



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JOYCE THAYANE DA CONCEIÇÃO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE UM ANO PÓS-VACINAÇÃO COM
CORONAVAC EM IDOSOS E PROFISSIONAIS EM INSTITUIÇÕES DE LONGA
PERMANÊNCIA**

SÃO CRISTÓVÃO – SE

2024

JOYCE THAYANE DA CONCEIÇÃO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE UM ANO PÓS-VACINAÇÃO COM
CORONAVAC EM IDOSOS E PROFISSIONAIS EM INSTITUIÇÕES DE
LONGA PERMANÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Sergipe como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Marta Schimieguel Mascarenhas Lima

Linha de pesquisa: Desenvolvimento e controle e uso de fármacos e medicamentos

SÃO CRISTÓVÃO – SE

2024

DEDICATÓRIA

“Dedico o presente trabalho aos meus pais, que foram meu maior apoio nos momentos de angústia e fez esse sonho se tornar um sonho possível”.

AGRADECIMENTOS

Ao alcançar este momento significativo, não posso deixar de expressar minha profunda gratidão a Deus. A conclusão deste mestrado não seria possível sem o apoio inabalável da minha orientadora, cujas palavras de incentivo foram faróis orientadores em tempos de incerteza.

À minha família, em especial à minha mãe, Jeane, e ao meu pai, Cosme, cujo amor e apoio foram a força motriz ao longo desta jornada, à minha irmã, Taty, aos meus tios e tias, em especial tia Arlete, e aos meus primos e primas, agradeço por acreditarem em mim nos momentos mais desafiadores.

Agradeço ao meu trio preferido, Jorge, Isadora e Edson, por sempre estarem comigo em todos os momentos e por me ouvirem reclamar por dois anos. Eu amo vocês. Aos amigos das saídas, Jomario, Alleh, Laís, Livia e Douglas, obrigado por compartilharem risos, desafios e aprendizados valiosos. Aos meus melhores amigos, Bianca, Bruno, Cainã, Lucas, Giusep, Lu e Yago, por sempre segurarem minha mão quando preciso e estarem sempre ali contribuindo para minha sanidade mental. Às meninas do BG das minas, em especial a Nessa, Fernanda, Giovanna, Luana, Luh e Milena, por todas as vezes em que eu não queria fazer nada nem existir, sempre surgia um joguinho para animar.

Agradeço aos meus amigos de laboratório, em especial a Melissa, Chuan e Lucas, cuja presença tornou minha jornada de trabalho mais significativa e prazerosa. Agradeço sinceramente pela colaboração, apoio e camaradagem ao longo deste período. E não posso deixar de agradecer à minha dupla, Márcia, essa jornada não foi fácil, mas foi mais leve com você.

À CAPES, FAPITEC-SE e CNPQ pelo auxílio financeiro que viabilizou a execução deste projeto. Além da Universidade Federal de Sergipe, pela estrutura oferecida, essencial à realização deste trabalho.

Cada página escrita nesta dissertação é um testemunho do esforço coletivo e das horas dedicadas. Este fim é também um novo começo, e levo comigo as lições, as amizades e as memórias que moldaram esta jornada. Que este agradecimento transmita o meu profundo apreço por cada contribuição e por todos que tornaram este capítulo possível.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE UM ANO PÓS-VACINAÇÃO COM CORONAVAC EM IDOSOS E PROFISSIONAIS EM INSTITUIÇÕES DE LONGA PERMANÊNCIA. JOYCE THAYANE DA CONCEIÇÃO DOS SANTOS, SÃO CRISTOVÃO, 2024

Os grupos de risco como idosos e indivíduos com comorbidades estão associados às formas mais graves e maior taxa de mortalidade da COVID-19. Institutos de pesquisa em todo o mundo concentraram esforços no desenvolvimento de vacinas para controlar a pandemia, visando estabelecer memória imunológica contra o SARS-CoV-2 (síndrome aguda respiratória severa do coronavírus-2), e reduzir casos graves da doença. Este estudo teve como objetivo avaliar a imunidade humoral e celular em idosos e profissionais de instituições de longa permanência em Sergipe, um ano após a vacinação contra a COVID-19. A imunidade humoral foi avaliada empregando o imunoensaio de fluorescência para quantificação dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 IgG e IgM totais e IgG neutralizantes (nAb). A imunidade celular foi avaliada empregando imunofenotipagem por citometria de fluxo, utilizando o citômetro Attune NxT e o software FlowJo. A estratégia de análise foi a caracterização fenotípica e funcional das populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, *naive* e de memória (CD45RA/CCR7), e dos linfócitos NK (CD69). Foram avaliados 175 indivíduos, sendo 139 idosos e 36 profissionais. A maioria foi do sexo feminino (64%), com idade variando de 60 a 102 anos entre os idosos (M=79,4) e de 26 a 50 anos (M=42) ($p < 0,00001$). Observou-se que a positividade dos testes de anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 foi semelhante em ambos os grupos, 98,5% no grupo idoso e 100% no grupo profissional ($p=0,1306$), demonstrando resposta robusta ao vírus SARS-CoV-2. Os anticorpos IgM foram detectados em 35% dos idosos e 22% dos profissionais, enquanto os anticorpos IgG foram detectados em 85% dos idosos e 94,4% dos profissionais. Na análise longitudinal 90 dias (D90) e 360 (D360) dias após a vacinação, observou-se que a presença de nAb foi maior no D360 com 100% em ambos os grupos, e apenas 63% dos idosos e 65,2% dos profissionais no D90. Os anticorpos IgG foram detectados em 77% (D90) e 90% (D360) dos idosos, e 87 e 100% dos profissionais respectivamente ($p=0,0371$ e $0,0035$), sugerindo efeito benéfico da dose de reforço na vacinação. A imunidade celular foi avaliada em 19 indivíduos, 12 idosos com idade variando de 65 a 89 anos (M=77), e sete profissionais com idades de 24 a 59 anos (M=40). Foi demonstrado aumento na expressão dos linfócitos T CD4⁺ nos idosos em comparação aos profissionais, sendo o fenótipo *Effector Memory* com maior expressão nos idosos. Entre os linfócitos T CD8⁺, o fenótipo *naive* apresentou redução na expressão no grupo de idosos. A análise dos linfócitos *natural killer* (NK) evidenciou aumento na expressão de linfócitos NK ativados nos idosos. Em conclusão, não houve diferença na resposta imune humoral entre idosos e profissionais, sugerindo eficácia da vacinação independentemente da idade. Além disso, a análise celular revelou que os idosos apresentaram maior expressão de linfócitos T CD4⁺, especialmente os de memória efetora, e linfócitos NK ativados. Estes resultados contribuem para a compreensão da resposta imunológica, no desenvolvimento de estratégias de vacinação para proteger a população das formas mais graves da COVID-19, especialmente os grupos mais vulneráveis.

PALAVRAS-CHAVE: SARS-CoV-2, vacinas, idosos, COVID-19.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE IMMUNE RESPONSE ONE YEAR AFTER VACCINATION WITH CORONAVAC IN THE ELDERLY AND PROFESSIONALS IN LONG-STAY INSTITUTIONS. JOYCE THAYANE DA CONCEÇÃO DOS SANTOS, SÃO CRISTOVÃO, 2024

Risk groups such as the elderly and individuals with comorbidities are associated with the most severe forms and higher mortality rates of coronavirus disease (COVID-19). Research institutes around the world have focused efforts on the development of vaccines to control the pandemic, aiming to establish immunological memory against SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome from coronavirus-2), and reduce severe cases of the disease. This study aimed to evaluate humoral and cellular immunity in elderly people and professionals from long-term care facilities in Sergipe, one year after vaccination against COVID-19. Humoral immunity was assessed using fluorescence immunoassay to quantify total anti-SARS-CoV-2 IgG and IgM antibodies and neutralizing IgG (nAb). Cellular immunity was assessed using flow cytometry immunophenotyping, using the Attune NxT cytometer and FlowJo software. The analysis strategy was the phenotypic and functional characterization of populations of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, naïve and memory (CD45RA/CCR7), and NK lymphocytes (CD69). 175 individuals were evaluated, 139 of whom were elderly and 36 that were professionals. The majority were female (64%), with ages ranging from 60 to 102 years old (M=79.4) and from 26 to 50 years old (M=42) ($p < 0.00001$). It was observed that the average anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibody tests were similar in both groups, 98.5% in the elderly group and 100% in the professional group ($p=0.1306$), demonstrating a strong response to the virus SARS-CoV-2. IgM antibodies were detected in 35% of elderly people and 22% of professionals, while IgG antibodies were detected in 85% of elderly people and 94.4% of professionals. In the longitudinal analysis 90 days (D90) and 360 (D360) days after vaccination, it was observed that the presence of nAb was higher on D360 with 100% in both groups, and only 63% of the elderly and 65.2% of the professionals on the D90. IgG antibodies were detected in 77% (D90) and 90% (D360) of the elderly, and 87 and 100% of professionals respectively ($p=0.0371$ and 0.0035), suggesting a beneficial effect of the booster dose in vaccination. Cellular immunity was assessed in 19 individuals, 12 elderly people aged between 65 and 89 years (M=77), and seven professionals aged between 24 and 59 years (M=40). An increase in the expression of CD4⁺ T lymphocytes was demonstrated in the elderly compared to professionals, with the Effector Memory phenotype being more pronounced in the elderly. Among CD8⁺ T lymphocytes, the naïve phenotype showed reduced expression in the elderly group. Analysis of natural killer (NK) lymphocytes showed an increase in the expression of activated NK lymphocytes in the elderly. In conclusion, there was no difference in the humoral immune response between the elderly and professionals, suggesting the effectiveness of vaccination regardless of age. Furthermore, cellular analysis revealed that the

elderly had a higher expression of CD4+ T lymphocytes, especially effector memory lymphocytes, and activated NK lymphocytes. These results contribute to the understanding of the immune response, in the development of vaccination strategies to protect the population from the most serious forms of COVID-19, especially the most vulnerable groups.

KEYWORDS: SARS-CoV-2, vaccines, elderly people, COVID-19.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1 COVID-19 e SARS-CoV-2	18
3.2 Fisiopatologia e Resposta imune à infecção pelo SARS-Cov-2.....	21
3.3 Vacinas contra a COVID-19.....	24
3.4 Imunossenescência.....	26
4 METODOLOGIA	28
4.1 Casuística, aspectos éticos e local de realização da pesquisa.....	28
4.2 Coleta e processamento das amostras	29
4.3 Detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 usando imunoensaio por fluorescência (FIA)	29
4.4 Sorologia de anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 (antígenos Spike RBD)	30
4.5 Obtenção de células mononucleares (CMN)	30
4.6 Estudo imunofenotípico	31
4.6.1 Estratégia de análise	32
4.7 Análises estatísticas	33
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	42
7 Conclusão	46
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICES	56
ANEXOS	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do vírus SARS-CoV-2.	19
Figura 2: Mecanismo de Infecção do Sars-Cov-2.....	22
Figura 3: Avaliação do anticorpo neutralizante nAb anti-SARS-CoV-2 em idosos e profissionais no D90 e D360.....	36
Figura 4: Análise das concentrações de anticorpos IgG-anti-SARS-CoV-2 em idosos e profissionais no D90 e D360.....	37
Figura 5: Avaliação da expressão das populações de Linfócitos T CD4+ entre os grupos analisados.....	39
Figura 6: Avaliação da expressão do perfil de memória <i>Efector memory</i> (CD45RA-CCR7-) nos LT CD4+ e <i>Naive</i> (CCR7+ CD45RA+) nos LT CD8+	39
Figura 7: Análise das subpopulações dos fenótipos de memória de linfócitos T CD4+ e CD8+ de um participante do grupo de idosos (VAC027) utilizando o software de análise <i>FlowJo</i>	40
Figura 8: Avaliação da expressão do marcador CD69 entre os grupos em analisados.....	41
Figura 9: Avaliação da expressão de CD56, e CD3 na população de linfócitos NK CD69+ entre os grupos em estudo.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Interpretação do resultado do teste com base no Índice *Cut-Off* (COI).

Tabela 2: Características dos participantes da pesquisa

Tabela 3: Resposta de anticorpos contra SARS-CoV-2 um ano após a vacinação com CoronaVac.

Tabela 4: Características dos participantes do estudo, com valores médios da expressão das populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e respectivos perfis de memória.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCR7	<i>CC-chemokine receptor 7</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
COI	<i>Cut-off Indices</i>
CoV	Coronavírus
COVID-19	<i>Corona Virus Disease - 2019</i>
D90	Coleta Após 90 dias da vacinação
D360	Coleta Após 360 dias da vacinação
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	Proteína de envelope do SARS-CoV-2
ECA-2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
EpiSERGIPE em Sergipe	Projeto Evolução da Prevalência de Infecção por SARS-CoV-2
FIA	Imunoensaio de Fluorescência
IFNs	Interferons
IFN-α	Interferon Alfa
IFN-β	Interferon Beta
IgA	Imunoglobulinas do tipo A
IgG	Imunoglobulinas do tipo G
IgM	Imunoglobulinas do tipo M
M	Proteína de transmembranar do SARS-CoV-2
MERS-CoV	Síndrome Respiratória do Coronavírus do Oriente Médio
N	Proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2
NK	células <i>Natural Killer</i>
nAb	<i>Neutralizing Antibody</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organizações das Nações Unidas
PNI	Programa Nacional de Imunização
RBD	Domínio de Ligação ao Receptor

RNA	Ácido Ribonucleico
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa Quantitativa
S	Proteína Spike do SARS-CoV-2
SARS-CoV	Síndrome Aguda Respiratória Severa do Coronavírus
SARS-CoV-2	Síndrome Aguda Respiratória Severa do Coronavírus 2
SRAG	Síndrome da insuficiência respiratória aguda grave
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TMPRSS2	Serina Protease Transmembranar 2
UFS	Universidade Federal de Sergipe

1 INTRODUÇÃO

A COVID-19 é uma doença causada pelo coronavírus SARS-CoV-2 identificada no final de 2019 em Wuhan, na China. A infecção provocou surtos e, devido à sua rápida disseminação em todo o mundo, em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 uma pandemia. Em maio de 2023, a OMS declarou o fim da COVID-19 como uma emergência de saúde pública, com aproximadamente 765 milhões de casos e mais de 7 milhões de mortes (Huang *et al.*, 2020; ONU, 2023).

Inicialmente acreditava-se que o vírus poderia ser menos patogênico que o SARS-CoV (Síndrome Aguda Respiratória Severa do Coronavírus) e o MERS-CoV (Síndrome Respiratória do Oriente Médio). No entanto, logo observou-se que sua patogenicidade superava seus antecessores e o SARS-CoV-2 rapidamente se tornou uma emergência internacional de saúde pública (Li *et al.*, 2023).

Os coronavírus são vírus de RNA envelopados pertencentes à família Coronaviridae, possuem um genoma de RNA extenso, com cerca de 26 a 32 quilobases. O SARS-CoV-2 possui RNA de cadeia simples e é constituído por quatro proteínas estruturais principais: a proteína do nucleocapsídeo (N), a proteína transmembranar (M), a proteína de envelope (E) e a proteína Spike (S) que tem duas subunidades - a S1 e a S2, sendo que a subunidade S1 possui o domínio de ligação ao receptor (RBD) responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira (Zhen *et al.*, 2020; Bai *et al.*, 2021).

O vírus é transmitido por meio de contato com gotículas ou superfícies contaminadas. Ele entra no hospedeiro pelas vias respiratórias, onde está presente a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2). Essa enzima é responsável por auxiliar na regulação da pressão sanguínea e é encontrada em diversos órgãos do trato respiratório, renal e digestivo. Isso explica o tropismo viral do SARS-CoV-2 pelo pulmão, rins e intestino delgado, uma vez que ele utiliza a ECA2 como receptor para adentrar a célula hospedeira. Quando a proteína S se acopla à ECA2, ela é ativada pela enzima serina protease transmembranar 2 (TMPRSS2), permitindo que o vírus entre na célula e libere o RNA presente em seu interior na célula hospedeira (Hao *et al.*, 2022; Lamers; Haagmans, 2022).

Quando o vírus entra no hospedeiro, desencadeia a resposta imune inata e adaptativa. Na resposta imunológica inata, a principal forma de bloqueio das infecções virais se dá através da indução da expressão dos interferons do tipo I (IFNs tipo I), e por células *natural killers* (NK) que provocam a morte de células infectadas constituindo um importante mecanismo de defesa inicial antes do desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa (Karkie; Kanneganti, 2022).

Células como T CD4+, células B e T CD8+ são as principais responsáveis pela resposta imune adaptativa. As células B produzem anticorpos em resposta ao antígeno, os anticorpos estimulam o sistema imunológico a formar células B de memória que produzem anticorpos neutralizantes. Estes anticorpos bloqueiam a ligação da proteína S com a ECA2, impedindo a entrada do vírus na célula hospedeira (Narasimhan *et al.*, 2021, Carrillo *et al.*, 2021; Koch *et al.*, 2021).

Os anticorpos produzem respostas às várias proteínas do SARS-CoV-2, em especial às proteínas S, N. A infecção estimula a produção de imunoglobulina A (IgA) imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG). Em outras ifecções a IgM é a primeira a ser produzida e indica que a doença está na fase aguda ou inicial, entretanto na COVID-19 a primeira a ser produzida é a IgA. A IgG é produzida após a fase aguda e permanece detectável durante um longo período, sendo um indicador da fase crônica, esta classe de imunoglobulinas é a mais detectadas em ensaios sorológicos (Bonanni *et al.*, 2021; Donno *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021; Yaugel-Nvovoa; Bourlet; Paul, 2022).

Os sintomas mais comuns no início da COVID-19 são febre, tosse, fadiga, produção de escarro, cefaleia, anosmia, hemoptise, diarreia, dispneia e linfopenia. Entretanto, os sinais da doença podem mudar de leves e moderados para agudos e se apresentarem de forma mais grave, principalmente em indivíduos com doenças crônicas, evoluindo rapidamente para síndrome da insuficiência respiratória aguda grave (SRAG) e, em casos extremos, para óbito (Bakhshandeh *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2020; Ye *et al.*, 2020).

Para conter a disseminação da COVID-19, foram adotadas diversas medidas, tais como a utilização de máscaras, a higienização das mãos, o distanciamento social, e com a vacinação como a principal delas. A vacinação é uma forma de adquirir proteção contra doenças infecciosas, pois o sistema imune é estimulado a produzir

anticorpos o que torna a resposta imunológica mais rápida e robusta em infecções futuras (Andryukov *et al.*, 2021; Chakraborty *et al.*, 2021; Fiolet *et al.*, 2022; Muik *et al.*, 2021; Rotondo *et al.*, 2021).

No Brasil foram incluídas no Plano Nacional de Imunização (PNI) quatro vacinas para uso emergencial com diferentes tecnologias: *CoronaVac* com vírus inativo, *Janssen Vaccine* com vetores de adenovírus sorotipo 26 (Ad26), *AstraZeneca* com vetor adenovírus recombinante e *Pfizer-Wyeth* com RNA mensageiro sintético (ANVISA, 2021).

A *CoronaVac* é uma vacina de vírus inativado produzida pela indústria farmacêutica chinesa *Sinovac* e o Instituto Butantan. O imunizante obteve, nos estudos iniciais, eficácia de 50,38%, prevenindo em até 85% os casos graves da doença, atualmente a eficácia é de 65,7%. A vacina é aplicada em um esquema de duas doses com intervalo de 21 dias, apresentando baixo índice de reações alérgicas (0,3%) e sem registro de riscos a efeitos adversos graves após sua administração (Dundar *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2022).

Não se sabe ainda a duração da imunidade conferida pelo imunizante contra a COVID-19; alguns trabalhos sugerem que a imunidade mediada por anticorpos pode durar por pelo menos seis meses após imunização, mas, ao longo do tempo, tende a diminuir a atividade neutralizante, estando incerto ainda por quanto tempo o imunizante oferece proteção (Barouch, *et al.*, 2021; Doria-Rose *et al.*, 2021; Naaber *et al.*, 2021; Pegu *et al.*, 2021; Loch, 2020). Foi aprovada uma terceira e quarta doses de reforço inicialmente para indivíduos com comorbidades, idosos e profissionais de saúde, após seis meses do esquema vacinal completo e, posteriormente, foi estendido para toda a população maior de 18 anos, com um intervalo de quatro meses da dose anterior (ANVISA, 2021; Brasil, 2021b; Brasil, 2021c).

Por ser um grupo que desenvolve mais facilmente a forma grave da COVID-19, a vacinação dos idosos foi priorizada, mesmo ainda não existindo estratégia uniforme para imunizar esta faixa etária e avaliar sua eficiência. Com o avanço da idade, o sistema imunológico passa por alterações que prejudicam a resposta imune no espaço e tempo, processo denominado de imunossenescência. Em idosos, distúrbios em decorrência das comorbidades e imunossenescência aumentam a probabilidade de desenvolver uma tempestade de citocinas induzida por vírus, acarretando um

aumento excessivo da resposta imunológica que atrai células inflamatórias para dentro do tecido pulmonar, causando danos aos pulmões e ao sistema respiratório como um todo (Cunha *et al.*, 2020; Nikolich-Zugich *et al.*, 2020; Perrota *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020).

Partindo desse pressuposto, tornou-se relevante avaliar a resposta imunológica conferida após um ano do esquema completo vacinal de idosos residentes de instituições de longa permanência, visto que essa população foi uma das primeiras a receber o imunizante e, ainda assim, há na literatura uma escassez de estudos que investiguem a resposta imunológica humoral e celular nesse grupo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a imunidade humoral mediante a produção de anticorpos totais e neutralizantes e a imunidade celular por meio da análise de linfócitos T um ano pós-vacinação em idosos e profissionais de instituições de longa permanência.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a presença de anticorpos neutralizantes um ano pós-imunização contra a COVID-19;
- Comparar a resposta imunológica humoral um ano pós-imunização contra COVID-19 entre o grupo de idosos e de profissionais;
- Comparar a resposta imunológica humoral 90 e 360 dias pós-imunização contra a COVID-19.
- Avaliar a expressão de linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+ um ano pós-imunização contra a COVID-19.
- Avaliar a expressão de CD69 em linfócitos NK (natural-killer) nos idosos e grupo controle e realizar a quantificação das NK e NKTs.

3 REVISÃO DA LITERATURA

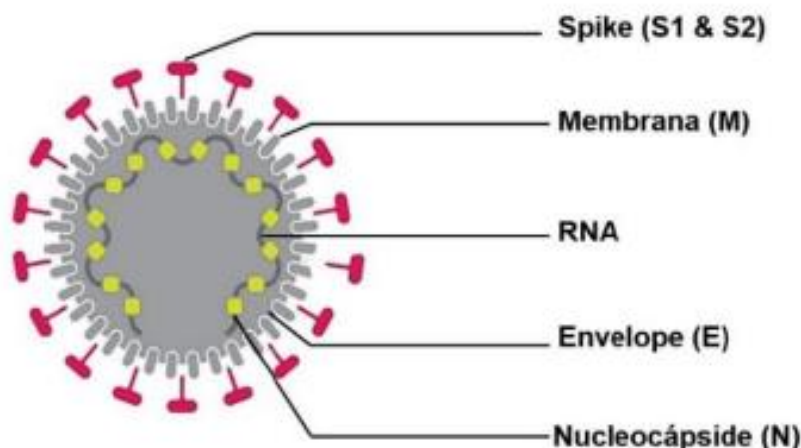
3.1 COVID-19 e SARS-CoV-2

Em 2019, casos de pneumonia grave de origem desconhecida foram detectados na cidade de Wuhan, na China. Logo, as autoridades nacionais do país notificaram à OMS o aparecimento da síndrome, que ainda não tinha uma etiologia definida. O comitê de estudos da família coronaviridae identificou sua semelhança com o SARS-CoV, sendo denominado de SARS-CoV-2, e a doença oriunda do vírus recebeu o nome de COVID-19 (Rabaan *et al.*, 2020; Hasöksüz *et al.*, 2020).

Acreditava-se que a doença poderia ser menos patogênica quando comparada aos surtos das duas últimas décadas causados pelos coronavírus SARS-CoV e MERS-CoV, na China e Arábia Saudita, respectivamente. No entanto, essa hipótese foi rapidamente descartada, e devido à sua rápida disseminação e alto índice de contágio, tornou-se um problema de saúde pública mundial. A pandemia do SARS-CoV-2, juntamente com seu impacto social e econômico global sem precedentes, marcou a terceira introdução zoonótica de um coronavírus altamente patogênico na população humana. As duas introduções zoonóticas anteriores foram as do SARS-CoV e do MERS-CoV (Alsafi 2022; Irani 2022).

Os coronavírus possuem genes na região ORF1 (*Open Reading Frame 1*) que codificam proteínas para a replicação do vírus, nucleocapsídeo e formação da Spike. O vírion contém um nucleocapsídeo composto por proteína fosforilada nucleocapsídeo (N) e RNA genômico. Esse nucleocapsídeo está revestido por dois tipos de proteínas: glicoproteína Spike (S), encontrada em todos os CoVs, e a hemaglutinina-esterase (HE), presente apenas em alguns CoVs. A glicoproteína Spike (S) é responsável pela fixação e entrada do vírus na célula hospedeira. As proteínas da membrana (M) (glicoproteína transmembrana tipo III) e a proteína do envelope (E) estão localizadas entre a proteína S e o envelope do vírus (Figura 1). Os coronavírus receberam esse nome devido à aparência característica em forma de coroa (do Latim, corona) (Li *et al.*, 2020; Gusev *et al.*, 2022; Zhu *et al.*, 2020). A similaridade na sequência da proteína Spike entre o SARS-CoV-2 e o SARS-CoV é de aproximadamente 76-78%. O RBD sozinho compartilha uma similaridade de 73-76% (Hoffman *et al.* 2021; Letko *et al.*, 2020; Wan *et al.*, 2020).

Figura 1: Estrutura do vírus SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de Bio-Rad e Muralidar (Bio-Rad & Laboratories, 2022; Muralidar *et al.*, 2020).

Como outros vírus de RNA, o SARS-CoV-2, embora se adapte aos seus novos hospedeiros humanos, é propenso à evolução genética com o desenvolvimento de mutações ao longo do tempo, resultando em variantes que podem apresentar características diferentes de suas cepas ancestrais. Diversas variantes do SARS-CoV-2 foram descritas durante o curso desta pandemia, entre as quais apenas algumas são consideradas variantes preocupantes, como a variante Delta (B.1.617.2) e a variante Ômicron (B.1.1.529), devido ao seu alto grau de transmissibilidade e aumento da virulência, impactando na saúde pública (Cascella *et al.*, 2023; WHO, 2023).

As mutações do vírus podem afetar o reconhecimento do sistema imunológico, a transmissibilidade do vírus e/ou o grau de agressividade da infecção. Algumas dessas mutações proporcionam vantagens evolutivas que favorecem a seleção de variantes. Essas variantes podem surgir devido às deleções genéticas, não sinônimas, inserções e substituições (Mistry *et al.*, 2021).

A doença é transmitida por inalação ou contato com gotículas infectadas, e o período de incubação varia de 2 a 14 dias. Os sintomas mais comuns incluem febre, tosse, dor de garganta, falta de ar, fadiga e mal-estar, entre outros. Muitas pessoas são assintomáticas e a doença se manifesta de forma leve na maioria dos indivíduos; no entanto, em algumas (geralmente idosos e aqueles com comorbidades), pode

evoluir para pneumonia, síndrome respiratória aguda grave (SRAG) e disfunção de múltiplos órgãos (Singhal, 2020; Mohamadian *et al.*, 2021; Salian *et al.* 2021).

De acordo com dados epidemiológicos registrados pela OMS divulgados até janeiro de 2024, a pandemia da COVID-19, contabilizando desde o primeiro caso em 2019 até o momento, alcançou a marca de 765 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo. Destas, mais de 7 milhões perderam a vida devido a complicações da doença (ONU, 2024).

No Brasil, o primeiro caso foi notificado em 26 de fevereiro, na cidade de São Paulo. A infecção então se espalhou para vários estados. Até janeiro de 2024, totalizaram-se 38.374.307 casos confirmados, sendo 707.470 óbitos desde o início da pandemia, com uma taxa de mortalidade de 336,7 dos infectados e uma incidência de 18.108,8 a cada 100 mil habitantes e uma letalidade de 1,9%. Cerca de 6 mil destes óbitos, aconteceram em Sergipe, acarretando uma mortalidade de 284,5 a cada 100 mil habitantes. Em 05 de maio de 2023, a OMS declarou o fim da COVID-19 como emergência de saúde pública (Brasil, 2024; ONU, 2023).

O diagnóstico da infecção é realizado por meio da identificação do vírus ou de seus antígenos, utilizando testes moleculares ou testes de detecção de antígenos. O padrão-ouro para essa análise é a qRT-PCR (Reação da Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa, em tradução livre), que apresenta alta sensibilidade e especificidade. Este teste é utilizado para detectar infecções recentes, confirmando a presença do RNA do vírus. Os testes imunocromatográficos detectam de forma qualitativa antígenos virais presentes no vírus. As amostras analisadas nesses testes são provenientes de material retirado das vias respiratórias, como nariz ou garganta (Xun *et al.*, 2021; Yüce *et al.*, 2021).

Os testes sorológicos não são mais utilizados para diagnóstico, entretanto, desempenham um papel complementar importante ao monitorar a resposta humoral à infecção por SARS-CoV-2 e às vacinas da COVID-19. A partir de uma amostra de soro, é possível avaliar a presença de anticorpos IgM e IgG, os quais são produzidos pelo sistema imune em resposta à infecção viral (Asselah *et al.*, 2021; Böger, 2021).

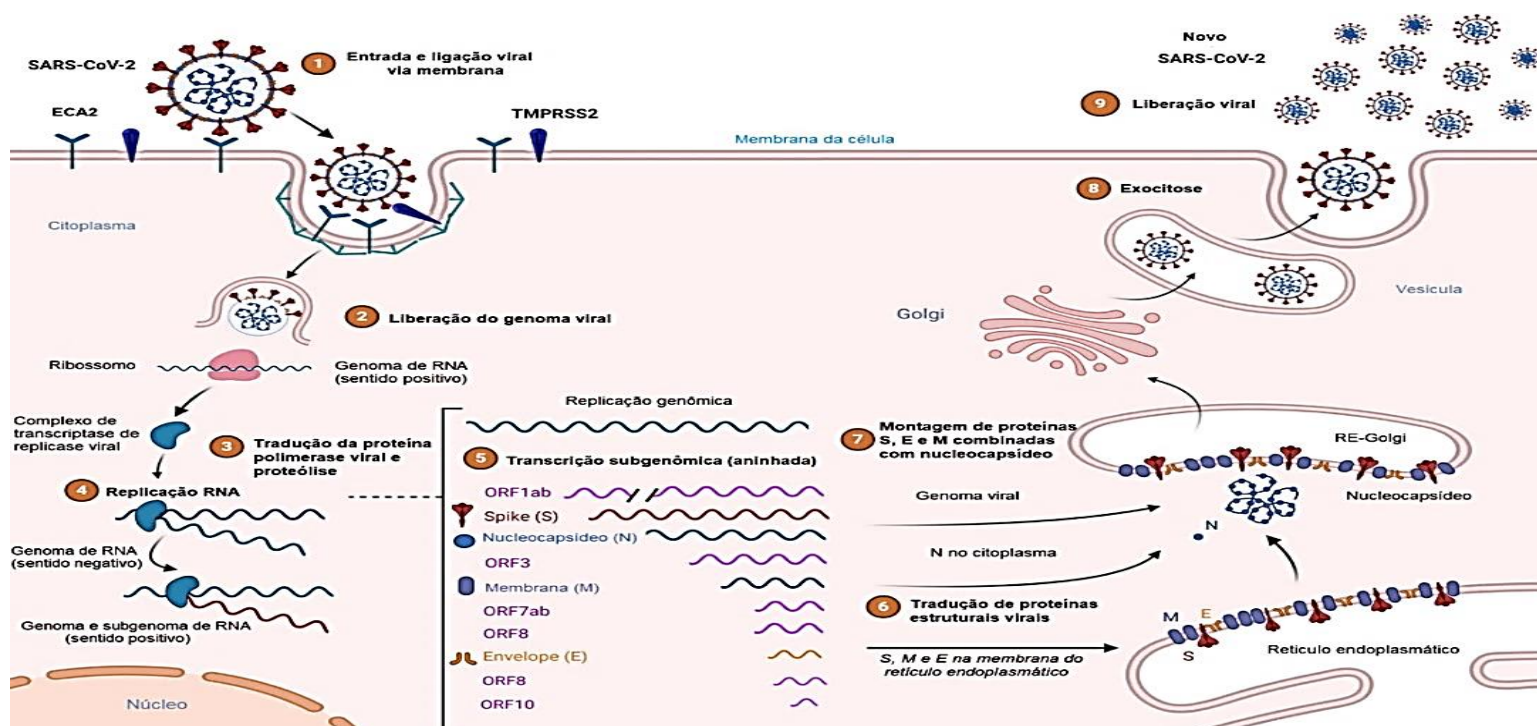
3.2 Fisiopatologia e Resposta imune à infecção pelo SARS-CoV-2

O mecanismo fisiopatológico da infecção pelo SARS-CoV-2 descreve que a infecção e disseminação do coronavírus acontece quando este se liga aos receptores da enzima conversora de angiotensina (ECA2) na superfície da célula-alvo. Em seguida, o receptor ECA2 é clivado pela enzima serina protease transmembranar 2 (TMPRSS2) que resulta na ativação da proteína *Spike* através da qual o vírus entra na célula (figura 2) (Azkur *et al.*, 2020; Malone *et al.*, 2022).

A expressão e distribuição dos receptores de entrada influenciam, consequentemente, o tropismo viral e a patogenicidade. A ECA2 é expressa em órgãos do sistema respiratório, renal e digestivo, levando ao tropismo viral do SARS-CoV-2 por tecidos do pulmão, rim e intestino delgado (Ahlawat *et al.*, 2020). Durante o ciclo de vida intracelular, os coronavírus expressam e replicam seu ácido ribonucleico (RNA) genômico para produzir cópias completas incorporadas às partículas virais recém-produzidas. Esses genomas de RNA são notavelmente flanqueados por regiões 5' e 3' não traduzidas, contendo estruturas secundárias de RNA que desempenham um papel crucial na síntese viral (V'kovski *et al.*, 2021; Ricardo-Lax *et al.*, 2021).

As mutações que ocorreram no SARS-CoV-2 levaram a uma alta afinidade da proteína Spike com o receptor celular ECA-2 e inibição das respostas imunológicas. Isso se deve a um revestimento que oculta os glicanos na superfície do vírus, tornando-o mais virulento e patogênico. A semelhança genética entre o SARS-CoV-2 e outros coronavírus, como o SARS-CoV e MERS-CoV, foi observada, mas os anticorpos produzidos contra o SARS-CoV não reconhecem a proteína Spike do SARS-CoV-2 (Ricci *et al.*, 2021; Sreepadmanabh; Sahu; Chande, 2020).

Figura 2. Mecanismo de Infecção do Sars-CoV-2.



Fonte: Adaptado de Azkur *et al.*, 2020.

Legenda: Ligação do vírus, internalização às células epiteliais e replicação. Representação gráfica das organizações genômicas e subgenômicas do SARS-CoV, com destaque para o SARS-CoV-2, que utiliza o receptor ACE2 e a protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) para adentrar a célula hospedeira. Após a entrada no citoplasma celular, o RNA genômico; os dois grandes quadros de leitura abertos (ORFs) são traduzidos em um complexo de proteína transcriptase viral (atividade de fosfatase e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e uma helicase). A replicação do genoma envolve a síntese de um RNA de fita negativa de comprimento total e serve como modelo para o RNA genômico completo. Após a tradução, as proteínas estruturais são direcionadas para as membranas intracelulares do Golgi, mais especificamente no compartimento intermediário de Golgi do retículo endoplasmático (ERGIC), conhecido como local de brotamento. Neste local, novos vírions são montados e liberam o RNA do genoma completo da célula hospedeira.

O sistema imunológico é a linha de defesa do corpo contra invasores e consiste em duas respostas imunes: a adaptativa e a inata. A resposta imune adaptativa pode ser subdividida em resposta humoral, que envolve a produção de anticorpos pelos linfócitos B, e resposta celular, liderada pelos linfócitos T. A imunidade inata é a primeira barreira contra invasores, sendo uma resposta rápida que reconhece padrões moleculares amplamente distribuídos em patógenos. Ela é representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, mesmo naqueles que não foram expostos a antígenos anteriormente (Fulop *et al.*, 2018; Cunha *et al.*, 2020).

Na resposta imunológica inata, a principal estratégia de combate às infecções virais envolve a indução da expressão dos interferons de tipo I (IFNs tipo I) e a ação das células natural killer (NK), que promovem a eliminação de células infectadas. Este é um mecanismo fundamental de defesa inicial antes do desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa. Os interferons de tipo I, como o IFN- α (interferon alfa) e o IFN- β (interferon beta), desempenham um papel crucial ao inibir a replicação viral nas células infectadas (Karkie; Kanneganti, 2022; Li *et al.*, 2022).

Os linfócitos NK desempenham um papel central na imunidade inata, sendo essenciais para a defesa imunológica. Sua ativação ocorre através do reconhecimento de alvos específicos nas células a serem eliminadas, de maneira semelhante aos linfócitos T convencionais. Diferentemente destes últimos, os NK não requerem estímulo prévio para iniciar sua atividade citotóxica. Durante esse processo, os linfócitos NK expressam marcadores, como o CD69, membro da superfamília de lectinas do tipo C, em sua superfície celular, em resposta ao estímulo. Essa produção e ativação desempenham papel crucial na eficácia do sistema imunológico (Elliott; Siddique; Weintock, 2015; Mace, 2023).

A resposta imunológica contra a COVID-19 segue um padrão semelhante. Estudos indicam um reconhecimento inicial pela resposta imune inata, com a produção de citocinas pró-inflamatórias e mediadores químicos, visando estabelecer uma resposta antiviral eficaz. A presença de níveis elevados de citocinas inflamatórias é uma característica notável em pacientes graves (Chen *et al.*, 2020).

As principais características da resposta adaptativa são especificidade, memória e especialização da resposta. Embora as principais células envolvidas na resposta imune adaptativa sejam os linfócitos, as células apresentadoras de antígenos desempenham um papel importante na sua ativação (Fulop *et al.*, 2018; Cunha *et al.*, 2020). A imunidade adaptativa contra infecções virais é mediada por anticorpos, os quais bloqueiam a ligação e a entrada do vírus nas células hospedeiras, e por linfócitos T citotóxicos (LTCs), que eliminam a infecção destruindo as células infectadas. No contexto da imunidade adquirida, observa-se a apresentação de antígenos e ativação dos linfócitos T e B, assim como a geração de anticorpos (LEE; RYU, 2021).

O epitélio apresenta antígenos virais para linfócitos T CD8+ por meio de proteínas do MHC de classe I. As células dendríticas subepiteliais e macrófagos teciduais reconhecem os antígenos virais e os apresentam aos linfócitos T CD4+ induzindo essas células a se diferenciarem em linfócitos T auxiliares, que ajudam os linfócitos B a se desenvolverem em plasmócitos e promover a produção de anticorpos específicos contra o vírus (Azkur *et al.*, 2020).

No entanto linfopenia é frequente em pacientes com COVID-19 que apresentam uma redução do número linfócitos T que, em casos graves da doença, é mais acentuada. A replicação do vírus induz a destruição das células epiteliais infectadas e a ativação de células dendríticas, monócitos e macrófagos, estimulando a liberação de mediadores pró-inflamatórios em grande quantidade, acarretando uma tempestade de citocinas. Estudos revelaram alterações em biópsia e autópsia de pacientes infectados com COVID-19 e a análise patológica pulmonar mostrou dano alveolar difuso; também foram observadas lesões endoteliais graves decorrentes do rompimento das membranas celulares causado pela presença do vírus no interior da célula (Asselah *et al.*, 2021; Pitiriga *et al.*, 2023; Qin *et al.*, 2020).

3.3 Vacinas contra a COVID-19

Com o avanço da COVID-19 tornou-se necessário o desenvolvimento e administração de vacinas para o controle da doença (Fiolet *et al.*, 2022; Seyahi *et al.*, 2021). Partindo da cepa original encontrada em Wuhan foram desenvolvidos imunizantes empregando vários mecanismos, como as tecnologias baseadas em RNA mensageiro (mRNA), adenovírus inativado, proteínas recombinantes e vetor viral não replicante. Algumas delas oriundas de tecnologias aprovadas para outras vacinas e

outras inéditas que ainda não haviam sido testadas para vacinação em grande escala, como no caso dos imunizantes fabricados a partir de vetores virais não replicantes e de RNAm em humanos (Locht, 2020; Chakraborty *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2021; Muik *et al.*, 2021; Rotondo *et al.*, 2021).

Atualmente, no Brasil, quatro vacinas desenvolvidas com diferentes tecnologias foram aprovadas para uso emergencial e incluídas no Plano Nacional de Imunização (PNI). A *Pfizer-Wyeth* da BioNTech (BNT162b2 PF-07302048), *AstraZeneca* (AZD1222Z ChAdOX1 NCOV-19) da Universidade de Oxford e Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz), *CoronaVac* da indústria farmacêutica chinesa *Sinovac* e Instituto Brasileiro Butantan e *Janssen Vaccine* (JNJ-78436735 Ad26.COV2.S) da Johnsons & Johnsons (ANVISA, 2021; BRASIL, 2021b).

No início da vacinação utilizou-se o imunizante *CoronaVac*, uma vacina que utiliza partículas de vírus inativados para estimular a resposta imune. Os primeiros grupos a serem vacinados foram pessoas com mais de 60 anos, profissionais da saúde, indígenas e quilombolas. A *CoronaVac* previne em até 85% os casos graves da doença, sendo aplicada em um esquema de duas doses, com intervalo de 21 dias, apresentando baixo índice de reações alérgicas (0,3%) sem registro de riscos a eventos adversos graves após sua administração (Borges *et al.*, 2021; Fadlyana *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2020; Dundar *et al.*, 2022).

No segundo semestre de 2021, a primeira dose de reforço para pessoas com comorbidades, idosos e profissionais de saúde foi aprovada, sendo administrada seis meses após a última dose de vacinação. Em novembro de 2021, esse reforço foi ampliado para todas as pessoas acima de 18 anos, com um intervalo recomendado de cinco meses após o esquema vacinal completo. Posteriormente, esse intervalo foi reduzido para quatro meses. Além disso, o Ministério da Saúde do Brasil estabeleceu que aqueles que tomaram a primeira dose da vacina Janssen deveriam tomar uma dose de reforço, preferencialmente da mesma vacina, entre dois e quatro meses após a primeira aplicação. Em março de 2022, uma segunda dose de reforço foi aprovada para indivíduos com comorbidades, idosos e profissionais de saúde, quatro meses após a primeira dose de reforço. Em julho de 2022, essa segunda dose foi liberada para toda a população acima de 18 anos (ANVISA, 2022; Brasil, 2021b; Brasil, 2021c; Loch, 2020).

Em 2023, foi elaborado um planejamento de vacinação para cada faixa etária, juntamente com um esquema vacinal que inclui vacinas bivalentes contendo cepas atualizadas. Essas vacinas bivalentes se distinguem das monovalentes pela capacidade de estimular uma resposta imune mais efetiva contra a variante ômicron. O esquema vacinal primário para cada faixa etária é o seguinte: para crianças de 6 meses a 4 anos, 11 meses e 29 dias, três doses Pfizer tampa vinho, para crianças de 03 anos a 4 anos, 11 meses e 29 dias duas doses e uma dose de reforço, para crianças de 5 a 11 anos duas doses e uma de reforço, para pessoas de 12 a 39 anos que não estão no grupo prioritário receber a vacina bivalente e se não iniciaram a vacinação ou não completaram o esquema vacinal completo duas doses e uma de reforço, para adultos de 40 a 59 anos que não estão no grupo prioritário recomenda-se receber as vacinas bivalentes com duas doses e duas de reforço (ANVISA, 2023).

3.4 Imunossenescência

A população idosa é considerada vulnerável, com uma incidência significativamente elevada de morbidade e mortalidade em comparação à população jovem. Além disso, as infecções tendem a afetar os idosos de forma atípica, com um prognóstico mais desfavorável. O envelhecimento traz mudanças fisiológicas, como o surgimento de doenças relacionadas à idade, problemas cardiovasculares, neurológicos e pulmonares, todos agravantes para o risco de infecções. Quando os idosos se encontram em condições de isolamento, vivem sozinhos ou são institucionalizados, o risco de infecções aumenta, tornando-se fator determinante para a disseminação de doenças virais (Wang *et al.*, 2020; Cunha *et al.*, 2020; Nikolich-Zugich *et al.*, 2020).

O sistema imunológico inato e adaptativo dos idosos sofre, em um processo fisiológico natural, inúmeras alterações relacionadas à idade denominadas "imunossenescência". Essas mudanças afetam elementos celulares e moleculares, bem como a coordenação da própria resposta imune no tempo e no espaço que funciona eficazmente em indivíduos jovens e adultos, mas se deteriora com a idade. A soma dessas mudanças os deixa mais vulneráveis a novas doenças infecciosas (Akbar; Gilroy, 2020).

Durante o ciclo da vida humana, a produção de linfócitos T passa por algumas mudanças, como a diminuição da sua produção. Estes são amadurecidos no timo,

órgão que involui após a puberdade, tornando-se indetectável nos adultos. Desta forma, a produção de linfócitos T é de 10% em uma criança, sendo reduzida para 1% entre os 40 a 50 anos, queda essa que ocorre devido a disfunção adquirida com o envelhecimento da medula óssea. Contudo, os linfócitos T e B que foram produzidos na juventude normalmente são mantidos por longos períodos nos órgãos linfáticos secundários, como os linfonodos (Nikolich-Zugich *et al.*, 2020; Cunha *et al.*, 2020; Perrotta *et al.*, 2020).

Os linfonodos são responsáveis pela manutenção e coordenação de novas respostas imunológicas necessárias para controlar vírus, sofrendo mudanças dramáticas relacionadas à idade no terço final da vida, tornando os linfócitos T *naïve* menos capazes de coordenar novas respostas imunológicas às infecções. Além disso, os linfócitos T remanescentes não se movem com rapidez suficiente para encontrar as células da imunidade inata quando uma infecção ocorre, podendo ser uma consequência da desregulação nas quimiocinas que orientam a migração dos linfócitos T. Assim, quando ativados, os linfócitos T e B exibem proliferação e diferenciação reduzidas (Ligotti *et al.*, 2021; Napoli *et al.*, 2020).

Idosos podem ser considerados um grupo de alto risco para a COVID-19, já que podem desenvolver a doença de maneira rápida e progressiva. A imunossenescência representa um fator de risco para a COVID-19 em idosos, pois leva à uma redução da capacidade do sistema imunológico de responder a novos antígenos, incluindo o vírus SARS-CoV-2. Os idosos apresentam inflamação crônica associada a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, proteínas de fase aguda e estresse oxidativo. Embora uma resposta imune forte possa conter a infecção, a literatura sugere que o excesso de citocinas e mediadores pró-inflamatórios podem levar a um pior prognóstico. Esta "tempestade de citocinas", junto com o rompimento de mecanismos anti-inflamatórios, pode desencadear um desequilíbrio no eixo de coagulação, comprometendo a saúde dos pacientes (Perrotta *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2020).

4 METODOLOGIA

4.1 Casuística, aspectos éticos e local de realização da pesquisa

Este trabalho deriva de um estudo epidemiológico de base populacional denominado “EVOLUÇÃO DA PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR COVID-19 EM SERGIPE (EPISERGIPE), o qual serviu de base para o desenvolvimento de diversas pesquisas relacionadas à fisiopatologia, evolução e controle da doença. Dentre as pesquisas relacionadas ao controle da pandemia, inclui-se o projeto intitulado “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA APÓS UM ANO DE VACINAÇÃO COM CORONAVAC EM IDOSOS”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFS sob número de parecer 5.942.130. Todos os indivíduos selecionados receberam as informações necessárias sobre o projeto e aqueles que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Este é um estudo observacional multicêntrico prospectivo, que consistiu na análise sorológica da resposta imune à vacinação contra SARS-CoV-2 entre idosos e profissionais em instituições de longa permanência (ILPIs) do estado de Sergipe, após um ano do esquema vacinal completo com *Coronavac*. Como critério de inclusão todos os voluntários selecionados de oito ILPIs (Lar de Idosos Nossa Senhora da Conceição/SAME, Residencial Sênior Pura Vida, Asilo Isais Gileno Barreto, Asilo Santo Antônio/Estância, Asilo Santo Antônio/ Lagarto, Centro de Convivência para Idosos Padre Leon Gregório, Lar São Francisco de Assis e Residencial para Idosos Meu Aconchego) completaram o esquema vacinal um ano antes da coleta com *Coronavac*, com dose de reforço.

Como critério de exclusão idosos e profissionais que não completaram o esquema vacinal um ano antes da coleta, que foram vacinados com uma vacina diferente da *Coronavac*, voluntários que não foi possível o acesso venoso e profissionais com idade acima de 50 anos. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hematologia e Toxicologia do Departamento de Farmácia e no Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

4.2 Coleta e processamento das amostras

Foram coletados 20 mL de sangue por meio de punção venosa periférica, que foram divididos em cinco tubos, quatro contendo anticoagulante EDTA e outro contendo gel separador e ativador de coágulo. A partir das amostras colhidas em tubos contendo EDTA, 2 mL foram utilizados para a realização do hemograma e separação do plasma que foi armazenado a -80°C, e uma outra alíquota de 14 mL utilizada para a obtenção de células mononucleares, seguido pelo estudo imunofenotípico e posterior armazenamento para estudos in vitro.

As amostras colhidas em tubo contendo gel separador e ativador de coágulo foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos para obtenção do soro sanguíneo e posteriormente realização das análises sorológicas.

4.3 Detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 usando imunoensaio por fluorescência (FIA)

Para as análises sorológicas, foi utilizado o equipamento Ichroma™ e o kit Ichroma™ COVID-19 Ab, da marca Biosys Ltda, que detecta anticorpos IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 por imunofluorescência (FIA). O kit é composto por cassete, detector, diluente do detector e chip de identificação. O cassete contém uma tira teste, onde estão impregnados na membrana IgY de galinha na linha controle, anti-IgM humano na linha teste 1 e anti-IgG humano na linha teste 2.

O procedimento foi realizado de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Transferiu-se 150 µL do diluente para o tubo contendo os grânulos e, uma vez completamente dissolvidos, foram adicionados 10 µL da amostra (soro) para o tubo, que foi agitado até a mistura ficar homogênea. Foram transferidos 75 µL da mistura para o poço de amostra do cassete e deixado à temperatura ambiente por 10 minutos para incubação. Finalizado o tempo de incubação, o cassete foi escaneado e os resultados qualitativos e o valor auxiliar de IgM e IgG foram emitidos na tela do leitor.

Tabela 1. Interpretação do resultado do teste com base no Índice *Cut-Off*.

Cut-Off	RESULTADO
< 0,9	Negativo para IgG/IgM
Entre 0,9 e 1,1	Indeterminado para IgG/IgM
> 1,1	Positivo para IgG/IgM

4.4 Sorologia de anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 (antígenos Spike RBD)

Foi empregado o imunoensaio de fluorescência (FIA) para a avaliação qualitativa da interferência dos anticorpos ligantes, COVID-19 nAb, com possível função neutralizante, contra vírus SARS-CoV-2 presentes na amostra, na interação entre o domínio de ligação do receptor (RBD) da glicoproteína viral Spike (S) com o receptor de superfície ECA-2 em amostras de sangue total/soro/plasma humano.

Foram transferidos 200 µL do diluente do detector para o tubo detector A que contém um grânulo de conjugado da proteína *Spike* RBD do SARS-CoV-2. Quando o grânulo é completamente dissolvido no tubo, ele se torna o tampão de detecção. Logo após foram transferidos 50 µL da amostra para o tubo detector A, agitando a mistura vigorosamente cerca de 10 vezes. A mistura do tubo detector A mais a amostra ficaram a temperatura ambiente por 5 minutos. Após isso foram transferidos 150 µL da mistura da amostra para o tubo detector B contendo um grânulo de conjugado biotina-ECA-2. O tudo foi agitado para dissolver completamente o grânulo. Posteriormente, foram transferidos 75 µL da mistura da amostra para o poço de amostra do cassete, mantendo o cassete a temperatura ambiente por 15 minutos antes de inserir o cassete no suporte do equipamento Ichroma™.

4.5 Obtenção de células mononucleares (CMN)

Foram utilizados tubos falcon de 50 mL onde foram adicionados o volume total de sangue (aproximadamente 12 mL – 3 tubos) e um volume de 17 mL de PBS até completar 21 mL para cada paciente. Em seguida foram transferidos 7 mL da diluição para cada tubo falcon estéril de 15 mL, contendo 3 mL de Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, EUA, densidade 1.007 g/mL) (totalizando três tubos por paciente). O material foi centrifugado a 1500 RPM por 30 minutos a 4°C, após a

centrifugação a interface opalescente de células mononucleares foi transferida para um novo tubo, composto por 5 mL de PBS e foi realizada homogeneização cuidadosamente. As células mononucleares obtidas foram lavadas por três vezes com 3 mL de PBS com centrifugação a 1500 RPM por 5 minutos a 4°C. Após as lavagens, o pellet celular foi ressuspensionado em 1 mL de PBS, posteriormente utilizou-se uma alíquota de 5 µL dessa suspensão para contagem de células e avaliação da viabilidade celular utilizando Azul de Trypan 0,4% (Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, EUA).

A viabilidade celular foi avaliada por meio da coloração das CMN com Azul de Trypan em diluição de 1:20. Na qual, foi adicionado em um microtubo 5µl da suspensão de CMNs (pellet + PBS) e 95µl Azul Trypan, seguidamente incubado por 2 minutos a temperatura ambiente. Por fim, as células foram colocadas na câmara de Neubauer para contagem e avaliação da viabilidade celular, no microscópio na objetiva de 40.

4.6 Estudo imunofenotípico

Após a separação, alíquotas de CMNs foram utilizadas em ensaios biológicos de imunofenotipagem por citometria de fluxo, a reação antígeno/anticorpos das amostras foi realizada em 100µL de suspensão celular, contendo aproximadamente 1×10^6 de células mononucleares, as quais foram incubadas com 20µL de anticorpos monoclonais específicos para cada marcador em dois tubos distintos, tubo 1 (CD3/APCH7, CD4/APC, CD45RA/PE, CCR7/FITC) e tubo 2 (CD3/PE/BL2, CD56/PECy7/BL4, CD69/APC/RL1) por 30 minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada por cinco minutos a 1.500 rotações por minutos (RPM), o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado em solução salina tamponada com fosfatos (PBS, pH=7.4) e novamente centrifugado a 1.500 rpm por cinco minutos. Após essa fase, o sedimento foi novamente ressuspensionado em 1 mL de solução de formaldeído a 1% em PBS e armazenado no refrigerador, por no máximo 24 horas, ao abrigo da luz até o momento da análise no citômetro de fluxo (ORFAO et al., 1999).

A pesquisa da expressão dos marcadores imunofenotípicos: CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD56, CD69 e CCR7 foi feita em amostras de todos os participantes do estudo.

As análises imunofenotípicas foram realizadas por meio da citometria de fluxo de oito cores por meio do citômetro Attune NxT do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe. A aquisição foi realizada em duas etapas com aquisição de 50.000 eventos totais, levando-se em consideração os parâmetros FOWARD SCATTER (FSC), que avalia o tamanho celular, e SIDE SCATTER (SSC), que avalia a complexidade e granulosidade celular. Foram empregados controles isotípicos de marcação inespecífica que serviram como referencial para calibração do citômetro de fluxo (ORFAO et al., 1999).

Os dados obtidos por meio do citômetro Attune NxT foram analisados utilizando o software FlowJo versão 10.6.1. A análise teve como estratégia adotada a caracterização fenotípica e funcional das populações de linfócitos T CD4+ e CD8+, naive e de memória (CD45RA/CCR7), e dos linfócitos NK, ativados e não ativados (CD69).

4.6.1 Estratégia de análise

A estratégia de análise das populações de linfócitos T utilizando o programa de análise de citometria de fluxo FlowJo, seguiu os seguintes passos:

- 1) Dentro da população de linfócitos (FSC-A x SSC-A), foi delimitada uma região CD3+;
- 2) Partindo da população CD3+ foram selecionadas as singles cells (FSC-A x FSC-H);
- 3) A população de single cells foi avaliada para delimitação da população CD4+ (SSC-A x CD4);
- 4) As regiões CD4+ e CD8+ foram analisadas quanto a expressão do CCR7 e CD45A, delimitando as subpopulações CD45RA+/CCR7- (Efector Memory RA+, quadrante inferior esquerdo), CCR7+/CD45RA+ (Naive, quadrante superior direito) e CCR7+/CD45RA- (Central Memory, quadrante superior esquerdo), e CD45RA-/CCR7- (Efector Memory, quadrante inferior esquerdo).

As análises das **populações de linfócitos NK** seguiram a seguinte estratégia:

- 1) Dentro da população de linfócitos (FSC-A x SSC-A), foi delimitada uma região

CD3+;

- 2) Partindo da população CD3+ foram selecionadas as *singles cells* (FSC-A x FSC-H);
- 3) A população de *single cells* foi avaliada para delimitação da população CD69+ e CD69-
- 4) Na população CD69 positivo foi avaliada a expressão de CD3 e CD56 para diferenciação das populações NK e NKT.

4.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software *Biostat* (versão 5.3), foram realizados teste t independente, para a diferença na idade entre os grupos, diferenças na porcentagem de neutralização entre os grupos, idosos e profissionais. Mudanças na porcentagem de neutralização entre D90 e D360 foram avaliadas usando um teste t pareado e foi utilizado teste binomial de duas proporções. A suposição de normalidade foi verificada por meio do teste de D'Agostino-Pearson. Todos os testes foram bicaudais, ao nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Um total de 313 indivíduos foram inicialmente selecionados para este estudo, sendo 211 idosos institucionalizados e 102 profissionais dessas instituições. Dentre os idosos, 72 não tiveram amostras de sangue coletadas por dificuldades de acesso venoso e óbitos. E dentre os profissionais, 46 não tiveram amostras de sangue coletadas por indisponibilidade de período de trabalho (plantão noturno), ou não quiseram participar desta etapa da pesquisa. Ainda dentre os profissionais, 20 deles apresentavam idade superior a 50 anos, caracterizando um critério de exclusão do estudo.

Por fim, foram realizadas análises de 179 indivíduos, sendo 139 idosos e 36 profissionais de oito ILPIs de Sergipe: Asilo Isaias Gileno Barreto, Asilo Santo Antônio/Estância, Asilo Santo Antônio/ Lagarto, Centro de Convivência para Idosos Padre Leon Gregório, Lar de Idosos Nossa Senhora da Conceição/SAME, Lar São Francisco de Assis, Residencial para Idosos Meu Aconchego, Residencial Sênior Pura Vida.

A maioria dos indivíduos analisados foram do sexo feminino (64%) os idosos em sua maior parte tem acima de 80 anos (53%) com média de idade de 79,4 anos (entre 60 e 102 anos), e a idade média dos profissionais 42 anos (entre 26 e 50 anos), indicando grupos de estudo com características etárias distintas ($p < 0,00001$) (tabela 2).

Tabela 2: Estratificação da idade e do sexo dos participantes da pesquisa

Variável	Idoso (n= 139)	Profissionais (n= 36)	p
Idade (média±desvio padrão), anos	79.4±9.8	42±7	p<0,0001
60-69	26 (19%)		
70-79	40 (29%)		
80-89	54 (39%)		
90-99	17 (12%)		
> 100	2 (1%)		
Sexo			
Masculino	61 (44%)	2 (5.6%)	
Feminino	78 (56%)	34 (94.4%)	

Na avaliação da resposta imune humoral, observou-se que na produção de anticorpos neutralizantes, após um ano de vacinação, os idosos apresentaram resposta semelhante aos profissionais ($p=0,4692$), na análise da positividade do teste de anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 (nAb POSITIVO $\geq 30\%$) (tabela 3). Foi analisada a positividade dos grupos aos anticorpos IgG e IgM; para anticorpos IgG os idosos e profissionais obtiveram uma porcentagem de 85% e 94,4% respectivamente, $p=0,1309$. Já para o IgM foi analisada a porcentagem de negatividade para os grupos, sendo observado 59% para os idosos e 67% para os profissionais $p=0,4011$. (tabela 3)

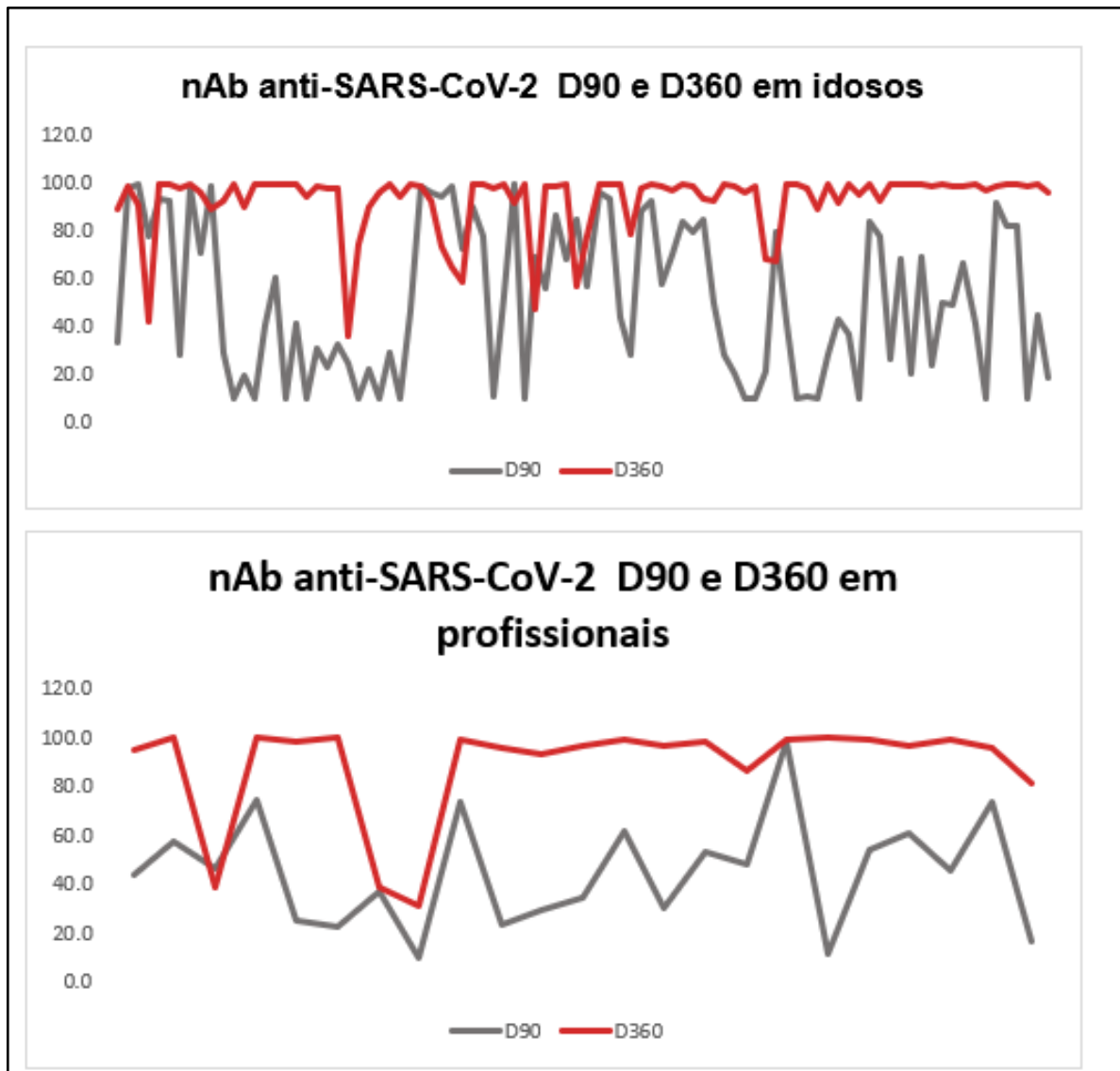
Tabela 3: Resposta de anticorpos contra SARS-CoV-2 um ano após a vacinação com CoronaVac.

Variável	Idoso (n= 139)	Profissionais (n= 36)	p
Média dos níveis de IgM			
Positivo	49 (35%)	8 (22%)	p= 0,4011
Indeterminado	8 (6%)	4 (11%)	
Negativo	82 (59%)	24(67%)	
Média dos níveis de IgG			
Positivo	118 (85%)	34 (94,4%)	p=0,1306
Indeterminado	2 (1,4%)	0	
Negativo	19 (13,6%)	2 (5,6%)	
Indivíduos com nAb anti-SARS-CoV-2 (COI* ≥30%)	137 (98,5%)	36 (100%)	p=0,4692

COI, %= índice cut-off

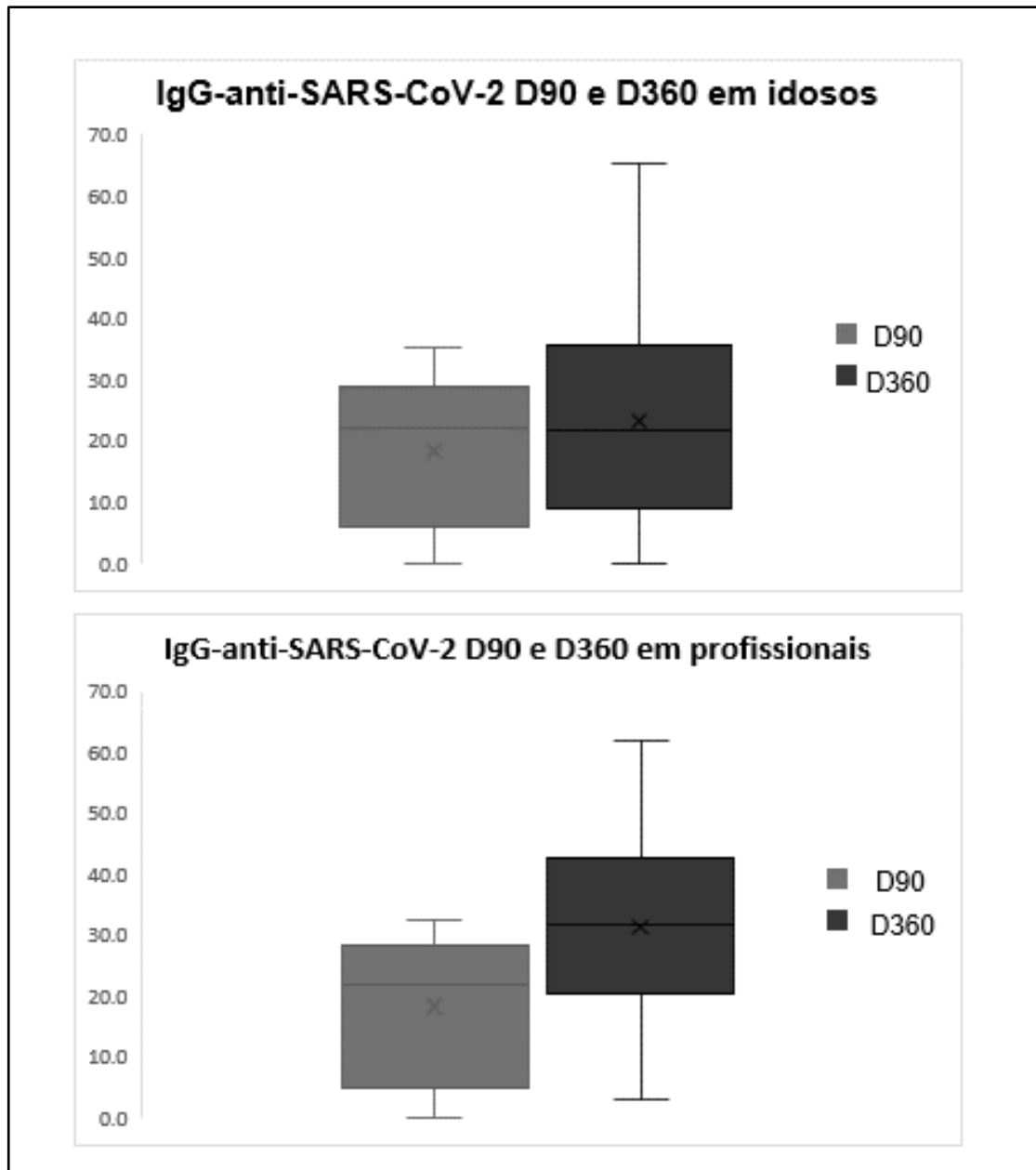
Foi realizada uma análise comparativa da resposta imune humoral dos idosos e profissionais que participaram do estudo 90 (D90) e 360 (D360) dias pós-vacinação. Nesta comparação foram selecionados 90 idosos e 23 profissionais. Nas duas análises (D90 e D360) quando analisada a positividade no teste de anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 (nAb POSITIVO $\geq 30\%$), dos idosos avaliados 63,3% apresentaram positividade no D90 e 100% no D360 (figura 3). Entre os profissionais 65,2% apresentaram positividade no D90 e no D360 100%.

Figura 3: Quantidade de títulos de anticorpo neutralizante nAb anti-SARS-CoV-2 em idosos e profissionais no D90 e D360



D90: 90 dias após a vacinação D360: 360 dias após a vacinação

Figura 4: Análise das concentrações de anticorpos IgG-anti-SARS-CoV-2 em idosos e profissionais no D90 e D360



D90: 90 dias após a vacinação D360: 360 dias após a vacinação

Na avaliação da resposta celular, foram analisados 19 indivíduos, sendo doze idosos (GI: grupo de idosos vacinados) e sete profissionais (GC: grupo controle vacinados). Os indivíduos apresentaram uma variação de idade de 65 a 89 anos ($M = 77$) no grupo de idosos e de 24 a 50 anos ($M = 40$) no grupo de profissionais, $p < 0,0001$.

Este estudo não demonstrou diferença significativa no total de linfócitos entre os dois grupos (G1 e GC). Foi observado o aumento da população dos linfócitos T CD4+ nos idosos vacinados ($p = 0,0106$) em comparação ao GC. Quando comparado

ao total de linfócitos T CD8+ entre os dois grupos, não foi observada diferença significativa (tabela 4).

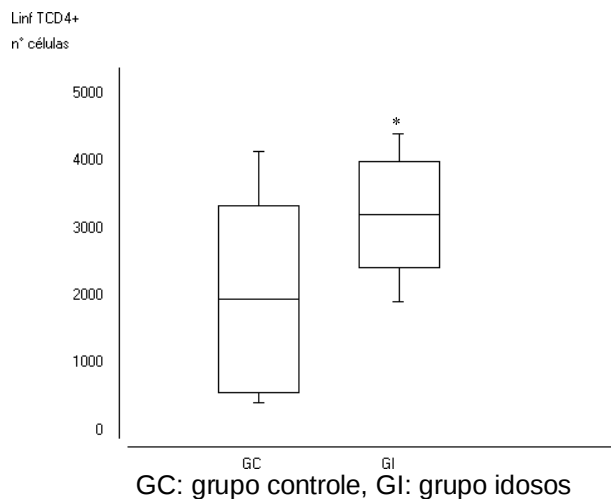
Tabela 4: Características dos participantes do estudo, com valores médios da expressão das populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ e respectivos perfis de memória.

Linfócitos T CD4+			
	GC (n=7)	GI (n=12)	p
Idade (média/anos)	40	77	
Total de linfócitos CD4+*	1.946	3.204	0,0106
LT CD4+ - <i>Effector Memory</i> RA+*	553	888	0,0990
LT CD4+ - <i>Central Memory</i> *	69	108	0,1066
LT CD4+ - <i>Efeotor Memory</i> *	1.160	2.067	0,0286
LT CD4+ - <i>Naive</i> *	164	140	0,3910
Linfócitos T CD8+			
Total de linfócitos CD8+*	1.541	1.513	0,4825
LT CD8+ - <i>Efeotor Memory</i> RA+*	733	785	0,4308
LT CD8+ - <i>Central Memory</i> *	8	13	0,2200
LT CD8+ - <i>Efeotor Memory</i> *	582	686	0,3605
LT CD8+ - <i>Naive</i> *	219	28	0,0298

GC = grupo controle; GI = grupo idosos; *média do número absoluto de células.

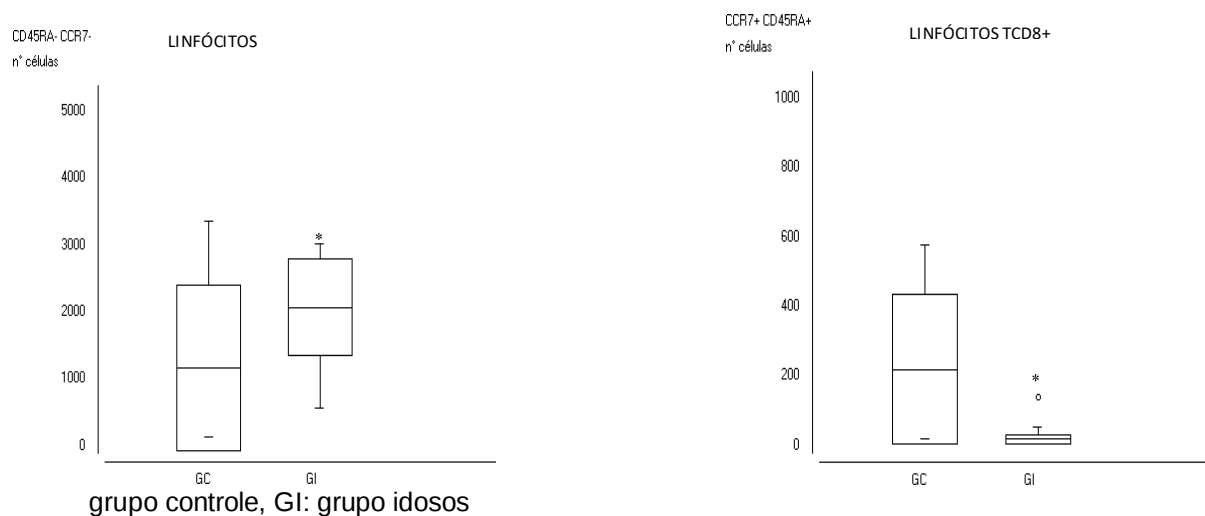
O perfil dos fenótipos CD45RA e CCR7 foi avaliado, tanto em linfócitos CD4+ quanto em linfócitos T CD8+, em amostras de todos os participantes do estudo. Quando comparados os grupos G1 e GC, entre os linfócitos T CD4+ não foram observadas diferenças estatísticas nos fenótipos *Efeotor Memory* RA+ (CD45RA+/CCR7-), *Central Memory* (CCR7+/CD45RA-) e *Naive* (CCR7+/CD45RA+) apresentando respectivamente p= 0,0990, p= 0,1066 e p= 0,3910, porém o fenótipo *Efeotor Memory* (CD45RA-/CCR7-) evidenciou diferença significativa.

Figura 5: Avaliação da expressão das populações de Linfócitos T CD4+ entre os grupos analisados



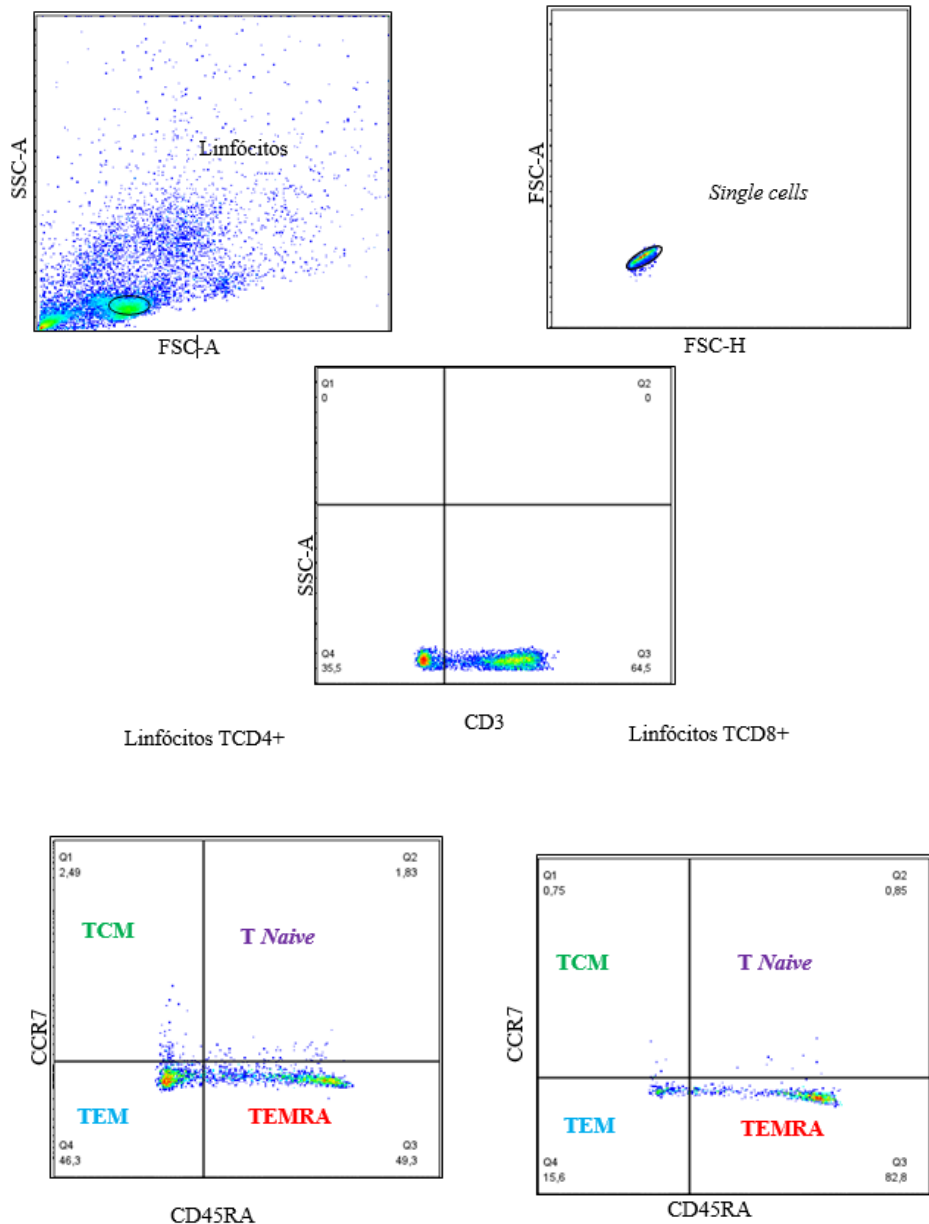
Quando comparados os grupos G1 e GC, entre os linfócitos T CD8+ não foram observadas diferenças estatísticas nos fenótipos *Efeitor Memory RA+* (CD45RA+/CCR7-), *Central Memory* (CCR7+/CD45RA-) e *Efeitor Memory* (CD45RA-/CCR7-) apresentando respectivamente $p=0,4308$, $p=0,2200$, e $p=0,3605$, apenas o fenótipo *Naive* (CCR7+/CD45RA+) evidenciou diferença significativa apresentando $p=0,0298$.

Figura 6: Avaliação da expressão do perfil de memória *Efeitor memory* (CD45RA- CCR7-) nos LT CD4+ e *Naive* (CCR7+ CD45RA+) nos LT CD8+.GC:



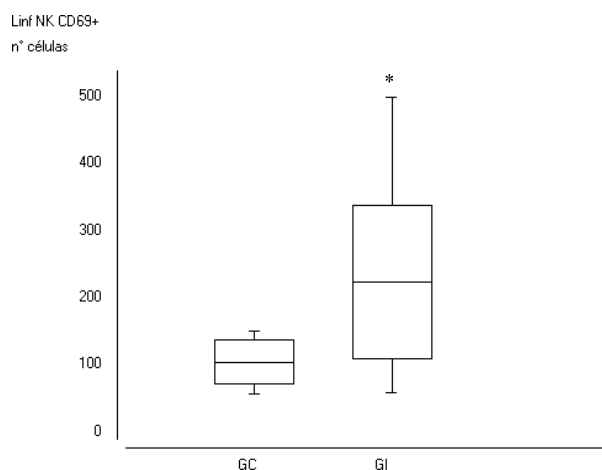
As análises da população de linfócitos T de um dos participantes do estudo (VAC027), e as subpopulações dos fenótipos de memória *Efector Memory RA+*, *Naive*, *Central Memory* e *Efector Memory*, de linfócitos T CD4+ e CD8+ (figura 7).

Figura 7: Análise das subpopulações dos fenótipos de memória de linfócitos T CD4+ e CD8+ de um participante do grupo de idosos (VAC027) utilizando o software de análise *FlowJo*. CD45RA+/CCR7- (*Efector Memory RA+*, quadrante inferior direito), CCR7+/CD45RA+ (*Naive*, quadrante superior direito) e CCR7+/CD45RA- (*Central Memory*, quadrante superior esquerdo), e CD45RA-/CCR7- (*Efector Memory*, quadrante inferior esquerdo).



Foi avaliada a expressão de um marcador de ativação (CD69), que está presente população de linfócitos NK, demonstrando diferença na quantidade de células CD69+(ativadas) com maior número de células no GI ($p=0,0024$) (Figura 8).

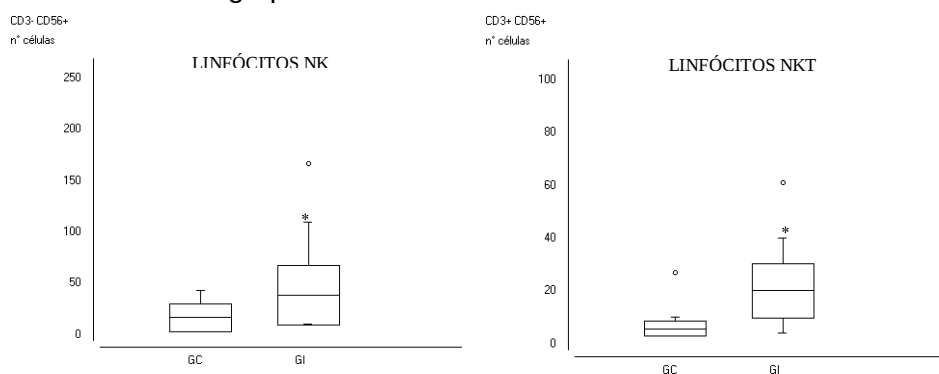
Figura 8: Avaliação da expressão do marcador CD69 entre os grupos em analisados



GC: grupo controle, GI: grupo idosos

Como demonstrado na figura 9, entre os linfócitos NK ativados (CD69+) foi analisada a presença dos fenótipos CD56, e CD3. O grupo de idosos apresentou maior expressão dos fenótipos CD56+ CD3+ (NK-T) e CD56+ CD3- (NK) ($p=0,0165$ e $p=0,0202$ respectivamente).

Figura 9: Avaliação da expressão de CD56, e CD3 na população de linfócitos NK CD69+ entre os grupos em estudo.



GC: grupo controle, GI: grupo idosos

6 DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou a resposta imune após vacinação em um grupo de idosos, tendo como parâmetros de comparação um grupo de profissionais que recebeu a imunização inicial nas mesmas condições da população estudada.

Os estudos sobre resposta imune à vacinação contra a COVID-19 tiveram que ser conduzidos com urgência para o controle da pandemia. A avaliação da resposta imune é uma forma de monitorar a efetividade da vacina na população. Entretanto, grupos de risco, como a população idosa foram excluídos inicialmente desses estudos. Este grupo etário geralmente apresenta um sistema imunológico deficiente devido à imunossenescência, que pode causar tanto diminuição na produção das células do sistema imune como linfócitos T e B, como deficiências funcionais nas respostas imunes inata e adaptativa. Analisar esta eficácia e persistência da resposta imune a longo prazo é crucial para o controle e erradicação de doenças infecciosas como a COVID-19 (Gallais *et al.*, 2021).

O risco de infecção e severidade da COVID-19 é altamente variável entre diferentes indivíduos e população, fatores como idade mais avançada, gênero masculino e comorbidades estão associados a um maior risco de infecção por SARS-CoV-2 (Meister *et al.*, 2022; Parohan *et al.*, 2021). Neste estudo, após um ano da vacinação, não foi observada diferença na resposta imune entre os profissionais (grupo controle jovem) e os idosos. Dados semelhantes foram encontrados em outros estudos onde a idade não foi um fator significativo para a taxa de soropositividade (Assaid *et al.*, 2022; Guiomar *et al.*, 2022; Morgiel *et al.*, 2022). A igualdade da resposta imune à vacinação entre jovens e idosos demonstra que as células do sistema imune dos idosos estão desenvolvendo uma resposta robusta ao vírus SARS-CoV-2, obtendo assim uma menor probabilidade de desenvolver a doença em sua forma mais grave.

A vacinação é uma alternativa viável no combate à infecção por SARS-CoV-2 e a imunidade conferida pela vacina deve ser eficaz e duradoura. Estudos sorológicos são necessários para avaliar a resposta imune decorrente da vacinação ao longo do tempo. Neste estudo foi avaliada a resposta humoral conferida 360 dias após a vacinação com a Coronavac, com uma dose de reforço. Observou-se que a média dos testes de anticorpos neutralizantes anti-SARS-CoV-2 foi semelhante nos dois grupos. A presença desses anticorpos indica a possível capacidade de neutralizar a

ligação da proteína S no domínio RBD à ECA2 do indivíduo, impedindo, assim, a entrada do vírus na célula hospedeira, sugerindo um papel protetor em futuros contatos com o vírus (Dimeglio *et al.*, 2022; Kadkhoda, 2021).

Os anticorpos IgM e IgG são produzidos em sua maioria contra a proteína S e a proteína N. A proteína S torna-se o foco principal no desenvolvimento de vacinas, pois o Domínio de Ligação ao Receptor (RBD) presente na subunidade S1 do SARS-CoV-2 é reconhecido como o principal alvo para a formação de anticorpos capazes de se ligar e neutralizar o vírus (Ghaffari *et al.*, 2020; Koch *et al.*, 2021). Neste estudo também foi analisada a presença dos anticorpos IgM e IgG. O anticorpo IgM foi positivo em aproximadamente um terço dos idosos e um quarto dos profissionais, o que já era esperado, pois esse anticorpo é um dos primeiros a ser produzido durante a resposta imune ao SARS-CoV-2 entre 10 e 15 dias após os sintomas e a presença dele pode informar uma infecção aguda ou recente. Ao longo do tempo há um declínio do anticorpo IgM e podem surgir outras classes como o IgG 20 dias após a infecção. O anticorpo IgG é produzido em uma fase mais tardia da resposta imune, fazendo parte da memória imunológica e proporcionando uma resposta imune mais rápida nos próximos contatos com o vírus. Neste estudo a maioria dos participantes apresentaram o anticorpo IgG, confirmando que há uma resposta imunológica de memória após um ano da imunização contra a COVID-19. Entretanto, por ser um teste qualitativo não foi possível mensurar os títulos desses anticorpos (Al-Mughales *et al.*, 2021; Yaugel-Novoa *et al.*, 2022).

A durabilidade da resposta humoral tem sido objeto de investigação em diversos estudos. Levin e colaboradores (2021) evidenciaram uma redução nos níveis de anticorpos seis meses após a administração da vacina. Dispinseri e colaboradores (2021) constataram que os títulos de anticorpos neutralizantes (nAbs) diminuem de forma gradual após 5-8 semanas, embora permaneçam detectáveis. Esta diminuição sugere a necessidade de administrar doses de reforço nas vacinas para que ocorra uma elevação nos títulos de anticorpos. No presente estudo, obteve-se informações de dois momentos após a vacinação completa com Coronavac: 90 dias e 360 dias, sendo que no último período todos os idosos tinham sido vacinados com a dose de reforço da vacina, administrada aproximadamente 6 meses antes da coleta. Na comparação dos dois períodos observou-se que a presença de anticorpos neutralizantes e de anticorpos IgG foi maior no D360. Isso pode ser explicado pela

administração da dose de reforço da vacina, que tem como objetivo elevar os níveis de anticorpos e manter a proteção contra o vírus (Nashwan *et al.*, 2022).

Neste estudo foi avaliada foi determinado o número de linfócitos T CD4 e TCD8 360 dias após a vacinação com a Coronavac, com uma dose de reforço. As respostas imunes mediadas por células T são reconhecidas pela sua especificidade notavelmente alta e desempenham um papel indispensável na indução de respostas antivirais eficazes. Durante infecções virais, como a causada pelo SARS-CoV-2, ocorre a produção de anticorpos específicos, linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+, os quais desempenham funções protetoras essenciais no controle da infecção. Cada componente da imunidade adaptativa exhibe variações conforme o tipo de infecção viral e a sua resposta correspondente (Krammer, 2020; Stephens; Mcelrath, 2020).

Observou-se que indivíduos idosos exibiram uma produção significativamente aumentada de linfócitos T CD4+ em comparação com o grupo de controle, composto por profissionais de faixa etária mais jovem. Os linfócitos T CD4+ desempenham um papel de uma assistência cognata as células B e T, além de estimular a formação da memória imunológica e promover atividade citotóxica (Tiyo *et al.*, 2021). A presença desses linfócitos foi identificada em estudos, como o realizado por Yuan e colaboradores (2023), no qual foi avaliada a resposta imune à vacinação em 595 profissionais de saúde imunizados com CoronaVac. Esses profissionais foram acompanhados por 8 meses após a vacinação. Nesse estudo, não foram identificadas diferenças na produção de linfócitos T CD4+ em diversas faixas etárias e períodos distintos. O aumento de T CD4+ foi relacionado à idade no estudo de Cohen e colaboradores (2021), que avaliou longitudinalmente a resposta imunológica em 254 pacientes ao longo de 8 meses. Os participantes tinham idades entre 18 e 80 anos (Média = 48,5). Como resultado, foi identificado um aumento na expressão de T CD4+ proporcional ao aumento da idade, correspondendo a 1,16 a 1,20 vezes por década de idade.

Quanto aos fenótipos específicos dos linfócitos T CD4+, observou-se uma predominância do fenótipo *Efector Memory* no grupo de idosos. Essa tendência pode ser atribuída à imunossenescência, caracterizada pela redução na liberação de linfócitos TCD4+ *naive* e de linfócitos T de memória central, ao passo que o número de linfócitos T de memória efetora aumenta. Essa dinâmica justifica a predominância dessa subclasse de linfócitos em indivíduos mais velhos (Alves; Bueno, 2019).

Os linfócitos T CD8+ desempenham um papel crucial na eliminação do vírus e na indução da morte das células infectadas (Cohen et al., 2021). No decorrer desse estudo, foi identificada a produção desses linfócitos em ambos os grupos, apresentando uma expressão igualitária. Contudo, é relevante notar que a produção de linfócitos T CD8+ foi inferior à produção de linfócitos T CD4+, uma tendência observada em diversos estudos (Costa et al., 2022a; Costa et al., 2022b; Li et al., 2021; Vikkurthi et al., 2022).

Os linfócitos NK são comumente conhecidos por suas funções antivirais e anticancerígenas, é importante destacar que estas células também desempenham um papel na regulação do sistema inato. Elas desempenham um papel vital na defesa dos tecidos do hospedeiro, eliminando células imunológico ativadas, tais como células T CD8+ e macrófagos, nas fases posteriores da infecção, quando a ameaça infecciosa já diminuiu. Esse papel imunomodulador contribui para a preservação da integridade dos tecidos do organismo (Zafarani et al., 2023). Os resultados deste estudo indicaram um aumento significativo no número de linfócitos NK CD69+ no grupo de idosos em comparação com o grupo de controle. O estudos como o de Le Garff-Tavernier e colaboradores (2010) também indicou um aumento na expressão do marcador CD69, responsável pela ativação de linfócitos NK, em idosos quando comparado a jovens.

Assim como as células NK, as células NKT têm características citotóxicas, mas sua principal função é regular a secreção de citocinas pró e/ou anti-inflamatórias após a ativação (Zingaropoli et al., 2021). Na literatura, não foram encontrados estudos que avaliassem a expressão de NK e NKT pós vacinação contra a COVID-19 entre idosos e jovens. Em estudos como o de Kaszubowska, Foerster e Kmiec (2022), que comparou a expressão de NK e NKT em 85 indivíduos com idade entre 19 e 94 anos, foi observado um aumento na expressão de células NK e NKT em idosos. Esses resultados corroboram com os achados do nosso estudo, no qual foi evidenciado um aumento na expressão de NK e NKT na mesma faixa etária.

7 Conclusão

Conclui-se que não houve diferença significativa na resposta imune entre os grupos de idosos e profissionais, sugerindo a eficácia da vacinação independentemente da idade, com possíveis efeitos benéficos das doses de reforço na produção de anticorpos e durabilidade da resposta imune. Ao avaliar dois momentos pós-vacinação completa, aos 90 dias e 360 dias, destaca-se que a presença de anticorpos neutralizantes e de anticorpos IgG foi maior no último período (D360). Isso sugere que a dose de reforço da vacina aplicada contribuiu para fortalecer e prolongar a resposta imune ao longo do tempo.

A análise celular revelou maior expressão de linfócitos T CD4+ e, embora com redução em linfócitos T CD8+ *naïve*, a rápida expansão dos linfócitos de memória induzida pela vacina pode fortalecer a imunidade. Esse estudo contribui para a compreensão da eficácia e durabilidade da resposta imune mediada por vacinação, colaborando para o entendimento das estratégias de imunização adotadas do pelo país para proteger grupos mais vulneráveis.

Quanto aos linfócitos NK, os resultados indicam uma ativação mais pronunciada, especialmente nas subpopulações NK-T e NK, em idosos institucionalizados que receberam a vacina CoronaVac, comparados aos profissionais do grupo controle. Essas descobertas fornecem insights valiosos sobre a resposta imunológica a longo prazo após a vacinação e podem ser relevantes na avaliação da eficácia da vacina em distintos grupos populacionais.

Entretanto, a pesquisa apresenta limitações, como o tamanho da amostra e a falta de investigação específica sobre a resposta da CoronaVac às variantes Delta e Omicron do SARS-CoV-2. Isso ocorre devido à ausência de exposição dos participantes a essas variantes durante o período de realização do estudo.

REFERÊNCIAS

- AHLAWAT, S. *et al.* "Immunological co-ordination between gut and lungs in SARS-CoV-2 infection." *Virus research* vol. 286 (2020): 198103. doi:10.1016/j.virusres.2020.198103
- AKBAR, A. N., and DEREK W. G. "Aging immunity may exacerbate COVID-19." *Science (New York, N.Y.)* vol. 369,6501 (2020): 256-257. doi:10.1126/science.abb0762
- AL-MUGHHALES JA, AL-MUGHHALES TJ, SAADAH OI. "Monitoring Specific IgM and IgG Production Among Severe COVID-19 Patients Using Qualitative and Quantitative Immunodiagnostic Assays: A Retrospective Cohort Study". *Front Immunol.* 2021;12:705441. Publicado 2021 Set 3. doi:10.3389/fimmu.2021.705441
- ALSAFI, R. T. "Lessons from SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 Infections: What We Know So Far." *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale* vol. 2022 1156273. 12 Aug. 2022, doi:10.1155/2022/1156273.
- ANDRYUKOV, B. G., and Natalya N Besednova. "Older adults: panoramic view on the COVID-19 vaccination". *AIMS public health* vol. 8,3 388-415. 8 May. 2021, doi:10.3934/publichealth.2021030.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. "Coronavírus, Informações sobre vacinas: Esquemas Vacinais". Brasil, 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/coronavirus/vacinas/esquemas-vacinais>> Acesso em: 23 out 2023.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. "Coronavírus, Informações sobre vacinas: Vacinas – COVID-19". Brasil, 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas>> Acesso em: 23 out 2022.
- ASSAID, N. *et al.* "Anti-SARS-CoV-2 Antibody Responses 5 Months Post Complete Vaccination of Moroccan Healthcare Workers." *Vaccines* vol. 10,3 465. 18 Mar. 2022, doi:10.3390/vaccines10030465
- ASSELAH, T. *et al.* "COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development." *Journal of hepatology* vol. 74,1 (2021): 168-184. doi:10.1016/j.jhep.2020.09.031
- AZKUR, A. K. *et al.* "Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19." *Allergy* vol. 75,7 (2020): 1564-1581. doi:10.1111/all.14364
- BAI, Z. *et al.* "The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation." *Viruses* vol. 13,6 1115. 10 Jun. 2021, doi:10.3390/v13061115.
- BAKSHSHANDEH, B. *et al.* "Mutations in SARS-CoV-2; Consequences in structure, function, and pathogenicity of the virus". *Microbial pathogenesis* vol. 154 (2021): 104831. doi:10.1016/j.micpath.2021.104831.

BAROUCH, D. H. *et al.* “Durable Humoral and Cellular Immune Responses 8 Months after Ad26.COV2.S Vaccination.” *The New England journal of medicine* vol. 385,10 (2021): 951-953. doi:10.1056/NEJMc2108829

BIO-RAD, & Laboratories, I. (2022). “Platelia anti-SARS-CoV-2 S IgG Quant”.< https://www.bio-rad.com/sites/default/files/2022-04/PF409_platelia-iggquant_brochure-ous_jan2022.pdf> Acesso em: 08/01/2024.

BÖGER, B. *et al.* “Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19.” *American journal of infection control* vol. 49,1 (2021): 21-29. doi:10.1016/j.ajic.2020.07.011

BONANNI, P. *et al.* “O papel dos testes serológicos para reforçar as iniciativas e políticas de vacinação para a COVID-19 na Europa.” *COVID* . 2021; 1(1):20-38. <https://doi.org/10.3390/covid1010004>

BRASIL. Ministério da Saúde. Casa Civil. “COVID-19: Terceira dose da vacina COVID-19, para reforço da imunização, começa em setembro”. 25 de ago. de 2021]. Brasília, 2021b. Disponível em: < <https://www.gov.br/casacivil/pt-br/assuntos/noticias/2021/agosto/ministerio-da-saude-anuncia-dose-de-reforco-para-vacinacao-contra-a-COVID-19>> Acesso em: 29 nov de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. “Janssen: Ministério da Saúde recomenda dose de reforço com intervalo de dois a seis meses”. 25 de nov. 2021. Brasília, 2021c. Disponível em: < <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2021-1/novembro/janssen-ministerio-da-saude-recomenda-dose-de-reforco-com-intervalo-de-dois-a-seis-meses>> Acesso em: 29 nov 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. “Secretaria de Vigilância em Saúde [homepage on the internet”. Brasília: Ministério da Saúde; 2024. [COVID-19 Painel Coronavírus]. Disponível em: <<https://COVID.saude.gov.br/>> Acesso em: 08 Jan 2024.

CARRILLO, J. *et al.* “Humoral immune responses and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2; implications in pathogenesis and protective immunity.” *Biochemical and biophysical research communications* vol. 538 (2021): 187-191. doi:10.1016/j.bbrc.2020.10.108

CASCELLA, M. *et al.* “Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19).” *StatPearls*, StatPearls Publishing, 18 Ago 2023.

CHAKRABORTY, C. *et al.* “SARS-CoV-2 causing pneumonia-associated respiratory disorder (COVID-19): diagnostic and proposed therapeutic options”. *European review for medical and pharmacological sciences* vol. 24,7 (2020): 4016-4026. doi:10.26355/eurrev_202004_20871.

CHEN, Y. *et al.* “Aging in COVID-19: Vulnerability, immunity and intervention.” *Ageing research reviews* vol. 65 (2021): 101205. doi:10.1016/j.arr.2020.101205

COHEN, K W *et al.* “Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells.” *Cell reports. Medicine* vol. 2,7 (2021): 100354. doi:10.1016/j.xcrm.2021.100354.

COSTA, C. *et al.* "Cellular Immune Response to BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine in a Large Cohort of Healthcare Workers in a Tertiary Care University Hospital." *Vaccines* vol. 10,7 1031. 27 Jun. 2022a, doi:10.3390/vaccines10071031

COSTA, P. R. *et al.* "Humoral and cellular immune responses to CoronaVac up to one year after vaccination." *Frontiers in immunology* vol. 13 1032411. 21 Oct. 2022b, doi:10.3389/fimmu.2022.1032411

CUNHA, L. L. *et al.* "Remodeling of the Immune Response With Aging: Immunosenescence and Its Potential Impact on COVID-19 Immune Response." *Frontiers in immunology* vol. 11 1748. 7 Aug. 2020, doi:10.3389/fimmu.2020.01748

DE DONNO, A. *et al.* "IgM and IgG Profiles Reveal Peculiar Features of Humoral Immunity Response to SARS-CoV-2 Infection." *International journal of environmental research and public health* vol. 18,3 1318. 1 Feb. 2021, doi:10.3390/ijerph18031318

DIMEGLIO, C. *et al.* "Antibody titers and protection against a SARS-CoV-2 infection." *The Journal of infection* vol. 84,2 (2022): 248-288. doi:10.1016/j.jinf.2021.09.013

DISPINSERI, S. *et al.* "Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in symptomatic COVID-19 is persistent and critical for survival." *Nature communications* vol. 12,1 2670. 11 May. 2021, doi:10.1038/s41467-021-22958-8

DORIA-ROSE, *et al.* "Antibody persistence through 6 months after the second dose of mRNA-1273 vaccine for COVID-19". *N Engl J Med.* 2021;384:2259–2261.

DUNDAR, B. *et al.* "Eficácia da resposta a anticorpos após a vacinação de profissionais de saúde infectados e não infectados pela vacina inativa de duas doses contra a COVID-19". *Jornal de virologia médica* Vol. - O que se . 94,6 (2022): 2431-2437. doi:10.1002/jmv.27649

ELLIOTT DE, S. SS, W. JV. "Innate immunity in disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*". 2014 May;12(5):749-55. doi: 10.1016/j.cgh.2014.03.007. Epub 2014 Mar 12. PMID: 24632348; PMCID: PMC4083246.

FADLYANA, Eddy *et al.* "A phase III, observer-blind, randomized, placebo-controlled study of the efficacy, safety, and immunogenicity of SARS-CoV-2 inactivated vaccine in healthy adults aged 18-59 years: An interim analysis in Indonesia." *Vaccine* vol. 39,44 (2021): 6520-6528. doi:10.1016/j.vaccine.2021.09.052

FIOLET, T. *et al.* "Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review". *Clinical Microbiology and Infection*, v. 28, p. 202-221, 2022.

FULOP, T. *et al.* "Immunosenescence and Inflamm-Aging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes?." *Frontiers in immunology* vol. 8 1960. 10 Jan. 2018, doi:10.3389/fimmu.2017.01960

GALLAIS, Floriane *et al.* "Evolution of antibody responses up to 13 months after SARS-CoV-2 infection and risk of reinfection." *EBioMedicine* vol. 71 (2021): 103561. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103561

GHAFFARI, A. *et al.* "COVID-19 Serological Tests: How Well Do They Actually Perform?." *Diagnostics (Basel, Switzerland)* vol. 10,7 453. 4 Jul. 2020, doi:10.3390/diagnostics10070453

GUIOMAR, R. *et al.* "Monitoring of SARS-CoV-2 Specific Antibodies after Vaccination." *Vaccines* vol. 10,2 154. 20 Jan. 2022, doi:10.3390/vaccines10020154

GUSEV, E. *et al.* "SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19." *International journal of molecular sciences* vol. 23,3 1716. 2 Feb. 2022, doi:10.3390/ijms23031716.

HAO, M. *et al.* "Pathogenic Mechanism and Multi-omics Analysis of Oral Manifestations in COVID-19." *Frontiers in immunology* vol. 13 879792. 4 Jul. 2022, doi:10.3389/fimmu.2022.879792.

HASÖKSÜZ, M. *et al.* "Coronaviruses and SARS-COV-2". *Turkish journal of medical sciences* vol. 50,SI-1 549-556. 21 Apr. 2020, doi:10.3906/sag-2004-127.

HOFFMAN, T. *et al.* "Diagnostic Potential of a Luminex-Based Coronavirus Disease 2019 Suspension Immunoassay (COVID-19 SIA) for the Detection of Antibodies against SARS-CoV-2." *Viruses* vol. 13,6 993. 26 May. 2021, doi:10.3390/v13060993.

HUANG, D. *et al.* "Diagnostic Value of Hematological and Biochemical Parameters Combinations for Predicting Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Suspected Patients." *The American journal of the medical sciences*, S0002-9629(21)00136-1. 21 Apr. 2021, doi:10.1016/j.amjms.2021.04.006.

IRANI, S. "Immune Responses in SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV Infections: A Comparative Review." *International journal of preventive medicine* vol. 13 45. 12 Mar. 2022, doi:10.4103/ijpvm.IJPVM_429_20.

KARKI, R., and Thirumala-Devi Kanneganti. "Innate immunity, cytokine storm, and inflammatory cell death in COVID-19." *Journal of translational medicine* vol. 20,1 542. 22 Nov. 2022, doi:10.1186/s12967-022-03767-z.

KASZUBOWSKA L, FOERSTER J, KMIEĆ Z. "NKT-like (CD3 + CD56+) cells differ from T cells in expression level of cellular protective proteins and sensitivity to stimulation in the process of ageing." *Immun Ageing*. 2022 Apr 11;19(1):18. doi: 10.1186/s12979-022-00274-z. PMID: 35410272; PMCID: PMC8996639.

KOCH, T. *et al.* "Correlates of Vaccine-Induced Protection against SARS-CoV-2." *Vaccines* vol. 9,3 238. 10 Mar. 2021, doi:10.3390/vaccines9030238

KRAMMER, F. "SARS-CoV-2 vaccines in development." *Nature* vol. 586,7830 (2020): 516-527. doi:10.1038/s41586-020-2798-3

LAMERS, M. M, BART L. H. "SARS-CoV-2 pathogenesis." *Nature reviews. Microbiology* vol. 20,5 (2022): 270-284. doi:10.1038/s41579-022-00713-0.

LE GARFF-TAVERNIER, M *et al.* "Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span." *Wiley Online Library: Aging cell*, v. 9, n. 4, p. 527- 535, 2010.

LEE, SangJoon, and JIN-HYEOB R. "Influenza Viruses: Innate Immunity and mRNA Vaccines." *Frontiers in immunology* vol. 12 710647. 31 Aug. 2021, doi:10.3389/fimmu.2021.710647

LETKO, M. *et al.* "Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses." *Nature microbiology* vol. 5,4 (2020): 562-569. doi:10.1038/s41564-020-0688-y

LEVIN, E. G. *et al.* "Waning Immune Humoral Response to BNT162b2 Covid-19 Vaccine over 6 Months." *The New England journal of medicine* vol. 385,24 (2021): e84. doi:10.1056/NEJMoa2114583

LI, G. *et al.* "Coronavirus infections and immune responses". *J Med Virol.* Vol 92:424–432 (2020). DOI: 10.1002/jmv.25685

LI, M. *et al.* "Comparative susceptibility of SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV across mammals." *The ISME journal* vol. 17,4 (2023): 549-560. doi:10.1038/s41396-023-01368-2.

LI, Q. *et al.* "Immune response in COVID-19: what is next?." *Cell death and differentiation* vol. 29,6 (2022): 1107-1122. doi:10.1038/s41418-022-01015-x.

LI, Z. *et al.* "Characterization of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immune Responses Induced by Inactivated COVID-19 Vaccines in a Real-World Setting." *Frontiers in immunology* vol. 12 802858. 22 Dec. 2021, doi:10.3389/fimmu.2021.802858

LIGOTTI, M. E. *et al.* "Immunopathology and Immunosenescence, the Immunological Key Words of Severe COVID-19. Is There a Role for Stem Cell Transplantation?." *Frontiers in cell and developmental biology* vol. 9 725606. 14 Sep. 2021, doi:10.3389/fcell.2021.725606

LOCHT, C. "Vaccines against COVID-19". *Anaesthesia, critical care & pain medicine* vol. 39,6 (2020): 703-705. doi:10.1016/j.accpm.2020.10.006

MACE, E. M. "Human natural killer cells: Form, function, and development." *The Journal of allergy and clinical immunology* vol. 151,2 (2023): 371-385. doi:10.1016/j.jaci.2022.09.022.

MALONE, B. *et al.* "Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design." *Nature reviews. Molecular cell biology* vol. 23,1 (2022): 21-39. doi:10.1038/s41580-021-00432-z.

MEISTER, Tatjana *et al.* "Clinical characteristics and risk factors for COVID-19 infection and disease severity: A nationwide observational study in Estonia." *PloS one* vol. 17,6 e0270192. 16 Jun. 2022, doi:10.1371/journal.pone.0270192

MISTRY, P. *et al.* "SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity." *Frontiers in immunology* vol. 12 809244. 3 Jan. 2022, doi:10.3389/fimmu.2021.809244.

MOHAMADIAN, M. *et al.* "COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis." *The journal of gene medicine* vol. 23,2 (2021): e3303. doi:10.1002/jgm.3303

MORGIEL, E. *et al.* "Complete (Humoral and Cellular) Response to Vaccination against COVID-19 in a Group of Healthcare Workers-Assessment of Factors Affecting Immunogenicity." *Vaccines* vol. 10,5 710. 30 Apr. 2022, doi:10.3390/vaccines10050710

MUIK, A. *et al.* "Neutralization of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 pseudovirus by BNT162b2 vaccine-elicited human sera". *Science* (New York, N.Y.) vol. 371,6534 (2021): 1152-1153. doi:10.1126/science.abg6105.

MURALIDAR, S. *et al.* "The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2." *Biochimie* vol. 179 (2020): 85-100. doi:10.1016/j.biochi.2020.09.018.

NAABER, P. *et al.* "Dynamics of antibody response to BNT162b2 vaccine after six months: a longitudinal prospective study." *The Lancet regional health. Europe* vol. 10 (2021): 100208. doi:10.1016/j.lanepe.2021.100208

NAPOLI, C. *et al.* "Immunosenescence exacerbates the COVID-19." *Archives of gerontology and geriatrics* vol. 90 (2020): 104174. doi:10.1016/j.archger.2020.104174

NARASIMHAN, M. *et al.* "Clinical Evaluation of the Abbott Alinity SARS-CoV-2 Spike-Specific Quantitative IgG and IgM Assays among Infected, Recovered, and Vaccinated Groups." *Journal of clinical microbiology* vol. 59,7 (2021): e0038821. doi:10.1128/JCM.00388-21

NASHWAN, A *et al.* "mRNA-based COVID-19 Vaccines Booster Dose: Benefits, Risks and Coverage." *Acta bio-medica : Atenei Parmensis* vol. 93,3 e2022236. 1 Jul. 2022, doi:10.23750/abm.v93i3.13103

NIKOLICH-ZUGICH, J. *et al.* "SARS-CoV-2 and COVID-19 in older adults: what we may expect regarding pathogenesis, immune responses, and outcomes." *GeroScience* vol. 42,2 (2020): 505-514. doi:10.1007/s11357-020-00186-0

ONU- ORGANIZAÇÕES DAS NAÇÕES UNIDAS. "Chefe da Organização Mundial da Saúde declara o fim da COVID-19 como uma emergência de saúde global" 05 mai 2023 Disponível em: < <https://brasil.un.org/pt-br/230307-chefe-da-organiza%C3%A7%C3%A3o-mundial-da-sa%C3%BAde-declara-o-fim-da-covid-19-como-uma-emerg%C3%Aancia-de-sa%C3%BAde>> Acesso em: 30 dez 2023.

PAROHAN, M. *et al.* "Risk factors for mortality in patients with Coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection: a systematic review and meta-analysis of observational studies." *The aging male : the official journal of the International Society for the Study of the Aging Male* vol. 23,5 (2020): 1416-1424. doi:10.1080/13685538.2020.1774748

PEGU, A. *et al.* "Durability of mRNA-1273 vaccine-induced antibodies against SARS-

CoV-2 variants." *Science (New York, N.Y.)* vol. 373,6561 (2021): 1372-1377.
doi:10.1126/science.abj4176

PERROTTA, F. *et al.* "COVID-19 and the elderly: insights into pathogenesis and clinical decision-making." *Aging clinical and experimental research* vol. 32,8 (2020): 1599-1608. doi:10.1007/s40520-020-01631-y

PITIRIGA, V. C. *et al.* "SARS-CoV-2 T Cell Immunity Responses following Natural Infection and Vaccination." *Vaccines* vol. 11,7 1186. 30 Jun. 2023,
doi:10.3390/vaccines11071186

QIN, C. *et al.* "Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* vol. 71,15 (2020): 762-768.
doi:10.1093/cid/ciaa248

RABAAN, A. A. *et al.* "SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview". *Le infezioni in medicina* vol. 28,2 (2020): 174-184.

RICARDO-LAX, I. *et al.* "Replication and single-cycle delivery of SARS-CoV-2 replicons." *Science (New York, N.Y.)* vol. 374,6571 (2021): 1099-1106.
doi:10.1126/science.abj8430

RICCI, D. *et al.* "Innate Immune Response to SARS-CoV-2 Infection: From Cells to Soluble Mediators." *International journal of molecular sciences* vol. 22,13 7017. 29 Jun. 2021, doi:10.3390/ijms22137017

ROTONDO, J. C. *et al.* "SARS-CoV-2 Infection: New Molecular, Phylogenetic, and Pathogenetic Insights. Efficacy of Current Vaccines and the Potential Risk of Variants". *Viruses* vol. 13,9 1687. 25 Aug. 2021, doi:10.3390/v13091687.

SAHIN, U. *et al.* "BNT162b2 vaccine induces neutralizing antibodies and poly-specific T cells in humans." *Nature* vol. 595,7868 (2021): 572-577.
doi:10.1038/s41586-021-03653-6

SALIAN, V. S. *et al.* "COVID-19 Transmission, Current Treatment, and Future Therapeutic Strategies." *Molecular pharmaceuticals* vol. 18,3 (2021): 754-771.
doi:10.1021/acs.molpharmaceut.0c00608

SEYAHİ, E. *et al.* "Antibody response to inactivated COVID-19 vaccine (CoronaVac) in immune-mediated diseases: a controlled study among hospital workers and elderly." *Rheumatology international* vol. 41,8 (2021): 1429-1440.
doi:10.1007/s00296-021-04910-7

SINGHAL, T. "A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19)." *Indian journal of pediatrics* vol. 87,4 (2020): 281-286. doi:10.1007/s12098-020-03263-6

SREEPADMANABH M., SAHU AK, CHANDE A. "COVID-19: Advances in diagnostic tools, treatment strategies, and vaccine development". *J Biosci.* 2020;45(1):148.
doi:10.1007/s12038-020-00114-6

STEPHENS, D. S, e MCEL RATH M J. . "COVID-19 and the Path to Immunity." *JAMA*

vol. 324,13 (2020): 1279-1281. doi:10.1001/jama.2020.16656

TIYO, B. T. *et al.* "What Happens to the Immune System after Vaccination or Recovery from COVID-19?" *Life (Basel, Switzerland)* vol. 11,11 1152. 29 Oct. 2021, doi:10.3390/life11111152

V'KOVSKI, P. *et al.* "Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2". *Nature reviews. Microbiology* vol. 19,3 (2021): 155-170. doi:10.1038/s41579-020-00468-6.

VIKKURTHI, R., *et al.* "A vacina de viri o total inativado BBV152/Covaxin provoca uma memória imunológica celular robusta para SARS-CoV-2 e variantes preocupantes". *Nat Microbiol* 7 , 974–985 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01161-5>.

WAN, Y. *et al.* "Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus". *Journal of virology* vol. 94,7 e00127-20. 17 Mar. 2020, doi:10.1128/JVI.00127-20.

WANG, F. *et al.* "The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness." *JCI insight* vol. 5,10 e137799. 21 May. 2020, doi:10.1172/jci.insight.137799

WANG, H. *et al.* "Estudo de caso-controle de indivíduos com nucleocapsídeo discrepante e Resultados de Spike Protein SARS-CoV-2 IgG." *Clinical Chemistry* , Volume 67, Edi o 7, julho de 2021, páginas 977–986, <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvab045>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). "Updated working definitions and primary actions for SARS-CoV-2 variants". Disponível em:<<https://www.who.int/publications/m/item/updated-working-definitions-and-primary-actions-for--sars-cov-2-variants>>. Acesso em: 08 Jan. 2024.

XUN, G. *et al.* "Um sistema de teste r pido, preciso, escalon vel e port til para diagnóstico COVID-19". *Nat Commun* 12, 2905 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23185-x>.

YANG, Y. *et al.* "SARS-CoV-2: characteristics and current advances in research". *Virology journal* vol. 17,1 117. 29 Jul. 2020, doi:10.1186/s12985-020-01369-z.

YANG, Y. *et al.* "SARS-CoV-2: characteristics and current advances in research". *Virology journal* vol. 17,1 117. 29 Jul. 2020, doi:10.1186/s12985-020-01369-z.

YAUGEL-NOVOA M., BOURLET T., PAUL S. "Role of the humoral immune response during COVID-19: guilty or not guilty?". *Mucosal Immunol.* 2022;15(6):1170-1180. doi:10.1038/s41385-022-00569-w.

YE, Zi-Wei, e DONG-YAN J. "Sheng wu gong cheng xue bao" = *Chinese journal of biotechnology* vol. 36,4 (2020): 571-592. doi:10.13345/j.cjb.200115.

YUAN Y., XU J., MA B, *et al.* "Characteristics of humoral and cellular responses to coronavirus disease 2019 (COVID-19) inactivated vaccine in central China: A prospective, multicenter, longitudinal study". *Front Immunol.* 2023;14:1107866. Published 2023 Mar 3. doi:10.3389/fimmu.2023.1107866

YÜCE, M. *et al.* "COVID-19 diagnosis -A review of current methods." *Biosensors & bioelectronics* vol. 172 (2021): 112752. doi:10.1016/j.bios.2020.112752

ZAFARANI, A *et al.* "Natural killer cells in COVID-19: from infection, to vaccination and therapy." *Future virology* (2023): 10.2217/fvl-2022-0040. doi:10.2217/fvl-2022-0040

ZHEN, W. *et al.* "Comparison of Four Molecular *In Vitro* Diagnostic Assays for the Detection of SARS-CoV-2 in Nasopharyngeal Specimens." *Journal of clinical microbiology* vol. 58,8 e00743-20. 23 Jul. 2020, doi:10.1128/JCM.00743-20.

ZHENG, C. *et al.* "Real-world effectiveness of COVID-19 vaccines: a literature review and meta-analysis." *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* vol. 114 (2022): 252-260. doi:10.1016/j.ijid.2021.11.009.

ZHU, N. *et al.* "A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019". *N Engl J Med* vol 382:727-33. Feb 20, 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017.

ZINGAROPOLI, M A *et al.* "Major reduction of NKT cells in patients with severe COVID-19 pneumonia." *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* vol. 222 (2021): 108630. doi:10.1016/j.clim.2020.108630

APÊNDICES



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Título do Projeto: “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA APÓS UM ANO DE VACINAÇÃO COM CORONAVAC EM IDOSOS”

Pesquisador Responsável: **Profa Dra Dulce Marta Schimieguel Mascarenhas Lima**

Local onde será realizada a pesquisa: Instituições de Longa Permanência para Idosos e Universidade Federal de Sergipe

O Sr(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) desta pesquisa porque atende aos pré-requisitos da população alvo para o estudo em questão. Sua contribuição é muito importante, mas não deve participar contra a sua vontade.

Esta pesquisa será realizada para avaliar o comportamento do imunizante contra COVID-19 em idosos, avaliando os efeitos da imunossenescência nas respostas imunológica e celular. Mesmo havendo recomendações específicas para a vacinação de idosos, ainda não existe estratégia uniforme para imunizar esta faixa etária e avaliar sua eficiência. Diante disso, esse projeto propõe-se analisar a eficiência da vacina em idosos, traçar estratégias para compreender e amenizar a imunossenescência através de estratégias efetivas que melhorem a qualidade de vida.

Os objetivos dessa pesquisa são avaliar a efetividade da vacinação contra a covid-19 em pacientes idosos de Instituições de longa permanência (ILPs) do estado de Sergipe, um ano após a vacinação com a CoronaVac.

Serão selecionados 200 idosos e 100 profissionais de instituições de longa permanência para idosos do estado de Sergipe, nas instituições Lar de Idosos de Nossa Senhora da Conceição (SAME), Residencial Sênior Pura Vida, Lar e Lazer para Idosos, Meu Aconchego Res. para Idosos, A Associação de Proteção à Velhice Desamparada de Estância, Lar Santo Antônio de Lagarto, Lar São Francisco de Assis de Simão Dias, Lar Padre Gregório de Nossa Senhora da Glória e Lar Isaías Gileno Barreto, após um ano da administração do esquema vacinal completo contra a COVID-19. Este trabalho será desenvolvido no Laboratório de Hematologia e Toxicologia do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

Antes de decidir, é importante que entenda todos os procedimentos, os possíveis benefícios, riscos e desconfortos envolvidos nesta pesquisa.

A qualquer momento, antes, durante e depois da pesquisa, você poderá solicitar mais esclarecimentos, recusar-se ou desistir de participar sem ser prejudicado, penalizado ou responsabilizado de nenhuma forma. Caso você já esteja em tratamento e não queira participar, você não será penalizado por isso.

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, Sr(a) poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dra Dulce Marta Schimieguel Mascarenhas Lima, nos telefones (79) 99191-8102 - (79) 3194-7597, Cidade Universitária Prof. "José Aloísio de Campos" Av. Marechal Rondon, s/n, Jardim Rosa Elze, 49.100-000 / São Cristóvão-SE e e-mail hematox2017@gmail.com.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Sergipe. "O CEP é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos" (Resolução CNS nº 466/2012, VII. 2).

Página 1/ 3

Rubrica do Pesquisador Principal	Rubrica do(a) Participante da Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

Caso você tenha dúvidas sobre a aprovação do estudo, seus direitos ou se estiver insatisfeito com este estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Sergipe, situado na Rua Cláudio Batista s/nº Bairro: Sanatório – Aracaju CEP: 49.060-110 – SE. Contato por e-mail: cep@academico.ufs.br .Telefone: (79) 3194-7208 e horários para contato– Segunda a Sexta-feira das 07:00 as 12:00h.

Todas as informações coletadas neste estudo serão confidenciais (seu nome jamais será divulgado) e utilizadas apenas para esta pesquisa. Somente nós, o pesquisador responsável e/ou equipe de pesquisa, teremos conhecimento de sua identidade e nos comprometemos a mantê-la em sigilo.

Para maiores informações sobre os direitos dos participantes de pesquisa, leia a **Cartilha dos Direitos dos Participantes de Pesquisa** elaborada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep), que está disponível no site:

http://conselho.saude.gov.br/images/comissoes/conep/img/boletins/Cartilha_Direitos_Participantes_de_Pesquisa_2020.pdf

Caso você concorde e aceite participar desta pesquisa, deverá rubricar todas as páginas deste termo e assinar a última página, nas duas vias. Eu, o pesquisador responsável, farei a mesma coisa, ou seja, rubricarei todas as páginas e assinarei a última página. Uma das vias ficará com você para consultar sempre que necessário.

O QUE Sr(a) PRECISA SABER:

- ✓ **DE QUE FORMA Sr(a) VAI PARTICIPAR DESTA PESQUISA:** Para a sua participação na pesquisa serão coletados 20 mL de sangue por meio de punção periférica no braço ou da mão pela equipe de pesquisadores, para posterior realização de análise da produção de anticorpos e para análise das células e posterior armazenamento a -80°C, no caso de um novo projeto o Sr(a) será contatado para solicitarmos uma nova permissão.
- ✓ **RISCOS EM PARTICIPAR DA PESQUISA:** Os riscos relativos ao procedimento de coleta são mínimos e estão diretamente associados aos procedimentos de rotina. No caso da coleta de sangue, o procedimento é praticamente indolor, podendo ocorrer pequenos extravasamentos de sangue no local, possíveis sensações de dor ou desconforto com a picada ou reações adversas. Os riscos de ordem psicológica serão minimizados pela manutenção da privacidade dos participantes no momento da coleta e pelo sigilo da identidade dos mesmos em quaisquer formas de publicação elaborada com os dados obtidos.
- ✓ **BENEFÍCIOS EM PARTICIPAR DA PESQUISA:** Os resultados obtidos servirão de base para a análise da efetividade da vacinação, bem como da periodicidade de administração de doses de reforço populacional específico e na população em geral; dito isso sua participação é de fundamental importância.
- ✓ **PRIVACIDADE E CONFIDENCIALIDADE:** Todos os seus dados serão confidenciais, ou seja, não serão divulgados de nenhuma forma para ninguém, minimizando os possíveis riscos relacionados a perda de confidencialidade. Os resultados poderão ser divulgados em publicações científicas mantendo sigilo dos dados pessoais.
- ✓ **ACESSO A RESULTADOS DA PESQUISA:** As publicações contendo os resultados serão disponibilizadas aos participantes e à toda população em formato acessível.
- ✓ **CUSTOS ENVOLVIDOS PELA PARTICIPAÇÃO DA PESQUISA:** você não terá custos para participar desta pesquisa; se o sr(a) tiver gastos com exames, transporte e alimentação, inclusive de seu acompanhante (se necessário), eles serão reembolsados pelo pesquisador. A pesquisa também não envolve compensações financeiras, ou seja, o sr(a) não poderá receber pagamento para participar.

Página 2/ 3

Rubrica do Pesquisador Principal	Rubrica do(a) Participante da Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

✓ **DANOS E INDENIZAÇÕES:** Se lhe ocorrer qualquer problema ou dano pessoal durante a pesquisa, lhe será garantido o direito à assistência médica imediata, integral e gratuita, às custas do pesquisador responsável, com possibilidade de indenização caso o dano for decorrente da pesquisa (através de vias judiciais Código Civil, Lei 10.406/2002, Artigos 927 a 954).

Consentimento do participante

Eu, abaixo assinado, declaro que concordo em participar desse estudo como voluntário(a). Fui informado(a) e esclarecido(a) sobre o objetivo desta pesquisa, li, ou foram lidos para mim, os procedimentos envolvidos, os possíveis riscos e benefícios da minha participação e esclareci todas as minhas dúvidas.

Sei que posso me recusar a participar e retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto me cause qualquer prejuízo, penalidade ou responsabilidade. Autorizo o uso dos meus dados de pesquisa sem que a minha identidade seja divulgada.

Recebi uma via deste documento com todas as páginas rubricadas e a última assinada por mim e pelo Pesquisador Responsável.

Nome do(a) participante: _____

Assinatura: _____ local e data: _____

Declaração do pesquisador

Declaro que obtive de forma apropriada, esclarecida e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante para a participação neste estudo. Entreguei uma via deste documento com todas as páginas rubricadas e a última assinada por mim ao participante e declaro que me comprometo a cumprir todos os termos aqui descritos.

Nome do Pesquisador Responsável: _____

Assinatura: _____ Local/data: _____

Nome do auxiliar de pesquisa/testemunha quando aplicável: _____

Assinatura: _____ Local/data: _____



Assinatura Datiloscópica (quando não alfabetizado)

Página 3/ 3

Rubrica do Pesquisador Principal	Rubrica do(a) Participante da Pesquisa

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SERGIPE - UFS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA APÓS UM ANO DE VACINAÇÃO COM CORONAVAC EM IDOSOS

Pesquisador: DULCE MARTA SCHIMIEGUEL MASCARENHAS LIMA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 64091222.0.0000.5546

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.753.535

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo "Informações Básicas da Pesquisa" (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1982573.pdf) e do "Projeto Detalhado / Brochura Investigador" (PROJETO_VACINAS_IDOSOS.pdf), postados em 07/10/2022 e 18/07/2022, respectivamente.

INTRODUÇÃO:

Em dezembro de 2019, a cidade chinesa de Wuhan registrou seus primeiros casos de pneumonia grave de origem desconhecida, esses casos foram notificados a Organização Mundial da Saúde (OMS), devido sua etiologia não estar bem definida pelas autoridades nacionais do país. O grupo de pesquisa de coronavírus nomeou oficialmente o novo vírus zoonótico de coronavírus da síndrome respiratória aguda grave tipo 2, ou SARS-CoV- 2, abreviado, o agente causador da doença do coronavírus 2019 (COVID-19), considerada uma infecção viral altamente contagiosa e com altas

taxas de mortalidade. Logo, a COVID-19 se tornou uma emergência internacional de saúde pública (RABAAN et al., 2020; HASÖKSÜZ et al., 2020; KHAN et al., 2020). Os sintomas mais comuns incluem febre, tosse e fadiga, podendo estar associados a produção de escarro, cefaleias, anosmia, hipogeusia, diarreia, mialgia e dispneia. Por outro lado, os sinais da doença podem

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

CEP: 49.060-110

E-mail: cep@academico.ufs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SERGIPE - UFS



Continuação do Parecer: 5.753.535

Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	18/07/2022 10:36:52	DULCE MARTA SCHIMIEGUEL MASCARENHAS LIMA	Aceito
----------------	-----------------------------	------------------------	---	--------

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARACAJU, 11 de Novembro de 2022

Assinado por:

FRANCISCO DE ASSIS PEREIRA
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

E-mail: cep@academico.ufs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
BIBLIOTECA CENTRAL



TERMO DE SOLICITAÇÃO PARA NÃO PUBLICAÇÃO ELETRÔNICA

Não autorizo a Universidade Federal de Sergipe a disponibilizar através do site <http://bdtd.ufs.br>, o texto integral da obra abaixo citada, em formato digital PDF, para fins de leitura, impressão e download, a título de divulgação da produção científica brasileira, pois estou em processo de desenvolvimento de um artigo científico baseado neste material. A publicação antecipada na biblioteca virtual pode expor o conteúdo do trabalho ao público, o que poderia resultar em eventuais problemas de plágio ou de duplicidade de conteúdo ao submeter o artigo a revistas científicas.

() Tese (x) Dissertação

Programa de Pós-Graduação: Ciências Farmacêuticas

Área de concentração: Desenvolvimento e controle de fármacos e medicamentos

Título: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE UM ANO PÓS-VACINAÇÃO COM CORONAVAC EM IDOSOS E PROFISSIONAIS EM INSTITUIÇÕES DE LONGA PERMANÊNCIA.

Autor: Joyce Thayane da Conceição dos Santos

CPF: 058.782.245-77 E-mail: joycethayane@hotmail.com

Orientador: Dra. Dulce Marta Schimieguel Mascarenhas Lima

CPF: 653.495.989-53 E-mail: dulcemarta@hotmail.com

Data de defesa: 18 de Fevereiro de 2024

Instituição de vínculo empregatício do autor: _____

Agência de fomento (se bolsista): Capes

21 de Agosto de 2024

Assinatura do autor



Termo de Encaminhamento

Pelo presente, encaminho a versão final da ()tese / (x)dissertação de Joyce Thayane da Conceição dos Santos, intitulada **AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE UM ANO PÓS-VACINAÇÃO COM CORONAVAC EM IDOSOS E PROFISSIONAIS EM INSTITUIÇÕES DE LONGA PERMANÊNCIA**, realizada sob minha orientação, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Declaro também que o trabalho cumpriu todas as exigências da banca. Desta forma, esta Coordenação pode receber o material final, bem como dar encaminhamento aos trâmites de solicitação do diploma.

Data: 21/08/2024

Orientador (a)

Letter to the editor:

KINETICS OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH ASYMPTOMATIC OR MILD COVID-19: A LONGITUDINAL STUDY BASED IN AN IN-HOUSE INDIRECT ELISA METHOD

Nathanielly de Lima Silva^{1,2} , Danilo Nobre¹ , Joyceane Alves de Oliveira^{1,2} , Márcia Santos Rezende^{1,2} , Joyce Thayane da Conceição dos Santos^{1,2} , Adriano Antunes de Souza Araújo^{1,2,3} , Lucindo José Quintans-Júnior^{2,3,4} , Rafael Ciro Marques Cavalcante⁵ , Luiz Carlos de Souza Ferreira⁶ , Paulo Ricardo Martins-Filho⁷ , Dulce Marta Schimieguel^{1,2} 

- ¹ Department of Pharmacy, Laboratory of Hematology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil
- ² Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil
- ³ Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil
- ⁴ Laboratory of Neuroscience and Pharmacological Assays (LANEF), Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil
- ⁵ Department of Pharmacy, Federal University of Sergipe, Lagarto, Sergipe, Brazil
- ⁶ Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil
- ⁷ Investigative Pathology Laboratory, Federal University of Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil

* **Corresponding author:** Dra. Dulce Marta Schimieguel, Departamento de Farmácia, Laboratório de Hematologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil. CEP: 49100-000. E-mail: dulcemarta@hotmail.com

<https://dx.doi.org/10.17179/excli2022-5337>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Studies have shown that severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) may induce humoral and cellular immune memory to receptor-binding domain (RBD), spike glycoprotein (S), and nucleocapsid (N) protein for at least five months in more than 90 % of individuals with COVID-19 (Dan et al., 2021). However, there is consistent evidence for the effect of disease severity on antibody magnitude (Peluso et al., 2021). It has been suggested that asymptomatic or mild COVID-19 patients have inadequate acquisition of humoral immunity (Takeshita et al., 2021), which is critical for herd immunity and the development effective vaccination strategies. In this study, we evaluate changes in humoral immune responses in patients with asymptomatic or mild COVID-19 during six months of follow-up.

In this longitudinal study, we selected 62 individuals (median age of 42.5 years; interquartile range [IQR] 33.3-52.0; 59.7 % female) tested positive for SARS-CoV-2 immunoglobulin G (IgG) antibodies using a fluorescence immunoassay (FIA) (iChroma II, BioSys) from July

2020 (peak of the first wave) to March 2021 (beginning of the second wave associated with transmission of the Gamma variant) in the state of Sergipe, Northeast Brazil. Sergipe is located in a region with the worst socioeconomic indicators in the country, has an estimated population of 2.3 million, and a Human Development Index of 0.665. The first case of COVID-19 in Sergipe was confirmed on March 14, 2020, and at the time of writing this manuscript, more than 341,000 cases and 6400 deaths had been registered.

All participants included in the present study had a history of asymptomatic or mild COVID-19, were not vaccinated against the disease, and were selected from the EpiSERGIPE Project conducted in the state of Sergipe. The EpiSERGIPE project was a population-based serosurvey study that aimed to estimate the proportion of the population previously infected and to determine the population's level of immunity against SARS-CoV-2. In the state of Sergipe, the seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies in July 2020 and March 2021 was 9.3 % (95 % CI 8.5–10.1) (de Souza Araújo et al., 2021) and 15.4 % (95 % CI 14.5-16.4) (unpublished data), respectively.

An in-house indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based method was used to evaluate the serum titers of anti-nucleocapsid SARS-CoV-2 antibodies at three moments: baseline (D0), 90 days (D90), and 180 days (D180). Briefly, 96-microwell plates (Nunc, Thermo Fisher Scientific) were coated with 200 µl of recombinant SARS-CoV-2 nucleocapsid protein at 0.1 µg/mL and incubated overnight at 4 °C. On the following day, the plates were washed five times with 1 % PBS. Plates were blocked with 2 % BSA dissolved in PBS and incubated for 2 hours at 37 °C. The samples were diluted to 1:500 and incubated at 37 °C for 1.5 hours. Plates were washed five times with PBS-Tween (0.05 %) and goat anti-human IgG (HRP) secondary antibodies (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) were added at 1:20,000 and incubated at 37 °C for 1.5 hours. As previously, plates were washed five times and incubated for 20 min with 50 µl of o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (SigmaFast OPD, Sigma-Aldrich). The reaction was stopped with 25 µl of 1M H₂SO₄ and read at 450 nm on a plate reader (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific).

To define the cut-off point, samples cryopreserved since the beginning of 2019 in our biobank, tested by fluorescent immunoassay and demonstrating a non-reactive result were later used as negative controls with a mean concentration of 3.59 ng/mL. Using the formula “*cut-off*=*m*+(2**SD*)”, we obtained the final value of 11.49 ng/mL, where “*m*” represented the mean and “*SD*” the standard deviation of the concentrations of negative controls for SARS-CoV-2.

The serum titers of anti-nucleocapsid SARS-CoV-2 antibodies were plotted in boxplots. The assumptions of normality were checked, and the Friedman test and post hoc Conover's test (Bonferroni's correction) were used to compare the levels of IgG antibodies to the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein between the three assessment periods. A two-way ANOVA was used to analyze the influence of sex (male and female) and age (≤ 40 years and > 40 years) on the levels of anti-SARS-CoV-2 antibodies. The significance level adopted was 5 %. The analyses were performed using the JASP software version 0.13 (JASP Team, Amsterdam, Netherlands).

In D0, 79 % (49 of 62) of individuals had a positive result for the presence of anti-nucleocapsid SARS-CoV-2 antibodies. In D90 and D180, the percentage of positive results was 69.3 % (43 of 62) and 53.2 % (33 of 62), respectively. We found a progressive decline in the levels of anti-nucleocapsid SARS-CoV-2 antibodies over time, ranging from 26.2 (IQR 12.4-37.7) in D0 to 11.7 (IQR 5.6-18.2) in D180 (*p* < 0.001) (Figure 1; supplementary file). In addition, we found that individuals over 40 years old had higher levels of IgG antibodies to the SARS-CoV-2 nucleocapsid in D90, regardless of sex. An influence of sex and age on the humoral response was not observed on D0 and D180 (Figure 2; supplementary file).

Asymptomatic or mild disease has been found in about 80 % of patients with SARS-CoV-2 infection. In most cases, antibody levels increase within the first weeks of infection (Qu et

al., 2020), but our results showed that about 20 % of individuals did not seroconvert in the first evaluation. Although clinical and biological characteristics may influence the individual immune response, it is possible that this negative seroconversion rate is a result of inherent limitations of the immunoassay, including its sensitivity and the use of only one target SARS-CoV-2 protein. Furthermore, despite studies having suggested that antibody titers are determined especially by disease severity and not duration (Seow et al., 2020), we found a progressive decline in the levels of anti-nucleocapsid SARS-CoV-2 antibodies and an approximately 30 % decrease in the number of individuals with detectable IgG antibodies six months after an asymptomatic or mild SARS-CoV-2 infection.

The present findings suggest that the natural humoral response after SARS-CoV-2 infection in outpatients is not sustained in the long term, which may increase the risk of reinfection for these individuals. In a study performed by Lumley et al. (2021), it was shown that previous SARS-CoV-2 infection is associated with protection from reinfection for most people for at least six months. The decline in humoral response after asymptomatic or mild infection has been associated with lower viral load and lower release of pro-inflammatory cytokines, as well as a decrease in blood B-cell ratio and antibody-secreting cells (Yang et al., 2021).

Age and sex are factors that can influence the humoral response through antibody production during and after SARS-CoV-2 infection. In our study, we found that subjects over 40 years old had higher levels of IgG antibodies to the SARS-CoV-2 nucleocapsid than those younger subjects three months after infection. In addition, we found no differences between sexes regarding the serum titers of anti-nucleocapsid SARS-CoV-2 antibodies at the three time points. These findings showed different kinetics in the humoral response against SARS-CoV-2 infection according to age and corroborate other studies that showed that older age is associated with sustained antibody response in COVID-19 (Noh et al., 2021). Although the impact of age on COVID-19 clinical outcomes is recognized, it has been suggested that immunosenescence could be two forces with opposite effects, partly explaining the complex relationship between age and antibody levels after COVID-19 infection (Meyer et al., 2022).

This study showed a progressive decline in the levels of anti-nucleocapsid SARS-CoV-2 antibodies during the first six months after SARS-CoV-2 infection among individuals with asymptomatic or mild disease. Approximately 50 % of individuals have no detectable antibodies six months after infection. Moreover, we found a potential influence of age on the humoral response against SARS-CoV-2.

Authors' contributions

Silva NL, Nobre D, de Oliveira JA, Rezende MS, dos Santos JTC: collected and analyzed the data; interpreted the results; writing – review and editing; De Souza Araújo AA, Quintans-Júnior LJ, Martins-Filho PR, Cavalcante RCM, Ferreira LCS, Schimieguel DM: conceptualisation; project administration; resources; interpreted the results; drafted the manuscript; writing – review and editing.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Role of funding source

This study is part of the EpiSERGIPE project which is supported by grant SES/FAPES/UFES 001/2020.

Acknowledgments

We thank the healthcare workers and members of the EpiSERGIPE project for their efforts in the fight against COVID-19 in the state of Sergipe.

REFERENCES

- Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*. 2021;371(6529):eabf4063.
- de Souza Araújo AA, Quintans-Júnior LJ, Heimfarth L, Schimieguel DM, Corrêa CB, de Moura TR, et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies in the poorest region of Brazil: results from a population-based study. *Epidemiol Infect*. 2021;149:e130.
- Lumley SF, O'Donnell D, Stoesser NE, Matthews PC, Howarth A, Hatch SB, et al. Antibody status and incidence of SARS-CoV-2 infection in health care workers. *N Engl J Med*. 2021;384:533–40.
- Meyer M, Constancias F, Worth C, Meyer A, Muller M, Boussuge A, et al. Humoral immune response after COVID-19 infection or BNT162b2 vaccine among older adults: evolution over time and protective thresholds. *GeroScience*. 2022;44:1229–40.
- Noh JY, Kwak J-E, Yang J-S, Hwang SY, Yoon JG, Seong H, et al. Longitudinal assessment of anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 immune responses for six months based on the clinical severity of Coronavirus disease 2019. *J Infect Dis*. 2021;224:754–63.
- Peluso MJ, Takahashi S, Hakim J, Kelly JD, Torres L, Iyer NS, et al. SARS-CoV-2 antibody magnitude and detectability are driven by disease severity, timing, and assay. *Sci Adv*. 2021;7(31):eabh3409.
- Qu J, Wu C, Li X, Zhang G, Jiang Z, Li X, et al. Profile of immunoglobulin G and IgM antibodies against severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis*. 2020;71:2255–8.
- Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S, Pickering S, Steel KJA, et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nat Microbiol*. 2020;5:1598–607.
- Takeshita M, Nishina N, Moriyama S, Takahashi Y, Uwamino Y, Nagata M, et al. Incomplete humoral response including neutralizing antibodies in asymptomatic to mild COVID-19 patients in Japan. *Virology*. 2021;555:35–43.
- Yang Y, Wang X, Du R-H, Zhang W, Si H-R, Zhu Y, et al. Serological investigation of asymptomatic cases of SARS-CoV-2 infection reveals weak and declining antibody responses. *Emerg Microbes Infect*. 2021;10:905–12.