



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
CURSO BIOMEDICINA

CAROLINA QUEIROZ DE ARAUJO

**AVALIAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T DE MEMÓRIA
ESPECÍFICOS PARA VARIANTES DO SARS-CoV-2 EM INDIVÍDUOS
VACINADOS COM DOSE DE REFORÇO**

SALVADOR – BA

2024

CAROLINA QUEIROZ DE ARAUJO

**AVALIAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T DE MEMÓRIA
ESPECÍFICOS PARA VARIANTES DO SARS-CoV-2 EM INDIVÍDUOS
VACINADOS COM DOSE DE REFORÇO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Profa. Dra. Luana Leandro Gois

SALVADOR – BA

2024

CAROLINA QUEIROZ DE ARAUJO

**AVALIAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T DE MEMÓRIA
ESPECÍFICOS PARA VARIANTES DO SARS-CoV-2 EM INDIVÍDUOS
VACINADOS COM DOSE DE REFORÇO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina e aprovada em sua forma final pelo Curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Salvador, 1 de novembro de 2024.

Profª. Dra. Luana Leandro Gois
Universidade Federal da Bahia

Profª. Dra. Sara Nunes de Oliveira Araujo
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Prof. Ms. Carlos Augusto Oliveira Júnior
Universidade Federal da Bahia

Dedico o presente trabalho ao Senhor, Deus da minha vida, “Pois tu formaste o meu interior, tu me teceste no ventre de minha mãe. Graças te dou, visto que de modo assombrosamente maravilhoso me formaste; as tuas obras são admiráveis, e a minha alma o sabe muito bem.”Sl 139:13-16

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Senhor, por me sustentar todos os dias, enquanto não sou digna de nada, Ele me constrange a cada dia com bênçãos e misericórdia.

Agradeço aos meus pais, por me proporcionarem o estudo, mas acima de tudo o amor, o cuidado e o apoio. Assim espero poder fazer o mesmo, cuidando até seus últimos dias.

Agradeço a minhas irmãs, por crescerem junto comigo, por estarem sempre para mim, por poder ser parte de sua família.

Agradeço aos meus amigos, que são mais que família, por me acolherem sempre, cuidarem de mim e por caminharem comigo nessa estrada peregrina.

Agradeço a equipe pelo apoio e encorajamento, pelo trabalho de excelência, por serem inspiração de compromisso com a ciência.

“Por isso não tema, pois estou com você; não tenha medo, pois sou o seu Deus. Eu o fortalecerei e o ajudarei; Eu o segurarei com a minha mão direita vitoriosa.”

Isaiás 41:10

RESUMO

Tendo em vista a diminuição de anticorpos período após vacinação e o importante papel dos linfócitos T na infecção viral, este estudo visa caracterizar o perfil fenotípico e funcional de linfócitos T de memória entre indivíduos vacinados com diferentes esquemas vacinais contra COVID-19. O estudo incluiu 18 profissionais de saúde que receberam CoronaVac (n=11) ou ChAdOx1 (n=7) como esquema primário e BNT-162b2 como dose de reforço. As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) dos voluntários foram adquiridas e cultivadas sob estimulação de peptídeos da proteína spike da sequência original do SARS-CoV-2 (Wuhan) e das variantes P.1 (Gama) e B.1.1.529 (Ômicron) por 18h a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, as PBMCs foram marcadas com anticorpos (CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD27, CCR7, IFN- γ , TNF- α) e adquiridas com um citômetro de fluxo (Fortessa-BD). Os dados foram analisados usando o *software* FlowJo. Após reforço vacinal, linfócitos T CD4⁺ de memória apresentavam principalmente um fenótipo de célula de memória efetora (TEM), memória altamente específica (TEMRA) e memória transicional (TTM), assim como os linfócitos T CD8⁺ eram principalmente da população naiva (TN), TEM, TEMRA e TTM. A maior parte das células de memória eram produtoras exclusivamente de IFN- γ ou TNF- α . O grupo ChAdOx1+BNT162b2 teve uma maior frequência de linfócitos totais em resposta a sequência original de Wuhan (46,2%; IQR 43,1-53,3%) quando comparado ao grupo CoronaVac+BNT162b2 (36,6%; IQR 30,9-39,9%) (p<0,05). Porém, o grupo CoronaVac+BNT162b2 teve maior proporção de linfócitos T CD4⁺ TTM produtores de IFN- γ resposta a variante Gama (0,3%; IQR 0,2-0,9%) comparado ao grupo ChAdOx1+BNT162b2 (0,08%; IQR 0,04-0,1%) (p<0,05). Em conclusão, foi possível observar que as vacinas induzem diferenciação de células T com perfil de memória, produtoras IFN- γ ou TNF- α , em resposta aos peptídeos de spike da sequência original e das variantes Gama e Ômicron.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; Vacinação; Linfócitos T

ABSTRACT

Considering the decrease in antibodies over time after vaccination and the important role of T lymphocytes in viral infection, this study aims to compare the phenotypic and functional profile of memory T lymphocytes among individuals vaccinated with different COVID-19 vaccination regimens. The study included 18 healthcare professionals who received CoronaVac (n=11) or ChAdOx1 (n=7) as the primary regimen and BNT-162b2 as a booster dose. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from the volunteers were acquired and cultured under stimulation with peptides from the spike protein of the original SARS-CoV-2 sequence (Wuhan) and the P.1 (Gamma) and B.1.1.529 (Omicron) variants for 18 hours at 37°C with 5% CO₂. Subsequently, the PBMCs were labeled with antibodies (CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD27, CCR7, IFN- γ , TNF- α) and acquired using a flow cytometer (Fortessa-BD). Data were analyzed using FlowJo software. After booster vaccination, memory CD4⁺ T lymphocytes mainly exhibited an effector memory (TEM), highly specific memory (TEMRA), and transitional memory (TTM) phenotype, while CD8⁺ T lymphocytes were primarily from the naive (TN), TEM, TEMRA, and TTM populations. Most memory cells produced IFN- γ or TNF- α . The ChAdOx1+BNT162b2 group had a higher frequency of total lymphocytes in response to the original Wuhan sequence (46.2%; IQR 43.1-53.3%) compared to CoronaVac+BNT162b2 (36.6%; IQR 30.9-39.9%) ($p < 0.05$). However, the CoronaVac+BNT162b2 group had a higher proportion of CD4⁺ TTM IFN- γ ⁺ TNF- α ⁻ T lymphocytes in response to Gamma (0.3%; IQR 0.2-0.9%) compared to ChAdOx1+BNT162b2 (0.08%; IQR 0.04-0.1%) ($p < 0.05$). In conclusion, it was observed that vaccines induce IFN- γ or TNF- α production by memory cells in response to spike peptides from the original sequence and the Gamma and Omicron variants.

Keywords: SARS-CoV-2; Vaccination; T Lymphocytes.

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	10
2	PROPOSTA DE SUBMISSÃO.....	30
2.1	REVISTA.....	30
2.2	REGRAS DE SUBMISSÃO.....	30

Avaliação das subpopulações de linfócitos T de memória específicos para variantes do SARS-CoV-2 em indivíduos vacinados com dose de reforço

Carolina Queiroz de Araujo^{II}, Victória Cruz Paraná^I, Greice Carolina Santos da Silva^I, Giovanna Abreu Marques de Jesus^{II}, Mariana Queiroz^{III}, Alessandro Sette^{IV}, Alba Grifoni^{IV}, Raimundo Coutinho^{I,II}, Maria Fernanda Rios Grassi^{I,II}, Luana Lenadro Gois^{I,III}.

^I Instituto Gonçalo Moniz (IGM), FioCruz/BA, Salvador, Bahia.

^{II} Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia.

^{III} Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador BA, Brasil.

^{IV} La Jolla Institute, San-Diego (EUA).

RESUMO

OBJETIVO: Descrever o perfil fenotípico e funcional de linfócitos T de memória específicos para os peptídeos da proteína S do SARS-CoV-2 e suas variantes entre indivíduos com diferentes esquemas vacinais contra COVID 19 após dose de reforço.

MÉTODOS: O estudo incluiu 18 profissionais de saúde que receberam CoronaVac (n=11) ou ChAdOx1 (n=7) como esquema primário e BNT-162b2 como dose de reforço. As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) dos voluntários foram adquiridas e cultivadas sob estimulação de peptídeos da proteína spike da sequência original do SARS-CoV-2 (Wuhan) e das variantes P.1 (Gama) e B.1.1.529 (Ômicron) por 18h a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, as PBMCs foram marcadas com anticorpos (CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD27, CCR7, IFN-g, TNF-α) e adquiridas com um citômetro de fluxo (Fortessa-BD). Os dados foram analisados usando o *software* FlowJo.

RESULTADOS: Após reforço vacinal, linfócitos T CD4⁺ de memória apresentavam principalmente um fenótipo de célula de memória efetora (TEM), memória altamente específica (TEMRA) e memória transicional (TTM), assim como os linfócitos T CD8⁺ eram principalmente da população naive (TN), TEM, TEMRA e TTM. A maior parte das células de memória eram produtoras exclusivamente

Correspondência:

FioCruz-IGM
R. Waldemar Falcão, 121 – Cadeal,
Salvador – BA, 40296-710

- 1- Instituto Gonçalo Moniz (IGM), FioCruz/BA, Salvador, Bahia
- 2- Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia
- 3- Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia
- 4- La Jolla Institute, San-Diego (EUA)

de IFN- γ ou TNF- α . O grupo ChAdOx1+BNT162b2 teve uma maior frequência de linfócitos totais em resposta a sequência original de Wuhan (46,2%; IQR 43,1-53,3%) quando comparado ao grupo CoronaVac+BNT162b2 (36,6%; IQR 30,9-39,9%) ($p < 0,05$). Porém, o grupo CoronaVac+BNT162b2 teve maior proporção de linfócitos T CD4+ TTM produtores de IFN- γ resposta a variante Gama (0,3%; IQR 0,2-0,9%) comparado ao grupo ChAdOx1+BNT162b2 (0,08%; IQR 0,04-0,1%) ($p < 0,05$).

CONCLUSÃO: Foi possível observar que as vacinas induzem diferenciação de células T com perfil de memória, produtoras IFN- γ ou TNF- α , em resposta aos peptídeos de spike da sequência original e variantes Gama e Ômicron.

DESCRITORES: SARS-CoV-2; Linfócitos T; Vacinação.



INTRODUÇÃO

O coronavírus da síndrome aguda respiratória-2 (SARS-CoV-2) é um vírus envelopado de RNA de fita simples e sentido único¹. Este vírus é o agente etiológico da doença por coronavírus 2019 (COVID-19), que teve um grande impacto na saúde da população mundial após seu aparecimento em dezembro de 2019. Devido a sua alta taxa de transmissão, em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 como pandemia, iniciando a busca pela imunização².

Ao passo que o vírus se disseminava no Brasil, novas variantes eram notificadas juntamente com o surgimento das ondas epidêmicas. Em 2020, praticamente não houve testes para a identificação das linhagens, período no qual é identificada, em escala muito pequena, a variante Alfa; já na segunda onda, a variante predominante foi a Gama e, na sequência, a Ômicron e suas subvariantes³. Estas variantes, por sua repercussão são denominadas “variantes de preocupação” e se dão a partir de mutações em proteínas estruturais do vírus, principalmente na proteína Spike, pois é o sítio de ligação do vírus com as células do hospedeiro⁴. Dessa forma, esta proteína é o principal alvo para o desenvolvimento das vacinas⁵, a fim de estimular a produção de anticorpos neutralizantes capazes de bloquear a infecção e gerar linfócitos T de memória, desta forma diminuindo as hospitalizações e óbitos pela doença. No Brasil, a partir de 2021 diferentes plataformas vacinais foram disponibilizadas para imunização da população, estas foram: 1) vacina de vírus inativado (CoronaVac); 2) vacina de vetor viral de adenovírus carreando DNA do SARS-CoV-2 (ChAdOx1 nCoV-19); e 3) vacina de RNA (BNT162b2)^{6,7,8}.

As vacinas de vírus inativado e aquelas que codificam o vírus possuem elevada eficácia contra o vírus da COVID-19 e induzem boa resposta de anticorpos neutralizantes^{6,9}. No entanto, esta resposta sofre diminuição ao longo do tempo devido à redução nos títulos de anticorpos e escape viral induzido pelas mutações⁹. Enquanto anticorpos neutralizantes atuam com papel dominante na prevenção da infecção, a resposta celular possui potencial atividade moduladora na infecção¹⁰. A resposta celular é mediada por linfócitos T CD4+ e T CD8+. Células T CD4+ são frequentemente consideradas como as maiores produtoras

de citocinas¹¹, e células T CD8+ possuem papel efetivo no controle da infecção por seu caráter citotóxico contra células infectadas, além de capacidade de diferenciação para produção de citocina tipo Tc1 (IFN- γ e TNF- α)¹². A fim de eliminar e controlar a infecção viral, estas células secretam citocinas inflamatórias (IFN- γ e TNF- α), capazes de estimular e regular a resposta antiviral^{13,14}. Além da resposta efetora, a resposta imune de memória é crucial para garantir proteção à longo prazo, especialmente contra reinfecções. Entre as células de memória identifica-se algumas subpopulações, entre as quais são células T de memória central (TCM), memória altamente específica (TEMRA), memória transicional (TTM) e memória efetora (TEM). Estas células são caracterizadas pela sua capacidade de auto renovação, permanecem em tecidos linfoides e não linfoides aguardando uma nova exposição ao antígeno específico, e possuem memória de funções efetoras pós encontro com molécula antigênica¹². A diferenciação em células de memória depende de alguns fatores como duração da estimulação e presença de citocinas¹⁵.

Pouco tem sido descrito acerca dos linfócitos T de memória específicos contra o SARS-CoV-2 induzidos pela imunização. Sendo assim, o estudo visa descrever o perfil fenotípico e funcional de linfócitos T de memória específicos entre indivíduos vacinados com diferentes esquemas vacinais contra COVID 19 após dose de reforço. Dessa forma, este trabalho pode contribuir com a elucidação sobre características das subpopulações de linfócitos T de memória gerados por doses de reforço heterólogas em resposta a variantes do SARS-CoV-2.

MÉTODOS

Seleção de Voluntários

Trata-se de um estudo descritivo, de corte transversal com grupos comparativos, aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Gonçalo Moniz (IGM/FIOCRUZ).

A população do estudo é composta por indivíduos não infectados, saudáveis, vacinados contra o SARS-CoV-2. Foram incluídos 18 indivíduos, divididos em dois grupos de acordo com a plataforma do esquema vacinal primário: a) vírus inativados (CORONAVAC), b) vetor viral (ChAdOx1 nCoV-19). Todos os 18 indivíduos foram vacinados com uma dose de reforço da plataforma vacinal de RNA (BNT162b2). Os voluntários foram selecionados em busca ativa entre profissionais de saúde contatados através de redes sociais em maio de 2022. São indivíduos maiores de 18 anos, de ambos os sexos. As amostras foram coletadas após 5 meses da aplicação do 1º reforço vacinal. Foram excluídos indivíduos com infecção aguda, infectados por HIV, HTLV, hepatites B e C.

Coleta de Amostras Biológicas

Para todos os indivíduos foi preenchida uma ficha clínica contendo dados demográficos (idade, sexo e procedência) e história médica pregressa. Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas por gradiente de Ficoll e criopreservadas em nitrogênio líquido até o momento das análises. As PBMCs foram descongeladas para avaliação do perfil fenotípico e funcional dos linfócitos de memória específicos da resposta imune celular.

Peptídeos de SARS-CoV-2

Pools de peptídeos das variantes do SARS-CoV-2 foram utilizados para estimular as PBMCs e investigar a resposta celular específica. Os peptídeos testados foram: sequência original isolada em Wuhan (1ug/ml), e variantes P.1 (Gama) (1ug/ml) e B.1.1.529 (Ômicron) (1ug/ml). Estes foram produzidos e cedidos em colaboração

pela equipe do Prof. Alessandro Sette do Center for Infectious Disease and Vaccine Research La Jolla Institute for Immunology, EUA.

Caracterização Fenotípica e Funcional

Subpopulações de células T memória foram analisadas por citometria de fluxo. As PBMCs foram descongeladas e cultivadas na presença de peptídeos de SARS-CoV-2, fitohemaglutinina (10mg/mL) ou apenas meio por 18 horas, à 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, as PBMCs foram lavadas e marcadas com anticorpos monoclonais para determinar o fenótipo e função destas células. Foram usados anticorpos monoclonais para os seguintes marcadores: anti-CD3-APC-Cy7 (Bio Legend®, San Diego, EUA), anti-CD4-ALEXA-700 (Invitrogen®, Waltham, EUA), anti-CD8-FITC (Becton Dickinson®, Franklin Lakes, EUA), anti-CD45RA-PE-Cy5 (Invitrogen®, Waltham, EUA), anti-CD27-BV510/PE-CF594 (Becton Dickinson®, Franklin Lakes, EUA), anti-CCR7-PE-Cy7 (Becton Dickinson®, Franklin Lakes, EUA), IFN- γ -PE (Becton Dickinson®, Franklin Lakes, EUA), TNF- α -APC (Becton Dickinson®, Franklin Lakes, EUA) e *LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain* (Thermo Fisher®, Waltham, EUA). As aquisições foram feitas em citômetro de fluxo (BD FACS RSFortessa™, San Jose, CA, EUA) e analisados pelo Software FlowJo (Tree Star). Para avaliação das amostras adquiridas, a seguinte estratégia de *gate* foi realizada: 1) Delimitação das *Single Cells*; 2) Identificação das células vivas, utilizando o marcador de morte celular *LIVE/DEAD*; 3) A partir das células vivas, foi estabelecida população de linfócitos utilizando os parâmetros de tamanho e granulosidade; 4) Nesta população de linfócitos, utilizando os marcadores extra-celulares anti-CD3 e anti-CD8 foi identificada população de linfócitos T CD8+, o mesmo foi aplicado para identificação de linfócitos T CD4+ utilizando os marcadores anti-CD3 e anti-CD4; 5) Em cada população, linfócitos totais, T CD4+ e T CD8+, subpopulações foram definidas primeiramente marcando as células com anticorpos mononucleares anti-CD27 e anti-CD45RA; 6) Posteriormente, utilizando um terceiro marcador extra-celular, anti-CCR7, as subpopulações de linfócitos T naive (TN) (CD27+, CD45RA+ e CCR7+), T de memória central (TCM) (CD27+, CD45RA- e CCR7+), T de memória efetoras (TEM) (CD27-, CD45RA- e CCR7-), T de memória efetoras terminalmente

diferenciadas (TEMRA) (CD27-, CD45RA+ e CCR7-) e T de memória transicional (TTM) (CD27+, CD45RA- e CCR7-) foram identificadas; 7) A fim de avaliar o perfil funcional nas populações de linfócitos totais, T CD4+, T CD8+ e subpopulações de memória, os marcadores intra-celulares IFN- γ e TNF- α foram utilizados para identificar as células mono-produtoras (IFN- γ +TNF- α - ou IFN- γ -TNF- α +), duplo-produtoras (IFN- γ +TNF- α +) ou não produtoras (IFN- γ -TNF- α -).

Considerações Éticas

O projeto é aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), sob número CAAE 4.244.483, do IGM/Fiocruz. No momento da inclusão dos voluntários, a equipe do projeto descreve o estudo em detalhes, incluindo os riscos e benefícios. Se os indivíduos compreenderam e consentiram em participar do estudo foi pedido que eles leiam e assinem o TCLE, no qual constam os telefones do pesquisador e do CEP envolvidos.

Análise de dados

Os dados obtidos foram tabulados no *Research Electronic Data Capture* (RedCap). As análises estatísticas e confecção dos gráficos foram realizadas através do software GraphPad Prism versão 9.4 (GraphPad Inc., San Diego, CA). Diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando p-valor for < 0,05. As características sociodemográficas e clínicas, assim como as porcentagens das subpopulações de memória dos linfócitos T CD4+ e CD8+ e seu perfil funcional foram descritas através de distribuição de frequências, mediana e medidas de dispersão e foram apresentadas em tabelas e gráficos. Foram conduzidas análises estatísticas utilizando o teste exato de Fisher ou qui-quadrado para avaliar a presença de diferenças entre os grupos estudados, especialmente no que diz respeito as características sociodemográficas e clínicas. O teste de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov foram aplicados para determinar se as variáveis apresentam distribuição normal ou não normal. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os testes ANOVA (dados paramétricos), Kruskal-Wallis (dados não paramétricos), seguido pelo pós-teste de Dunn's Multiple Comparison, além dos testes teste T pareado (dados

paramétricos) ou Mann-Whitney (dados não paramétricos). Para calcular as proporções da produção das citocinas em linfócitos totais, T CD4+, T CD8+ e suas subpopulações, o cálculo foi realizado somando a frequência de células mono-produtoras ou duplo-produtoras para IFN- γ e TNF- α , este resultado foi considerado como 100% e assim foi feito o cálculo para identificar a proporção de IFN- γ - TNF- α +, IFN- γ + TNF- α - ou IFN- γ - TNF- α + nesse total.

RESULTADOS

Características sociodemográficas e clínicas da população do estudo

O grupo do esquema primário CoronaVac + 1^o reforço BNT162b2 foi composto por onze indivíduos e o grupo de esquema primário ChAdOx1 + 1^o reforço BNT162b2 de sete indivíduos. Os participantes possuem em média 63±4,5 anos, maioria do sexo feminino (67%) e cor de pele branca (55%). Ainda, maior parte não possui histórico prévio de COVID-19 (61%), porém o grupo Coronavac + BNT162b2 teve mais indivíduos que referiram infecção prévia quando comparado ao grupo ChAdOx1 + BNT162b2 ($p = 0,01$). Além disso, indivíduos vacinados com Coronavac + BNT162b2 tiveram intervalo maior entre a vacina e a inclusão no estudo ($p = 0,008$) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Dados sociodemográficos e clínicos dos participantes (n = 18)

Variáveis	Total (n = 18)	Esquema primário CoronaVac + 1o reforço BNT162b2 (n = 11)	Esquema primário ChAdOx1 + 1o reforço BNT162b2 (n = 7)	p valor
# Idade (média)	63 ± 4,5	64 ± 5,2	62 ± 3,0	ns
^^ Sexo (n, %)				ns
Feminino	12 (67%)	7 (64%)	5 (71%)	
Masculino	6 (33%)	4 (36%)	2 (29%)	
^^ Cor de pele (n, %)				ns
Preto	1 (6%)	1 (9%)	-	
Pardo	7 (39%)	4 (36%)	3 (43%)	
Branco	10 (55%)	6 (54%)	4 (57%)	
^^ COVID-19 (n, %)				*p = 0,01
Sim	7 (39%)	5 (46%)	2 (29%)	
Não	11 (61%)	6 (54%)	5 (71%)	
Incerto	-	-	-	
# Intervalo pós-vacinação (média em semanas)	31 (20 - 37)	32 (28 - 37)	28 (20 - 34)	**p = 0,008

^^ Chi-square; #Mann whitney test

Dados apresentados em números absolutos e frequências (%)

ns: não significante

Avaliação do perfil fenotípico da resposta celular dos vacinados

A fim de avaliar o perfil fenotípico de linfócitos T dos indivíduos vacinados com o 1º reforço da vacina contra o SARS-CoV-2, foram caracterizados os linfócitos totais, linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+, bem como as subpopulações. A análise foi realizada comparando a frequência de células das culturas estimuladas com peptídeos de SARS-CoV-2 com a frequência de células da cultura sem estímulo (controle negativo) (**Tabela 2**). A partir disso, foi possível observar que a resposta das células T ao estímulo da sequência original isolada em Wuhan e das variantes Gama e Ômicron é semelhante após a aplicação da 1ª dose de reforço, em que existe maior frequência de subpopulações de memória efetora (TEM) e memória transicional (TTM), além de menor incidência de linfócitos T de memória transicional (TCM) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Resultados da avaliação do perfil fenotípico e funcional da resposta celular nos vacinados com o 1º reforço vacinal comparando os estímulos ao controle negativo (n = 18)

Variável	1º reforço				p valor
	Controle Negativo	Wuhan	Gama	Ômicron	
Linfócitos (%)	40.60 (34.38-50.10)	39.50 (34.35-47.78)	42.65 (36.98-48.45)	42.85 (35.43-46.85)	ns
T CD4+ (% linfócitos)	44.75 (29.50-55.78)	44.85 (28.95-56.70)	44.40 (27.95-59.00)	45.20 (32.10-55.90)	ns
TN (% T CD4)	02.10 (00.47-03.82)	02.03 (00.98-03.19)	02.18 (01.13-03.07)	01.64 (00.99-02.52)	ns
TEM (% TCD4)	17.40 (12.88-24.63)	18.15 (12.80-27.43)	18.10 (13.50-24.25)	18.40 (12.90-25.73)	ns
TEMRA (% TCD4)	05.66 (02.57-12.29)	05.45 (02.98-11.80)	06.21 (02.38-15.33)	06.86 (02.33-14.43)	ns
TCM (% TCD4)	00.98 (00.51-03.89)	01.57 (00.52-03.78)	01.45 (00.56-04.57)	01.57 (00.51-03.56)	ns
TTM (% TCD4)	25.95 (14.75-30.55)	27.50 (17.48-35.28)	26.90 (18.68-36.20)	25.25 (10.65-34.33)	ns
T CD8+ (% linfócitos)	13.45 (10.25-17.85)	13.25 (10.55-17.93)	13.75 (12.15-17.48)	13.10 (10.15-17.35)	ns
TN (% T CD8)	02.35 (00.47-14.05)	03.52 (01.88-16.80)	02.89 (00.80-14.11)	01.63 (00.92-12.85)	ns
TEM (% TCD8)	16.70 (13.05-24.55)	17.70 (12.85-22.10)	16.05 (12.80-24.70)	18.65 (15.10-22.95)	ns
TEMRA (% TCD8)	13.25 (09.78-27.88)	13.35 (09.70-24.45)	12.55 (10.30-25.13)	14.60 (09.17-26.53)	ns
TCM (% TCD8)	00.58 (00.39-01.32)	00.51 (00.20-01.07)	00.87 (00.32-01.49)	00.61 (00.21-01.46)	ns
TTM (% TCD8)	19.25 (10.19-23.85)	18.65 (09.35-25.58)	20.10 (09.38-25.48)	18.65 (09.12-25.55)	ns

Dados apresentados em valores medianos (IQR)

TN: células T naive. TEM: células de memória efetoras. TEMRA: células de memória efetoras altamente diferenciadas. TCM: células de memória central. TTM: células de memória transicional. ns: não significante

* Teste ANOVA (dados paramétricos) ou teste de Kruskal Wallis (Dados não paramétricos)

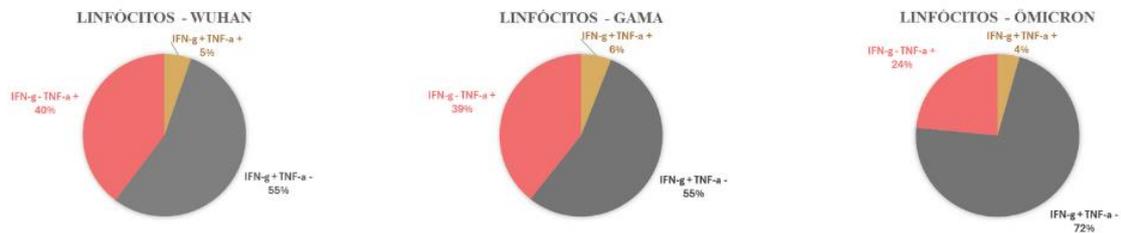
Nota: o controle negativo sem estímulo

Avaliação do perfil funcional da resposta celular dos vacinados

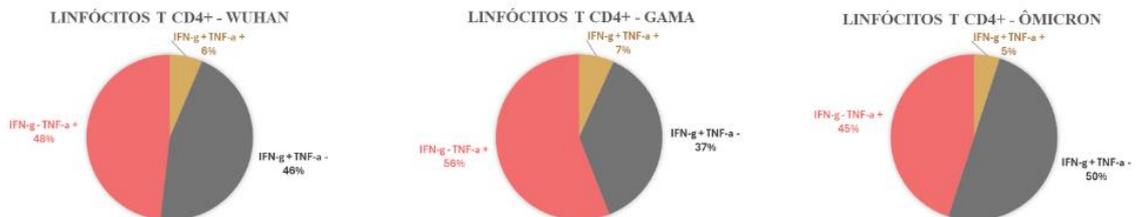
A fim de adquirir informações sobre o perfil funcional da resposta celular dos participantes, a produção de citocinas (IFN- γ e TNF- α) foi avaliada em cada uma das populações e subpopulações, podendo ser mono-produtoras ou duplo-produtoras. Analisando todos os indivíduos em conjunto, independente do esquema vacinal, observou-se uma maior proporção de células mono-produtoras

de citocinas (IFN- γ ou TNF- α) nos linfócitos totais, T CD4+ e T CD8+ (**Figura 1**). Pode-se evidenciar uma predominância de algumas citocinas a partir dos diferentes estímulos (Wuhan, Gama e Ômicron). Subpopulações de linfócitos T CD4+ TEMRA e TCM apresentaram maior proporção de células com produção de IFN- γ (**Figura 2**). Já linfócitos T CD4+ TEM e TTM apresentaram maior proporção de células com produção de TNF- α (**Figura 2**). Em relação aos linfócitos T CD8+ (**Figura 3**), as subpopulações TEM, TEMRA e TTM mostraram perfil de células produtoras de IFN- γ predominante em resposta aos estímulos Wuhan e Ômicron, enquanto em resposta à variante Gama apresentaram maior proporção de células produtoras de TNF- α . Ainda, nas células de perfil TTM foi observada uma maior frequência de células dupla-produtoras de citocinas em resposta à sequência original Wuhan (**Figura 3**). Não foi observado produção de IFN- γ e TNF- α na subpopulação TCM de linfócitos T CD8+.

A



B



C

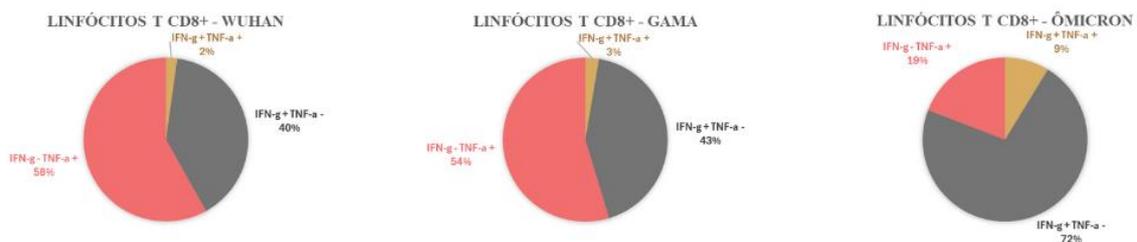
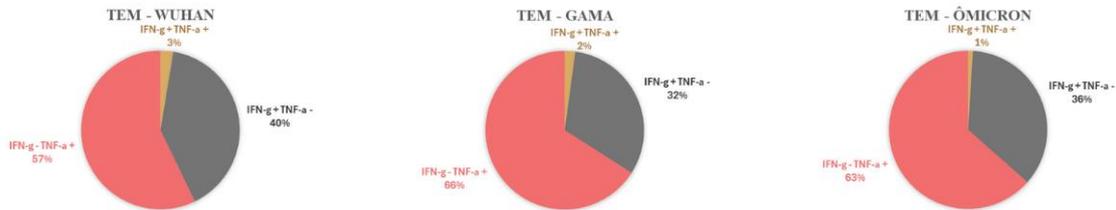
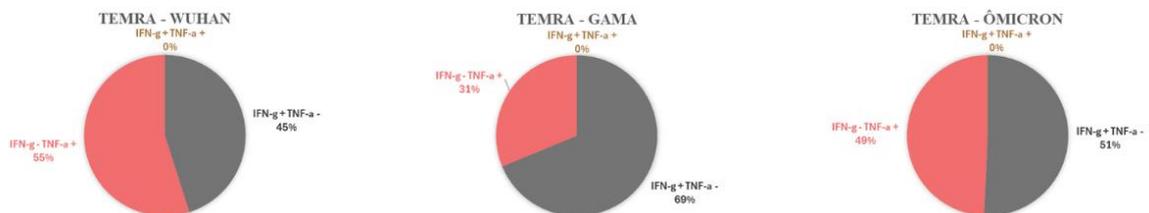


Figura 1: Frequência da produção de IFN- γ e TNF- α em linfócitos totais (A), linfócitos T CD4+ (B) e linfócitos T CD8+ (C). Resultados com base no cálculo de proporção de produção das citocinas.

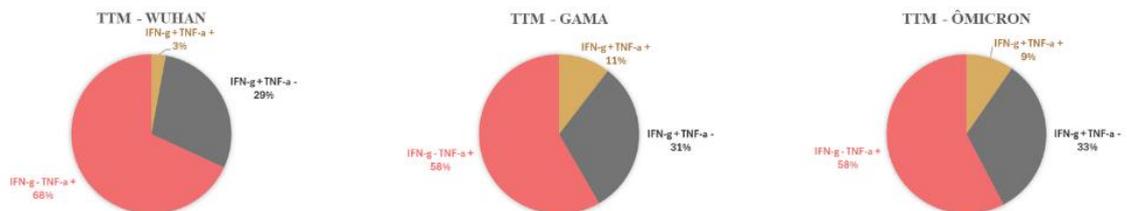
A



B



C



D

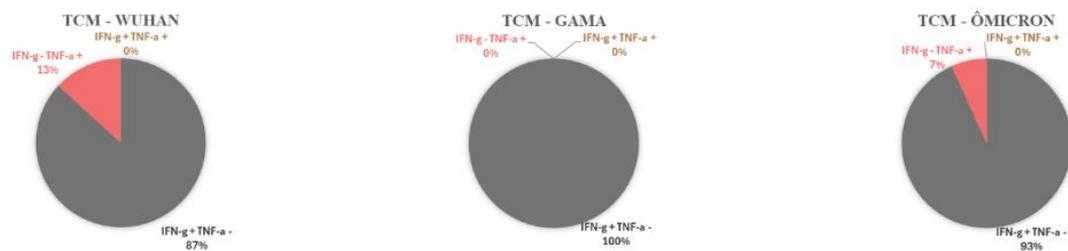


Figura 2: Frequência da produção de IFN- γ e TNF- α por subpopulações de linfócitos T CD4+. (A) TEM: T de memória efetora. (B) TEMRA: T de memória altamente específica. (C) TTM: T de memória transicional. (D) TCM: T de memória central. Resultados com base no cálculo de proporção de produção das citocinas.

A



Figura 3: Frequência da produção de IFN- γ e TNF- α por subpopulações de linfócitos T CD8+. (A) TEM: memória efetora. (B) TEMRA: memória altamente específica. (D) TTM: memória transicional. Resultados com base n cálculo de proporção de produção das citocinas.

Avaliação do perfil fenotípico e funcional da resposta celular dos vacinados comparando plataformas vacinais.

Com intuito de avaliar a resposta celular de acordo com a plataforma vacinal aplicada nos indivíduos, foi realizada uma comparação descritiva entre ambos os grupos. Foi observada maior frequência de células T CD4+ TEM no grupo ChAdOx1 + BNT162b2 em resposta aos estímulos. Também, identificamos menor proporção de linfócitos T CD8+ naive e maior frequência de subpopulações de memória em indivíduos imunizados com CoronaVac + BNT162b2 em resposta aos estímulos, quando comparado ao grupo ChAdOx1 + BNT162b2 (**Figura 4**).

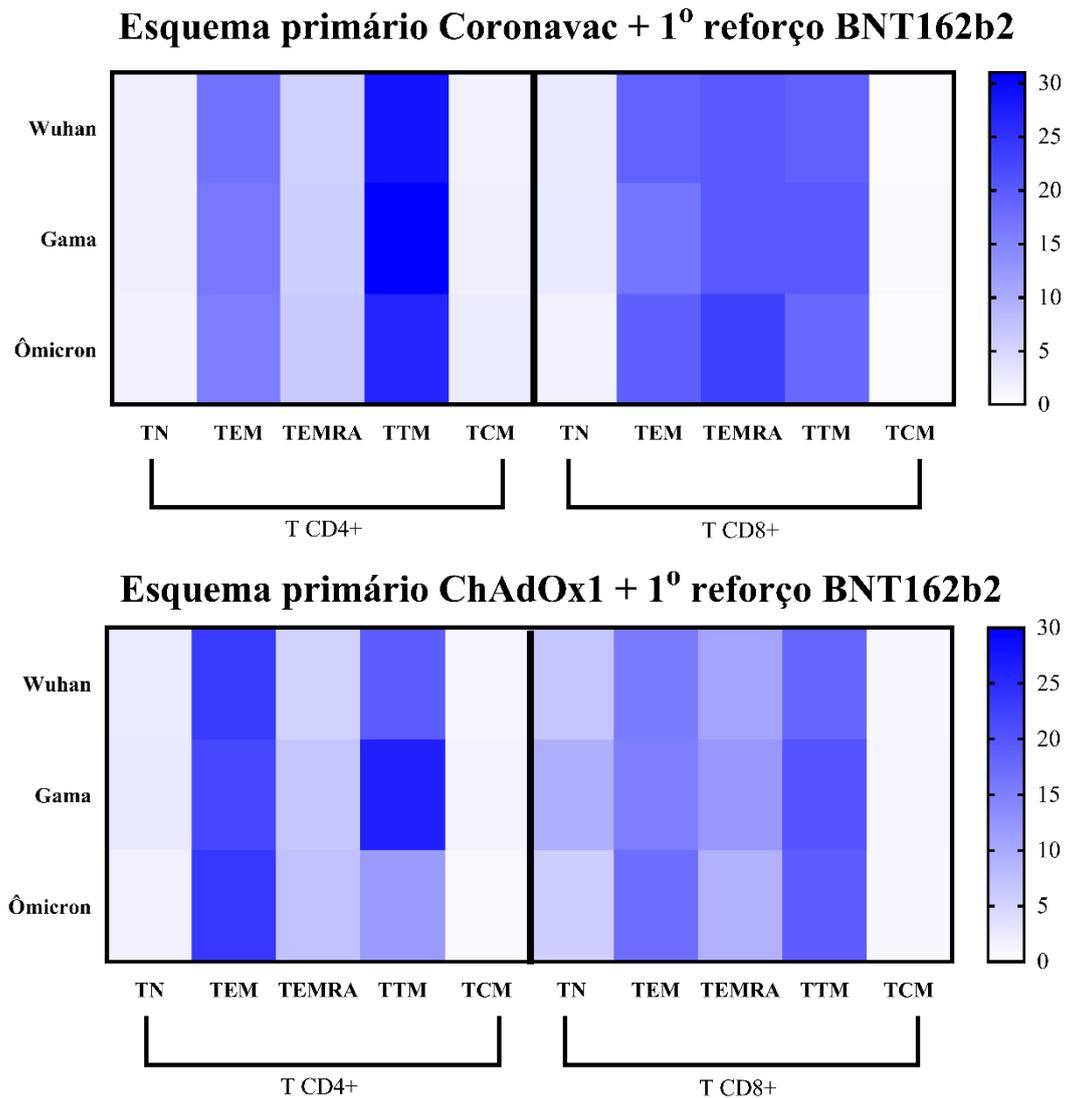


Figura 4: O *heat map* utiliza a intensidade da coloração (do branco ao azul) para representar a frequência da produção de subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+ em resposta aos estímulos nos grupos das diferentes plataformas vacinais.

Além disso, na análise quantitativa, observa-se que o grupo ChAdOx1+BNT162b2 teve uma maior frequência de linfócitos totais em resposta a sequência original de Wuhan (Mediana: 46,2%; IQR 43,1-53,3%) quando comparado a CoronaVac+BNT162b2 (Mediana: 36,6%; IQR 30,9-39,9%) ($p = 0,03$). Porém, o grupo CoronaVac+BNT162b2 teve maior proporção de linfócitos T CD4+ TTM produtores exclusivos de IFN- γ em resposta a variante Gama (Mediana: 0,3%;

IQR 0,2-0,9%) comparado ao grupo ChAdOx1+BNT162b2 (Mediana: 0,08%; IQR 0,04-0,1%) ($p = 0,01$) (**Figura 5**).

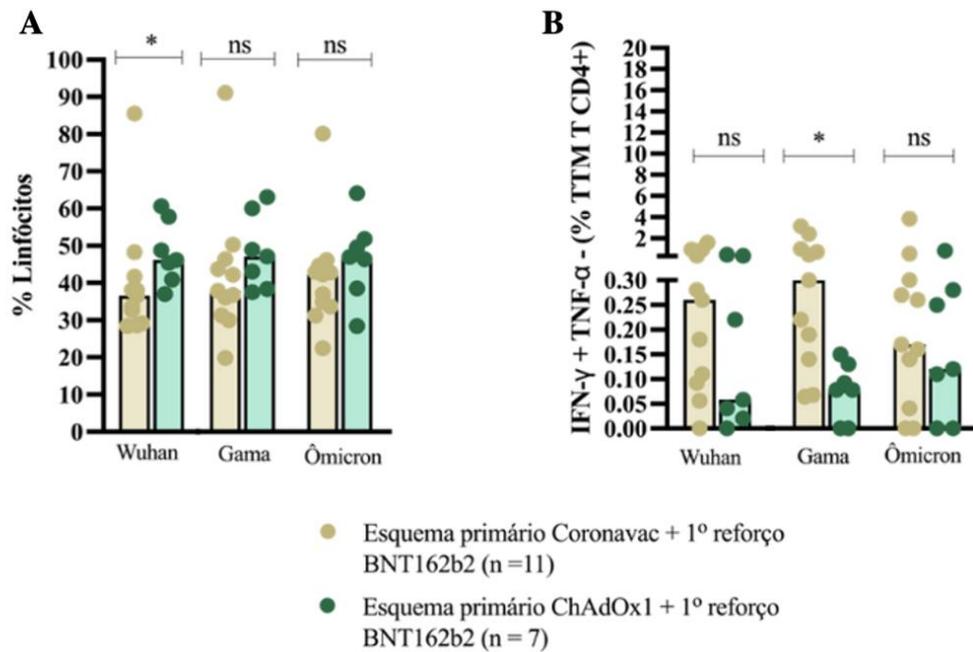


Figura 5: Frequência de linfócitos em resposta aos estímulos, comparando os grupos CoronaVac+BNT162b2 ($n = 11$) e ChAdOx1+BNT162b2 ($n = 7$), $p = 0,03$ (**A**). Frequência de linfócitos T CD4+ TTM produtores de IFN- γ em resposta aos estímulos, $p = 0,01$ (**B**). Teste de T (dados paramétricos) ou teste de Mann-Whitney (dados não paramétricos). ns: não significativa.

DISCUSSÃO

Neste estudo comparamos o perfil fenotípico e funcional de linfócitos T de memória específicos entre indivíduos vacinados com diferentes esquemas vacinais contra COVID 19 após dose de reforço. Linfócitos T específicos para o SARS-CoV-2 representam parte do sistema imune e regulam a inflamação através de citocinas efetoras (IFN- γ e TNF- α) a fim de obter uma resposta imune efetiva. Portanto, investigamos a frequência de subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+ em resposta aos estímulos: sequência original isolada em Wuhan e variantes Gama e Ômicron, assim como avaliamos a produção das citocinas IFN- γ e TNF- α por estas células. Identificamos, através da avaliação fenotípica, semelhante frequência de linfócitos T e subpopulações de memória em resposta aos três estímulos após aplicação da primeira dose de reforço. Os resultados sugerem uma conservação da resposta aos peptídeos da sequência original de SARS-CoV-2 induzida pela vacinação que é capaz de induzir respostas semelhantes as variantes Gama e Ômicron. Outros autores observaram igualmente que a resposta das células de memória não foram impactadas pelas diferentes variantes¹⁶.

Em um estudo prévio, o perfil funcional de linfócitos totais, T CD4+ e T CD8+ de indivíduos vacinados com esquema primário demonstrou produção de citocinas IFN- γ e TNF- α quando comparado o momento pré e pós-vacinação¹⁷. No presente estudo, também observou-se a produção destas citocinas pelos linfócitos T e suas subpopulações de linfócitos T CD4+ e T CD8+ em resposta aos peptídeos da sequência original e das variantes Gama e Ômicron após dose de reforço vacinal. A detecção de células produtoras de citocinas especificamente em resposta aos peptídeos das variantes possivelmente indica uma que ocorre uma conservação de epítomos reconhecidos pelas células T CD4+ nas sequências das variantes, o que conseqüentemente contribuiu para a manutenção da capacidade protetora da resposta celular de indivíduos vacinados¹⁸. De fato, Silva *et al* demonstram a conservação de epítomos e regiões imuno dominantes de linfócitos T CD8+ para

a sequência original e nas variantes Gama, Delta e Ômicron, o que favorece uma possível conservação na resposta imune celular aos diferentes estímulos¹⁹.

Não foram identificados linfócitos T CD8+ de memória central (TCM) produtores de citocinas em resposta aos peptídeos testados. A população TCM é caracterizada pela ausência do perfil efetor (CD27+), localizando-se predominantemente em tecidos linfoides e não no sangue periférico¹². Entretanto, no presente estudo, foram identificados linfócitos T CD4+ deste perfil produzindo citocinas, este fenômeno por ser explicado devido ao fato que possivelmente células T CD4+ como são especializadas na produção de citocinas, conservam esta capacidade funcional que pode ser detectada a partir de estímulos específicos *in vitro*¹¹.

O grupo CoronaVac + BNT162b2 houve maior proporção de subpopulações de memória de linfócitos T CD8+ em resposta aos estímulos testados em relação ao grupo ChAdOx1 + BNT162b2, supostamente indicando que a vacina de vírus inativado provoca aumento e diferenciação de linfócitos T CD8+ em células de memória em comparação com a vacina de vetor viral. Para o grupo ChAdOx1 + BNT162b2 apresentou-se maior frequência de linfócitos totais em resposta a sequência original isolada em Wuhan em comparação ao grupo CoronaVac + BNT162b2, isso possivelmente se dá pelo fato de que as vacinas ChAdOx1 e BNT162b2 terem sido desenvolvidas utilizando a proteína S da sequência original, levando assim a uma resposta imune de memória direcionada à esta proteína em comparação ao grupo com um esquema vacinal contendo vacina inativada, que contém outros peptídeos além da proteína S estimulando a resposta imune.

Ainda, observa-se maior frequência de linfócitos T CD4+ de memória transicional (TTM) produtores de IFN- γ no grupo CoronaVac + BNT162b2 em resposta a Gama, porém as medianas para sequência original e variante Gama nas plataformas vacinais são semelhantes, o que corrobora com trabalho realizado por Tarke et al, no qual afirma que a proteção efetiva realizada por células T de memória é similar nas diferentes plataformas vacinais utilizadas¹⁶. Ainda nesta análise, a resposta a variante Ômicron mostra semelhança na frequência de células T CD4+ nos grupos CoronaVac e ChAdOx1, possivelmente em decorrência da infecção prévia por COVID-19 alegada por indivíduos dos dois grupos no momento da variante Ômicron no país.

Este estudo possui algumas limitações, portanto deve ser considerado com cautela. O número relativamente pequeno de participantes ($n=18$) pode ter reduzido a potência estatística do estudo. A população do estudo é composta por indivíduos mais velhos (média de $63 \pm 4,3$), o que pode interferir na avaliação da resposta imune, tendo em vista a imunosenescência sofrida por idosos²⁰. Também, parte dos indivíduos alega ter tido infecção prévia pelo SARS-CoV-2, podendo influenciar na frequência de linfócitos, afinal o contato natural com patógeno gera a estimulação para desenvolvimento de uma resposta de memória²¹. Além disso, tendo em vista que a intensidade da resposta imune é maior no período mais próximo pós-vacinal, um maior intervalo pós-vacinal pode interferir na avaliação da resposta celular, que neste estudo foi maior para o grupo CoronaVac + BNT162b2. Ainda, não obtivemos coleta pré-reforço vacinal dos participantes do estudo, portanto não foi possível realizar a análise utilizando uma comparação como *baseline* para descrever um possível incremento na resposta imune após o reforço vacinal.

Em conclusão, o reforço vacinal induz uma resposta semelhante a sequência original e variantes com maior proporção de células monoproductoras de IFN- γ ou TNF- α . Além disso, vacinados com ChAdOx1 e reforço BNT162b2 apresentaram maior frequência de linfócitos T em resposta a sequência original isolada em Wuhan. Esses resultados sugerem que ambas as plataformas induzem subpopulações de memória e produção de citocinas para os diferentes estímulos testados.

REFERÊNCIAS

1. Zhou Z, Zhu Y, Chu M. Role of COVID-19 vaccines in SARS-CoV-2 variants. *Frontiers in Immunology*. 2022 May 20;13:6–7. doi:10.3389/fimmu.2022.898192
2. OMS classifica coronavírus como pandemia. Gov.br, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2020/03/oms-classifica-coronavirus-como-pandemia>. Acesso em: 23 mar 2024.
3. Moura EC, Cortez-Escalante J, Cavalcante FV, Barreto IC de HC, Sanchez MN, Santos LMP. Covid-19: evolução temporal e imunização nas três ondas epidemiológicas, Brasil, 2020–2022. *Revista de Saúde Pública*. 2022 Nov 18;56:105.
4. Scovino AM, Dahab EC, Vieira GF, Freire-de-Lima L, Freire-de-Lima CG, Morrot A. SARS-CoV-2's Variants of Concern: A Brief Characterization. *Frontiers in Immunology*. 2022 Jul 26;13. doi: 10.3389/fimmu.2022.834098.
5. Bai Z, Cao Y, Liu W, Li J. The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. *Viruses*. 2021 Jun 10;13(6):1115. doi:10.3390/v13061115.
6. Jin L, Li Z, Zhang X, Li J, Zhu F. CoronaVac: A review of efficacy, safety, and immunogenicity of the inactivated vaccine against SARS-CoV-2. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2022 Jul 25;18(6). doi: 10.1080/21645515.2022.2096970.
7. Lamb YN. BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine: First approval. *Drugs*. 2021 Mar 8;81(4):1–7. doi: 10.1007/s40265-021-01480-7.
8. Wei J, Zhang W, Doherty M, Wallace ZS, Sparks JA, Lu N, et al. Comparative effectiveness of BNT162b2 and ChAdOx1 nCoV-19 vaccines against COVID-19. *BMC medicine*. 2023 Feb 28;21(1):78. doi: 10.1186/s12916-023-02795-w.
9. Zhang Z, Mateus J, Coelho CH, Dan JM, Moderbacher CR, Gálvez RI, et al. Humoral and cellular immune memory to four COVID-19 vaccines. *Cell*. 2022 Jul;185(14):2434-2451.e17. doi: 10.1016/j.cell.2022.05.022.
10. Brandão SCS, Godoi ETAM, Ramos J de OX, Melo LMMP de, Sarinho ESC. COVID-19 grave: entenda o papel da imunidade, do endotélio e da coagulação na prática clínica. *Jornal Vasculiar Brasileiro*. 2020;19.

11. Mosmann TR, Li L, Sad S. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Seminars in Immunology*. 1997 Apr 1 [cited 2024 Apr 6];9(2):87–92.
12. Gonzalez SM, Taborda NA, Rugeles MT. Role of Different Subpopulations of CD8+ T Cells during HIV Exposure and Infection. *Frontiers in Immunology*. 2017 Aug 7;8. doi: 10.3389/fimmu.2017.00936.
13. Weiskopf D, Schmitz KS, Raadsen MP, Grifoni A, Okba NMA, Endeman H, et al. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Science Immunology*. 2020 Jun 26;5(48):eabd2071. doi: 10.1126/sciimmunol.abd2071. doi: 10.1126/sciimmunol.abd2071.
14. Montazersaheb S, Hosseiniyan Khatibi SM, Hejazi MS, Tarhriz V, Farjami A, Ghasemian Sorbeni F, et al. COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. *Virology Journal*. 2022 May 26;19(1).
15. Broadley I, Pera A, Morrow G, Davies KA, Kern F. Expansions of Cytotoxic CD4+CD28– T Cells Drive Excess Cardiovascular Mortality in Rheumatoid Arthritis and Other Chronic Inflammatory Conditions and Are Triggered by CMV Infection. *Frontiers in Immunology*. 2017 Mar 2;8. doi: 10.3389/fimmu.2017.00195.
16. Tarke A, Coelho CH, Zhang Z, Dan JM, Yu ED, Methot N, et al. SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron. *Cell*. 2022 Jan 24;185(5). doi: 10.1016/j.cell.2022.01.015.
17. Huang WT, Weng SW, Tzeng HT, Yen FC, Chiang YS, You HL. Lymphocyte Subpopulations Associated with Neutralizing Antibody Levels of SARS-CoV-2 for COVID-19 Vaccination. *Vaccines*. 2022 Sep 17;10(9):1550.
18. Arunachalam PS, Lai L, Samaha H, Feng Y, Hu M, Hui HS, et al. Durability of immune responses to mRNA booster vaccination against COVID-19. *The Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 2023 May 15 [cited 2023 May 16];133(10). doi: 10.1016/j.cell.2022.01.015.
19. Da Silva, et al. Impact of Mutations in Immunodominant Regions of SARS-CoV-2 Variants on Recognition by CD8+ T Cell: an in silico analysis. *Manuscrito não publicado*.
20. Chen Y, Klein SL, Garibaldi BT, Li H, Wu C, Osevala NM, et al. Aging in COVID-19: Vulnerability, immunity and intervention. *Ageing Research Reviews*. 2021 Jan;65:101205. doi: 10.1016/j.arr.2020.101205.
21. Primorac D, Vrdoljak K, Brlek P, Pavelić E, Molnar V, Matišić V, et al. Adaptive Immune Responses and Immunity to SARS-CoV-2. *Frontiers in Immunology*. 2022 May 4;13. doi: 10.3389/fimmu.2022.848582.

2. PROPOSTA DE SUBMISSÃO

2.1 REVISTA:

Revista de Saúde Pública

2.2 REGRAS DE SUBMISSÃO

São aceitos manuscritos em inglês e português. O texto de manuscrito de pesquisa original deve seguir a estrutura conhecida como IMRD: Introdução, Métodos, Resultados e Discussão

Artigo original:

- Devem conter até 3.500 palavras (excluindo resumos, tabelas, figuras e referências).
- Número máximo de tabelas e figuras: 5.
- Número máximo recomendado de referências: 30.
- Resumos no formato estruturado com até 300 palavras.

1. Preparo do manuscrito

Título no idioma original do manuscrito

O título deve ser conciso e completo, contendo informações relevantes que possibilitem a recuperação do artigo nas bases de dados. O limite é de 90 caracteres, incluindo espaços.

Título resumido

É o título que constará no cabeçalho do artigo. Deve conter a essência do assunto em até 45 caracteres.

Descritores

Para manuscritos escritos em português, devem ser indicados entre 3 a 10 descritores extraídos do vocabulário "Descritores em Ciências da Saúde" (DeCS), da BVS/Bireme, no idioma original. Para manuscritos em inglês, utilizar o Medical Subject Headings (MeSH) da *National Library of Medicine* (EUA). Se não forem encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos livres.

Resumo

O resumo deve ser escrito em seu idioma original. As especificações quanto ao tipo de resumo estão descritas em cada uma das categorias de artigos. Como regra geral, o resumo deve incluir: objetivo do estudo, principais procedimentos metodológicos (população em estudo, local e ano de realização, métodos observacionais e analíticos), principais resultados e conclusões.

2. Estrutura do texto

Introdução – Deve relatar o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes. O objetivo do manuscrito deve estar explícito no final da introdução.

Métodos- É imprescindível a descrição clara dos procedimentos adotados, das variáveis analisadas (com a respectiva definição, se necessário) e da hipótese a ser testada. Descrever também a população, a amostra e os instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade. É necessário que haja informações sobre a coleta e o processamento de dados. Devem ser incluídas as devidas referências para as técnicas e métodos empregados, inclusive os métodos estatísticos; é fundamental que os métodos novos ou substancialmente modificados sejam descritos, justificando-se as razões para seu uso e mencionando-se suas limitações. Os critérios éticos de pesquisa devem ser respeitados. Os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões éticos e aprovada por comitê de ética.

Resultados – É preciso que sejam apresentados em uma sequência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados, nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise.

Discussão – A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os aspectos novos e importantes observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas precisam ser esclarecidas. É necessário incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As *Conclusões* devem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho.

3Referências

Listagem: As referências devem ser normatizadas de acordo com o **estilo Vancouver**, listadas por ordem de citação. Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o PubMed. No caso de publicações com até seis autores, todos devem ser citados; acima de seis, devem ser citados apenas os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al.”. Sempre que possível, incluir o DOI do documento citado.