

Produção de anticorpos e citocinas em resposta ao SARS-CoV-2: comparação entre imunidade vacinal e híbrida

Antibody and cytokine production in response to SARS-CoV-2: vaccine versus hybrid immunity comparison

Júlia Bombini Faustini¹ , Ana Paula Campanelli² , Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva³ , Vânia Nieto Brito de Souza^{1*} 

¹ Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brasil.

² Departamento de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, SP, Brasil.

³ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

* Autor de correspondência/Corresponding author: vbrito@ils.br

Recebido/Received: 19.12.2023

Aceito/Accepted: 25.03.2024

Publicação/Publication: 24.06.2024

Editor Chefe/Editor-in-chief: Adriana Bugno

RESUMO

A resposta imunológica pelo SARS-CoV-2 após protocolos vacinais e infecção natural é pouco compreendida. Comparando indivíduos vacinados com esquema heterólogo que receberam um reforço vacinal (imunidade vacinal) com aqueles que apresentaram episódio leve de COVID-19 (imunidade híbrida) no mesmo período, verificamos níveis semelhantes de anticorpos contra SARS-CoV-2. Em culturas de células mononucleares, o estímulo com o antígeno viral induziu produção de citocinas pró-inflamatórias nos dois grupos, entretanto, os níveis de IL-17 foram menores em indivíduos com imunidade vacinal. Nossos resultados sugerem que o reforço vacinal teve efeitos semelhantes à infecção natural pelo SARS-CoV-2 na resposta imunológica de indivíduos previamente vacinados.

Palavras-chave. SARS-CoV-2, COVID-19, Vacinas, Resposta Imune, Anticorpos.

ABSTRACT

The immune response generated by SARS-CoV-2 vaccination protocols and natural infection remains incompletely understood. We compared individuals who received a heterologous vaccination scheme with a booster shot (vaccine immunity) to those who experienced a mild COVID-19 episode (hybrid immunity) during the same timeframe. Our findings revealed similar levels of SARS-CoV-2 antibodies in both groups. Stimulation by viral antigen in mononuclear cell cultures induced pro-inflammatory cytokines in both groups, while individuals with vaccine immunity exhibited lower IL-17. These results suggest that a vaccine booster can induce an immune response in previously vaccinated individuals comparable to that elicited by natural SARS-CoV-2 infection.

Keywords. SARS-CoV-2, COVID-19, Vaccines, Immune Response, Antibodies.

A COVID-19 permanece um problema sanitário atual, sendo a vacinação uma importante ferramenta profilática para mitigar os impactos dessa doença. Apesar da aplicação de vacinas desencadear a produção de uma resposta imune específica com papel protetivo, foi notado que a aplicação de uma única dose vacinal não sustenta essa imunidade ativa por longos períodos, havendo diminuição dos níveis plasmáticos de anticorpos após poucos meses¹. Assim, são necessárias doses de reforço para manter uma resposta imune eficiente por períodos maiores. Com o desenvolvimento de diferentes vacinas, diversos protocolos heterólogos foram aplicados a fim de gerar respostas imunológicas mais eficazes¹. Nesse cenário, foi amplamente questionada a eficácia das vacinas e dos protocolos vacinais diante da proteção gerada pela infecção natural².

Dessa maneira, investigamos a resposta imune celular e humoral específica de trabalhadores da saúde previamente submetidos a esquema vacinal heterólogo, comparando o efeito da infecção natural pelo SARS-CoV-2 após o esquema vacinal com uma dose de reforço com a vacina da Janssen.

Foram avaliados profissionais da área de saúde do sexo feminino (n = 24) imunizadas com esquema vacinal heterólogo contra o SARS-CoV-2 composto por três doses de vacina, sendo as duas primeiras doses de CoronaVac (Sinovac Biotech/Butantan), com um intervalo de 21 dias entre elas, e a terceira dose de BNT162b2 (Comirnaty, Pfizer-BioNTech), 180 dias após a primeira dose da CoronaVac. As participantes foram divididas em dois grupos: Imunidade Híbrida (IH; n = 9) e Imunidade Vacinal (IV; n = 15). O grupo IH apresentou um único episódio de COVID-19 com sintomas leves, sem necessidade de internação, num período entre 30 e 60 dias antes do estudo. O grupo IV recebeu, nesse mesmo período, uma dose de reforço com a vacina Ad26.COV2.S (Janssen, Johnson & Johnson) e nunca teve confirmada infecção pelo SARS-CoV-2 até o momento do estudo.

A pesquisa de IgG anti-Spike do SARS-CoV-2 foi feita por ELISA empregando-se um kit comercial (EI2606-9601G, Euroimmun, Lübeck, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. Para a avaliação da resposta imune celular foram feitas culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC – Peripheral blood mononuclear cell) estimuladas com a cepa selvagem de SARS-CoV-2 (Genbankaccess MT126808.1) inativada por radiação ultravioleta. As células mononucleares foram isoladas em gradiente de densidade empregando-se Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA). O número de células foi determinado através do método de exclusão com azul de Tripán em câmara hemocitométrica de Neubauer e as células foram distribuídas em placas de 96 poços, na densidade de 1×10^5 células/poço. As culturas foram realizadas em meio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies, New York, NY, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco), 1 mM penicilina-estreptomicina (Gibco), 2 nM de L-glutamina, 1 mM de aminoácidos não essenciais e mantidas em estufa incubadora a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 horas. Foram gerados 8 poços de cultura por paciente, divididos em culturas controles não estimuladas e culturas estimuladas com SARS-CoV-2 inativado na multiplicidade de infecção 10:1 (vírus:célula). Os níveis de interleucina (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-17, Interferon-gama (IFN- γ) e Fator de necrose tumoral (TNF) foram avaliados no sobrenadante das culturas empregando-se o ensaio multiplex CBA (Cytometric Bead Array, BD Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a análise de dados, a comparação dos resultados entre diferentes grupos foi feita pelo teste de Mann Whitney, e a comparação entre as variáveis no mesmo grupo foi feita pelo teste de Wilcoxon, após a exclusão dos outliers pelo método ROUT. Todas as análises foram realizadas pelo programa estatístico GraphPad Prism versão 9.0.0 (2020). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Lauro de Souza Lima (Número do Parecer: 5.485.067) de acordo com as normas preconizadas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), e seguiu os padrões exigidos pela Resolução 466/2012 do Ministério da Saúde – Conselho Nacional da Saúde. Consentimento informado, livre e esclarecido foi obtido de todos os participantes do estudo.

A média de idade do grupo IH foi de 51,4 anos enquanto no grupo IV a média foi de 50,1 anos. Os níveis de anticorpos foram semelhantes entre os grupos, não havendo diferença significante entre os

indivíduos que foram naturalmente infectados pelo SARS-CoV-2 (IH) e aqueles que receberam a dose de reforço vacinal (IV) (**Figura A**). Quanto à produção de citocinas (**Figura B**), observamos que nas culturas estimuladas com SARS-CoV-2, houve maior produção de citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 em ambos os grupos em comparação com as culturas não estimuladas, sem diferenças significantes entre os grupos. Os níveis de IL-17 foram maiores no grupo IH tanto nas culturas não estimuladas quanto naquelas estimuladas com o SARS-CoV-2 em comparação ao grupo IV. Em relação a IL-10, verificamos menor produção nas culturas estimuladas pelo SARS-CoV-2 do grupo IH, enquanto no grupo IV não houve diferença significativa entre culturas estimuladas e não estimuladas. A produção de IL-1 β foi significativamente maior nas culturas estimuladas com o vírus apenas no grupo IV. Os níveis de IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-12p70 e IFN- γ foram baixos ou indetectáveis.

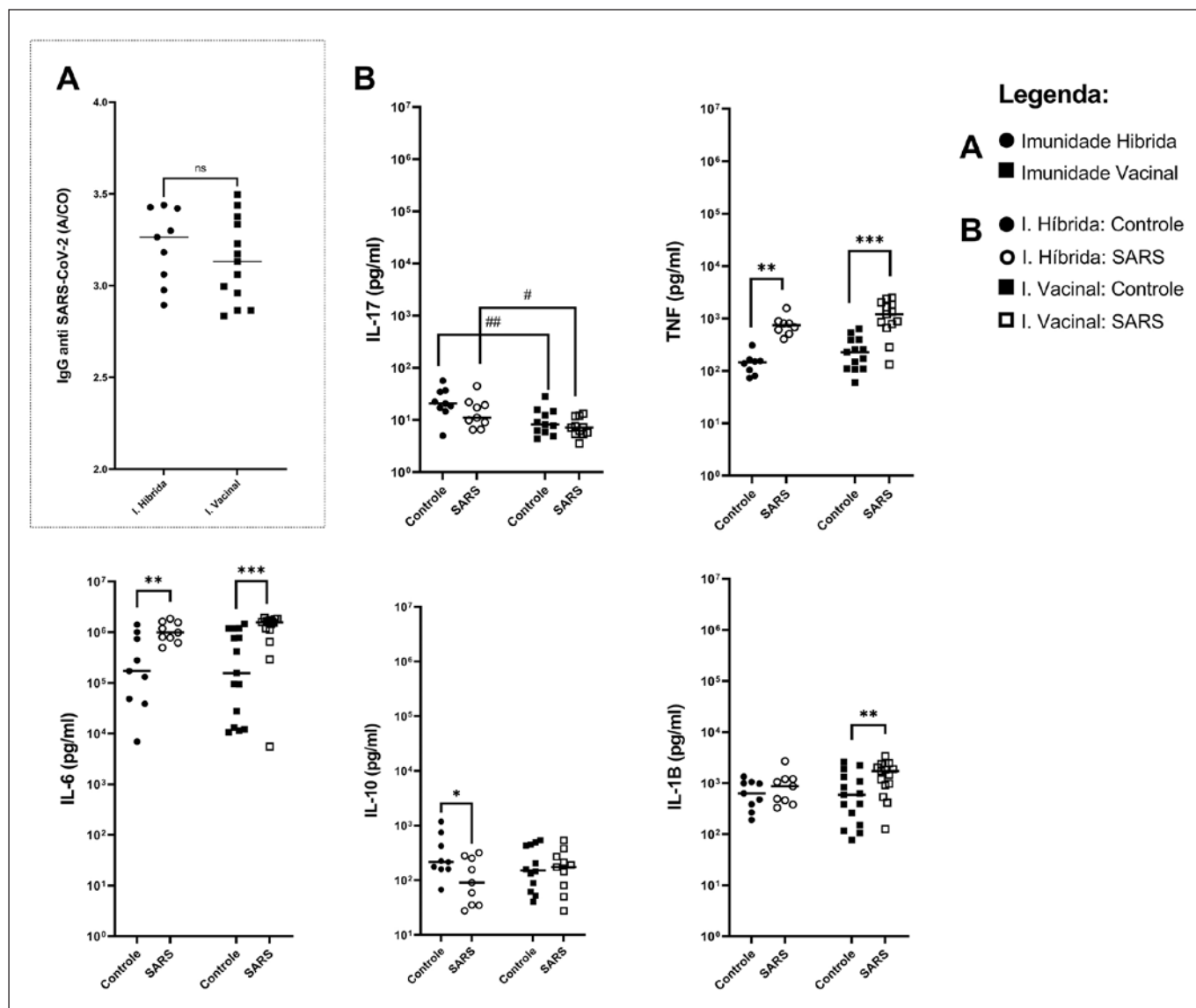


Figura. (A): Detecção por ELISA de anticorpos (IgG) contra a proteína S (*Spike*) do SARS-CoV-2 em amostras de soro. Os valores apresentados representam a razão entre a absorbância na amostra (A) de cada paciente e o *cut-off* (CO) fornecido pelo fabricante do ensaio; (B): Níveis de citocinas em culturas de células monoclulares de sangue periférico estimuladas com SARS-CoV-2 (SARS) inativado ou mantidas sem estímulo (Controle). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$. Teste de Wilcoxon para amostras pareadas (*); Teste de Mann-Whitney (#)

O entendimento da fisiopatogenia da COVID-19 e de ferramentas que diminuem a transmissão e gravidade do quadro clínico é de suma importância para o manejo dessa doença. Nesse sentido, as vacinas foram implementadas como ferramenta para redução da transmissão e dos danos causados pela doença³.

No presente estudo, verificamos que os indivíduos previamente vacinados que receberam uma dose de reforço apresentaram resposta semelhante aos indivíduos vacinados que foram naturalmente infectados pelo coronavírus no mesmo período. Ambos os grupos apresentaram níveis semelhantes de anticorpos IgG contra a proteína *Spike* do SARS-CoV-2. De maneira similar, Vespa et al² observaram que indivíduos naturalmente infectados pelo coronavírus tinham níveis de anticorpos semelhantes aos observados em indivíduos que receberam a vacina baseada em vetor viral (Ad26.COV2.S, Janssen), cerca de 30 dias depois do estímulo. Resultados semelhantes foram relatados por Rossi et al⁴, ao comparar os níveis de anticorpos entre indivíduos naturalmente infectados e aqueles vacinados com outra vacina empregando vetor viral (AZD1222, Astrazeneca), enquanto as vacinas baseadas em mRNA induziram níveis mais elevados de anticorpos².

Embora todos os participantes tenham recebido imunização prévia com vírus inativado (Coronovac) e reforço com vacina baseada em mRNA (BNT162b2; Pfizer-BioNTech), os níveis de anticorpos produzidos frente a esta última caem drasticamente após 6 meses de imunização⁵. Assim, acreditamos que os dados apresentados reflitam o último estímulo recebido: infecção natural ou reforço adicional com vacina de vetor viral.

Além da resposta imune humoral representada pela produção de anticorpos, o conjunto de citocinas produzido em resposta ao SARS-CoV-2 apresenta grande relevância para o desfecho da infecção. Nossos resultados demonstraram que o perfil de citocinas pro-inflamatórias (TNF e IL-6) induzido em culturas de PBMC estimuladas com o coronavírus inativado, foi semelhante entre indivíduos que receberam o reforço vacinal e aqueles que tiveram a infecção pelo SARS-CoV-2. No entanto, observamos aumento de IL-1 β apenas no grupo que recebeu o reforço vacinal (IV). Olajide et al⁶ também verificaram produção elevada de TNF, IL-6, IL-1 β e IL-8 em culturas PBMCs de indivíduos saudáveis não vacinados estimuladas com antígenos do SARS-CoV-2. No mesmo sentido, Vespa et al² relataram níveis semelhantes de linfócitos T CD4⁺ produzindo TNF entre indivíduos naturalmente infectados pelo coronavírus e aqueles imunizados com a vacina, baseada em vetor viral (Ad26.COV2.S, Janssen).

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória considerada um marcador da gravidade da doença, pois contribui de maneira ativa para a gravidade do quadro inflamatório⁷. Nossos dados, entretanto, não apontam níveis elevados desta citocina nas culturas estimuladas com o SARS-CoV-2, fato que pode estar relacionado ao modelo empregado, incluindo o antígeno usado (vírus inativado) e o curto período de incubação (24 horas). Vale ressaltar, entretanto, que essa citocina foi a única que apresentou níveis maiores no grupo IH, sugerindo que a infecção natural pelo vírus pode estimular sua produção, fato que não ocorreria na IV e poderia contribuir na proteção contra danos inflamatórios.

Com um papel regulador, a IL-10 confere proteção frente a quadros inflamatórios. No contexto do COVID-19, esta citocina é encontrada em níveis aumentados em conjunto com outras citocinas inflamatórias como a IL-4, IL-7, IL-18, IFN- γ e TNF⁸. A menor produção desta citocina nas culturas do grupo IH estimuladas com antígenos do SARS-CoV-2 sugere que a resposta ao vírus é mediada principalmente por citocinas pró-inflamatórias, e a produção da IL-10 pode até ser inibida. No grupo IV, por outro lado, não houve inibição da produção desta citocina, sugerindo um melhor prognóstico para estes indivíduos.

Em conjunto, os dados obtidos no presente estudo apontam semelhança nas respostas imunes mediadas por anticorpos e citocinas entre os grupos IV e IH, sugerindo que a aplicação de doses de reforço aos esquemas vacinais heterólogos é capaz de mimetizar a proteção conferida pela infecção natural em indivíduos vacinados.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

FINANCIAMENTO

Não declarado pelos autores.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem Andressa de Deus Souza, Rejane Rojas Lozano Cortezini e Marcia Regina Garcia Miras Bosco, pelo suporte laboratorial ao projeto.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Júlia Bombini Faustini: convite aos participantes do estudo, execução das análises laboratoriais, interpretação de resultados, preparo do manuscrito. Ana Paula Campanelli e Thais Fernanda de Campos Fraga da Silva: concepção do estudo, execução das análises laboratoriais, interpretação de resultados, revisão do manuscrito. Vânia Nieto Brito de Souza: concepção do estudo, supervisão das análises laboratoriais, interpretação de resultados, revisão crítica do manuscrito. Todos os autores aprovaram a versão final do manuscrito.

NOTA DE APRESENTAÇÃO

Os resultados deste manuscrito integram o Trabalho de Conclusão do curso de Pós-Graduação de Júlia Bombini Faustini, intitulado “Resposta imune celular e humoral contra o SARS-CoV-2: comparação entre imunidade vacinal e mista”, apresentado no ano de 2022, no Instituto Lauro de Souza Lima/Bauru através do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS (CEFOR).

REFERÊNCIAS

1. Fiolet H, Kherabi Y, MacDonald CJ, Ghosn J, Peiffer-Smadja N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clinical Microbiology and Infection*. 2022;28(2):202-221.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.10.005>
2. Vespa S, Simeone P, Catitti G, Buca D, Bellis D, Pierdomenico L et al. SARS-CoV-2 and immunity: natural infection compared with vaccination. *Int J Mol Sci*. 2022;23:8982.
<https://doi.org/10.3390/ijms23168982>

3. Hodgson SH, Mansatta K, Mallett G, Harris V, Emary KRW, Pollard AJ. What defines an efficacious COVID-19 vaccine? A review of the challenges assessing the clinical efficacy of vaccines against SARS-CoV-2. *Lancet Infect Dis*. 2021;21(2):e26-e35.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30773-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30773-8)
4. Rossi C, Lanuti P, Cicalini I, Bellis D, Pierdomenico L, Boccio P et al. BNT162b2 mRNA vaccination leads to long-term protection from COVID-19 disease. *Vaccines*. 2021;9:1164.
<https://doi.org/10.3390/vaccines9101164>
5. Levin EG, Lustig Y, Cohen C, Fluss R, Indenbaum V, Amit S et al. Waning immune humoral response to BNT162b2 Covid-19 vaccine over 6 months. *N Engl J Med*. 2021;385(24):e84.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2114583>
6. Olajide OA, Iwuanyanwu VU, Adegbola OD, Al-Hindawi AA. SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1 induces neuroinflammation in BV-2 microglia. *Mol Neurobiol*. 2022;59(1):445-58.
<https://doi.org/10.1007/s12035-021-02593-6>
7. Wu X, Xia T, Shin WJ, Yu KM, Jung W, Herrmann A et al. Viral mimicry of Interleukin-17A by SARS-CoV-2 ORF8. *mBio*. 2022;13(2):e00402-22.
<https://doi.org/10.1128/mbio.00402-22>
8. Udomsinprasert W, Jittikoon J, Sangroongruangsri S, Chaikledkaew U. Circulating levels of Interleukin-6 and Interleukin-10, but not tumor necrosis factor-alpha, as potential biomarkers of severity and mortality for COVID-19: systematic review with meta-Analysis. *J Clin Immunol*. 2020;41:11-22.
<https://doi.org/10.1007/s10875-020-00899-z>