



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Eduarda Laís Munari

**Avaliação da imunogenicidade de uma vacina de subunidade proteica contra a
COVID-19**

Florianópolis
2023

Eduarda Laís Munari

**Avaliação da imunogenicidade de uma vacina de subunidade proteica contra a
COVID-19**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. André Báfica

Coorientador: Dr. Daniel Augusto Gasparin Bueno Mendes

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Munari, Eduarda Laís

Avaliação da imunogenicidade de uma vacina de subunidade proteica contra a COVID-19 / Eduarda Laís Munari ; orientador, André Luiz Barbosa Báfica, coorientador, Daniel Augusto Gasparin Bueno Mendes, 2023.

56 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. vacina de mucosa. 3. proteína quimérica. 4. rota de imunização. I. Báfica, André Luiz Barbosa. II. Mendes, Daniel Augusto Gasparin Bueno. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Eduarda Laís Munari

**Avaliação da imunogenicidade de uma vacina de subunidade proteica contra a
COVID-19**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 29 de setembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Álvaro Menin
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Juliano Ferreira
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Dr. André Báfica
Orientador

Florianópolis, 2023.

Este trabalho é dedicado a todas as pessoas de bom coração que me incentivaram a chegar até aqui. A todos vocês, meu profundo agradecimento!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Dr. André Báfica, por me orientar desde o meu estágio de verão no início de 2020 até o presente momento. Por acompanhar a minha trajetória ao longo desse tempo, por ser um grande mentor científico nos momentos decisivos, pela oportunidade e confiança. Obrigada por contribuir tanto na minha formação pessoal quanto profissional.

Ao Dr. Daniel Mendes, o meu muito obrigada! Obrigada por topar ser meu coorientador e principalmente por se tornar meu grande amigo. Obrigada pelas inúmeras discussões científicas, pelo tempo de qualidade investido na minha formação, por instigar em mim a arte de pensar, pela grande parceria, pelo conforto nas horas difíceis, enfim, por tudo! Sem você essa caminhada não seria tão divertida. Tenho muita admiração pela pessoa e pelo profissional de excelência que você é.

A Ms. Carolina Eto, minha grande amiga, por me ensinar tudo com muito amor e carinho, pelas incontáveis ajudas e sugestões de coisas científicas ou não. Por me apoiar em todas as etapas do mestrado e por permanecer ao meu lado nessa jornada. Agradeço também por todo incentivo e positividade. Muito do que sou hoje eu devo a você! Obrigada!

Aos Professores Daniel Mansur, Edroaldo Lummertz e José Henrique M. Oliveira, pela disponibilidade, pelas discussões científicas e pela dedicação como professores.

A Ms. Nicoli Heck, pela padronização do teste de ELISA e pela grande amizade. Obrigada por todas as dicas de vida, carreira e por ter contribuído tanto para o meu amadurecimento. Obrigada pelas risadas. Admiro muito você, loirinha!

Ao Ms. Juliano Vieira, pela expressão e purificação da proteína N utilizada neste trabalho. Pelas trocas de biotério e pela padronização do teste de ELISA para a proteína N.

A Dr. Ruth Fernandes, minha eterna Rainha do Nilo, ensinou tantas coisas para mim e para o Juliano. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos comigo, pelo companheirismo, amor, apoio e pela amizade.

A todos os ex e atuais integrantes do Laboratório de Imunobiologia, obrigada pela parceria, pelas conversas científicas, pelas risadas, pelo apoio e por compartilhar momentos incríveis ao longo desses anos. Aprendi muito com todos e levarei cada ensinamento dentro do meu coração. Sinto muito orgulho por ter feito parte desse time de excelência.

Ao Prof. Dr. Sérgio Costa de Oliveira e Dr. Fábio Mambelli por cederem gentilmente a proteína *rChimera* utilizada para as imunizações e testes deste trabalho.

A Prof. Dra. Leda Castilho por ceder gentilmente a proteína *Spike*.

Ao Prof. Juliano e ao Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) por auxiliar na fluidez do dia-a-dia com o biotério e com as atividades relacionadas.

A minha mãe e ao meu padrasto, grandes incentivadores dos meus sonhos. Obrigada por acreditarem tanto em mim! Vocês foram essenciais para que chegasse até aqui, nunca vou esquecer das muitas caixas de comida que eu trouxe de Curitiba para Floripa, das longas viagens, dos cuidados com o Cadu e o Sodom, das palavras positivas e de todas as comemorações com as minhas conquistas. Eterna gratidão!

Ao meu grande companheiro de vida, Bruno. Desde 2015 partilhando a vida comigo, sendo um dos maiores incentivadores da minha carreira, acreditando e contribuindo diariamente para que não faltasse nada em nenhum momento. Obrigada por tanto amor, cuidado, tempo de qualidade. Admiro muito você e o profissional exemplar que é. Tua história é linda e fico muito feliz em saber que fiz parte dela. Obrigada!

A minha amiga Mariana Maraschin. Companheira de trajeto para o laboratório e academia. Compartilhou comigo várias risadas, pensamento e assuntos profundos. Obrigada por fazer parte dessa caminhada que foi o mestrado e principalmente por ter se tornado uma grande amiga.

As minhas eternas amigas Veterinárias Fer e Gi, desde a graduação me acompanhando e incentivando. Fico feliz em saber que estamos tão bem e chegamos ao ponto que queríamos. Deu tudo certo! Ao Vini, vet de pequenos, um grande amigo que sempre me apoiou e comemorou com as minhas conquistas.

As minhas colegas do mestrado, Letícia, Fabi e Isa. Excelentes pessoas e companheiras. Tenho certeza que serão grandes pesquisadoras.

Ao Cadu e ao Sodom, dois carinhos gente boa. Sinto muito por não acompanhar a vida de vocês, mas sei que vocês estão sendo bem cuidados, com muita água, comida, amor e grama para caminhar. Amo vocês!

A UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela minha formação de qualidade, pela estrutura e ensino. Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) pelos equipamentos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa. A CAPES e ao MCTIC pelo financiamento direto e indireto deste trabalho.

“É necessário sair da ilha para ver a ilha, não nos vemos se não saímos de nós. ”

(SARAMAGO, 1998)

RESUMO

A COVID-19 é uma enfermidade viral de caráter pandêmico, causado pelo agente SARS-CoV-2. O sítio primário da infecção por esse vírus é o trato respiratório superior, podendo acometer o trato respiratório inferior, desencadeando a Síndrome Respiratória Aguda Grave, potencialmente fatal. Embora existam vacinas contra a COVID-19, todas são administradas por via intramuscular falham em induzir respostas locais específicas. Além disso, a diversidade do vírus SARS-CoV-2 e suas variantes apresentam uma potencial ameaça à eficácia das vacinas. Portanto, vários estudos estão em andamento para explorar diferentes estratégias vacinais, incluindo diferentes formas de administração. No presente estudo, investigamos a imunogenicidade de uma proteína quimérica multiepítopo composta pelas porções das proteínas N₄₅₋₂₀₆ e S₂₂₃₋₅₁₄ (*rChimera*) do SARS-CoV-2 associada ao adjuvante Alum. *rChimera* foi administrada em camundongos C57BL/6 adultos, na dose de 10 µg/animal, tanto por via intramuscular quanto intranasal, seguindo um esquema de imunização com uma dose primária seguida de um reforço no 21º dia. Após o protocolo de imunização, coletamos amostras como soro, lavado broncoalveolar e baço para avaliar as respostas humorais e celulares específicas aos antígenos S e N do SARS-CoV-2, bem como a resposta contra o antígeno *rChimera*. Por meio de ensaios ELISA indiretos, observamos que camundongos imunizados por via intramuscular apresentavam uma maior proporção de anticorpos específicos da classe IgG anti-S, além de IgG anti-N e *rChimera*. Quanto à resposta celular, as células T estimuladas com os antígenos, não produziram a citocina IFN-γ e não alteraram o número e a frequência das células T CD3⁺CD4⁺ e CD8⁺. Ao usar a mesma estratégia de vacinação pela via intranasal, observamos que não houve diferença entre o grupo que recebeu a vacina quando comparado ao grupo veículo. Para investigar mais a fundo a resposta imunológica nessa via alternativa, aumentamos a dose da proteína *rChimera* para 20 µg, aplicada no dia 0 e 21 do esquema de imunização. Observamos que essa abordagem gerou uma resposta sistêmica humoral específica. Em resumo, os resultados deste estudo demonstram a eficácia imunológica da proteína quimérica quando administrada por diferentes vias, especialmente quando aplicada na via de infecção do vírus SARS-CoV-2. Essas descobertas abrem portas para uma possível candidata vacinal administrada por uma via capaz de induzir uma resposta de mucosa, além de contar com menor invasividade na aplicação.

Palavras-chave: vacina de mucosa; proteína quimérica; rota de imunização.

ABSTRACT

COVID-19 is a pandemic viral disease, caused by the agent SARS-CoV-2. The primary site of infection by this virus is the upper respiratory tract, which can affect the lower respiratory tract, triggering Severe Acute Respiratory Syndrome, which is potentially fatal. Although there are vaccines against COVID-19, all of them administered intramuscularly fail to induce specific local responses. Furthermore, the diversity of the SARS-CoV-2 virus and its variants poses a potential threat to the effectiveness of vaccines. Therefore, several studies are underway to explore different vaccine strategies, including different forms of administration. In the present study, we investigated the immunogenicity of a multiepitope chimeric protein composed of portions of the N₄₅₋₂₀₆ and S₂₂₃₋₅₁₄ (*rChimera*) proteins of SARS-CoV-2 associated with the Alum adjuvant. *rChimera* was administered to adult C57BL/6 mice, at a dose of 10 µg/animal, both intramuscularly and intranasally, following an immunization schedule with a primary dose followed by a booster on the 21st day. After the immunization protocol, we collected samples such as serum, bronchoalveolar lavage and spleen to evaluate the specific humoral and cellular responses to the S and N antigens of SARS-CoV-2, as well as the response against the rChimera antigen. Using indirect ELISA assays, we observed that mice immunized intramuscularly had a higher proportion of specific antibodies of the IgG anti-S class, in addition to IgG anti-N and rChimera. As for the cellular response, T cells stimulated with antigens did not produce the cytokine IFN-γ and did not change the number and frequency of CD3⁺CD4⁺ and CD8⁺ T cells. When using the same intranasal vaccination strategy, we observed that there was no difference between the group that received the vaccine when compared to the vehicle group. To further investigate the immunological response in this alternative route, we increased the dose of rChimera protein to 20 µg, applied on days 0 and 21 of the immunization schedule. We observed that this approach generated a specific systemic humoral response. In summary, the results of this study demonstrate the immunological efficacy of the chimeric protein when administered by different routes, especially when applied to the SARS-CoV-2 virus infection route. These discoveries open the door to a possible vaccine candidate administered via a route capable of inducing a mucosal response, in addition to being less invasive in application.

Keywords: mucosal vaccine; chimeric protein; immunization route application.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de imunização intramuscular	31
Figura 2. Esquema dose-reforço de imunização intramuscular com a proteína <i>rChimera</i> induz anticorpos específicos aos antígenos do agente SARS-CoV-2... ..	32
Figura 3. Imunização intramuscular não induz resposta local específica.....	33
Figura 4. Imunização intramuscular não induziu resposta celular específica aos antígenos do agente SARS-CoV-2.	34
Figura 5. A imunização intramuscular não influencia a frequência e nº de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	34
Figura 6. Esquema de imunização intranasal	35
Figura 7. Imunização intranasal não induziu anticorpos específicos aos antígenos do agente SARS-CoV-2.....	36
Figura 8. Imunização intranasal não induz resposta local específica	37
Figura 9. Imunização intranasal não induziu resposta celular específica aos antígenos do agente SARS-CoV-2.....	38
Figura 10. A imunização intranasal não induziu o aumento da frequência e nº de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	39
Figura 11. Esquema de imunização intranasal com dose de 20 µg	40
Figura 12. Dose de 20 µg de <i>rChimera</i> administrada via intranasal induz resposta humoral sistêmica	41
Figura 13. Estratégia de <i>gate</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos e esquema vacinal	28
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µl	Microlitro
ACE2	<i>Angiotensin I Converting Enzyme 2</i>
APCs	<i>Antigen Presenting Cells</i>
BCG	<i>Bacilo de Calmette e Guérin</i>
CD	<i>Cluster Of Differentiation</i>
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
DCs	<i>Dendritic Cells</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E.P.M	Erro Padrão da Média
HCl	Ácido Clorídrico
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IFNAR	<i>The Interferon-α/β Receptor</i>
IFNs	<i>Interferons</i>
IFN- γ	<i>Interferon-gama</i>
Ig	Imunoglobulinas
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
ISRE	<i>Interferon-Sensitive Response Element</i>
JAK-STAT	<i>The Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
LBA	Lavado Broncoalveolar
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associated Protein 5</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	Mililitro
MyD88	Fator de Diferenciação Mielóide 8
NF- κ B	<i>Factor Nuclear Kappa B</i>
NSP	<i>Nonstructural Protein</i>
O.D.	<i>Optical Density</i>
ORF	<i>Open Reading Frames</i>
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>

PMA+Iono *Phorbol Myristate Acetate and Ionomycin*
RBD *Receptor-Binding Domain*
RIG-I *Retinoic Acid-Inducible Gene I*
RNA *Ácido Ribonucleico*
SPF *Specific-pathogen-free*
STING *Stimulator of Interferon genes*
Th *T Helper Cells*
TLRs *Toll-like Receptors*
TMRPSS2 *Enzima Protease Serina Transmembranar 2*
T_{RM} *Tissue resident memory T cells*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	PANDEMIA COVID-19 E SARS-CoV-2	16
1.2	RESPOSTA IMUNE AO SARS-CoV-2	17
1.3	ESTRATÉGIAS VACINAIS	19
1.4	VIAS DE IMUNIZAÇÃO.....	21
1.4.1	Via intramuscular.....	21
1.4.2	Via intranasal.....	22
2	JUSTIFICATIVA	25
2.1	OBJETIVOS	26
2.1.1	Objetivo Geral.....	26
2.1.2	Objetivos Específicos.....	26
3	METODOLOGIA.....	27
3.1	COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS.....	27
3.2	ANIMAIS	27
3.3	PROTEÍNA <i>rChimera</i>	27
3.4	IMUNIZAÇÃO	27
3.5	COLETA DE AMOSTRAS	28
3.6	MENSURAÇÃO ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA OS ANTÍGENOS DO AGENTE SARS-CoV-2.....	29
3.7	CULTURA DE ESPLÊNOCITOS E DOSAGEM DE IFN- γ	29
3.8	ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO	30
3.9	PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO	30
4	RESULTADOS	31
4.1	A IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR INDUZ RESPOSTA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS AOS ANTÍGENOS DO AGENTE SARS-CoV-2.....	31
4.2	A IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR NÃO INDUZIU RESPOSTA HUMORAL NO TRATO RESPIRATÓRIO	33
4.3	A IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR NÃO INDUZIU RESPOSTA CELULAR PARA OS ANTÍGENOS S E N DO SARS-CoV-2.....	33
4.4	CAMUNDONGOS IMUNIZADOS PELA VIA INTRANASAL COM DOSES MAIS BAIXAS NÃO PRODUZEM IgG ANTI-PROTEÍNAS DO SARS-CoV-2	35

4.5	A IMUNIZAÇÃO INTRANASAL COM DOSES MAIS BAIXAS NÃO INDUZIU RESPOSTA HUMORAL NO TRATO RESPIRATÓRIO	37
4.6	ESPLENÓCITOS DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM DOSES MAIS BAIXAS PELA VIA INTRANASAL NÃO PRODUZEM RESPOSTA IMUNE CELULAR ESPECÍFICA.....	38
4.7	A INDUÇÃO DE RESPOSTA HUMORAL SISTÊMICA PELA VIA INTRANASAL OCORREU COM UMA DOSE MAIOR DA PROTEÍNA <i>rChimera</i>	40
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS	48
	APÊNDICE A	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 PANDEMIA COVID-19 E SARS-COV-2

Nos últimos 21 anos, a humanidade se deparou com três grandes epidemias de vírus patogênicos e zoonóticos da família Coronaviridae, são eles: SARS-CoV-1 (Síndrome Respiratória Aguda Grave - 2002), MERS (Síndrome Respiratória do Oriente Médio - 2012) e no final de 2019, um novo coronavírus denominado SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Grave 2) foi identificado. Os coronavírus pertencentes a essa família infectam muitas espécies animais, incluindo humanos, causando doenças entéricas, hepáticas, neurológicas e respiratórias (SHARMA; FAROUK; LAL, 2021; ZHU *et al.*, 2020).

O surto de COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*) desencadeado pelo SARS-CoV-2 foi identificado pela primeira vez na cidade de Wuhan, China. Pouco tempo após o surgimento dos primeiros casos, o vírus se espalhou rapidamente por outros países e em 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde declarou oficialmente o surto global de COVID-19 como uma pandemia. Atualmente, a pandemia COVID-19 já foi responsável por mais de 700 milhões de casos confirmados e mais de 6 milhões de mortes em todo o mundo (HU *et al.*, 2021; WHO, 2023a).

O novo coronavírus SARS-CoV-2 é um vírus envelopado, sendo que seu genoma consiste em um RNA de sentido positivo e de fita simples (+ssRNA). Com o maior e mais complexo genoma viral (~30 kb de comprimento), o SARS-CoV-2 apresenta duas grandes regiões de leituras abertas (*open Reading frame – ORFs*). O primeiro ORF corresponde 2/3 do genoma total e é responsável por codificar dois macropolipeptídeos pp1a/pp1b. Estes macropolipeptídeos são processados por proteases virais para gerar 16 proteínas não estruturais (NSP), que de maneira geral são necessárias para a replicação e transcrição viral (JAMISON *et al.*, 2022; YAN *et al.*, 2022). O 1/3 restante do material genético do vírus, codifica as proteínas estruturais *Spike* (S), Membrana (M), Envelope (E), Nucleocapsídeo (N) e proteínas acessórias (3a,6, 7a, 8, 9b, 9c e 10). Estas proteínas estão relacionadas principalmente com a montagem do agente viral, enquanto que as proteínas acessórias são consideradas indispensáveis para a replicação viral e exibem funções importantes nas interações vírus-hospedeiro (XIANG *et al.*, 2020; JAMISON *et al.*, 2022). Entre todas as proteínas citadas, a *Spike* destaca-se por mediar a entrada do vírus nas células do hospedeiro, o que a torna uma candidata em potencial para estratégias de combate ao SARS-CoV-2.

A proteína S está localizada no envelope externo do vírion com um formato espicular, estruturalmente quando inativada é uma proteína trimérica composta por duas subunidades: S1

e S2 (HUANG *et al.*, 2020). A subunidade S1 é subdividida em um domínio N-terminal (NTD) e o domínio de ligação ao receptor – RBD (do inglês, *Receptor Binding Domain*), que medeia a ligação entre a partícula viral e os receptores ACE2 (do inglês, *Angiotensin-Converting Enzyme 2*) das células cardíacas, intestinais, trato respiratório, neuronais e entre outras dos hospedeiros. Após a ligação RBD/ACE2, ocorre a clivagem da subunidade S2 pela protease TMRPSS2 do hospedeiro permitindo a fusão entre as membranas viral e celular, resultando na liberação do genoma do vírus SARS-CoV-2 no interior das células do hospedeiro (WALLS *et al.*, 2020; YANG; RAO, 2021).

No momento, a maioria dos anticorpos e vacinas neutralizantes são projetados para direcionar uma resposta imunológica específica à proteína S ou apenas ao domínio de ligação RBD, visando inibir a infecção viral (MIN; SUN, 2021; PINTO *et al.*, 2020). No entanto, surgem outras candidatas promissoras, como a proteína Nucleocapsídeo do SARS-CoV-2. A proteína N protege e empacota o RNA viral em um complexo ribonucleocapsídeo helicoidal. Além disso, sua sequência de 419 aminoácidos é altamente conservada em comparação com outros coronavírus (BAI *et al.*, 2021; OLIVEIRA; DE MAGALHÃES; HOMAN, 2020). Devido a essas características, o desenvolvimento de uma possível estratégia vacinal contra a proteína N poderia induzir respostas imunológicas capazes de reagir de forma cruzada com outros coronavírus humanos.

1.2 RESPOSTA IMUNE AO SARS-COV-2

Quando o vírus SARS-CoV-2 entra no trato respiratório do hospedeiro, ele infecta principalmente células que expressam o receptor ACE2. Essas células incluem as células epiteliais das vias aéreas, células endoteliais vasculares e células imunes pulmonares (HAMMING *et al.*, 2004). Simultaneamente, ocorre o reconhecimento de PAMPs (do inglês, *Pathogen associated molecular patterns*) pelas células do sistema imunológico inato, que compõem a primeira linha de defesa do hospedeiro, sinalizando a invasão por um agente patogênico (DIAMOND; KANNEGANTI, 2022).

As células do sistema imune inato expressam receptores de reconhecimento de padrão, como os TLRs (do inglês, *Toll-like receptors*). Os TLRs (TLR7 e TLR8), reconhecem o ssRNA do agente SARS-CoV-2 e inicia cascatas de sinalização a jusante recrutando proteínas adaptadoras, como a MyD88. A jusante de MyD88, o fator nuclear NF- κ B ativa a transcrição de várias citocinas pró-inflamatórias, IFNs (*Interferons*) do tipo I/III e quimiocinas, iniciando um mecanismo de defesa antiviral. Paralelamente, sensores citoplasmáticos RIG-I/MDA5

também detectam o material genômico viral e estimula a resposta de IFN via fator regulador de IFN 3/7 (IRF3/7), resultando na produção de IFN tipo I/III e quimiocinas (AKIRA; TAKEDA, 2004; KASUGA *et al.*, 2021).

Os IFNs produzidos pelas células infectadas podem atuar de forma autócrina ou parácrina ligando-se através do receptor IFNAR e ativando a via de sinalização JAK-STAT. Isso ocorre por meio da fosforilação das proteínas citoplasmáticas JAK1 e TYK2, que por sua vez levam à fosforilação de STAT1 e STAT2. Os heterodímeros formados por STAT1 e STAT2 são então transportados para o núcleo, onde se ligam a elementos de resposta estimulados por interferon (ISRE) presentes na região promotora do gene (SOUSA; BRITES, 2020; SHAH *et al.*, 2020). A ativação da via de sinalização JAK-STAT e a transcrição dos genes estimulados por IFN, contribuem para a limitação da replicação viral e a promoção da resposta imunológica adequada (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2021).

Sinergicamente, as DC (do inglês, *Dendritic cells*) também desempenham um papel crucial no controle da infecção viral. Essas células são responsáveis por capturar partículas virais no tecido do trato respiratório e em seguida coordenam respostas imunes inatas e adaptativas, secretam mediadores inflamatórios, induzem tolerância imunológica e recrutam outras células do sistema imune (MELLMAN; STEINMAN, 2001). As DCs são uma das principais células apresentadoras de antígenos (APCs – *Antigen Presenting Cells*) responsáveis por capturar, processar e apresentar peptídeos via MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) de classe II e classe I para células T CD4⁺ e T CD8⁺, respectivamente (BUTTENSCHÖN; MATTNER, 2021; PRIMORAC *et al.*, 2022).

A ativação inicial e expansão das células T CD8⁺ *naive* em células efetoras ocorre nos órgãos linfoides secundários, como linfonodos e baço, por meio da interação com as APCs. A população de células T CD8⁺ efetoras são heterogêneas tanto em termos fenotípicos quanto funcionais, sendo uma de suas principais funções a eliminação direta de células infectadas pelo vírus. Após esse processo, cerca de 90% das células entram em apoptose, enquanto algumas tornam-se células T CD8⁺ de memória, participando na eliminação viral rápida durante a reinfeção (MOSS, 2022; ZHANG; BEVAN, 2011). Dados indicam que essas células persistem por mais de um ano em pacientes convalescentes da COVID-19 (ADAMO *et al.*, 2022). Ou ainda, devido a capacidade de reatividade cruzada com outros CoVs, a resposta de células T podem perdurar por mais de 17 anos (LE BERT *et al.*, 2020).

Células T CD4⁺ também são ativadas quando encontram APCs e apresentam um perfil polifuncional, pois induzem diferentes subconjuntos de células T auxiliares, tais como Th1, Th2, Th9, Th7, foliculares (T_{fh}) e reguladoras (T_{reg}). Entre os subconjuntos, as células Th1

desempenham um papel fundamental na eliminação de microrganismos intracelulares, através da produção de citocinas inflamatórias efetoras, tais como Interferon- γ (IFN γ) e Fator de Necrose Tumoral (TNF α) (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). Enquanto que as células Th2 são críticas para a eliminação de parasitas helmínticos, através da produção de interleucinas IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, das quais também demonstram efeitos sob outras células do sistema imune, como a proliferação de linfócitos B (ALEEBRAHIM-DEHKORDI *et al.*, 2020).

Quando ativados, os linfócitos B podem se diferenciar em células plasmáticas produtoras de anticorpos de alta afinidade ou em células B de memória, seja por meio da interação com células T CD4⁺ ou pelo encontro com antígenos virais. Os anticorpos gerados apresentam diferentes isotipos, que são produzidos de acordo com o local e o tempo decorrido após o estímulo. A principal diferença entre cada imunoglobulina (Ig) reside na diversidade estrutural da região constante da cadeia pesada. Com base nisso, podemos identificar cinco tipos de Igs distintas: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE (CHEN *et al.*, 2022a).

Compreender como a resposta imune é gerada em uma infecção pelo agente SARS-CoV-2, bem como os potenciais antígenos que podem ser reconhecidos pelas células B ou apresentados por complexos MHC às células T, são essenciais para o desenvolvimento de vacinas eficazes. Esse conhecimento permite direcionar os esforços de pesquisas para o desenvolvimento de estratégias de imunização que induzam uma resposta imune rápida, robusta e duradoura contra o vírus.

1.3 ESTRATÉGIAS VACINAIS

Ao longo da história, as vacinas desempenharam um papel crucial na proteção da humanidade contra diversas doenças infecciosas, conferindo imunidade específica e duradoura. O desenvolvimento de uma vacina é um processo complexo, geralmente levando mais de 8 anos. No entanto, diante da pandemia do vírus SARS-CoV-2, foi possível construir uma vacina em tempo recorde devido aos avanços rápidos no sequenciamento do vírus e nas tecnologias genômicas. Atualmente, cerca de 380 vacinas candidatas estão em diferentes fases de teste pré-clínico e clínico, além das 50 vacinas para COVID-19 aprovadas pelos órgãos reguladores para uso em humanos (POLLARD; BIJKER, 2021; WHO, 2023b).

No Brasil, as vacinas aprovadas até a presente data são: *BNT162b2* (Pfizer-BioNtech), *CoronaVac* (Butantan), *Ad26.COV2.S* (Janssen-Cilag) e *ChAdOx1 nCoV-19* (AstraZeneca), das quais são baseadas em diferentes estratégias, como RNA mensageiro (mRNA), vírus inativado e vetores virais não replicantes, respectivamente (ANVISA, 2023). Ademais, também estão

disponíveis para uso em outros países vacinas compostas por subunidades proteicas (*NVX-CoV2373*) (HEATH *et al.*, 2021). Cada plataforma de vacina possui características exclusivas que as distinguem das demais, podendo ter implicações significativas na eficácia da vacina, na duração da proteção conferida e na segurança do seu uso (FORNI *et al.*, 2021).

A tecnologia do mRNA induz uma resposta imune específica, traduzindo e expressando antígenos virais através das células do hospedeiro. Por exemplo, a vacina *BNT162b2* codifica a proteína S do SARS-CoV-2, levando a fortes respostas de células T e anticorpos em humanos (SAHIN *et al.*, 2020). Já as vacinas inativadas utilizam o agente causador da doença em uma forma não patogênica, após tratamento físico ou químico para reduzir sua infectividade, mantendo a imunogenicidade contra os antígenos (GARCÍA-MONTERO *et al.*, 2021). A *CoronaVac* mostrou eficácia em induzir anticorpos específicos e reduzir a infecção por SARS-CoV-2 em animais. Assim, desde 2021 é utilizada para vacinação em humanos, aumentando a taxa de soroconversão para as proteínas S e N após 30 dias do esquema vacinal (GAO *et al.*, 2020; BOCHNIA-BUENO *et al.*, 2022).

Vacinas baseadas em vetores virais utilizam um gene que codifica um antígeno específico, esse é clonado em vírus replicantes ou não replicantes. A vacina *ChAdOx1 nCoV-19* demonstrou forte imunogenicidade, pois induziu respostas celulares e humorais em modelos animais, além de prevenir a ocorrência de pneumonia em primatas não humanos (VAN DOREMALEN *et al.*, 2020), demonstrando segurança e eficácia satisfatória em testes clínicos (EWER *et al.*, 2021). Em relação a estratégia de subunidade proteica, esta consiste na utilização de antígenos do patógeno, dos quais podem ser obtidos através da tecnologia recombinante ou de forma sintética. Somado a isso, é necessário a utilização de adjuvantes para potencializar a resposta imune do hospedeiro. A vacina *NVX-CoV2373*, utiliza como alvo a proteína *Spike* associado ao adjuvante *Matrix-M* e demonstrou alta eficácia (~90%) em estudos pré-clínicos, protegendo indivíduos de doenças leves, moderadas e graves (HEATH *et al.*, 2021; KEECH *et al.*, 2020). Ademais, a vacina *Spin-TEC*, formulada com uma proteína quimérica que inclui os antígenos RBD e N do SARS-CoV-2. Atualmente, encontra-se na fase 2 dos ensaios clínicos, mas testes preliminares já demonstraram sua capacidade de induzir resposta imunológica em camundongos e sua segurança durante a fase 1 de testes em seres humanos (CASTRO *et al.*, 2022).

Com exceção das vacinas *CoronaVac* e *Spin-Tec*, todas as vacinas mencionadas anteriormente têm em comum o uso de um único antígeno (*Spike* ou a sua porção RBD) como alvo vacinal, devido à sua alta imunogenicidade, abundante expressão na superfície viral e capacidade evocar fortes respostas imunes (WALLS *et al.*, 2020; YUAN *et al.*, 2020). No

entanto, o surgimento de novas variantes de preocupação com um conjunto de mutações específicas na proteína S, acabam por interferir na eficácia das vacinas atualmente empregadas para uso em humanos. Por exemplo, A última cepa mutante do agente SARS-CoV-2, denominada *Omicron*, exibiu cerca de 30 mutações na proteína S, reduzindo a eficiência dos anticorpos neutralizantes conferidos pelas vacinas de primeira geração (CARABELLI *et al.*, 2023; CELE *et al.*, 2022; RAHMAN *et al.*, 2022).

Com o aumento da evasão imune, as vacinas atuais tornaram-se menos eficazes na prevenção da infecção e transmissão viral. Por isso é necessário o investimento em novos esquemas vacinais que possam induzir respostas imunes amplas e duradouras. Um estudo recente com a participação do nosso grupo, demonstrou uma interessante estratégia vacinal alternativa, baseada na utilização do bacilo *Calmette-Guérin* para a entrega de um antígeno quimérico composto pela fusão das proteínas N₄₅₋₂₀₆ e S₂₂₃₋₅₁₄ (*rChimera*). Os dados pré-clínicos demonstram que a utilização da bactéria recombinante (rBCG) associado a um *boost* com a proteína *rChimera*, são promissores em induzir uma resposta do tipo Th1 e anticorpos IgG com atividade neutralizante em camundongos (MAMBELLI *et al.*, 2023). Curiosamente, a vacina BCG também tem efeitos protetores contra infecções causadas por patógenos não relacionados, através da ativação da imunidade treinada e heteróloga (O'NEILL; NETEA, 2020). Estudos demonstraram que indivíduos, de diferentes idades, quando vacinados com BCG, apresentavam maior proteção contra infecções por outros agentes infecciosos virais (ARTS *et al.*, 2018). Juntas, essas evidências sugerem que a BCG tem efeitos benéficos na imunidade que vão além da tuberculose, o que a torna uma candidata promissora para a defesa contra a COVID-19.

Paralelamente, pesquisas estão em curso para avaliar diversas estratégias vacinais por meio de novas vias de administração. Embora a maioria das vacinas contra a COVID-19 em uso, bem como a maioria das vacinas em estágio de desenvolvimento clínico, sejam administradas por via intramuscular, a rota de infecção do vírus SARS-CoV-2 torna as abordagens de vacinação mucosa especialmente pertinentes.

1.4 VIAS DE IMUNIZAÇÃO

1.4.1 Via intramuscular

A rota intramuscular (i.m.) é amplamente empregada para a imunização devido à sua facilidade de acesso e segurança. Atualmente, vacinas contra Hepatite B, difteria, tétano, coqueluche, *Haemophilus influenzae* tipo B, poliomielite I, II e III, bem como as vacinas anti-

SARS-CoV-2, são administradas por meio dessa via. Embora o músculo esquelético contenha uma menor quantidade de células imunes em comparação com outros tecidos, como a mucosa, a aplicação de formulações na musculatura desencadeia o recrutamento de células do sistema imunológico, contribuindo para uma resposta vacinal robusta (SAXENA *et al.*, 2016; WIENDL; HOHLFELD; KIESEIER, 2005).

A resposta imune específica do músculo ocorre instantaneamente após a imunização, estima-se que em média de 3-6 horas após a imunização intramuscular. Nesse contexto, células como as apresentadoras de antígenos percorrem os vasos linfáticos, migrando a partir do local da injeção até os linfonodos drenantes (NEELAND *et al.*, 2016). Posteriormente, ocorre a apresentação dos antígenos às células B e T, as quais orquestram respostas humorais e celulares específicas, respectivamente. Em modelos murinos, um estudo demonstrou que a via i.m. influencia uma resposta de tipo Th1, apresentando maiores títulos de IgG2a e produção de citocinas como IFN- γ (MOHANAN *et al.*, 2010). Este tipo de resposta é interessante pois contribui para a proteção antiviral do hospedeiro (TODOROVÍĆ-RAKOVIĆ; WHITFIELD, 2021).

Em resumo, a via intramuscular é um método comum para a maioria das vacinas utilizadas hoje em dia, devido a uma rápida absorção, segurança e eficácia imune. Entretanto, outras vias são exploradas, pois podem oferecer proteção igual ou superior, sem menos invasivas e sem a necessidade de profissionais de saúde treinados para aplicação, como por exemplo a via intranasal.

1.4.2 Via intranasal

O sistema respiratório dos mamíferos é dividido em: trato respiratório superior (TRS) e trato respiratório inferior (TRI). O TRS inclui as cavidades nasal e oral, enquanto que o TRI inclui a traqueia e o pulmão. Dentro destes sistemas, as superfícies das mucosas dos pulmões e das vias aéreas superiores, são locais comuns de infecção para muitos patógenos respiratórios, aerossóis tóxicos e alérgenos (GANESAN; COMSTOCK; SAJJAN, 2013). Com base nisso, uma das principais razões para utilizar a via mucosa de vacinação, é a ativação mais eficaz das células imunológicas locais, resultando em uma resposta mais direcionada e robusta.

Atualmente, todas as vacinas disponíveis anti-SARS-CoV-2 são administradas pela via intramuscular, fornecendo uma imunidade humoral e celular sistêmica capaz de reduzir a gravidade da doença, taxas de hospitalização e mortalidade. No entanto, a proteção oferecida pela vacinação i.m. pode não ser suficiente para lidar com a replicação e disseminação do vírus

no trato respiratório. Pois não induz altos níveis de memória imune antiviral no sítio primário da infecção, como células B e T residentes do tecido pulmonar (T_{RM}), bem como imunoglobulinas de mucosa como IgA e IgG (AZZI *et al.*, 2022; GOEL *et al.*, 2021; SHEIKH-MOHAMED *et al.*, 2022)

No presente momento, 12 candidatos vacinais para imunização i.n. estão em diferentes fases de testes clínicos, das quais baseiam-se principalmente em estratégias de subunidade proteica, vetor viral e vírus vivo atenuado (WHO, 2023b). Enquanto a isso, a vacinação intranasal em modelos animais já se encontra bem estabelecido e, com base em achados da literatura, foi capaz de induzir a produção local de anticorpos da classe IgA e IgG neutralizantes, além da resposta de células T no trato respiratório superior e inferior, conferindo proteção mediante a desafios com o agente viral (CHEN *et al.*, 2022b; DIALLO *et al.*, 2023; HASSAN *et al.*, 2020; LIEN *et al.*, 2021; STARK *et al.*, 2022; VAN DOREMALEN *et al.*, 2021).

Apesar dos esforços para comprovar a eficácia, segurança e imunogenicidade das vacinas administradas pela via mucosa contra o agente SARS-CoV-2, até o momento, somente uma vacina intranasal foi aprovada (FluMist), que se baseia na tecnologia de vírus da Influenza vivo atenuado. Estudos têm revelado que a vacinação intranasal com essa formulação resultou na redução de casos de infecção pelo vírus da Influenza em crianças com idade entre 1 e 6 anos (BELSHE *et al.*, 1998). Além disso, as formulações monovalentes ou bivalentes, demonstraram que essas vacinas também são seguras, imunogênicas e eficazes em adultos saudáveis (BELSHE *et al.*, 2004). Do ponto de vista imunológico, indivíduos que receberam a vacina de mucosa desenvolveram uma resposta de IgA local significativamente superior às análises feitas na fase pré-imune (BARRÍA *et al.*, 2013).

Outros microrganismos que tem como sítio primário de infecção o trato respiratório, também são alvos de estudos para o desenvolvimento de vacinas aplicadas i.n., tais como: *Mycobacterium tuberculosis* e *Bordetella pertussis*. A BCG, vacina licenciada para a tuberculose e administrada através da via intradérmica, fornece uma pequena proteção contra a doença disseminada durante a infância. No entanto, em adultos a proteção acaba sendo muito limitada, devido a isso, existe uma necessidade real de vacinas melhoradas com o objetivo de conferir proteção em todos os estágios da vida. Nesse contexto, os estudos pré-clínicos conduzidos por Bull e colaboradores (2019) revelaram que a vacinação mucosa com BCG não apenas proporciona defesa contra o *M. tuberculosis*, mas também estimula a formação de uma população específica de células T $CD4^+$ residentes no tecido pulmonar, enfatizando sua eficácia a nível local. Em outro cenário, uma vacina intranasal contra *B. pertussis* atenuada encontra-se em fase II de testes clínicos, demonstrando efetividade nas respostas imunes de mucosas e

proteção contra desafio atenuado (KEECH *et al.*, 2023). Baseados nestas informações, a imitação da rota natural da infecção por muito patógenos pode ser sugerida como um possível meio de melhorar a eficácia protetora das vacinas atualmente aprovadas.

2 JUSTIFICATIVA

As vias intramuscular e intranasal representam duas abordagens distintas no âmbito da administração de vacinas, cada uma carregando consigo suas próprias vantagens e considerações particulares. A via intramuscular é uma rota de administração tradicionalmente estabelecida para a aplicação de vacinas, possuindo uma vasta base de conhecimento e boa aceitação na comunidade médica e entre o público em geral. Por outro lado, a via intranasal direciona seu foco à estimulação das respostas imunológicas presentes na mucosa das vias respiratórias. A relevância das mucosas como porta de entrada para diversos patógenos ressalta a importância de uma resposta imune específica local. De acordo com isso, hipotetizamos que a vacina quimérica multiepítipo (*rChimera*), derivada das proteínas N e S do SARS-CoV-2, desencadeia uma resposta imunológica tanto sistêmica quanto local contra os antígenos virais. Assim, buscamos compreender se a vacina *rChimera* pode efetivamente gerar uma resposta imune completa e robusta contra os antígenos do SARS-CoV-2, ao adotar tanto a via intramuscular, de tradição consolidada, quanto a via intranasal, que explora a interação direta com as mucosas respiratórias.

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta imune celular e humoral de camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 vacinados com uma proteína quimérica multiepítopo (*rChimera*) por diferentes vias de administração.

2.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar a imunização de camundongos da linhagem C57BL/6 através das vias intramuscular e intranasal;
- Analisar a produção de anticorpos da classe IgG específicos anti-N, anti-S e anti-*rChimera* no soro e lavado broncoalveolar dos camundongos imunizados;
- Avaliar a resposta celular após imunização, através da ativação de linfócitos T e produção *in vitro* da citocina IFN- γ frente a um estímulo às proteínas N, S e *rChimera* do agente SARS-CoV-2.

3 METODOLOGIA

3.1 COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

O uso de animais neste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC), sob o número de protocolo 9566210722.

3.2 ANIMAIS

Camundongos C57BL/6 fêmeas e machos de 6-8 semanas de idade, pesando de 10 a 25 g, foram adquiridos do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX/UFSC). Os camundongos foram mantidos em caixas de polipropileno em condições livres de patógenos específicos (SPF, do inglês *Specific Pathogen Free*), à temperatura constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (55 a 65%) controladas, em ciclo claro/escuro de 12 horas e com regime de água e comida *ad libitum*.

3.3 PROTEÍNA *rChimera*

A proteína quimérica (*rChimera*) utilizada neste trabalho, foi previamente avaliada em uma pesquisa conduzida por Mambelli e colaboradores (2023). Nesse estudo, a formulação composta pela estratégia de BCG recombinante que expressa a proteína, demonstrou imunogenicidade e proteção contra a COVID-19 em modelo animal. A fim de avaliar a resposta imune apenas da proteína *rChimera* em diferentes vias de administração, a proteína foi sintetizada no Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob supervisão do Prof. Dr. Sérgio C. Oliveira e gentilmente cedida para o nosso grupo.

3.4 IMUNIZAÇÃO

Grupos de camundongos C57BL/6 de 6-8 semanas de idade, foram imunizados pela via intramuscular (50 μl) ou intranasal (20 μl) de acordo com o seguinte esquema vacinal: no dia 0, os camundongos receberam solução salina tamponada com fosfato (PBS) associado a 100 μg de Alum ($\text{Al}(\text{OH})_3$) ou 10 μg de proteína *rChimera* e 100 μg de Alum. 21 dias após, os camundongos receberam uma dose reforço com as mesmas formulações do dia 0. Em um segundo momento, aumentamos a dose da proteína *rChimera* (20 μg) e realizamos o mesmo

esquema vacinal citado anteriormente, com o objetivo de avaliar a resposta imune em camundongos imunizados pela rota intranasal. Em resumo, os grupos utilizados foram:

Grupos	Esquema vacinal	
Intranasal	Dia 0: 10 ou 20 µg de <i>rChimera</i> com 100 µg de Alum	Dia 21: 10 ou 20 µg de <i>rChimera</i> com 100 µg de Alum
Intramuscular	Dia 0: 10 µg de <i>rChimera</i> com 100 µg de Alum	Dia 21: 10 µg de <i>rChimera</i> com 100 µg de Alum
Veículo	Dia 0: solução de PBS com 100 µg de Alum	Dia 21: solução de PBS com 100 µg de Alum

Tabela 1. Grupos e esquema vacinal. Camundongos C57BL/6 foram distribuídos aleatoriamente em diferentes grupos denominados: intranasal, intramuscular e veículo, dos quais receberam no dia 0 e 21 diferentes formulações vacinais através das vias intranasal e intramuscular, respectivamente.

Além disso, para o controle positivo da técnica de ELISA para dosagem de IgG no soro dos camundongos, utilizamos soros de camundongos imunizados com a *CoronaVac* – uma vacina comercial de vírus inativado (iVac) sabidamente indutora de anticorpos anti-proteínas N, S e *rChimera*. Esses animais receberam o imunizante pela via intraperitoneal e 21 dias após o sangue total foi coletado e armazenado para posterior utilização.

A administração intranasal foi realizada conforme descrito por Turner e colaboradores (2011), usando uma pipeta posicionada cerca de 1 mm acima da narina e pressionando o êmbolo lentamente para que uma gota caia sobre a narina. O volume administrado e a sedação dos animais foram escolhas importantes neste trabalho, de acordo com Southam *et al.* (2002), volumes maiores que 20 µl são suficientes para atingir o trato respiratório inferior, bem como a sedação prévia dos animais antes do protocolo de imunização intranasal. Para isso, os animais foram contidos e anestesiados pela via intraperitoneal com cetamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg).

3.5 COLETA DE AMOSTRAS

No 42º dia do calendário de imunização, os camundongos foram anestesiados (cetamina/xilazina) para coleta de sangue via punção cardíaca e eutanasiados por deslocamento cervical. O soro foi obtido após coagulação (10 minutos em temperatura ambiente e 30 minutos a 4 °C) e centrifugação (10 minutos a 950 x g), em seguida armazenados em microtubos individuais a temperatura de -20 °C. Além disso, foram coletados baço e lavado broncoalveolar (LBA). O baço foi extraído de modo asséptico com o auxílio de pinças e tesouras de dissecação e mantidos a temperatura de 4 °C em meio RPMI suplementado com Penicilina/Estreptomicina (1:100) e Hapes (1:40), até o processamento. O LBA foi coletado através da canulação da traqueia e instilação de 1 ml de PBS, aproximadamente 600-800 µl foi recuperado quando o

pistão da seringa foi puxado lentamente. Posteriormente as amostras do LBA foram centrifugadas por 5 min a 400 x g e o sobrenadante armazenado a temperatura de -80°C.

3.6 MENSURAÇÃO ANTICORPOS ESPECÍFICOS PARA OS ANTÍGENOS DO AGENTE SARS-COV-2

Para avaliar os níveis de anticorpos específicos para os antígenos do SARS-CoV-2 em camundongos imunizados, foram coletados sangue dos diferentes grupos experimentais nos dias 0 (pré-imune), 14, 21, 28, 35 e 42. Enquanto que o LBA foi obtido apenas no 42º dia. Para isso, placas de 96 poços (*Corning*®) foram revestidas com 3 µg/ml (150 ng/poço) com o antígeno *rChimera*, *Spike* ou Nucleocapsídeo (N₅₀₋₃₅₀) e incubadas *overnight* a 4 °C. Após a incubação, as placas foram lavadas (PBS 1x/ 0.05% Tween 20) e submetidas a solução de bloqueio (PBS 1x/2% BSA/0.05% Tween 20) durante 1 h a 37 °C. Em seguida, foram adicionadas as amostras de soro diluídas (1:100) e incubadas *overnight* a 4 °C, enquanto que o LBA foi incubado por um período de 2 horas. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas e incubadas com os anticorpos secundários anti-mouse IgG-*horseradish peroxidase* (HRP) durante 1,5 h a 37°C. Por fim, as placas foram novamente lavadas e em seguida adicionados aos poços o substrato 3,3', 5'5'-Tetrametilbenzidina (*Scienco OneStep* – TMB). A reação foi interrompida pela adição de ácido clorídrico 1 N e a leitura feita em leitor de ELISA (Bio-Tek Elx800 *Universal Microplate Reader*), no comprimento de onda de 450 nm.

3.7 CULTURA DE ESPLÊNOCITOS E DOSAGEM DE IFN-γ

Os baços foram coletados, macerados através de um filtro poroso de 100 µm (*Cell Strainer*, BD Falcon), lavados com solução salina estéril, centrifugados a 1200 x g por 5 min, tratados com 4 ml de ACK *Lysis Buffer* (BioWhittaker®), lavados com solução salina estéril e centrifugados a 1200 x g por 5 min. Posteriormente as células foram ressuspensas em 3 ml de meio de RPMI (RPMI-1640 *medium*, Thermo Fisher), suplementado com 10% soro bovino fetal (Hyclone), Piruvato de Sódio 1:100 (Sigma), L-glutamina 2 mM 1:100 (Invitrogen), Penicilina/Streptomicina 1:100 e HEPES 1:40 (Life Technologies). O número de células foi ajustado para 1 x 10⁶ células/poço e então estimuladas com *rChimera* (10 µg/ml), *Spike* (10 µg/ml) e Nucleocapsídeo (N₅₀₋₃₅₀) (10 µg/ml). O Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA) e Ionomicina (eBioscience™) foram usados para controle positivo. Para controle negativo, as células foram incubadas apenas com meio. A incubação com os estímulos ocorreu em estufa de CO₂ com 5% de umidade e temperatura de 37 °C. Após 72 horas, o sobrenadante do cultivo

celular foi coletado para a dosagem da citocina INF- γ , através do ensaio de ELISA comercial (eBioscience™) de acordo com o protocolo modificado do fabricante.

3.8 ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO

Os esplenócitos obtidos do baço foram centrifugados a 1200 x g por 5 minutos, o pellet foi suspenso em 4 ml de ACK *Lysis Buffer* e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Terminado o tempo de incubação, as células foram lavadas com tampão FACS (Solução BSA 1% em PBS) e centrifugadas nas mesmas condições citadas anteriormente. Em seguida, os esplenócitos foram marcados com corante *Zombie Aqua 466 Biolegend* na proporção de 1:100 e as células incubadas por 15 min em temperatura ambiente. As ligações não específicas dos anticorpos foram bloqueadas com FC Block. Os seguintes mAbs foram usados para analisar moléculas de superfície celular: anti-CD45 PerCP, anti-CD3 FITC, anti-CD8 PE, anti-CD4 V450 e anti-CD19 APC. Após 1 hora de incubação com os mAbs, as amostras foram lavadas com 1 ml de tampão FACS e fixadas com 200 μ l de Paraformaldeído 1%. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo FACS *Verse* com o *software FACSuite* (BD Bioscience). A análise dos dados de citometria foram feitas no *software Flowjo* v. 10.1 (TreeStar) utilizando a estratégia de *gate* demonstrada na secção **APÊNDICE A** deste trabalho.

3.9 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o *software Prism* (GraphPad *Software* 9.0, Inc.). Foram aplicados os testes de normalidade de *Shapiro-Wilk* ($p > 0,05$). As análises com dois grupos foram realizadas usando o teste t de *Student* para dados paramétricos. Análises com mais de dois grupos foram realizadas com ANOVA de uma ou duas vias, e ajustes de Tukey foram incluídos para comparações múltiplas. Os valores de p obtidos por esses métodos foram considerados significativos quando menores que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 A IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR INDUZ RESPOSTA DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS AOS ANTÍGENOS DO AGENTE SARS-COV-2

Camundongos C57BL/6 foram imunizados pela via intramuscular com a proteína *rChimera* e o adjuvante Alum nos dias 0 e 21 de acordo com a ilustração abaixo (Figura 1). Os controles incluíram: camundongos que receberam o veículo da vacina (PBS e Alum) e camundongos imunizados com uma vacina comercial de vírus inativado (iVac) sabidamente indutora de anticorpos anti-SARS-CoV-2 (MAMBELLI *et al.*, 2023). Observou-se um aumento significativo nos níveis séricos de IgG anti-*rChimera* total após o esquema *dose-reforço* no grupo dos camundongos imunizados, quando comparados ao grupo que recebeu apenas o veículo da vacina. Adicionalmente, foram observados padrões similares ao avaliar a produção de anticorpos IgG direcionados às proteínas S e N₅₀₋₃₅₀ do vírus. É notável mencionar que os níveis de IgG foram particularmente elevados para o antígeno S. Esse aumento expressivo foi constatado no soro de todos os camundongos vacinados, ao contrário das proteínas *rChimera* e N₅₀₋₃₅₀, cujos níveis foram menos proeminentes, como ilustrado na Figura 2.

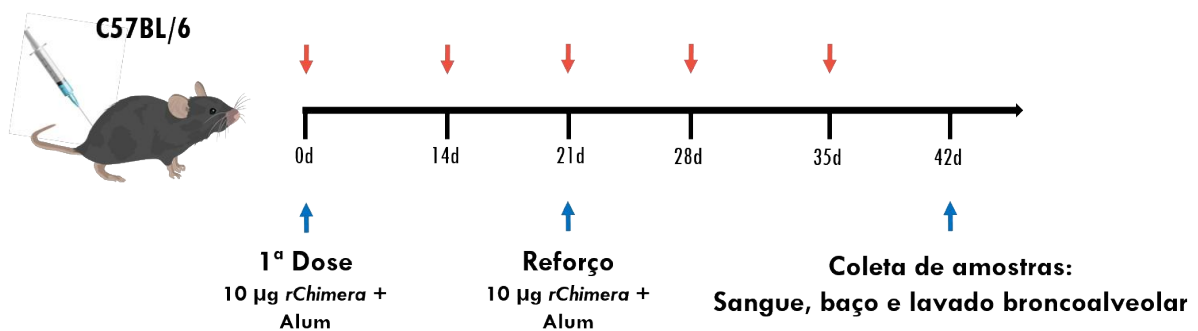


Figura 1. Esquema de imunização intramuscular. Camundongos da linhagem C57BL/6 foram imunizados pela via intramuscular com 10 µg de *rChimera* e 100 µg de Alum no dia 0, seguido de um reforço no 21º dia utilizando a mesma concentração da proteína *rChimera* (10 µg) associado ao adjuvante Alum (100 µg). 21 dias após o reforço, foi realizada a coleta de amostras como soro, lavado broncoalveolar e baço, com o objetivo de avaliar as respostas humoral e celular específicas. 0d corresponde ao soro pré-imune. As setas vermelhas indicam a coleta de soro através da punção da veia submandibular.

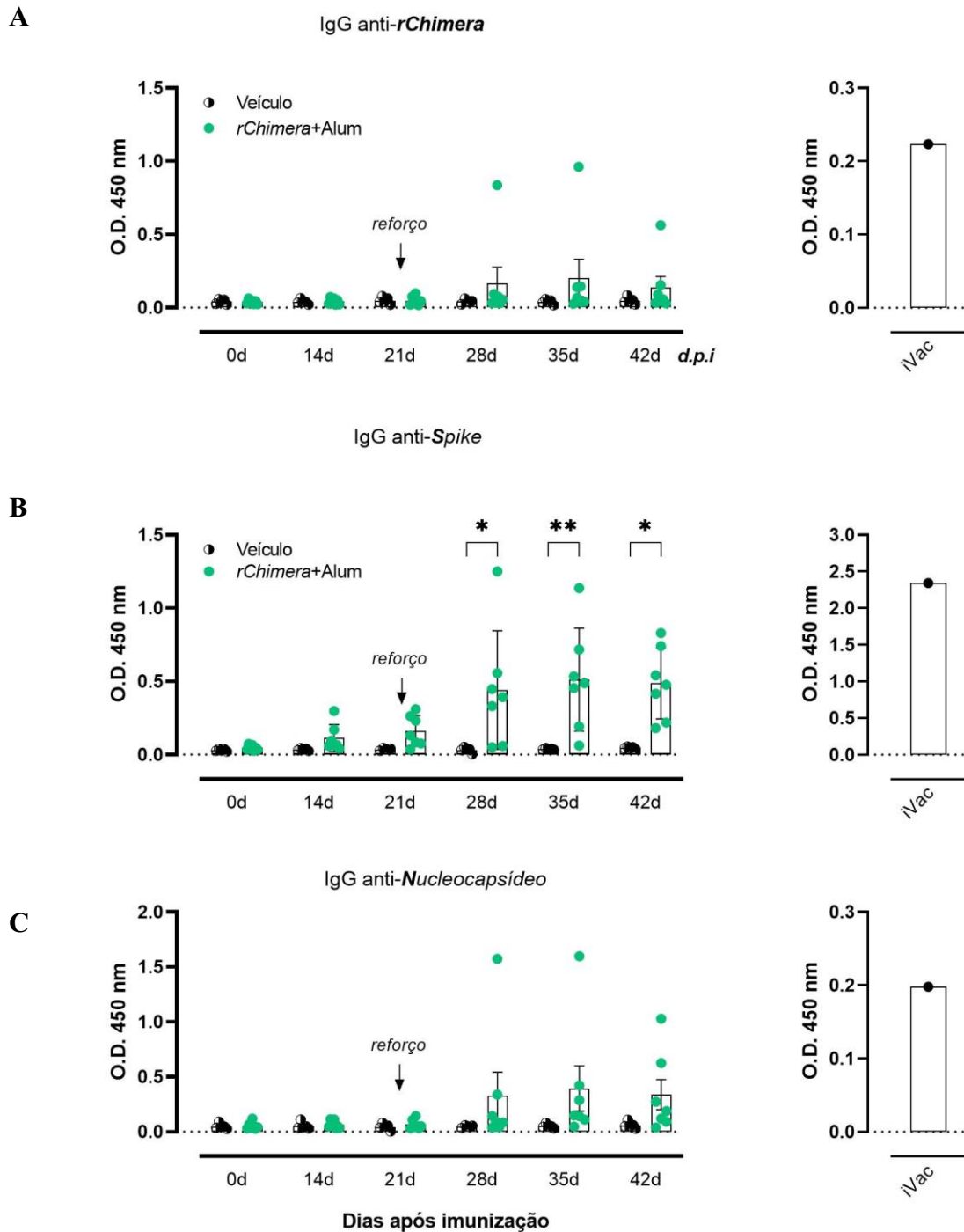


Figura 2. Esquema dose-reforço de imunização intramuscular com a proteína *rChimera* induz anticorpos específicos os antígenos do agente SARS-CoV-2. (A) Níveis de IgG anti-*rChimera*; (B) Níveis de IgG anti-*Spike*; (C) Níveis de IgG anti-Nucleocapsídeo (N₅₀₋₃₅₀). Placas de alta adsorção foram sensibilizadas com 3 µg/ml dos antígenos *rChimera*, S e N. As amostras dos soros obtidos nos dias 0, 14, 21, 28, 35 e 42 dos camundongos imunizados, veículos e iVac foram diluídos 1:100 e incubadas *overnight* a temperatura de 4°C; o anticorpo secundário anti-IgG-HRP foi diluído 1:5000 e incubado por 1,5 horas para a detecção dos anticorpos específicos. A reação foi desenvolvida com TMB durante 6 minutos e interrompida com HCl 1 N. Leitura realizada em espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados representam a média ± E.P.M onde cada ponto representa os valores independentes de O.D. para cada animal. Resultados representativos de um experimento. A análise estatística foi realizada por meio do teste *Two-way* ANOVA. * *p* valor < 0.05; ** *p* valor < 0.01.

4.2 A IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR NÃO INDUZIU RESPOSTA HUMORAL NO TRATO RESPIRATÓRIO

Conforme já relatado anteriormente, a imunização intramuscular induz uma resposta imune antiviral muito baixa no local de infecção. Para verificar se a nossa formulação estaria produzindo uma resposta local, investigamos o potencial da vacina *rChimera* administrada i.m. de induzir uma resposta humoral específica no trato respiratório. Entretanto, observamos que não houve diferença aumento na produção de imunoglobulinas específicas entre camundongos imunizados com veículo, imunizados ou animais naive, seja para anticorpos IgG anti-*rChimera*, anti-*Spike* ou anti-Nucleocapsídeo (N₅₀₋₃₅₀). No entanto, apenas um camundongo do grupo imunizado foi capaz de gerar resposta humoral específica para os antígenos anti-SARS-CoV-2 (Figura 3).

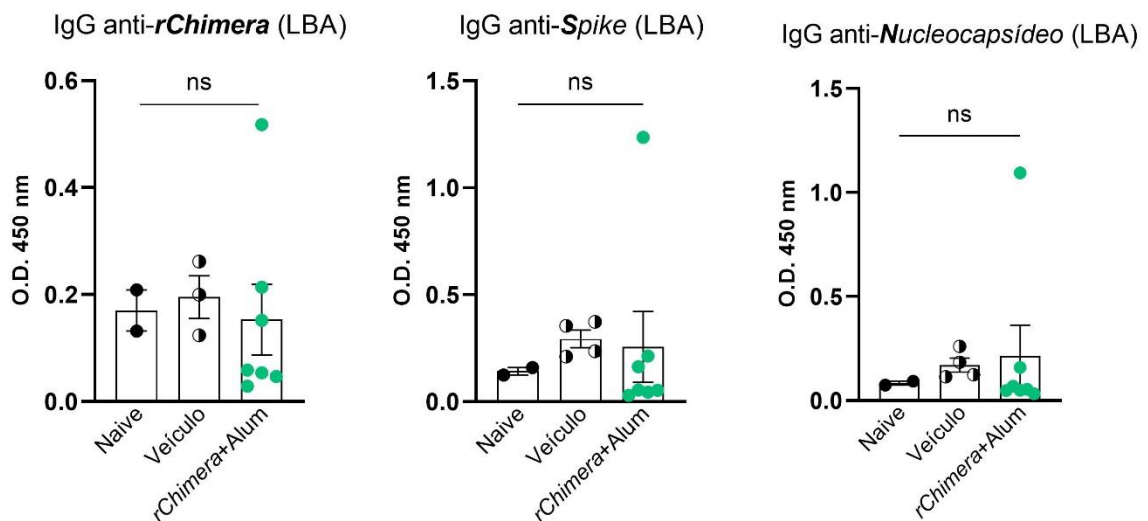


Figura 3. Imunização intramuscular não induz resposta local específica. Níveis de IgG específicos para as proteínas *rChimera*, S e N₅₀₋₃₅₀ foram avaliadas no LBA dos animais do grupo naive, veículo e *rChimera*+Alum. As amostras foram incubadas em placas previamente adsorvidas com os antígenos por 2 horas a temperatura ambiente; o anticorpo secundário anti-IgG-HRP foi diluído 1:5000 e incubado por 1,5 horas para a detecção dos anticorpos específicos. A reação foi desenvolvida com TMB durante 20 minutos e interrompida com HCl 1 N. Leitura realizada em espectrofotômetro a 450 nm. Para o controle negativo da técnica, foi utilizado o LBA de camundongos naive. Os resultados representam a média \pm E.P.M onde cada ponto representa os valores independentes de O.D. para cada animal. Resultados representativos de um experimento. A análise estatística foi realizada por meio do teste *One-way* ANOVA. ns: não significativo ($p > 0,05$).

4.3 A IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR NÃO INDUZIU RESPOSTA CELULAR PARA OS ANTÍGENOS S E N DO SARS-COV-2

Duas semanas após a dose de reforço, os camundongos foram eutanasiados e os baços coletados para obter os esplenócitos. Após o estímulo com as proteínas *rChimera*, S e N₅₀₋₃₅₀ *in vitro*, os níveis de IFN- γ foram mais altos no sobrenadante da cultura dos esplenócitos de um

camundongo imunizado pela via i.m. com *rChimera*+Alum (Figura 4). Por outro lado, quando avaliamos a frequência e o número de células T CD4⁺ e CD8⁺, constatamos que não havia diferença entre o grupo imunizado com a proteína quando comparado ao grupo que recebeu a solução veículo (Figura 5).

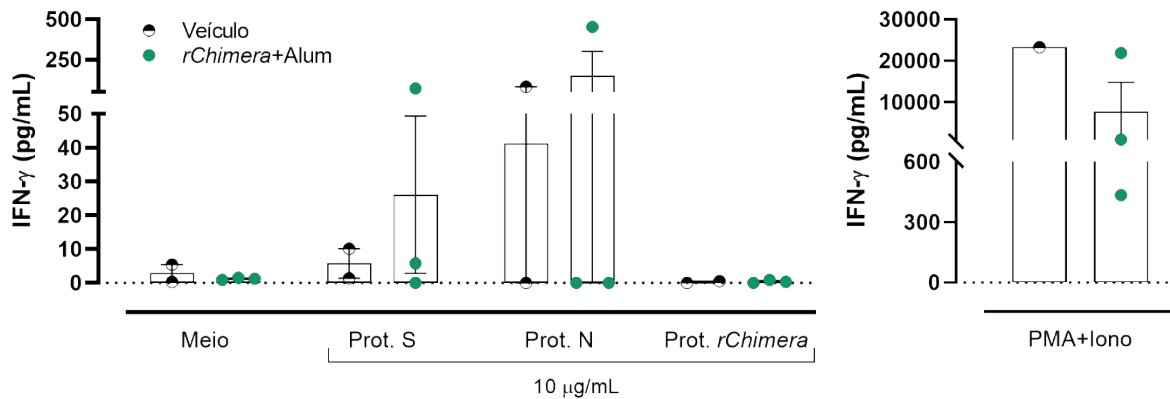


Figura 4. Imunização intramuscular não induziu resposta celular específica aos antígenos do agente SARS-CoV-2. Foram plaqueados esplenócitos de camundongos, imunizados com a proteína *rChimera* ou com a solução veículo, em placas de 96 poços na concentração de 1×10^6 células/poço. Em seguida, os estímulos com as proteínas S, N₅₀₋₃₅₀ e *rChimera* na concentração de $10 \mu\text{g/ml}$ foram adicionadas. Após 72 horas, o sobrenadante da cultura de células com os estímulos foi coletado para a quantificação da citocina IFN- γ através da metodologia de ELISA. Como controle positivo e negativo foram utilizados PMA+Iono (1x) e meio, respectivamente. Os resultados representam a média \pm E.P.M onde cada ponto representa os valores independentes de O.D. para cada animal. Resultados representativos de um experimento. PMA+Iono: phorbol 12-myristate 13-acetate+Ionomycin.

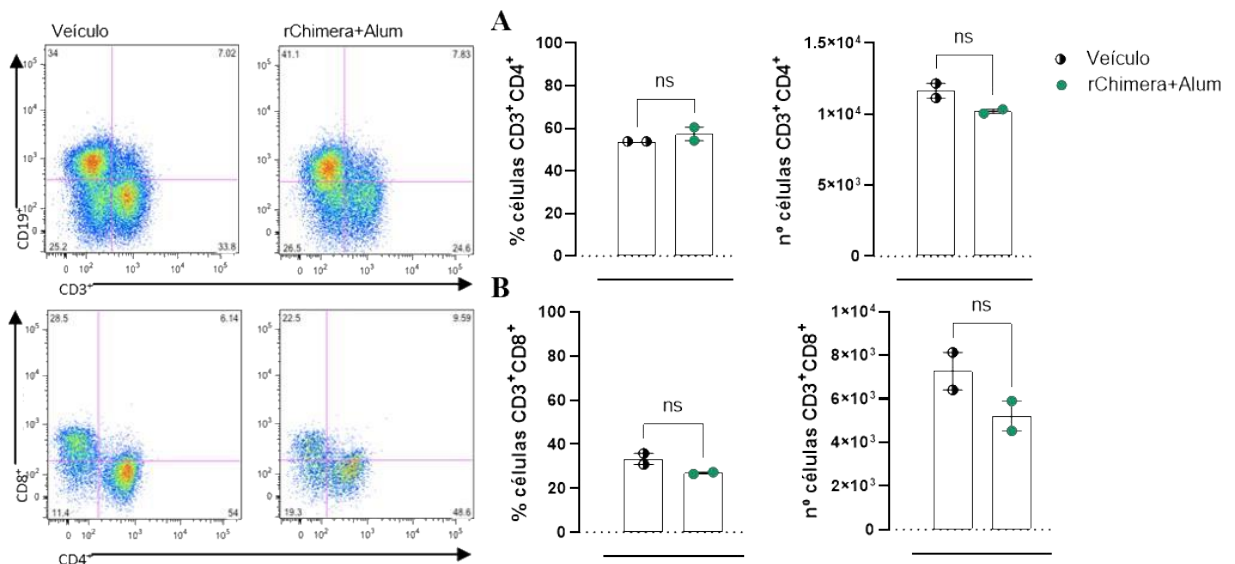


Figura 5. A imunização intramuscular não influencia frequência e nº de células T CD4⁺ e T CD8⁺. Esplenócitos de camundongos imunizados com *rChimera* ou veículo foram coletados e marcados com anticorpos específicos para as moléculas CD3, CD4 e CD8 durante uma hora no gelo, lavadas e fixadas com 1% de PFA. A) representa a frequência e nº de células CD3⁺CD4⁺. B) representa a frequência e nº de células CD3⁺CD8⁺. Os resultados representam a média \pm E.P.M onde cada ponto representa os valores independentes de O.D. para cada animal. Resultados representativos de um experimento. A análise estatística foi realizada por meio do teste *t Student*. ns: não significativo ($p > 0,05$). Ao lado esquerdo, imagens representativas da análise de Citometria de Fluxo.

4.4 CAMUNDONGOS IMUNIZADOS PELA VIA INTRANASAL COM DOSES MAIS BAIXAS NÃO PRODUZEM IgG ANTI-PROTEÍNAS DO SARS-CoV-2

Para avaliar de maneira mais abrangente a resposta imunológica gerada pela vacina contendo a proteína *rChimera*, empregamos uma abordagem alternativa de imunização. Nesse contexto, a estratégia vacinal utilizada seguiu os parâmetros ilustrados na figura 6, porém com uma variação significativa, a administração do antígeno quimérico ocorreu através da via intranasal. Assim, camundongos C57BL/6 com 6-8 semanas de idade, receberam 10 µg ou 20 µg de *rChimera* formulado com o adjuvante Alum no dia 0 e 21. É relevante notar que, uma dose de 10 µg não induziu um aumento dos níveis séricos de anticorpos IgG para as proteínas *rChimera*, N₅₀₋₃₅₀ e S do agente SARS-CoV-2 (Figura 7).

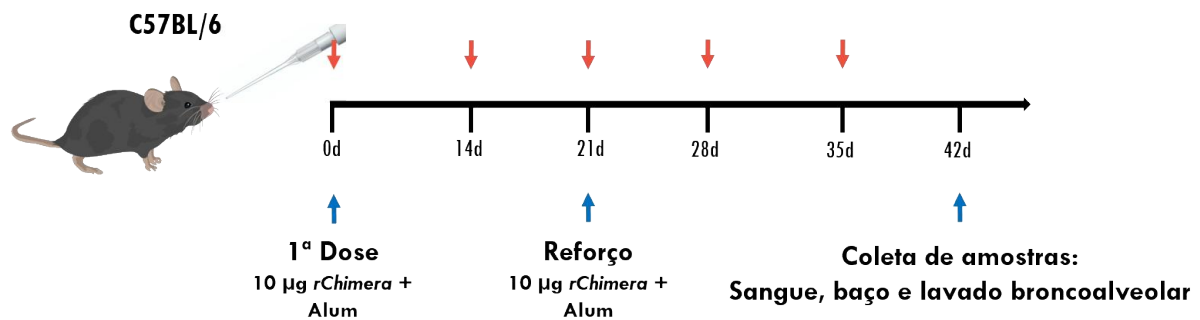


Figura 6. Esquema de imunização intranasal. Camundongos da linhagem C57BL/6 foram imunizados pela via intranasal com 10 µg de *rChimera* e 100 µg de Alum no dia 0, seguido de um reforço no 21º dia utilizando a mesma concentração da proteína *rChimera* (10 µg) associado ao adjuvante Alum (100 µg). 21 dias após o reforço, foi realizado a coleta de amostras como soro, lavado broncoalveolar e baço, com o objetivo de avaliar as respostas humoral e celular específicas. 0d corresponde ao soro pré-imune. As setas vermelhas indicam a coleta de soro através da punção da veia submandibular.

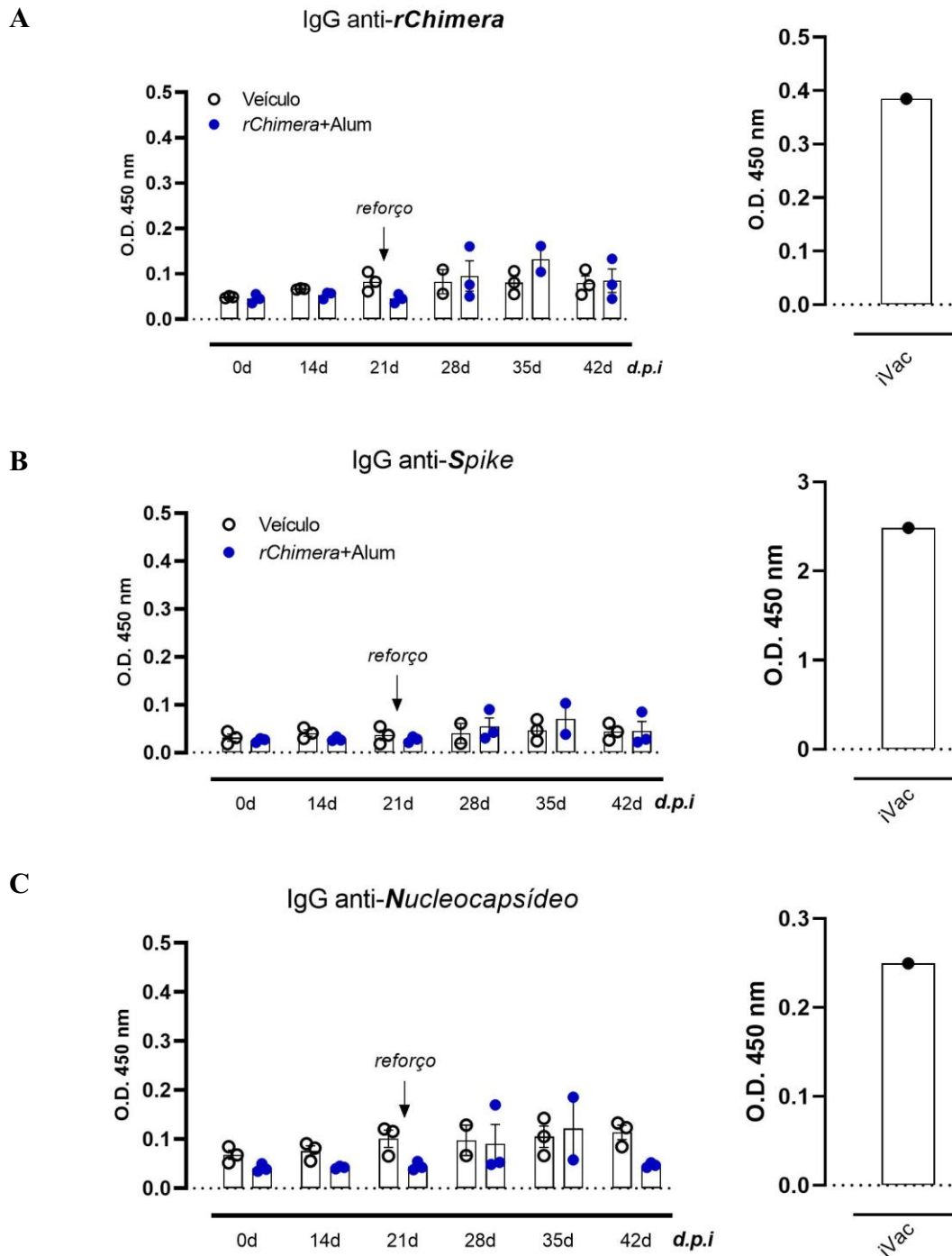


Figura 7. Imunização intranasal não induziu anticorpos específicos aos antígenos do agente SARS-CoV-2. (A) Níveis de IgG anti-*rChimera*; (B) Níveis de IgG anti-*Spike*; (C) Níveis de IgG anti-*Nucleocapsídeo* (N₅₀₋₃₅₀). Placas de alta adsorção foram sensibilizadas com 3 µg/ml dos antígenos *rChimera*, S e N. As amostras dos soros obtidos nos dias 0, 14, 21, 28, 35 e 42 dos camundongos imunizados, veículos e iVac foram diluídos 1:100 e incubadas *overnight* a temperatura de 4°C; o anticorpo secundário anti-IgG-HRP foi diluído 1:5000 e incubado por 1,5 horas para a detecção dos anticorpos específicos. A reação foi desenvolvida com TMB durante 5 minutos e interrompida com HCl 1 N. Leitura realizada em espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados representam a média ± E.P.M onde cada ponto representa os valores independentes de O.D. para cada animal. Resultados representativos de um experimento. *d.p.i*: Dias pós-imunização.

4.5 A IMUNIZAÇÃO INTRANASAL COM DOSES MAIS BAIXAS NÃO INDUZIU RESPOSTA HUMORAL NO TRATO RESPIRATÓRIO

Observando os resultados obtidos, verificou-se que a imunização intranasal utilizando uma proteína imunogênica não foi capaz de gerar uma resposta humoral sistêmica robusta. Diante disso, decidimos investigar a resposta humoral na mucosa respiratória, que é o local de entrada viral. Para realizar essa investigação, analisamos a presença de anticorpos IgG específicos contra as proteínas do SARS-CoV-2 no lavado broncoalveolar, coletado ao final do esquema de imunização. Os resultados foram consistentes com os anteriores, pois os camundongos imunizados com a proteína *rChimera* associada ao adjuvante Alum não apresentaram produção de anticorpos específicos, não alcançando significância estatística quando comparados aos controles (Figura 8).

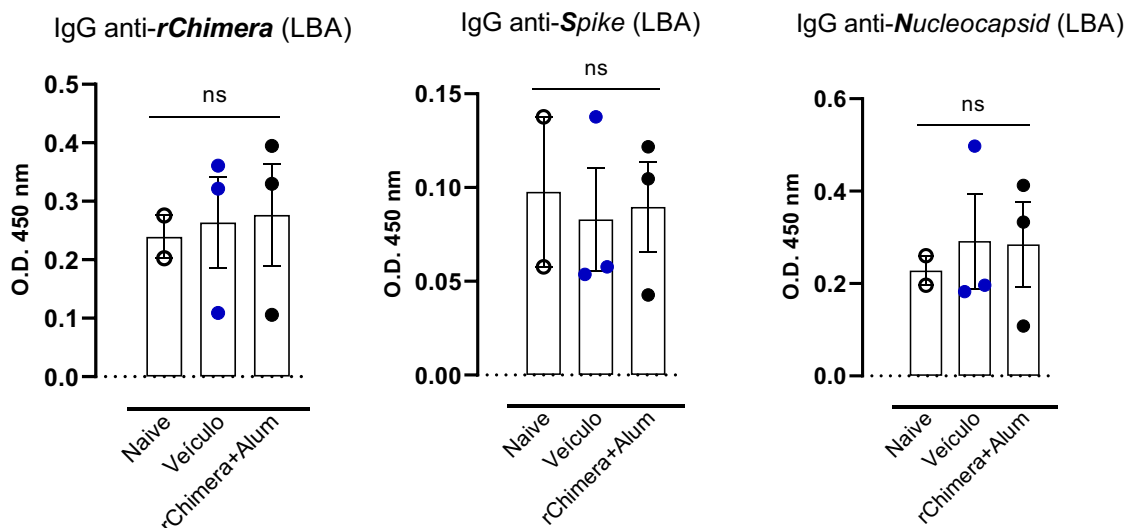


Figura 8. Imunização intranasal não induz resposta local específica. Níveis de IgG específicos para as proteínas *rChimera*, S e N foram avaliadas no LBA dos animais do grupo naive, veículo e *rChimera*+Alum. As amostras foram incubadas em placas previamente adsorvidas com os antígenos por 2 horas a temperatura ambiente; o anticorpo secundário anti-IgG-HRP foi diluído 1:5000 e incubado por 1,5 horas para a detecção dos anticorpos específicos. A reação foi desenvolvida com TMB durante 20 minutos e interrompida com HCl 1 N. Leitura realizada em espectrofotômetro a 450 nm. Para o controle da técnica, foi utilizado o LBA de camundongos naive. Os resultados representam a média \pm E.P.M onde cada ponto representa os valores independentes de O.D. para cada animal. Resultados representativos de um experimento. A análise estatística foi realizada por meio do teste *One-way* ANOVA. ns: não significativo ($p > 0,05$).

4.6 ESLENÓCITOS DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM DOSES MAIS BAIXAS PELA VIA INTRANASAL NÃO PRODUZEM RESPOSTA IMUNE CELULAR ESPECÍFICA

A resposta de células T, assim como a produção de anticorpos específicos, são importantes para a eliminação viral durante a infecção pelo agente SARS-CoV-2. Para confirmar se a administração intranasal de *rChimera* poderia provocar uma resposta imune celular específica, dosamos a citocina IFN- γ dos esplenócitos estimulados com as proteínas S, N e *rChimera*. De acordo com a figura 9, os níveis de IFN- γ produzidos não foram significativamente diferentes.

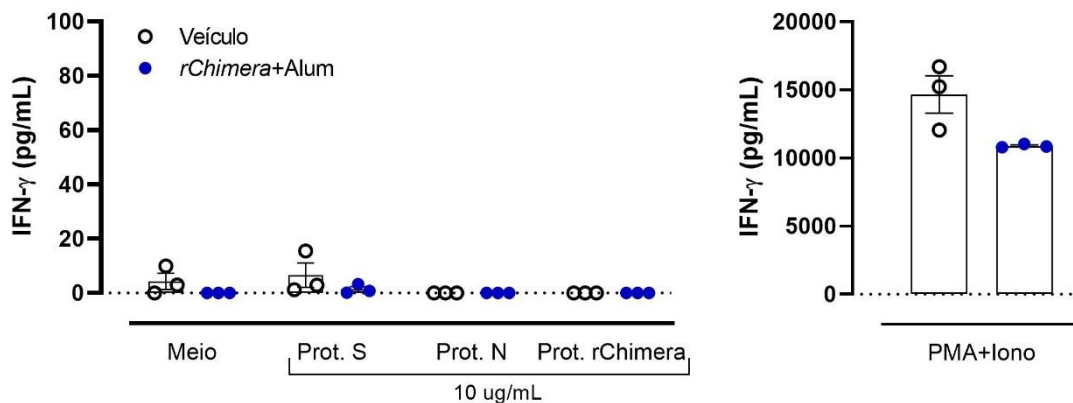


Figura 9. Imunização intranasal não induziu resposta celular específica aos antígenos do agente SARS-CoV-2. Foram plaqueados esplenócitos de camundongos, imunizados com a proteína *rChimera* ou com a solução veículo, em placas de 96 poços na concentração de 1×10^6 células/poço. Em seguida, os estímulos com as proteínas S, N e *rChimera* na concentração de $10 \mu\text{g/ml}$ foram adicionadas. Após 72 horas, o sobrenadante da cultura de células com os estímulos foi coletado para a quantificação da citocina IFN- γ através da metodologia de ELISA. Como controle positivo e negativo foram utilizados PMA+Iono (1x) e meio, respectivamente. Os resultados representam a média \pm E.P.M onde cada ponto representa os valores independentes de O.D. para cada animal. Resultados representativos de um experimento. PMA+Iono: phorbol 12-myristate 13-acetate+Ionomycin.

Quando observamos o número e frequência das células T CD4^+ e CD8^+ através da análise de citometria de fluxo, constatamos que mesmo após duas semanas da dose de reforço, os valores dessas duas variáveis permaneciam semelhantes tanto no grupo veículo quanto no grupo que recebeu a proteína associada ao adjuvante Alum (Figura 10).

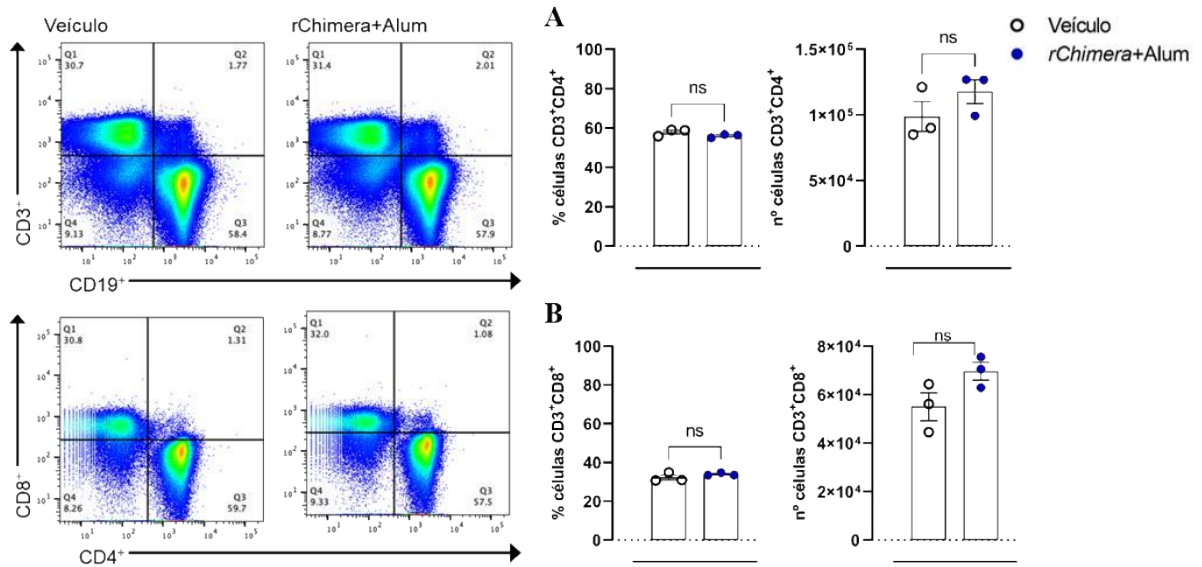


Figura 10. A imunização intranasal não induziu o aumento da frequência e n° de células T CD4⁺ e T CD8⁺. Esplenócitos de camundongos imunizados com *rChimera* ou veículo foram coletados e marcados com anticorpos específicos para as moléculas CD3, CD4 e CD8 durante uma hora no gelo, lavadas e fixadas com 1% de PFA. A) representa a frequência e n° de células CD3⁺CD4⁺. B) representa a frequência e n° de células CD3⁺CD8⁺. Os resultados representam a média ± E.P.M onde cada ponto representa os valores independentes de O.D. para cada animal. Resultados representativos de um experimento. A análise estatística foi realizada por meio do teste *t Student*. ns: não significativo ($p > 0,05$). Ao lado esquerdo, imagens representativas da análise de Citometria de Fluxo.

4.7 A INDUÇÃO DE RESPOSTA HUMORAL SISTÊMICA PELA VIA INTRANASAL OCORREU COM UMA DOSE MAIOR DA PROTEÍNA *rChimera*

Após observar que uma concentração menor da proteína *rChimera* não foi capaz gerar uma resposta imune específica e superior ao grupo veículo, testamos o mesmo protocolo de imunização exposto na figura 11 deste trabalho, no entanto, dobramos a concentração da proteína para 20 µg/animal. Para isso, camundongos C57BL/6 foram divididos em dois grupos: veículo e *rChimera*+Alum e receberam nos dias 0 e 21 as seguintes formulações, PBS 1X + 100 µg Alum e 20 µg de *rChimera* e 100 µg Alum, respectivamente. Ao final do protocolo, realizamos o teste de ELISA indireto para avaliar a presença ou não de anticorpos da classe IgG específicos para as proteínas *rChimera*, N e S no soro desses animais em comparação ao grupo veículo. Da mesma forma, também foi utilizado o soro dos camundongos imunizados com a vacina iVac. Os resultados deste experimento indicam que a imunização pela via intranasal foi capaz de gerar uma resposta humoral sistêmica específica, através da produção de anticorpos IgG anti-proteínas do SARS-CoV-2 (Figura 12).



Figura 11. Esquema de imunização intranasal com dose de 20 µg. Camundongos da linhagem C57BL/6 foram imunizados pela via intranasal com 20 µg de *rChimera* e 100 µg de Alum no dia 0, seguido de um reforço no 21º dia utilizando a mesma concentração da proteína *rChimera* (20 µg) associado ao adjuvante Alum (100 µg). 21 dias após o reforço, foi realizada a coleta de amostras como soro, lavado broncoalveolar e baço, com o objetivo de avaliar as respostas humoral e celular específicas. 0d corresponde ao soro pré-imune. As setas vermelhas indicam a coleta de soro através da punção da veia submandibular.

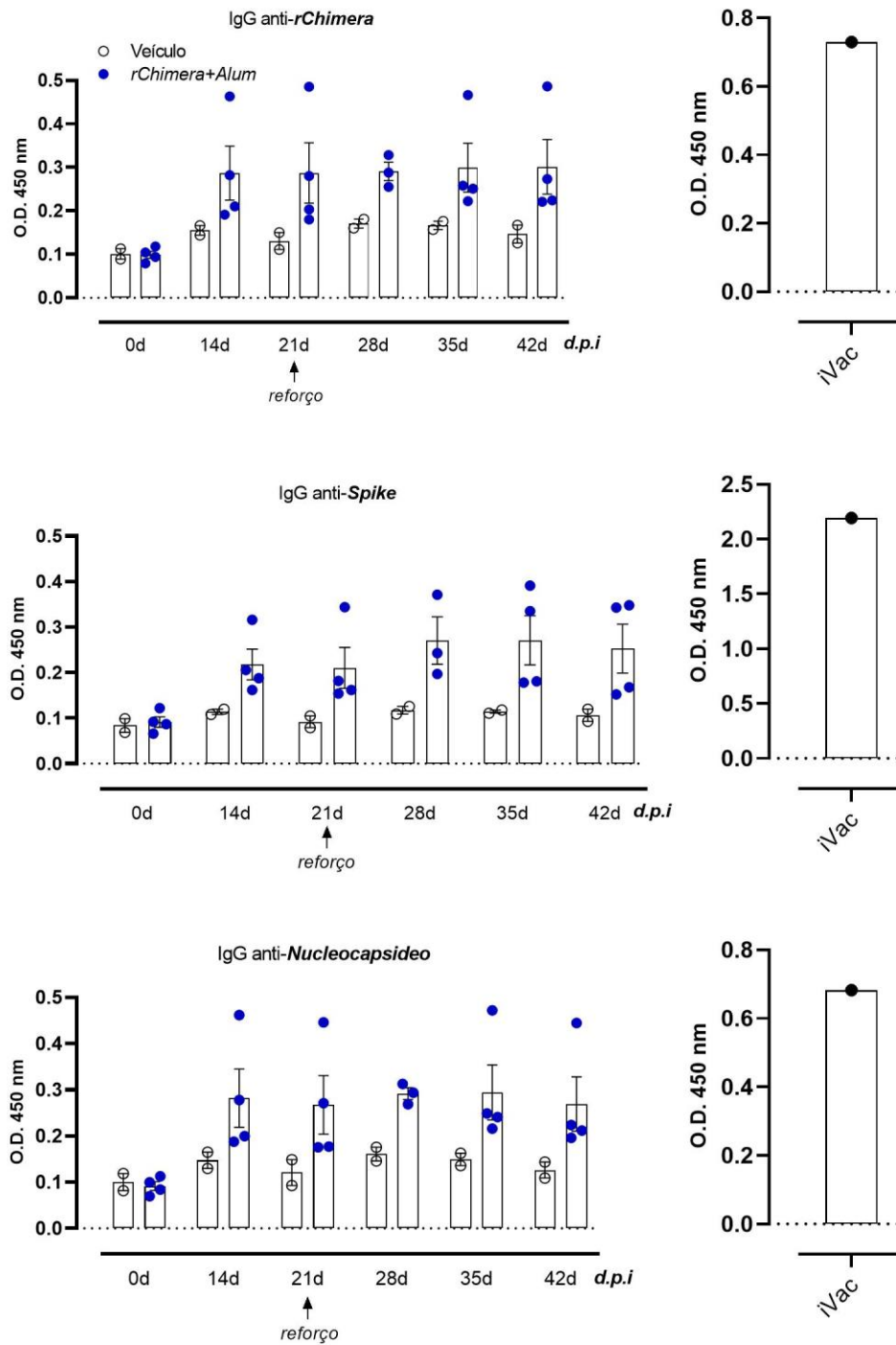


Figura 12. Dose de 20 μ g de *rChimera* administrada via intranasal induz resposta humoral sistêmica. As amostras dos soros obtidos nos dias 0, 14, 21, 28, 35 e 42 dos camundongos imunizados (20 μ g de *rChimera*+100 μ g de Alum) ou veículos (PBS 1x+100 μ g de Alum) foram diluídos 1:100 e incubadas *overnight* a temperatura de 4°C; o anticorpo secundário anti-IgG-HRP foi diluído 1:5000 e incubado por 1,5 horas para a detecção dos anticorpos específicos. A reação foi desenvolvida com TMB durante 6 minutos e interrompida com HCl 1 N. Leitura realizada em espectrofotômetro a 450 nm. Para o controle positivo da técnica, foram utilizados soros de camundongos vacinados com iVac. Os resultados representam a média \pm E.P.M onde cada ponto representa os valores independentes de O.D. para cada animal. Resultados representativos de um experimento. *d.p.i* = dias pós-imunização.

5 DISCUSSÃO

A COVID-19 é uma doença viral de caráter pandêmico, desencadeada pelo agente SARS-CoV-2. O sítio primário de infecção e replicação por esse patógeno é o trato respiratório superior, podendo acometer o trato respiratório inferior causando a síndrome do desconforto respiratório agudo grave que é potencialmente fatal (SCHULZE *et al.*, 2021). As vacinas contra a COVID-19 atualmente disponíveis demonstram uma eficácia superior a 90% na prevenção da forma grave da doença (BADEN *et al.*, 2021; DAGAN *et al.*, 2021; EMARY *et al.*, 2021). No entanto, a variabilidade do vírus SARS-CoV-2 e suas variantes preocupantes, tornam-se uma ameaça à proteção induzida pelas vacinas (MARKOV *et al.*, 2023). Por isso, vários estudos estão em andamento para a pesquisa de novos candidatos vacinais, bem como a necessidade analisar diferentes vias de administração.

Neste estudo, apresentamos a fase pré-clínica de uma estratégia vacinal alternativa que utiliza uma proteína quimérica composta pelas proteínas N e S do agente SARS-CoV-2, administrada via intramuscular e intranasal. Nossos resultados imunológicos revelaram que a vacina quando administrada pela via intramuscular, com uma dose de 10 µg de proteína/animal, é uma abordagem eficaz para induzir anticorpos de maneira sistêmica. Em contrapartida, quando administrado pela via intranasal não foi suficiente para induzir uma resposta específica de células B e T para os antígenos do agente SARS-CoV-2.

Anteriormente, um estudo explorou a imunogenicidade de uma proteína quimérica composta pelos antígenos RBD e N, associado ao adjuvante POLY ICLC, pela via intramuscular em camundongos (CASTRO *et al.*, 2022). Os resultados desse estudo corroboraram com os nossos achados, demonstrando que o esquema vacinal induziu uma resposta de células T e níveis elevados de anticorpos específicos contra os antígenos do SARS-CoV-2. No entanto, nossa imunização não induziu uma resposta humoral no BAL tão robusta quanto a observada por Castro e colaboradores (2022). Isso porque vacinas intramusculares falham em produzir respostas significativas de anticorpos no trato respiratório superior (VOLCKMAR; MELCHER; BRUDER, 2022). Em um outro trabalho, a coadministração de duas vacinas baseadas na estratégia de vetor viral que expressam os antígenos S e N, foram capazes de induzir resposta de linfócitos T, bem como de anticorpos IgG anti-N e anti-S. Notavelmente, os níveis de anticorpos foram consideravelmente maiores para a proteína *Spike*, como também observado em nossa pesquisa (DANGI *et al.*, 2020).

Apesar das respostas positivas obtidas através da imunização intramuscular o mesmo não foi observado na via intranasal, é importante ressaltar que a literatura científica tem

apresentado resultados promissores no uso de vacinação intranasal com subunidades proteicas em modelos animais. Maltseva e colaboradores (2023), realizaram um estudo em camundongos BALB/c fêmeas, nos quais foram imunizados com 20 µg da proteína RBD ou *Spike*, formuladas com os adjuvantes CT (*Cholera Toxin*) ou AMVAD (*Archael lipid mucosal vaccine adjuvant and delivery*). Os resultados demonstraram a indução de uma resposta específica de anticorpos IgG e IgA tanto local quanto sistemicamente. Em outro estudo, a imunização intranasal com três doses de uma vacina composta por RBD+PEI (Polietilenoimina) em camundongos C57BL/6, foi capaz de gerar resposta de anticorpos neutralizantes e proliferação de células T residentes do tecido pulmonar (LEI *et al.*, 2022).

Diallo e colaboradores (2023) também avaliaram a imunogenicidade e a eficácia protetora de uma vacina composta pela proteína S, formulada com um adjuvante agonista de TLR2 e STING. Foi possível observar que havia tanto uma resposta celular quanto humoral específica e camundongos quando desafiados com o vírus SARS-CoV-2, resistiam a infecção letal. Em conjunto, estas evidências somadas a tantas outras que avaliaram a resposta imune de vacinas administradas pela via intranasal, demonstram uma proteção em potencial conferida por essa rota de administração.

Algo importante a ser notado nesses estudos é a utilização de diferentes adjuvantes formulados ao mesmo antígeno. Nossa pesquisa baseou-se na utilização do adjuvante hidróxido de alumínio, do qual tem como mecanismo de ação, a liberação de DAMPS (do inglês, *Damage-associated molecular pattern*) através do processo de necrose celular. Os sinais responsáveis por recrutar e ativar células inflamatórias são: DNA, IL-33, IL-1β, ácido úrico, ATP, entre outros. Muitos estímulos como estes, atuam como potentes indutores de uma resposta imune do tipo Th2 (KOOL *et al.*, 2008; LI; NOOKALA; RE, 2007; MARICHAL *et al.*, 2011; RITEAU *et al.*, 2012; ROSE *et al.*, 2015).

Sasaki e colaboradores (2021) demonstrou que o adjuvante Alum, quando administrado pela via intranasal em camundongos BALB/c, é um forte indutor de DAMPs (IL-33, dsDNA, IL-1α, IL-1β, por exemplo), pois induz a morte celular de macrófagos alveolares e células epiteliais alveolares. Além disso, foi capaz de induzir uma forte resposta de anticorpos da classe IgA no LBA e aumentar a capacidade de captação dos antígenos vacinais através do MHC de classe II, presentes em APCs. Assim, podemos visualizar um potencial uso desse adjuvante em uma nova rota de imunização. Em contrapartida, baseado na nossa pesquisa, a combinação do adjuvante Alum a proteína *rChimera* não foi capaz de induzir uma resposta vacinal promissora como mencionado anteriormente. Isso se deve em parte a baixa capacidade

do adjuvante de induzir uma resposta do tipo Th1 (baixa produção de IgG2a) e células T CD8⁺, como demonstrado por Sasaki *et al.* (2020).

Um aspecto adicional para explicar a ausência de resposta imune local e sistêmica em camundongos imunizados pela via intranasal, pode ser atribuído ao fenômeno da tolerância de mucosa. A via respiratória é um compartimento extremamente eficiente na indução de tolerância, pois tem a finalidade de prevenir respostas inflamatórias prejudiciais a antígenos inalados, assegurando a homeostase corporal. Logo, baixas doses do antígeno ou poucas administrações podem não ser suficientes para induzir uma resposta imune efetora (MESTECKY; RUSSELL; ELSON, 2007). Um estudo demonstrou que camundongos alimentados com doses baixas de um antígeno favoreceu o processo de regulação celular, enquanto doses muito altas induzem um estado de anergia (FRIEDMAN; WEINER, 1994). Pensando nesses aspectos, aumentamos a dose (20 µg) da proteína *rChimera* administrada via intranasal com o objetivo de estimular imunidade a nível sistêmico. Os resultados foram promissores, demonstrando que camundongos imunizados com uma vacina composta pela proteína *rChimera*, associada ao adjuvante Alum, apresentam anticorpos séricos da classe IgG específicos para as proteínas do agente SARS-CoV-2. Contudo, esses dados não são suficientes para caracterizar uma resposta imune eficaz e robusta contra o agente SARS-CoV-2. Por isso, mais estudos são necessárias pesquisas adicionais a fim de avaliar outras variáveis que também desempenham um papel crucial na indução de uma resposta imunológica completa.

Conforme mencionado anteriormente, é importante destacar que existem outras variáveis relevantes para demonstrar a indução de resposta de mucosa, que não foram exploradas neste estudo, tais como a síntese local e secreção de anticorpos da classe IgA e a presença de células T residentes do tecido pulmonar (ALU *et al.*, 2022). O papel da imunoglobulina IgA é essencial antes do início da infecção epitelial, pois promove a captura e remoção de patógenos que atingem o sistema respiratório (CERUTTI, 2008). Devido a isso, a grande maioria dos estudos que investigam a promoção de resposta de mucosa avaliam a produção desse anticorpo em diferentes amostras, como LBA, saliva e soro (DIALLO *et al.*, 2023; MALTSEVA *et al.*, 2023; VAN DOREMALEN *et al.*, 2021). Em relação as células T_{RM}, estas são caracterizadas por expressar altos níveis de moléculas de superfície celular como CD103⁺ e CD69⁺. Além disso, residem em tecidos de barreira para rápida resposta diante de infecções subsequentes, independentemente do recrutamento de células T do sangue (BULL *et al.*, 2019; WOODLAND; SCOTT, 2005).

Outra descoberta significativa deste estudo é que a via de administração pode ter um impacto substancial na resposta imune. Ao imunizar camundongos com a mesma formulação,

mas usando diferentes vias de administração, observamos que isso levou à produção de respostas imunes específicas. Alguns estudos exploraram a imunização intranasal em paralelo a imunização intramuscular. Chen e colaboradores (2022b) ao utilizar a porção RBD fundido ao fragmento Fc do anticorpo (RBD-Fc) formulado com adjuvante de alumínio, demonstrou induzir uma forte resposta de IgG anti-RBD, anticorpos neutralizantes e fraca resposta de células T específicas. No entanto, a resposta celular foi maior no grupo dos animais que receberam a proteína pela via intramuscular, como observamos no nosso estudo ao comparar as duas rotas de administração com a mesma dose de 10 µg. Em outro trabalho, a imunização com RBD+Alum intranasal gerou uma resposta humoral específica a nível sistêmico e local, em contrapartida, a resposta de células T foi induzida, mas quando comparada a via intramuscular os níveis foram inferiores (DU *et al.*, 2021). Ainda, através de um trabalho publicado por Mohanan e colaboradores (2010), pôde-se observar que dependendo da via utilizada para a aplicação de substâncias, diferentes respostas são geradas e que camundongos imunizados pela via i.m., desenvolvem uma resposta do tipo Th1, produtora de citocinas como IFN- γ .

Alguns estudos abordaram a utilização de diferentes estratégias vacinais para avaliar a resposta mediante imunização intranasal e parenteral. Anum e colaboradores (2020) usando uma vacina baseada na tecnologia de vetores adenovirais, expressando antígenos do SARS-CoV-2, gerou resposta imune superior a via intramuscular. Em outro trabalho, a imunização intranasal foi capaz de conferir imunidade celular e humoral, além de proteção contra o desafio utilizando o vírus SARS-CoV-2, com apenas uma dose da vacina (HASSAN *et al.*, 2020). Vacinas para outros microrganismos também foram testados em diferentes vias, Derrick e colaboradores (2014) avaliaram o impacto da imunização intranasal com BCG comparada à imunização convencional. Através dos dados obtidos, camundongos imunizados pela via i.n. apresentavam maior frequência de células pulmonares T CD8⁺ e CD4⁺IFN- γ ⁺. Quando avaliados em esplenócitos, as frequências destas células também foram superiores a rota de imunização convencional (DERRICK *et al.*, 2014).

O nosso estudo também evidenciou que a imunização intranasal e a intramuscular não têm influência sobre o número e a frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ quando comparado ao grupo controle. De forma semelhante, Gao e colaboradores (2020), ao avaliar o subconjunto de linfócitos CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ após imunização com a vacina de vírus inativado, não observou diferença entre os grupos: vacinas, placebo e veículo. Entretanto, uma dose maior poderia aumentar esses parâmetros, favorecendo a indução de uma resposta imune de células T específicas. Acredita-se que outro método interessante para explorar a resposta imune celular

após esquema vacinal, seja através da avaliação da coloração intracelular de citocinas (ICS). A ICS é uma técnica comum baseada em citometria de fluxo, da qual tem como objetivo avaliar a função das células T *ex vivo*, incluindo sua capacidade de reconhecimento de antígenos e produção de citocinas. Sendo um parâmetro importante para entender como o sistema imunológico está respondendo à imunização (LAMOREAUX; ROEDERER; KOUP, 2006).

Até o momento, o emprego de vacinas mucosas tem uma trajetória segura comprovada, com décadas de aplicação em contextos veterinários (LIVARES; OOD, 2004). Em humanos, a vacina nasal contra influenza FluMist demonstrou segurança, eficácia e proteção contra o vírus da influenza (CARTER; CURRAN, 2011). Os dados demonstrados nesta discussão bem como os resultados deste trabalho indicam um futuro potencial da via intranasal como objeto de estudo, com o objetivo de explorar o sítio primário da infecção pelo agente SARS-CoV-2 e outros patógenos respiratório. Prevenindo a ocorrência de uma infecção local, barrando a transmissão comunitária, além de oferecer simplicidade de administração sem a necessidade de agulhas e seringas estéreis.

6 CONCLUSÃO

Nosso estudo sugere que a via intranasal utilizando uma dose de 20 μg da proteína *rChimera*, resulta em uma potente imunogenicidade humoral sistêmica. No entanto, é importante destacar que futuras avaliações serão necessárias para comprovar a capacidade de gerar uma resposta imunológica adequada, eficácia e segurança vacinal. Dessa forma, nosso estudo não apenas traz à tona a promissora perspectiva da proteína *rChimera* como uma possível solução contra a COVID-19, mas também estabelece uma base sólida para o desenvolvimento contínuo e aprofundado dessa rota de administração no campo das imunizações.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 10. ed. Philadelphia: Elsevier, 2021.

ADAMO, S. *et al.* Signature of long-lived memory CD8⁺ T cells in acute SARS-CoV-2 infection. **Nature**, v. 602, n. 7895, p. 148–155, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-021-04280-x>>.

AFKHAMI, S. *et al.* Respiratory mucosal delivery of next-generation COVID-19 vaccine provides robust protection against both ancestral and variant strains of SARS-CoV-2. **Cell**, v. 185, n. 5, p. 896-915, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2022.02.005>

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 7, p. 499–511, 2004.

ALEEBRAHIM-DEHKORDI, E. *et al.* T helper type (Th1/Th2) responses to SARS-CoV-2 and influenza A (H1N1) virus: from cytokines produced to immune responses. **Transplant Immunology**, v. 70, p. 101495, fev. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2021.101495>

ALU, A. *et al.* Intranasal COVID-19 vaccines: From bench to bed. **eBioMedicine**, v. 76, p. 103841, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103841>>.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Vacinas - Covid-19**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas>. Acesso em: 02 jul. 2023.

AZZI, L. *et al.* Mucosal immune response in BNT162b2 COVID-19 vaccine recipients. **eBioMedicine**, v. 75, 2022.

BADEN, L. R. *et al.* Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 5, p. 403–416, 2021.

BAI, Z. *et al.* Structure , Biological Functions , and a Potential Target for Drug. **Viruses**, v. 13, n. 1115, p. 1–13, 2021.

BARRÍA, M. I. *et al.* Localized mucosal response to intranasal live attenuated influenza vaccine in adults. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 1, p. 115–124, 2013.

BELSHE, R. B. *et al.* The Efficacy of Live Attenuated, Cold-Adapted, Trivalent, Intranasal Influenzavirus Vaccine in Children. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 20, p. 1405–1412, 1998.

BELSHE, R. *et al.* Safety, immunogenicity and efficacy of intranasals, live attenuated influenza vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 3, n. 6, p. 643–654, 2004.

BULL, N. C. *et al.* Enhanced protection conferred by mucosal BCG vaccination associates with presence of antigen-specific lung tissue-resident PD-1 + KLRG1 – CD4 + T cells. **Mucosal Immunology**, v. 12, n. 2, p. 555–564, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41385-018-0109-1>>.

BUTTENSCHÖN, J.; MATTNER, J. The interplay between dendritic cells and CD8 T lymphocytes is a crucial component of SARS-CoV-2 immunity. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 18, n. 2, p. 247–249, 2021.

CARABELLI, A. M. *et al.* SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 162–177, 2023.

CARTER, N. J.; CURRAN, M. P. Live Attenuated Influenza Vaccine (FluMist®; Fluenz™). **Drugs**, v. 71, n. 12, p. 1591–1622, 2011.

CASTRO, J. T. *et al.* Promotion of neutralizing antibody-independent immunity to wild-type and SARS-CoV-2 variants of concern using an RBD-Nucleocapsid fusion protein. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-022-32547-y>>.

CELE, S. *et al.* Omicron extensively but incompletely escapes Pfizer BNT162b2 neutralization. **Nature**, v. 602, n. 7898, p. 654–656, 2022.

CERUTTI, A. The regulation of IgA class switching. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 6, p. 421–434, 2008.

CHEN, S. *et al.* The role of B cells in COVID-19 infection and vaccination. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. August, p. 1–13, 2022a.

CHEN, L.; ZHANG, H.; LI, M.; WU, B.; ZHANG, Z.; GONG, R. An intranasal vaccine targeting the receptor binding domain of SARS-CoV-2 elicits a protective immune response. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. November, p. 1–17, 2022b.

DAGAN, N. *et al.* BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Mass Vaccination Setting. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 15, p. 1412–1423, 2021.

DANGI, T. *et al.* Combining *Spike*- and nucleocapsid-based vaccines improves distal control of SARS-CoV-2. **Cell Reports**, v. 36, n. 10, p. 109664, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109664>.

DERRICK, S. C. *et al.* Intranasal administration of Mycobacterium bovis BCG induces superior protection against aerosol infection with Mycobacterium tuberculosis in mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 10, p. 1443–1451, 2014.

DIALLO, B. K. *et al.* Intranasal COVID-19 vaccine induces respiratory memory T cells and protects K18-hACE mice against SARS-CoV-2 infection. **npj Vaccines**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2023.

DIAMOND, M. S.; KANNEGANTI, T. D. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. **Nature Immunology**, v. 23, n. 2, p. 165–176, 2022.

DU, Y. *et al.* Intranasal administration of a recombinant RBD vaccine induced protective immunity against SARS-CoV-2 in mouse. **Vaccine**, v. 39, n. 16, p. 2280–2287, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.006>>.

EMARY, K. R. W. *et al.* Efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine against SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 (B.1.1.7): an exploratory analysis of a randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 397, n. 10282, p. 1351–1362, 2021.

EWER, K. J. *et al.* T cell and antibody responses induced by a single dose of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine in a phase 1/2 clinical trial. **Nature Medicine**, v. 27, n. 2, p. 270–278, 2021.

FORNI, G. *et al.* COVID-19 vaccines: where we stand and challenges ahead. **Cell Death and Differentiation**, v. 28, n. 2, p. 626–639, 2021.

FRIEDMAN, A.; WEINER, H. L. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 14, p. 6688–6692, 1994.

GANESAN, S.; COMSTOCK, A. T.; SAJJAN, U. S. Barrier function of airway tract epithelium. **Tissue Barriers**, v. 1, n. 4, p. e24997, 2013.

GAO, Q. *et al.* Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. **Science**, v. 369, n. 6499, p. 77–81, 3 jul. 2020. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.abc1932>.

GARCÍA-MONTERO, C. *et al.* An Updated Review of SARS-CoV-2 Vaccines and the Importance of Effective Vaccination Programs in Pandemic Times. **Vaccines**, v. 9, n. 5, p. 433, 27 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/vaccines9050433>.

GOEL, R. R. *et al.* mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern. **Science**, v. 374, n. 6572, 2021.

HAMMING, I. *et al.* Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **Journal of Pathology**, v. 203, n. 2, p. 631–637, 2004.

HASSAN, A. O. *et al.* A Single-Dose Intranasal ChAd Vaccine Protects Upper and Lower Respiratory Tracts against SARS-CoV-2. **Cell**, v. 183, n. 1, p. 169–184.e13, 2020.

HEATH, P. T. *et al.* Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 13, p. 1172–1183, 2021.

HU, B. *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141–154, 2021.

HUANG, Y. *et al.* Structural and functional properties of SARS-CoV-2 *Spike* protein: potential antiviral drug development for COVID-19. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, n. 9, p. 1141–1149, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>>.

JAMISON, D. A. *et al.* A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, Part 1: Intracellular overdrive for SARS-CoV-2 infection. **European Journal of Human Genetics**, v. 30, n. 8, p. 889–898, 2022.

- KASUGA, Y. *et al.* Innate immune sensing of coronavirus and viral evasion strategies. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 53, n. 5, p. 723–736, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s12276-021-00602-1>>.
- KEECH, C. *et al.* M. Phase 1–2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant *Spike* Protein Nanoparticle Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 24, p. 2320–2332, 2020.
- KEECH, C. *et al.* Immunogenicity and safety of BPZE1, an intranasal live attenuated pertussis vaccine, versus tetanus–diphtheria–acellular pertussis vaccine: a randomised, double-blind, phase 2b trial. **The Lancet**, v. 401, n. 10379, p. 843–855, 2023. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02644-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02644-7)>.
- KOOL, M. *et al.* Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 4, p. 869–882, 2008.
- LAMOREAUX, L.; ROEDERER, M.; KOUP, R. Intracellular cytokine optimization and standard operating procedure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1507–1516, 2006.
- LE BERT, N. *et al.* SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 457–462, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>>.
- LEI, H. *et al.* Intranasal administration of a recombinant RBD vaccine induces long-term immunity against Omicron-included SARS-CoV-2 variants. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, 2022.
- LI, H.; NOOKALA, S.; RE, F. Aluminum Hydroxide Adjuvants Activate Caspase-1 and Induce IL-1 β and IL-18 Release. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 8, p. 5271–5276, 2007.
- LIEN, C. E. *et al.* CpG-adjuvanted stable prefusion SARS-CoV-2 *Spike* protein protected hamsters from SARS-CoV-2 challenge. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 6–12, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-88283-8>>.
- LIU, D. X. *et al.* Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. **Antiviral Research**, v. 109, p. 97–109, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.06.013>
- LIVARES, J. C. A.; OOD, J. W. Review article West Nile virus infection of horses. v. 35, p. 467–483, 2004.
- MALTSEVA, M. *et al.* Characterization of Systemic and Mucosal Humoral Immune Responses to an Adjuvanted Intranasal SARS-CoV-2 Protein Subunit Vaccine Candidate in Mice. **Vaccines**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2023.
- MAMBELLI, F. *et al.* Recombinant Bacillus Calmette-Guérin Expressing SARS-CoV-2 Chimeric Protein Protects K18-hACE2 Mice against Viral Challenge. **Journal of**

immunology (Baltimore, Md. : 1950), v. 2, 2023. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37098890>>.

MARICHAL, T. *et al.* DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. **Nature Medicine**, v. 17, n. 8, p. 996–1002, 2011.

MARKOV, P. V. *et al.* The evolution of SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. June, 2023.

MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 255–258, 2001.

MESTECKY, J.; RUSSELL, M. W.; ELSON, C. O. Perspectives on Mucosal Vaccines: Is Mucosal Tolerance a Barrier? **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 9, p. 5633–5638, 2007.

MIN, L.; SUN, Q. Antibodies and Vaccines Target RBD of SARS-CoV-2. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, n. April, p. 1–9, 2021.

MOHANAN, D. *et al.* Administration routes affect the quality of immune responses: A cross-sectional evaluation of particulate antigen-delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 147, n. 3, p. 342–349, 2010. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.012>>.

MOSS, P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. **Nature Immunology**, v. 23, n. 2, p. 186–193, 2022.

NEELAND, M. R.; *et al.* The Lymphatic Immune Response Induced by the Adjuvant AS01: A Comparison of Intramuscular and Subcutaneous Immunization Routes. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 7, p. 2704–2714, 2016.

OLIVEIRA, S. C.; DE MAGALHÃES, M. T. Q.; HOMAN, E. J. Immunoinformatic Analysis of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Identification of COVID-19 Vaccine Targets. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. July, p. 1–10, 2020.

PINTO, D. *et al.* Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. **Nature**, v. 583, n. 7815, p. 290–295, 2020. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2349-y>>.

POLLARD, A. J.; BIJKER, E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 2, p. 83–100, 2021. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>>.

PORTELA SOUSA, C.; BRITES, C. Immune response in SARS-CoV-2 infection: the role of interferons type I and type III. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 5, p. 428–433, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.07.011>>.

PRIMORAC, D. *et al.* Adaptive Immune Responses and Immunity to SARS-CoV-2. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. May, p. 1–13, 2022.

- RAHMAN, M. M. *et al.* A comprehensive review on COVID-19 vaccines: development, effectiveness, adverse effects, distribution and challenges. **VirusDisease**, v. 33, n. 1, p. 1–22, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13337-022-00755-1>>.
- RITEAU, N. *et al.* ATP release and purinergic signaling: A common pathway for particle-mediated inflammasome activation. **Cell Death and Disease**, v. 3, n. 10, p. 1–10, 2012.
- ROSE, W. A. *et al.* IL-33 released by alum is responsible for early cytokine production and has adjuvant properties. **Scientific Reports**, v. 5, n. March, p. 1–13, 2015.
- SAHIN, U. *et al.* Concurrent human antibody and TH1 type T-cell responses elicited by a COVID-19 RNA vaccine. **medRxiv**, p. 2020.07.17.20140533, 2020. Disponível em: <<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.07.17.20140533v1%0Ahttps://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.07.17.20140533v1.abstract>>.
- SASAKI, E. *et al.* Immunogenicity and Toxicity of Different Adjuvants Can Be Characterized by Profiling Lung Biomarker Genes After Nasal Immunization. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. September, p. 1–19, 2020.
- SASAKI, E. *et al.* Nasal alum-adjuvanted vaccine promotes IL-33 release from alveolar epithelial cells that elicits IgA production via type 2 immune responses. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 8 August, p. 1–25, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1009890>>.
- SAXENA, A. *et al.* Flow Cytometry of Muscle. **J Immunol Methods**, v. 74, n. 1, p. 27–34, 2016.
- SCHULZE, J. *et al.* Analysis of Severe Acute Respiratory Syndrome 2 Replication in Explant Cultures of the Human Upper Respiratory Tract Reveals Broad Tissue Tropism of Wild-Type and B.1.1.7 Variant Viruses. **Journal of Infectious Diseases**, v. 224, n. 12, p. 2020–2024, 2021.
- SHAH, V. K. *et al.* Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From the Past. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. August, p. 1–17, 2020.
- SHEIKH-MOHAMED, S. *et al.* Systemic and mucosal IgA responses are variably induced in response to SARS-CoV-2 mRNA vaccination and are associated with protection against subsequent infection. **Mucosal Immunology**, v. 15, n. 5, p. 799–808, 2022.
- SOUTHAM, D. S. *et al.* Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. **American Journal Of Physiology-Lung Cellular And Molecular Physiology**, v. 282, n. 4, p. 833-839, 1 abr. 2002. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00173.2001>.
- STARK, F. C. *et al.* Intranasal immunization with a proteosome-adjuvanted SARS-CoV-2 Spike protein-based vaccine is immunogenic and efficacious in mice and hamsters. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-022-13819-5>>.

TODOROVIĆ-RAKOVIĆ, N.; WHITFIELD, J. R. Between immunomodulation and immunotolerance: the role of ifn γ in SARS-CoV-2 disease. **Cytokine**, v. 146, p. 155637, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155637>.

TURNER, P. V. *et al.* Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. **Journal Of The American Association For Laboratory Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 600-613, set. 2011.

VAN DOREMALEN, N. *et al.* ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. **Nature**, v. 586, n. 7830, p. 578–582, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2608-y>.

VAN DOREMALEN, N. *et al.* Intranasal ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 vaccination reduces viral shedding after SARS-CoV-2 D614G challenge in preclinical models. **Science Translational Medicine**, v. 13, n. 607, p. 1–16, 2021.

VOLCKMAR, J.; MELCHER, L.; BRUDER, D. Route , origin & valence matter : towards sophisticated next- generation vaccines to cope with the COVID-19 pandemic. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, n. June, p. 5–7, 2022.

WALLS, A. C. *et al.* T. Structure , Function , and Antigenicity of the SARS-CoV-2 *Spike* Glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281- 292.e6, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>.

WIENDL, H.; HOHLFELD, R.; KIESEIER, B. C. Immunobiology of muscle: Advances in understanding an immunological microenvironment. **Trends in Immunology**, v. 26, n. 7, p. 373–380, 2005.

WOODLAND, D. L.; SCOTT, I. T cell memory in the lung airways. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 2, n. 2, p. 126–131, 2005.

World Health Organization. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. 2023.** Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 06 jun. 2023a.

World Health Organization. **COVID-19 vaccine tracker and landscape. 2023.** Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>. Acesso em: 2 jul. 2023b.

YAN, W. *et al.* Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, 2022.

YANG, H.; RAO, Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 685–700, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-021-00630-8>.

YUAN, M. *et al.* A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. **Science**, v. 368, n. 6491, p. 630–633, 2020.

ZHANG, N.; BEVAN, M. J. CD8⁺ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. **Immunity**, v. 35, n. 2, p. 161–168, 2011.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4⁺ T cell populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 445–489, 2010.

ZHU, N. *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 2020.

APÊNDICE A

A estratégia de *gate* foi realizada com base na distribuição em um gráfico FSC-A *versus* SSC-A, onde foram selecionadas células de baixo tamanho e granulosidade; seguido da seleção de células não marcadas pelo corante *Zombie* (Figura 13A); *gate* de células positivas para CD45 (proteína transmembranar expressa em todos os leucócitos) (Figura 13B); Seleção de células T, em gráfico de anti-CD3 *versus* anti-CD19 (Figura 13C); posteriormente, foram selecionadas as células T CD3⁺ do qual foi construído um gráfico de anti-CD8 *versus* anti-CD4 para a seleção de diferentes subpopulações de linfócitos T (Figura 13D). A mesma estratégia foi aplicada em todas as análises deste trabalho.

Estratégia de *gate*

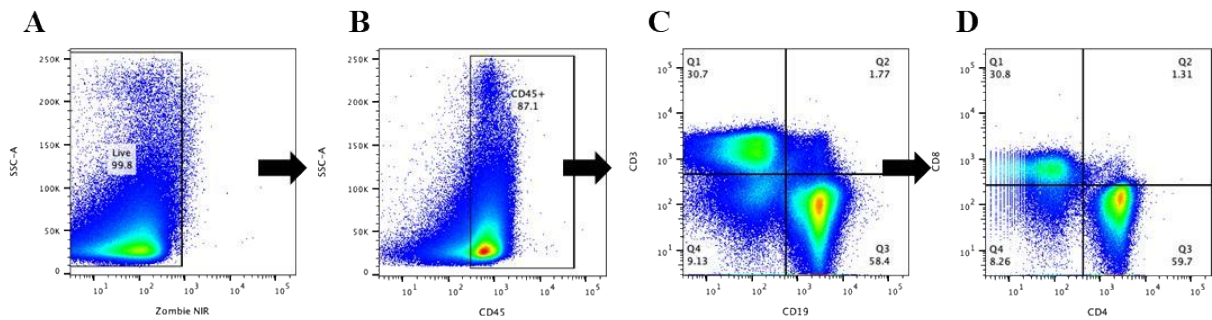


Figura 13. Estratégia de *gate*. A) foram selecionadas células marcadas negativamente para o marcador de viabilidade *Zombie*; B) a partir da população de células CD45⁺ foram selecionadas células anti-CD3⁺ *versus* anti-CD19⁺ (C); Seleção das subpopulações de linfócitos em um gráfico anti-CD8 *versus* anti-CD4 (D). Imagem representativa de um experimento.