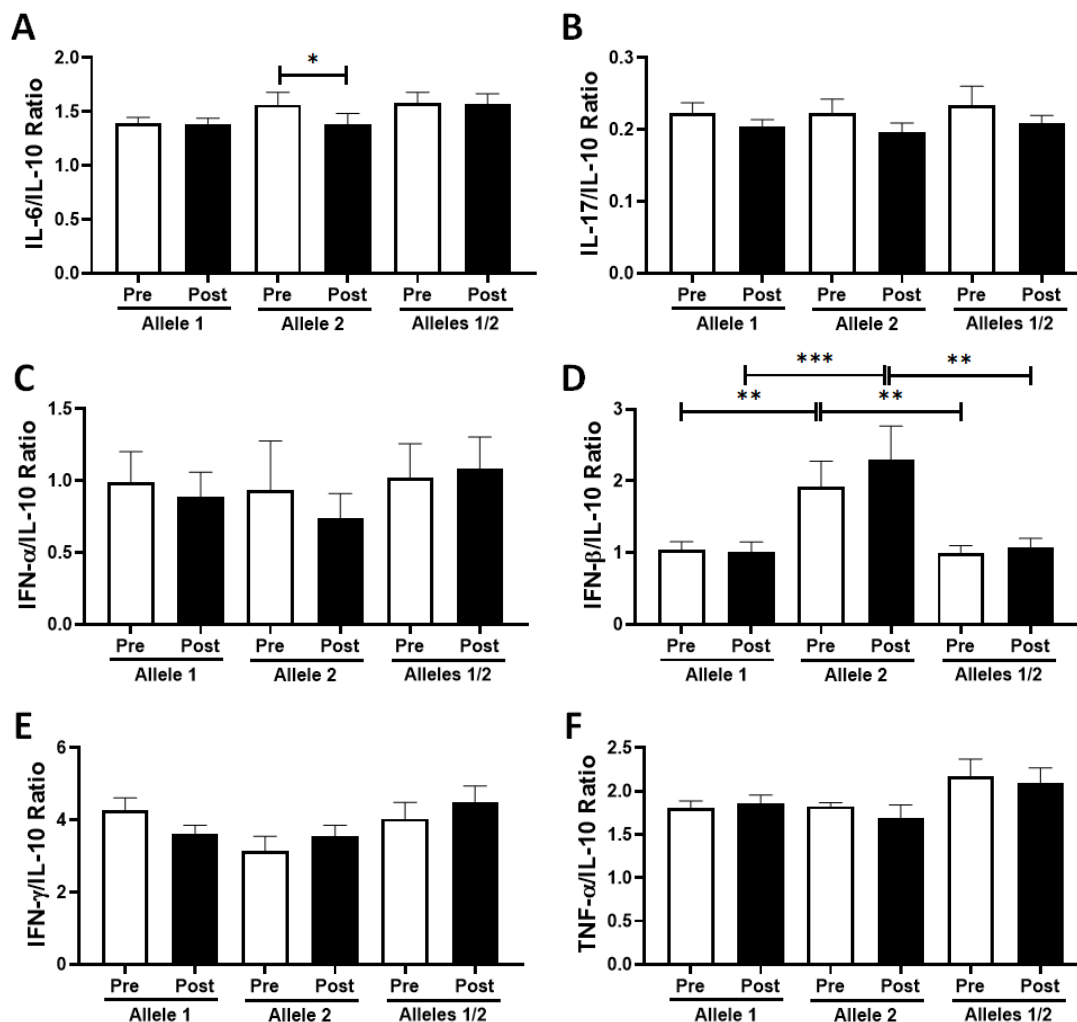


Figura 8. Análise da razão entre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias [IL-6/IL-10 (A), IL-17/IL-10 (B), IFN- α /IL-10 (C), IFN- β /IL-10 (D) e IFN- γ /IL-10 (E) e TNF- α /IL-10 (F), antes e 30 dias após a imunização com duas doses da vacina CoronaVac para COVID-19, nos voluntários idosos agrupados de acordo com o polimorfismo em IFN-lambda 3/4 [Alelo-1 (C/C), Alelo-2 (T/T) e Alelos-1/2 (heterozigoto, C/T)]. * p < 0,05.

5.8 Análise do coeficiente de correlação entre os parâmetros avaliados

A Tabela 2 apresenta os resultados significativos obtidos na análise do coeficiente de correlação de *Spearman* tendo os níveis de IgG específicos, tanto para os antígenos do SARS-CoV-2 quanto do CMV, como principais parâmetros avaliados. Exclusivamente o grupo Alelo-1 (C/C) mostrou que os níveis séricos de IgG específicos para antígenos SARS-CoV-2 (IgG-COVID-19) apresentaram associação negativa com os valores de IMC, principalmente no momento pré-vacinação, enquanto os valores séricos os níveis de IgG para antígenos de CMV (IgG-CMV) foram positivamente associados não apenas a um estado pró-inflamatório sistêmico, independentemente do momento avaliado, mas também à presença de células T senescentes (tanto células T CD4+ quanto células T CD8+), no momento pós-vacinação. Em relação ao grupo Alelo-2 (T/T), no

momento pré-vacinação, foram encontradas correlações negativas entre os níveis séricos de IgG para antígenos SARS-CoV-2 (IgG-COVID-19) e IL-17 ou IL-17/IL-10, e TNF- α ou TNF- α /IL-10, em contraste com correlações positivas entre os mesmos anticorpos e os níveis circulantes de IFN- α e IFN- γ , bem como as razões IFN- α /IL-10 e IFN- γ /IL-10, enquanto, no momento pós-vacinação, os níveis séricos de IgG para antígenos SARS-CoV-2 (IgG-COVID-19) mostraram uma correlação positiva com os níveis de IL-10 e uma correlação negativa com a porcentagem de células T CD8+ senescentes. Por último, o grupo Alelo-1/2 (heterozigoto, C/T) apresentou, no momento pré-vacinação, apenas uma correlação negativa entre os níveis séricos de IgG para antígenos SARS-CoV-2 (IgG-COVID-19) e as porcentagem de monócitos intermediários, bem como correlações positivas entre os níveis sistêmicos desses anticorpos (IgG-COVID-19) e os níveis circulantes de IL-10 e IFN- γ , no momento pós-vacinação.

Tabela 2. Análise do coeficiente de correlação de *Spearman* entre todos os parâmetros avaliados no presente estudo antes (pré-vacinação) e 30 dias após a administração da segunda dose da vacina CoronaVac (pós-vacinação) nos grupos de voluntários separados de acordo com a discriminação alélica em Alelo-1 (C/C), Alelo-2 (T/T) e Alelos-1/2 (heterozigoto, C/T),

Grupo Alelo-1 (C/C)					
Parâmetros	Pré-vacinação		Parâmetros	Pós-vacinação	
	Valor de <i>r</i>	Valor de <i>p</i>		Valor de <i>r</i>	Valor de <i>p</i>
IgG-COVID-19 X BMI	- 0.450	0.040	IgG-CMV X IFN- γ	0.554	0.009
IgG-CMV X IL-17	0.558	0.008	IgG-CMV X IL-6/IL-10	0.475	0.029
IgG-CMV X IFN- γ	0.534	0.012	IgG-CMV X IFN- γ /IL-10	0.697	<0.001
IgG-CMV X IL-17/IL-10	0.510	0.018	IgG-CMV X linfócitos TCD4+ senescentes	0.655	<0.001
IgG-CMV X IFN- γ /IL-10	0.606	0.003	IgG-CMV X linfócitos TCD8+ senescentes	0.675	<0.001
Grupo Alelo-2 (T/T)					
Parâmetros	Pré-vacinação		Parâmetros	Pós-vacinação	
	Valor de <i>r</i>	Valor de <i>p</i>		Valor de <i>r</i>	Valor de <i>p</i>
IgG-COVID-19 X TNF- α	- 0.995	<0.001	IgG-COVID-19 X IL-10	0.878	0.048
IgG-COVID-19 X IFN- α	0.996	<0.001	IgG-COVID-19 X linfócitos TCD8+ senescentes	- 0.886	0.045
IgG-COVID-19 X IFN- γ	0.918	0.027			
IgG-COVID-19 X IL-17	- 0.968	0.006			
IgG-COVID-19 X TNF- α /IL-10	- 0.999	<0.001			
IgG-COVID-19 X IFN- α /IL-10	0.998	<0.001			
IgG-COVID-19 X IFN- γ /IL-10	0.922	0.025			
IgG-COVID-19 X IL-17/IL-10	- 0.990	0.001			
Grupo Alelos-1/2 (C/T)					
Parâmetros	Pré-vacinação		Parâmetros	Pós-vacinação	
	Valor de <i>r</i>	Valor de <i>p</i>		Valor de <i>r</i>	Valor de <i>p</i>
IgG-COVID-19 X Intermediário	- 0.528	0.029	IgG-COVID-19 X IL-10	0.513	0.035
			IgG-COVID-19 X IFN- γ	0.567	0.017

5.9 Análise de regressão linear multivariada

Além da avaliação do coeficiente de correção acima apresentada, também realizamos uma análise de regressão linear multivariada ajustada para níveis séricos específicos de IgG para antígenos SARS-CoV-2 (Tabela 3). Nesta análise, observou-se que o grupo Alelo-1 (C/C) apresentou efeito significativo do IMC, tanto pré quanto pós-vacinação, bem como dos níveis sistêmicos de IL-17 e IFN- γ , além das razões de IL-17/IL-10 e IFN- γ /IL-10, com a resposta de anticorpos para vacinação contra COVID-19. Em relação ao grupo Alelo-2 (T/T), no momento pré-vacinação, foi encontrado efeito significativo dos valores de IgG-CMV, enquanto, no momento pós-vacinação, efeitos significativos com os valores de IgG-CMV e a porcentagem de monócitos não clássicos foram observadas em relação a resposta de anticorpos para vacinação contra COVID-19. Finalmente, o grupo Alelo-1/2 (heterozigoto, C/T) apresentou apenas um efeito significativo com a idade, no momento pós-vacinação.

Tabela 3. Resultados referentes à análise de regressão multivariada com ajuste para níveis séricos IgG específicos para antígenos SARS-CoV-2, antes (pré-vacinação) e 30 dias após a administração da segunda dose da vacina CoronaVac (pós-vacinação) nos grupos de voluntários separados de acordo com a discriminação alélica em Alelo-1 (C/C), Alelo-2 (T/T) e Alelos-1/2 (heterozigoto, C/T),

Ajuste para IgG específica para antígenos do SARS-CoV-2									
Parâmetros	Alelo-1 (C/C)								
	Pré-vacinação				Pós-vacinação				
	Valor de β	IC* - 95%	Valor de p	R^2	Valor de β	IC - 95%	Valor de p	R^2	
IMC	-0,03636	-0,0142 a 0,0416	0,0433	0,5496	-0,03849	-0,0673 a -0,00971	0,0124	0,1686	
IL-17	ns	ns	ns	Ns	-0,1911	-0,359 a -0,0229	0,0301	0,6288	
IL-17/IL-10	ns	ns	ns	Ns	-0,6557	-1,272 a -0,0395	0,0392	0,5796	
IFN-g	ns	ns	ns	Ns	0,004449	0,0017 a 0,0072	0,0049	0,8339	
IFN-g/IL-10	ns	ns	ns	Ns	0,01261	0,0037 a 0,0215	0,0102	0,6984	
Parâmetros	Alelo-2 (T/T)								
	Pré-vacinação				Pós-vacinação				
	Valor de β	IC - 95%	Valor de p	R^2	Valor de β	IC - 95%	Valor de p	R^2	
IgG-CMV	-0,03536	-0,0329 a -0,0378	0,0001	0,9998	-0,2331	-0,2727 a -0,1934	0,0003	0,9997	
Não clássicos	ns	ns	ns	Ns	6,734	3,774 a 9,695	0,0054	0,9996	
Parâmetros	Alelo-1/2 (C/T)								
	Pré-vacinação				Pós-vacinação				
	Valor de β	IC - 95%	Valor de p	R^2	Valor de β	IC - 95%	Valor de p	R^2	
Idade	ns	ns	ns	ns	-0,02826	-0,0585 a -0,00199	0,0379	0,2423	

*IC = intervalo de confiança

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi demonstrado pela primeira vez que idosos soropositivos para CMV, quando agrupados de acordo com o polimorfismo do gene IFN-lambda 3/4 (rs12979860 C>T), apresentam distinta resposta imune/inflamatória após imunização com duas doses da vacina CoronaVac para COVID-19.

Primeiramente, é importante mencionar que, independentemente do grupo em que os voluntários se enquadraram, a baixa imunogenicidade observada aqui [grupo Alelo-1 (35%), grupo Alelo-2 (40%) e grupo Alelos-1/2 (35%)] não apenas corrobora a literatura, mas também reforça o efeito prejudicial da imunossenescência no contexto da vacinação na população idosa.⁵¹⁻⁵³

Além disso, como previamente mencionado, os IFNs, particularmente o IFN-lambda, apresenta um proeminente efeito sobre vírus, incluindo infecção por CMV e SARS-CoV-2. Neste sentido, embora tenha sido demonstrado que a menor depuração viral observada em crianças com infecções agudas do trato respiratório superior e em indivíduos adultos/idosos infectados pelo SARS-CoV-2 poderia estar associada a variantes homozigóticas do gene *ifnl3/4*,^{54,55} o impacto do polimorfismo deste gene no contexto da vacinação para COVID-19, particularmente na população idosa, ainda é pouco compreendido. Portanto, investigamos aqui os *SNPs* do gene *il28b* (rs12979860 C>T), um IFN tipo III,^{56,57} e foi possível evidenciar que 20 voluntários (47,6%) apresentaram apenas citosina no par de alelos (C/C, grupo Alelo-1), enquanto 5 (11,9%) apresentaram apenas timina (T/T, grupo Alelo-2), e 17 (40,5%) apresentaram tanto citosina quanto timina (C/T, grupo Alelos-1/2), na região *upstream* de 3kpb do gene *il28b*.⁵⁸ Vale salientar que esses achados confirmam nosso estudo anterior, no qual o número de idosos que tinham genótipos com a presença de citosina (C/C e C/T) era maior do que apenas timina (T/T).⁴⁰

Além dessas observações, a avaliação da resposta de IgG específica para antígenos SARS-CoV-2 nos grupos de indivíduos idosos participantes mostrou aumento significativo nos níveis séricos deste anticorpo, no momento pós-vacinação, apenas no grupo Alelo-1. Não obstante, o mesmo grupo apresentou maior porcentagem de monócitos intermediários e menor porcentagem de monócitos não clássicos após a vacinação do que os valores obtidos

anteriormente. Além disso, foi evidenciado neste grupo uma correlação negativa significativa entre os níveis séricos de IgG específicos para antígenos SARS-CoV-2 e os valores de IMC pré-vacinação, bem como o estado pró-inflamatório sistêmico foi positivamente associado aos níveis séricos de IgG específica para antígenos CMV, antes e depois da vacinação para COVID-19. Interessantemente, a análise de regressão multivariada ajustada com base nos níveis séricos de IgG específicos para antígenos SARS-CoV-2 não apenas confirmou o impacto negativo do IMC, mas também revelou um efeito distinto dos níveis circulantes de IL-17 e IFN- γ , bem como suas respectivas razões (IL-17/IL-10 e IFN- γ /IL-10). Em relação à resposta de anticorpos tanto à infecção quanto à vacinação para COVID-19 em idosos soropositivos para CMV e agrupados de acordo com o polimorfismo do gene IFN-lambda 3/4, nosso grupo previamente mostrou que idosos homocigotos para o alelo 1 (C/C) apresentaram níveis mais altos de IgG específica para antígenos de SARS-CoV-2 8 meses após a infecção por SARS-CoV-2 do que aqueles encontrados durante essa infecção. Essa observação nos permitiu levantar a hipótese de que esse achado estaria associado à correlação negativa observada entre os níveis de IgG específica para SARS-CoV-2 e a soropositividade para CMV que foi verificada exclusivamente neste grupo de idosos.⁴⁰

Tomando por base esses prévios achados, podemos aqui sugerir que os níveis elevados de IgG específicos para antígenos do SARS-CoV-2 encontrados exclusivamente no grupo Alelo-1 poderiam estar relacionados a um "retardo" na indução da resposta imune à vacinação. Para sustentar essa hipótese, destacamos que a soropositividade para CMV poderia estar associado a influência (in)direta na indução e manutenção de um estado pró-inflamatório sistêmico, visto que neste grupo foi evidenciada significativa associação positiva entre este estado pró-inflamatório e a soropositividade para CMV.

Neste contexto, é reconhecido que a infecção crônica pelo CMV está intimamente relacionada à sucessivos ciclos de reativação deste vírus ao longo da vida, o que leva a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, o que impacta no estado inflamatório sistêmico⁵⁹ e também pode prejudicar a resposta à vacinação.⁶⁰ Notavelmente, foi relatado que a exposição subclínica ao CMV e sua reativação podem resultar não apenas na indução de em linfócitos

TCD4+CD57+ de memória de longo prazo,⁶¹ mas também levar a maior proporção de linfócitos TCD4+CD28^{null}, o que se correlaciona com reduzida resposta à vacinação.⁶⁰ Esses dados podem supostamente suportar nossos achados, pois verificamos correlação positiva entre os níveis séricos de IgG específicos para CMV e a proporção de células T senescentes, definidas como CD28-CD57+ (tanto para linfócitos TCD4+ quanto TCD8+), exclusivamente no grupo Alelo-1 pós-vacinação. Diante disso, especulamos que essas associações podem influenciar e, assim, levar a um atraso na resposta imune à COVID-19, que inclui a infecção por SARS-CoV-2 e sua vacinação.

Além destas, outros importantes resultados observados foram as associações positivas entre os níveis séricos de IgG específicos para CMV e algumas citocinas pró-inflamatórias, como IL-17 e IFN- γ no período pré-vacinação e TNF- α no período pós-vacinação. Nesse sentido, foi relatado que a DNAemia de CMV mostrou-se positivamente correlacionada com níveis séricos elevados de IL-17 e que as células de perfil Th17 ativadas neste contexto também coexpressaram IFN- γ e/ou TNF- α .⁶² Além disso, a correlação positiva entre os níveis séricos de IgG específicos para CMV e as razões de IL-17/IL-10, IFN- γ /IL-10 e IL-6/IL-10 corroboram a literatura que afirma que a presença crônica de CMV pode induzir um estado pró-inflamatório,⁶³⁻⁶⁵ o que, como mencionado acima, pode interferir na resposta imune à vacinação na população idosa.⁶⁶

Da mesma forma, a combinação da maior porcentagem de monócitos intermediários, que podem liberar níveis mais altos de citocinas pró-inflamatórias em resposta a produtos microbianos.⁶⁷ com a porcentagem reduzida de monócitos não clássicos, que têm propriedades anti-inflamatórias, pode dar mais suporte a sugestão de que o grupo Alelo-1 apresentava um estado sistêmico proeminentemente pró-inflamatório, o qual poderia supostamente afetar a resposta imune à vacinação para COVID-19. Vale salientar que, de acordo com a literatura, não apenas o número e a ativação de todos os subtipos de monócitos não são afetados pelo status sorológico relacionado ao CMV,^{68,69} o que está consistente com nossos dados, mas também um aumento no número de todos os subtipos de monócitos pode ocorrer com a idade, independentemente do sexo.⁶⁸ É importante notar que, embora os monócitos não sejam facilmente

infectados pelo CMV na corrente sanguínea, o vírus pode infectar seus precursores na medula óssea e essas células, ao abrigar o vírus, podem servir para entregar o vírus a vários locais.⁷⁰ Além disso, o próprio CMV pode estimular monócitos mesmo em sua forma latente, o que pode levar a um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes.⁷¹⁻⁷³

De acordo com a literatura, em particular, os monócitos intermediários desempenham um papel central na apresentação de antígenos devido à sua maior expressão de MHC classe II e algumas moléculas coestimuladoras, especialmente o CD86.⁷⁴ Nesse contexto, foi relatada uma capacidade notável dessas células de apresentar antígenos às células TCD8⁺.⁷⁵ Com base nessas informações, podemos sugerir que as porcentagens aumentadas de monócitos intermediários encontradas no grupo Alelo-1 pós-vacinação provavelmente poderiam estar relacionadas à apresentação de antígenos de CMV, o que poderia contribuir para gerar um estado pró-inflamatório sistêmico que favoreceria esse vírus e, conseqüentemente, levaria a um atraso na resposta imune à infecção e/ou vacinação por SARS-CoV-2, conforme relatado anteriormente.⁴⁰

Embora o grupo Alelo-1/2 tenha mostrado menor proporção de monócitos não clássicos pós-vacinação, de forma semelhante ao grupo Alelo-1. estes indivíduos heterozigotos mostraram uma significativa correlação negativa entre os níveis séricos de IgG específicos para antígenos do SARS-CoV-2 e as porcentagens de monócitos intermediários antes da vacinação, Este último achado pode demonstrar que uma adequada resposta imune à COVID-19 ocorre num estado inflamatório regulado e pode dar mais suporte a nossa sugestão de que a porcentagem aumentada desse subtipo de monócitos pró-inflamatórios, observada no grupo Alelo-1, poderia favorecer um estado pró-inflamatório sistêmico que interferiria na resposta imune à infecção por SARS-CoV-2 e à vacinação em idosos soropositivos para CMV.

Corroborando essa sugestão de que a inflamação equilibrada pode favorecer a resposta imune à COVID-19, uma correlação positiva foi demonstrada entre os níveis circulantes de IgG específicos para antígenos do SARS-CoV-2 e IL-10 tanto no grupo Alelo-2 quanto no grupo Alelos-1/2. Em particular, é consenso que a IL-10 tem marcantes propriedades anti-

inflamatórias.⁷⁶ e nosso grupo documentou anteriormente que idosos que apresentaram uma melhor resposta de anticorpos à vacinação para gripe não apenas apresentaram uma correlação positiva com os níveis circulantes de IL-10, mas também uma correlação negativa entre os níveis circulantes desta citocina e IgG específica para CMV.⁷⁷ Em relação à última observação, embora o grupo Alelos-1/2 não tenha apresentado correlação entre os níveis séricos de IgG específica para antígenos do SARS-CoV-2 e CMV, o grupo Alelo-2 apresentou. Assim, esses achados nos permitem sugerir que a presença de um único alelo C no gene IFN-lambda 3/4 pode influenciar parcialmente a resposta imune ao SARS-CoV-2 e ao CMV, já que o grupo Alelo-2, o qual é homocigoto para os alelos T/T, mostrou que a melhor resposta de anticorpos à infecção e vacinação para o SARS-CoV-2 esteve negativamente associada à soropositividade para CMV (dados observados na análise de regressão).

Segundo a literatura, uma menor incidência de infecções ativas por CMV e tendência à menor replicação desse vírus tem sido relatadas em indivíduos com o genótipo TT do que em indivíduos com o genótipo CC, sugerindo um efeito protetor do alelo T (rs12979860) contra a infecção e reativação por CMV.⁷⁸ Nesse sentido, foi levantada a hipótese de que esse efeito protetor do alelo T poderia ser pelo menos devido a respostas robustas de células T específicas para CMV.⁷⁹ De fato, nossos dados anteriores confirmam essa suposição, pois a melhor resposta à vacinação contra o vírus *Influenza* em idosos soropositivos para CMV foi associada tanto ao estado anti-inflamatório sistêmico quanto ao aumento da porcentagem de linfócitos T CD8+ “naive”.⁷⁷ Embora não tenhamos observado nenhuma associação entre a resposta de anticorpos à COVID-19 e linfócitos T “naive”, o grupo Alelo-2 mostrou uma significativa correlação negativa entre os níveis séricos de IgG específicos para antígenos do SARS-CoV-2 e as porcentagens dos linfócitos T CD8+ senescentes, o que pode apoiar a sugestão de que o genótipo TT poderia exercer um efeito protetor por meio de respostas robustas de células T específicas para CMV, já que a presença e a manutenção de linfócitos T senescentes, particularmente T CD8+, é uma característica da infecção crônica por CMV^{80,81} e também prejudica a resposta imunológica à vacinação em idosos.⁸²

Consistente com esta sugestão de que o genótipo TT pode produzir um estado mais protetor contra infecções virais, preferencialmente CMV, o grupo Alelos-2 apresentou maiores níveis circulantes de IFN- β e uma razão IFN- β /IL-10 aumentada do que demais grupos durante os períodos do estudo. É geralmente reconhecido que os IFNs tipo I, como o IFN- β , desempenham um papel central na resposta imune a infecções virais, incluindo SARS-CoV-2 e CMV.⁸³ A este respeito, a resposta imune inata desregulada descrita na COVID-19 grave foi associada a uma resposta limitada e tardia do IFN tipo I,⁸⁴ e também foi demonstrado que o IFN- β pode reduzir a replicação do CMV em células semelhantes a macrófagos.⁸⁵ Interessantemente, uma combinação de IFN- λ e IFN- β mostrou atividade anti-HCV sinérgica *in vitro*,⁸⁶ e foi sugerido que o IFN- λ pode ajustar os níveis de IFN- β , o qual, em níveis ótimos, controlam a replicação viral.⁸⁷ Essas informações podem sugerir que os níveis mais altos de IFN- β observados no grupo Alelo-2 podem não apenas ser úteis para controlar a infecção por CMV e otimizar a resposta imune contra a infecção por SARS-CoV-2 e vacinação, mas também mostrar uma possível ligação entre o polimorfismo do IFN-lambda e esse IFN tipo I no contexto do estudo.

Além destes achados, a associação negativa entre os níveis séricos de IgG específicos para SARS-CoV-2 e IMC ou idade, os quais são reconhecidamente gatilhos pró-inflamatórios, encontrados exclusivamente nos grupos Alelo-1 e Alelos-1/2, respectivamente, podem dar mais suporte a nossa hipótese de que a presença ou manutenção de um estado pró-inflamatório sistêmico pode promover um desequilíbrio no sistema imunológico e, co isso, um prejuízo na resposta tanto à infecção pelo SARS-CoV-2,^{88,89} como também à vacinação contra vários patógenos, inclusive na COVID-19.^{89,90}

7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Embora o presente estudo tenha obtido relevantes achados, o mesmo apresenta algumas limitações, como:

1) o número discrepante de voluntários entre os grupos de acordo com a genotipagem, 20 voluntários apresentaram homozigose para os alelos C/C (grupo Alelo-1), 5 voluntários apresentaram homozigose para os alelos T/T (grupo Alelo-2) e 17 voluntários apresentaram heterozigose (C/T, grupo Alelos-1/2). Vale ressaltar que essa discrepância não invalida nossos resultados e, aparentemente não impactou na significância estatística deste estudo, pois, considerando a frequência dos alelos encontrada, a variabilidade genética evidenciada aqui foi semelhante ao observado em nosso prévio estudo, o qual mostrou que o número de idosos que apresentavam genótipos com a presença de citosina (C/C e C/T) foi maior do que aqueles com apenas timina (T/T) (40);

2) a impossibilidade de realizar posteriores análises quanto ao impacto do polimorfismo do IFN-lambda na imunogenicidade em modelos de vacinas homólogas a CoronaVac, ou mesmo de vacinas que utilizaram diferentes plataformas tecnológicas para indução da resposta imunológica contra o vírus SARS-CoV-2, bem como frente a administração da terceira dose da CoronaVac devido à adoção do esquema vacinal heterólogo no país.

8 CONCLUSÃO

Embora o grupo Alelo-1 (C/C) tenha apresentado maiores níveis séricos de IgG específicos para SARS-CoV-2 pós-vacinação, a imunogenicidade e a avaliação de anticorpos neutralizantes apresentaram resultados semelhantes entre os grupos. Além disso, o grupo Alelo-1 mostrou significativa associação com a presença de um estado pró-inflamatório sistêmico e a soropositividade para CMV. Tomados em conjunto, esses achados corroboram não apenas nossa observação anterior de que indivíduos com Alelo-1 para o gene IFN-lambda podem apresentar uma resposta imune tardia ao vírus e/ou vacinação, mas também a literatura indicando que o estado sistêmico pró-inflamatório pode ser devido ao menor controle da infecção por CMV que ocorre em indivíduos que apresentam essa discriminação alélica.

Por fim, os resultados nos permitem sugerir que a avaliação do genótipo IFN-lambda e do estado de infecção por CMV podem ser úteis para identificar indivíduos com maior risco de apresentar resposta imune insuficiente à vacinação para vírus respiratórios, particularmente o SARS-CoV-2.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bao L, Zhang C, Dong J, Zhao L, Li Y, Sun J. Oral Microbiome and SARS-CoV-2: Beware of Lung Co-infection [Internet]. Vol. 11, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2020 [cited 2024 Jun 22]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32849438/>
2. World Health Organization - Epidemic and Pandemic Preparedness and Prevention (EPP). COVID-19 epidemiological update – 09 Oct 2024. Emergency Situational Updates [Internet]. 2024 [cited 2024 Oct 14]; Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-epidemiological-update-edition-172>
3. Chen Y, Klein SL, Garibaldi BT, Li H, Wu C, Osevala NM, et al. Aging in COVID-19: Vulnerability, immunity and intervention [Internet]. Vol. 65, *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd; 2021 [cited 2024 Jun 22]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163720303408?via%3Dihub>
4. Zhavoronkov A. Geroprotective and senoremediative strategies to reduce the comorbidity, infection rates, severity, and lethality in gerophilic and gerolavic infections. 2020 [cited 2024 Jun 22];18(8):6492–510. Available from: <file:///C:/Users/arian/Downloads/referencias/6%20aging-v12i8-102988.pdf>
5. Santoro A, Bntinesi E, Monti Daniela. Immunosenescence and inflammaging in the aging process: age-related diseases or longevity? *Ageing Res Rev* [Internet]. 2021 [cited 2024 Jun 22];71. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1568163721001690>
6. Franceschi Cláudio, Monti Daniela, Sansoni Paulo, Cossarizza Andrea. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today* [Internet]. 1995 [cited 2024 Jun

- 22];16(1):12–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167569995800646?via%3Dihub>
7. De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett* [Internet]. 2005 Apr 11 [cited 2024 Jun 22];579(10):2035–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579305002930>
 8. Barbé-Tuana F, Funchal G, Raquel C, Schmitz R, Maurmann RM, Bauer ME. The interplay between immunosenescence and age-related diseases. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2020;42(5):545–57. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00806-z>
 9. Kumar SJ, Shukla S, Kumar S, Mishra P. Immunosenescence and Inflamm-Aging: Clinical Interventions and the Potential for Reversal of Aging. *Cureus*. 2024 Jan 31;
 10. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri Fabiola, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2006 [cited 2024 Jun 22];908(1):244–54. Available from: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x?sid=nlm%3Apubmed>
 11. Murdaca G, Paladin F, Martino G, Gangemi S. Impact of Immunosenescence on Viral Infections with an Emphasis on COVID-19 [Internet]. Vol. 28, *Frontiers in Bioscience - Landmark*. IMR Press Limited; 2023 [cited 2024 Jun 22]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37796718/>
 12. Kumar R, Edith A B. Age-related changes in immunity: implications for vaccination in the elderly. *Expert Rev Vaccines* [Internet]. 2008 [cited 2024 Jun 22];7(4):467–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17266794/>

13. Gomez CR, Nomellini V, Faunce DE, Kovacs EJ. Innate immunity and aging. National Institute of Health [Internet]. 2008 [cited 2024 Jun 22]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2564282/pdf/nihms65988.pdf>
14. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Vol. 116, *Blood*. American Society of Hematology; 2010.
15. Naylor K, Li G, Vallejo AN, Lee WW, Koetz K, Bryl E, et al. The Influence of Age on T Cell Generation and TCR Diversity. *The Journal of Immunology*. 2005 Jun 1;174(11):7446–52.
16. Zhang D, Guo R, Lei L, Liu H, Wang Y, Wang Y, et al. Frontline Science: COVID-19 infection induces readily detectable morphologic and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes. *J Leukoc Biol*. 2021 Jan 1;109(1):13–22.
17. Gautier EL, Jakubzick C, Randolph GJ. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. Vol. 29, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2009. p. 1412–8.
18. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory Properties. *Immunity* [Internet]. 2003 [cited 2024 Jun 22];19(1):71–82. Available from: [https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613\(03\)00174-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761303001742%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(03)00174-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1074761303001742%3Fshowall%3Dtrue)
19. 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 Sep 22;118(12).
20. Carlin LM, Stamatziades EG, Auffray C, Hanna RN, Glover L, Vizcay-Barrena G, et al. Nr4a1-dependent Ly6Cl^{low} monocytes monitor

- endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*. 2013 Apr 11;153(2):362–75.
21. Tahir S, Steffens S. Nonclassical monocytes in cardiovascular physiology and disease. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2021 [cited 2024 Jun 22];320(5). Available from: https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpcell.00326.2020?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org
 22. Timmerman LK, G Flynn M, M Coen P, M Markofski M, D Pence B. Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise? *J Leukoc Biol* [Internet]. 2008 [cited 2024 Jun 22];84(5):1271–8. Available from: <https://academic.oup.com/jleukbio/article-abstract/84/5/1271/6975140?redirectedFrom=fulltext&login=false>
 23. Auffray C, Darin F, 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* (1979) [Internet]. 2007 [cited 2024 Jun 22];317:666–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17673663/>
 24. Miranda Alves J, Borges Germano D, Jung Kim Y, Helfenstein Fonseca FA, Izar MC, Dorota Tuleta I, et al. Modulation of monocyte subtypes in diabetes after non-surgical periodontal treatment. *Clinical Oral Investigations*. 2023;27:6847–54.
 25. Oh SJ, Lee JK, Ok Sarah S. Aging and the Immune System: the Impact of Immunosenescence on Viral Infection, Immunity and Vaccine Immunogenicity. *Immune Netw*. 2019;16(6).
 26. Haynes L, Swain SL. Why Aging T Cells Fail: Implications for Vaccination. Vol. 24, *Immunity*. Cell Press; 2006. p. 663–6.
 27. Haynes L, Eaton SM, Burns EM, Randall TD, Swain SL. Newly generated CD4 T cells in aged animals do not exhibit age-related defects in response to antigen. *Journal of Experimental Medicine*. 2005 Mar 21;201(6):845–51.

28. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J, et al. T cells and aging, January 2002 update. [Internet]. Vol. 7, *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2002 [cited 2024 Jun 22]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/11378277_T_cells_and_aging_January_2002_update
29. Snyder MR, Muegge LO, Offord C, O'Fallon WM, Bajzer Z, Weyand CM, et al. Formation of the Killer Ig-Like Receptor Repertoire on CD4+CD28null T Cells. *The Journal of Immunology*. 2002 Apr 15;168(8):3839–46.
30. Goronzy JJ, Fulbright JW, Crowson CS, Poland GA, O'Fallon WM, Weyand CM. Value of Immunological Markers in Predicting Responsiveness to Influenza Vaccination in Elderly Individuals. *J Virol*. 2001 Dec 15;75(24):12182–7.
31. A. S. Staras S, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, F. Pass R, Cannon MJ. Seroprevalence of Cytomegalovirus Infection in the United States, 1988–1994. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2006 [cited 2024 Jun 22];43(9):1143–51. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/43/9/1143/425223?redirectedFrom=fulltext&login=false>
32. Hesson J, Fudge N, Grant M. Cytomegalovirus immunity, inflammation and cognitive abilities in the elderly. *Viruses*. 2021 Nov 1;13(11).
33. Schmaltz HN, P. Fried MD LP, Xue QL, Walston MD J, Leng MD SX, Semba MD RD. Chronic Cytomegalovirus Infection and Inflammation Are Associated with Prevalent Frailty in Community-Dwelling Older Women. *Jornal of the American Geriatrics Society* [Internet]. 2005 [cited 2024 Jun 22];53(5):747–54. Available from: <https://agsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1532-5415.2005.53250.x>
34. Davies EL, Noor M, Lim EY, Houldcroft CJ, Okecha G, Atkinson C, et al. HCMV carriage in the elderly diminishes anti-viral functionality

of the adaptive immune response resulting in virus replication at peripheral sites. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Dec 15;13. Available from:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1083230/full>

35. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: From bench to bedside. Vol. 22, *Clinical Microbiology Reviews*. 2009. p. 76–98.
36. Sezgin E, An P, Winkler CA. Host genetics of cytomegalovirus (CMV) pathogenesis. Vol. 10, *Frontiers in Genetics*. Frontiers Media S.A.; 2019.
37. Dinnon KH, Leist SR, Schäfer A, Edwards CE, Martinez DR, Montgomery SA, et al. A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. *Nature*. 2020 Oct 22;586(7830):560–6.
38. Park A, Iwasaki A. Type I and Type III Interferons – Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2020 Jun 10;27(6):870–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312820302900>
39. Cecília De Lima Torres K, De P, Pereira A, França De Lima GS, Souza BR, Marques De Miranda D, et al. Immunosenescence. *Geriatrics, Gerontology and Aging* [Internet]. 2011 [cited 2024 Jun 22];5(3). Available from: <https://www.ggaging.com/summary/22>
40. Nardy A, Camargo CTS, Oliveira YFC de, Silva FC da, Almeida MS de, Monteiro FR, et al. Assessment of the Interferon-Lambda-3 Polymorphism in the Antibody Response to COVID-19 in Older Adults Seropositive for CMV. *Vaccines (Basel)*. 2023 Feb 1;11(2).
41. Instituto Butantan. Vacinação contra Covid-19 no Brasil completa 1 ano com grande impacto da CoronaVac na redução de hospitalizações e mortes. 2022 [cited 2024 Oct 26]; Available from: <https://butantan.gov.br/noticias/vacinacao-contracovid-19-no->

brasil-completa-1-ano-com-grande-impacto-da-coronavac-na-reducao-de-hospitalizacoes-e-mortes

42. SINOVAC LIFE SCIENCES CO. CORONAVAC [Bula]. China. SINOVAC LIFE SCIENCES CO., LTD. [Internet]. 2021 [cited 2024 Jun 1]. Available from: https://vacinacovid.butantan.gov.br/assets/arquivos/Bulas_Anvisa/20210806profissional.pdf
43. Santos VC, Santos AC. EXERCÍCIO FÍSICO E SEUS EFEITOS SOBRE O SISTEMA IMUNE DOS IDOSOS. Saúde e Pesquisa - Unicesumar [Internet]. 2010 Jun [cited 2024 Oct 26];3(2). Available from: <https://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/1557>
44. Johnson SA, Cambier JC. Ageing, autoimmunity and arthritis: Senescence of the B cell compartment - Implications for humoral immunity. Vol. 6, Arthritis Research and Therapy. 2004. p. 131–9.
45. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. Behav Res Methods. 2007 May;39(2):175–91.
46. C. Petrini. Helsinki 50 years on. Clin Ter. 2014;165(4).
47. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução n° 466, de 12 de dezembro de 2012. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 2013;
48. Wendel S, Kutner JM, Machado R, Fontão-Wendel R, Bub C, Fachini R, et al. Screening for SARS-CoV-2 antibodies in convalescent plasma in Brazil: Preliminary lessons from a voluntary convalescent donor program. Transfusion (Paris). 2020 Dec 1;60(12):2938–51.
49. Araujo DB, Machado RRG, Amgarten DE, Malta F de M, de Araujo GG, Monteiro CO, et al. SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in Brazil and establishment of a coordinated task network. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2020;115:1–8.

50. Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, Dickensheets H, et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet* [Internet]. 2013 Feb 6;45(2):164–71. Available from: <https://www.nature.com/articles/ng.2521>
51. Silva BR, Monteiro FR, Cezário K, Amaral JB do, Paixão V, Almeida EB, et al. Older Adults Who Maintained a Regular Physical Exercise Routine before the Pandemic Show Better Immune Response to Vaccination for COVID-19. *Int J Environ Res Public Health*. 2023 Jan 20;20(3):1939.
52. Weinberger B. Vaccines and Vaccination against SARS-CoV-2: Considerations for the Older Population. *Vaccines (Basel)*. 2021 Dec 4;9(12):1435.
53. McDonald I, Murray SM, Reynolds CJ, Altmann DM, Boyton RJ. Comparative systematic review and meta-analysis of reactogenicity, immunogenicity and efficacy of vaccines against SARS-CoV-2. *NPJ Vaccines*. 2021 May 13;6(1):74.
54. Rugwizangoga B, Andersson ME, Kabayiza JC, Nilsson MS, Ármannsdóttir B, Aurelius J, et al. IFNL4 Genotypes Predict Clearance of RNA Viruses in Rwandan Children With Upper Respiratory Tract Infections. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2019 Oct 4;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2019.00340/full>
55. Amodio E, Pipitone RM, Grimaudo S, Immordino P, Maida CM, Prestileo T, et al. SARS-CoV-2 Viral Load, IFN λ Polymorphisms and the Course of COVID-19: An Observational Study. *J Clin Med*. 2020 Oct 15;9(10):3315.
56. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*. 2004 Dec 11;202(1):8–32.

57. Roohi A, Soroosh P. May interferon λ be a novel therapeutic approach against COVID-19? *Med Hypotheses*. 2021 Jan;146:110351.
58. Bravo D, Solano C, Giménez E, Remigia MJ, Corrales I, Amat P, et al. Effect of the IL28B Rs12979860 C/T polymorphism on the incidence and features of active cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell transplant patients. *J Med Virol*. 2014 May 27;86(5):838–44.
59. Bennett JM, Glaser R, Malarkey WB, Beversdorf DQ, Peng J, Kiecolt-Glaser JK. Inflammation and reactivation of latent herpesviruses in older adults. *Brain Behav Immun*. 2012 Jul;26(5):739–46.
60. Chanouzas D, Sagmeister M, Faustini S, Nightingale P, Richter A, Ferro CJ, et al. Subclinical Reactivation of Cytomegalovirus Drives CD4+CD28null T-Cell Expansion and Impaired Immune Response to Pneumococcal Vaccination in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody–Associated Vasculitis. *J Infect Dis*. 2019 Jan 7;219(2):234–44.
61. Yeh AC, Varelias A, Reddy A, Barone SM, Olver SD, Chilson K, et al. CMV exposure drives long-term CD57+ CD4 memory T-cell inflation following allogeneic stem cell transplant. *Blood*. 2021 Dec 30;138(26):2874–85.
62. Dhital R, Anand S, Graber B, Zeng Q, Velazquez VM, Boddada SR, et al. Murine cytomegalovirus promotes renal allograft inflammation via Th1/17 cells and IL-17A. *American Journal of Transplantation*. 2022 Oct;22(10):2306–22.
63. Kilgour AH, Firth C, Harrison R, Moss P, Bastin ME, Wardlaw JM, et al. Seropositivity for CMV and IL-6 levels are associated with grip strength and muscle size in the elderly. *Immunity & Ageing*. 2013 Dec 13;10(1):33.
64. Leng SX, Margolick JB. Aging, sex, inflammation, frailty, and CMV and HIV infections. *Cell Immunol*. 2020 Feb;348:104024.

65. Roberts ET, Haan MN, Dowd JB, Aiello AE. Cytomegalovirus Antibody Levels, Inflammation, and Mortality Among Elderly Latinos Over 9 Years of Follow-up. *Am J Epidemiol*. 2010 Aug 15;172(4):363–71.
66. Pera A, Campos C, López N, Hassouneh F, Alonso C, Tarazona R, et al. Immunosenescence: Implications for response to infection and vaccination in older people. *Maturitas*. 2015 Sep;82(1):50–5.
67. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14^{dim} Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity*. 2010 Sep;33(3):375–86.
68. Puissant-Lubrano B, Apoil PA, Guedj K, Congy-Jolivet N, Roubinet F, Guyonnet S, et al. Distinct effect of age, sex, and CMV seropositivity on dendritic cells and monocytes in human blood. *Immunol Cell Biol*. 2018 Jan 17;96(1):114–20.
69. de Pablo-Bernal RS, Cañizares J, Rosado I, Galvá MI, Alvarez-Ríos AI, Carrillo-Vico A, et al. Monocyte Phenotype and Polyfunctionality Are Associated With Elevated Soluble Inflammatory Markers, Cytomegalovirus Infection, and Functional and Cognitive Decline in Elderly Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2016 May;71(5):610–8.
70. Guetta E, Guetta V, Shibutani T, Epstein SE. Monocytes Harboring Cytomegalovirus: Interactions With Endothelial Cells, Smooth Muscle Cells, and Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Circ Res*. 1997 Jul;81(1):8–16.
71. Yew KH, Carpenter C, Duncan RS, Harrison CJ. Human Cytomegalovirus Induces TLR4 Signaling Components in Monocytes Altering TIRAP, TRAM and Downstream Interferon-Beta and TNF-Alpha Expression. *PLoS One*. 2012 Sep 7;7(9):e44500.
72. Smith PD, Shimamura M, Musgrove LC, Dennis EA, Bimczok D, Novak L, et al. Cytomegalovirus Enhances Macrophage TLR Expression and MyD88-Mediated Signal Transduction To Potentiate

- Inducible Inflammatory Responses. *The Journal of Immunology*. 2014 Dec 1;193(11):5604–12.
73. de Pablo-Bernal RS, Cañizares J, Rosado I, Galva MI, Alvarez-Ríos AI, Carrillo-Vico A, et al. Monocyte Phenotype and Polyfunctionality Are Associated With Elevated Soluble Inflammatory Markers, Cytomegalovirus Infection, and Functional and Cognitive Decline in Elderly Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2016 May;71(5):610–8.
 74. Ren X, Mou W, Su C, Chen X, Zhang H, Cao B, et al. Increase in Peripheral Blood Intermediate Monocytes is Associated with the Development of Recent-Onset Type 1 Diabetes Mellitus in Children. *Int J Biol Sci*. 2017;13(2):209–18.
 75. Affandi AJ, Olesek K, Grabowska J, Nijen Twilhaar MK, Rodríguez E, Saris A, et al. CD169 Defines Activated CD14+ Monocytes With Enhanced CD8+ T Cell Activation Capacity. *Front Immunol*. 2021 Jul 28;12.
 76. FRANCESCHI C, BONAFE 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 Jun 25;908(1):244–54.
 77. 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+ T-Cell Profiles. *Front Immunol*. 2021 Oct 12;12.
 78. Annibali O, Piccioni L, Tomarchio V, Circhetta E, Sarlo C, Franceschini L, et al. Impact of IFN lambda 3/4 single nucleotide polymorphisms on the cytomegalovirus reactivation in autologous stem cell transplant patients. Ciccozzi M, editor. *PLoS One* [Internet]. 2018 Jul 23;13(7):e0200221. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0200221>

79. Corrales I, Solano C, Amat P, Giménez E, de la Cámara R, Nieto J, et al. IL28B genetic variation and cytomegalovirus-specific T-cell immunity in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Med Virol*. 2017 Apr 14;89(4):685–95.
80. Kim J, Kim AR, Shin EC. Cytomegalovirus Infection and Memory T Cell Inflation. *Immune Netw*. 2015;15(4):186.
81. Effros RB. The silent war of CMV in aging and HIV infection. *Mech Ageing Dev*. 2016 Sep;158:46–52.
82. Weltevrede M, Eilers R, de Melker HE, van Baarle D. Cytomegalovirus persistence and T-cell immunosenescence in people aged fifty and older: A systematic review. *Exp Gerontol*. 2016 May;77:87–95.
83. Giacconi R, Cardelli M, Piacenza F, Pierpaoli E, Farnocchia E, Di Rosa M, et al. Effect of Cytomegalovirus Reactivation on Inflammatory Status and Mortality of Older COVID-19 Patients. *Int J Mol Sci*. 2023 Apr 6;24(7):6832.
84. Lee JS, Shin EC. The type I interferon response in COVID-19: implications for treatment. *Nat Rev Immunol*. 2020 Oct 12;20(10):585–6.
85. Delannoy A, Hober D, Bouzidi A, Wattre P. Role of Interferon Alpha (IFN- α) and Interferon Gamma (IFN- γ) in the Control of the Infection of Monocyte-Like Cells with Human Cytomegalovirus (HCMV). *Microbiol Immunol*. 1999 Dec 14;43(12):1087–96.
86. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, et al. IL-28B (IFN- λ 3) e IFN- α inibem sinergicamente a replicação do VHC. *J Viral Hepat*. 2013 Apr 7;20(4):281–9.
87. Silva AMV da, Alvarado-Arnez LE, Azamor T, Batista-Silva LR, Leal-Calvo T, Bezerra OC de L, et al. Interferon-lambda 3 and 4 Polymorphisms Increase Sustained Virological Responses and Regulate Innate Immunity in Antiviral Therapy With Pegylated Interferon-Alpha. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Jul 7;11.

88. Tong MZ, Sng JD, Carney M, Cooper L, Brown S, Lineburg KE, et al. Elevated BMI reduces the humoral response to SARS-CoV-2 infection. *Clin Transl Immunology*. 2023 Jan 3;12(12).
89. Connors J, Bell MR, Marcy J, Kutzler M, Haddad EK. The impact of immuno-aging on SARS-CoV-2 vaccine development. *Geroscience*. 2021 Feb 11;43(1):31–51.
90. Hu J, Zhao M, Zhao Y, Dong W, Huang X, Zhang S. Increased body mass index linked to decreased neutralizing antibody titers of inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthcare workers. *Obes Sci Pract*. 2023 Feb 30;9(1):23–9.

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

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

Continuação do Parecer: 4.350.476

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

Continuação do Parecer: 4.350.476

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

Continuação do Parecer: 4.350.476

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_BASICAS_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	19/06/2020 21:07:57	Andre Luis Lacerda Bachi	Aceito
Outros	Cartas_Plataforma_Brasil.pdf	19/06/2020 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))**

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