

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DIMITRI SOKOLOWSKEI

**CARACTERIZAÇÃO DE DINÂMICAS IMUNE ADAPTATIVAS FRENTE A
IMUNIZAÇÃO POR BNT162b2 VIA SEQUENCIAMENTO DE CÉLULAS
INDIVIDUAIS**

BRASÍLIA

2023

DIMITRI SOKOLOWSKEI

**CARACTERIZAÇÃO DE DINÂMICAS IMUNE ADAPTATIVAS FRENTE A
IMUNIZAÇÃO POR BNT162b2 VIA SEQUENCIAMENTO DE CÉLULAS
INDIVIDUAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

Coorientador: Prof. Dr. Waldeyr Mendes Cordeiro da Silva

BRASÍLIA

2023

“Tudo aquilo que um homem ignora, não existe para ele. Por isso, o universo de cada um, se resume no tamanho do seu saber”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho à minha mãe, minha melhor amiga, companheira e pessoa que mais amo nesse mundo. Seus esforços e empenho em prover a mim, assim como a todos os meus irmãos, uma vida digna, com oportunidades e sua dedicação à criação de homens de caráter, devem ser sempre lembrados e respeitados. Agradeço sempre pelo suporte, pelas conversas e por sempre acreditar em mim, e ver através da educação uma forma de ascensão profissional, pessoal e espiritual.

Deixo aqui minha lembrança ao meu irmão Renan. Com você aprendi o real conceito de família, pois seus cuidados, na maior parte da minha vida, foram de um pai e não como de um irmão. Todavia, como irmão, terei sempre na memória momentos de brincadeira, diversão, aprendizado e respeito.

À Tatiana, minha grande companheira de muitos anos. Muito obrigado pela parceria, carinho e muito amor. Sinto-me privilegiado de ter uma pessoa tão especial na minha vida, onde podemos sonhar, alcançar e crescer juntos. Tenho certeza de que com você, estarei sempre no caminho certo. Ao Sérgio e Ana, meu sogro e sogra, que são uma segunda família para mim. Deixo meu carinho e gratidão.

Muito obrigado aos meus tios, João e Teresa, por sempre proverem suporte ao longo da minha trajetória educacional. Agradeço aos meus avós, João e Antônia, que sempre me apoiaram e me estimularam a estudar. Agradeço aos meus demais familiares que contribuíram de alguma forma em minha trajetória. Agradeço aos meus amigos de infância pela parceria e companheirismo.

Gostaria de deixar algumas singelas palavras ao meu orientador, professor Marcelo. Muito obrigado pela confiança e oportunidade a mim concedida. Agradeço a paciência, disponibilidade, humildade e sabedoria. As conversas que sempre tínhamos foram enriquecedoras e a liberdade que me concedeu em seguir meus interesses, ao mesmo tempo que me guiava e não me deixava perder de vista os objetivos concretos, ampliaram meus horizontes intelectuais, expandiu meus conhecimentos e aguçaram minha curiosidade e senso crítico. Hoje sou muito mais capaz intelectualmente do que há alguns anos, e isso se deve em grande parte ao senhor. Muito obrigado.

Não poderia deixar de mencionar meu coorientador, professor Waldeyr. A minha primeira grande referência na área de bioinformática foi você. Muito obrigado por todo o suporte, paciência e aprendizado.

Deixo minhas lembranças à professora Andrea, pelo seu suporte e dedicação ao laboratório e aos alunos. Seu comprometimento com a educação é inspirador e conhecimentos vastos são invejáveis. Deixo um abraço ao meu amigo da bioinformática, Pedro. Nossas conversas sempre foram muito agradáveis e produtivas, e sempre aprendia algo novo ou de relevância para meu trabalho. Muito obrigado e boa sorte durante o doutorado.

Por fim, sou muito grato à Universidade de Brasília, por prover uma infraestrutura de pesquisa completa e fortemente amparada, além de uma educação de excelência, apesar de todas as dificuldades atreladas à financiamento e condução de pesquisa no Brasil. Agradeço às agências de fomento que viabilizam verbas para pesquisa e que financiaram minha bolsa de estudos que foi, sem dúvidas, essencial para minha entrada e permanência na pós-graduação.

RESUMO

A síndrome respiratória aguda severa do coronavírus 2019 (SARS-CoV-2) consiste no agente etiológico da pandemia da doença do coronavírus 2019 (COVID-19). A adoção de políticas públicas, particularmente a vacinação em massa, foram essenciais no combate e mitigação dos impactos negativos da pandemia na saúde pública. Nesse contexto, as plataformas vacinais baseadas em RNA mensageiro (mRNA) foram revolucionárias, ao demonstrarem vantagens quanto à rapidez de produção e eficácia vacinal. Apesar da disponibilidade de dados caracterizando respostas imunológicas inatas e adaptativas frente a diferentes vacinas contra COVID-19, dinâmicas e processos moleculares em vacinas de mRNA ainda carecem de maiores investigações que, por sua vez, poderiam auxiliar no aperfeiçoamento de formulações vacinais contra possíveis coronavírus emergentes. Neste trabalho, empregando dados públicos de sequenciamento de RNA de células individuais (scRNA-seq) de indivíduos vacinados por BNT162b2, foi possível caracterizar dinâmicas no processo de imunidade adaptativa induzidas, longitudinalmente, pelo imunizante com esquema vacinal completo. O presente trabalho demonstrou dinâmicas celulares particulares após imunização, associadas a uma linfopenia T específica profunda, porém transitória, com expansão de populações de células B, como plasmoblastos e B de memória. Análises de expressão gênica diferencial mostraram a expressão de marcadores de ativação, proliferação e citotoxicidade celular, em linfócitos B e T, além de expressão progressiva de IFN-I ao longo dos períodos de tempo pós vacinação. Não obstante, as análises de ontologia gênica evidenciaram termos que corroboram com os achados de perfil transcricional. Ainda, a determinação de subpopulações B e T viabilizaram análises de inferência de trajetória, aprofundando achados de dinâmicas celulares pós vacinação e, finalmente, as análises de comunicação célula-célula puderam estabelecer padrões interacionais e sinalizatórios entre os agrupamentos celulares indicando a participação não exclusiva, porém crucial, de vias como FTL3, MIF e BAFF/APRIL frente a imunização. Os resultados obtidos no presente trabalho, evidenciaram mecanismos celulares e moleculares que propõem o desenvolvimento de vacinas de mRNA mais eficientes, efetivas e seguras contra futuras pandemias associadas a coronavírus e outras doenças infecciosas emergentes.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; BNT162b2; scRNA-seq

ABSTRACT

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2019 (SARS-CoV-2) is the etiological agent of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. The adoption of public policies, particularly mass vaccination, were essential in fighting and mitigating the negative impacts of the pandemic on public health. In this context, vaccine platforms based on messenger RNA (mRNA) were revolutionary, demonstrating advantages in terms of speed of production and efficacy. Despite the availability of data characterizing innate and adaptive immune responses to different vaccines against COVID-19, molecular dynamics and processes in mRNA vaccines still require further investigation, which, in turn, could help improve vaccine formulations against possible emerging coronaviruses. In this work, using public single cell RNA sequencing (scRNA-seq) data from individuals vaccinated by BNT162b2, it was possible to characterize adaptive immunity dynamics induced, longitudinally, by the immunizer with a complete vaccination schedule. The present work demonstrated particular cellular dynamics after immunization, associated with a profound but transient specific T lymphopenia, with expansion of B cell populations, such as plasmablasts and memory B cells. Differential gene expression analysis showed expression of cellular activation, proliferation and cytotoxicity markers in B and T lymphocytes, in addition to progressive expression of IFN-I over the post-vaccination time periods. Notwithstanding, gene ontology analysis highlighted terms that corroborate to the transcriptional profile findings. Furthermore, the determination of B and T subpopulations enabled trajectory inference analyses, deepening findings of post-vaccination cellular dynamics and, finally, cell-cell communication analyzes could establish interactional and signaling patterns between cell groupings indicating non-exclusive, however crucial, participation of pathways such as FTL3, MIF and BAFF/APRIL promoted by the immunization. The results obtained in the present work highlighted cellular and molecular mechanisms that propels the development of more efficient, effective and safer mRNA vaccines against future pandemics associated with coronaviruses and other emerging infectious diseases.

Keywords: SARS-CoV-2; BNT162b2; scRNA-seq

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Proteínas estruturais do SARS-CoV-2.	13
Figura 2. Composição do genoma de RNA viral.	13
Figura 3. Estruturas da proteína de espícula do SARS-CoV-2.	14
Figura 4. Estruturas de mRNA eucariótico.	16
Figura 5. Etapas de produção de mRNA.	18
Figura 6. Representação de etapas de transfecção e indução de imunidade via vacina de mRNA	20
Figura 7. Esquema de separação de células individuais em sistema de microfluídica.	23
Figura 8. Etapas de análises de bioinformática em scRNA-seq.	24
Figura 9. Esquema geral do fluxo metodológico empregado no presente trabalho.	26
Tabela 1. Descrição dos identificadores de amostra e seus respectivos metadados.	35
Figura 10. Controle de qualidade pré e pós filtragem.	36
Figura 11. Marcadores transcricionais empregados na anotação dos agrupamentos celulares.	38
Figura 12. Redução de dimensionalidade e anotação dos agrupamentos.	39
Figura 13. Proporção e abundância de agrupamentos celulares.	41
Figura 14. Expressão gênica diferencial em células B em relação ao Dia 0.	42
Figura 15. Expressão gênica diferencial em células T em relação ao Dia 0.	45
Figura 16. Expressão de IFN e vias relacionadas em células T.	46
Figura 17. Ontologia gênica em células B.	48
Figura 18. Ontologia gênica em células T.	49
Figura 19. Subpopulações de linfócitos B.	50
Figura 20. Subpopulações de linfócitos T.	51
Figura 21. Inferência de trajetória em células B.	52
Figura 22. Inferência de trajetória em células T.	54
Figura 23. Interatoma global entre grupos celulares.	56
Figura 24. Força de perfis interacionais <i>in</i> e <i>out</i> .	58
Figura 25. Envolvimento celular com sinalização MIF.	60
Figura 26. Sinalização receptor-ligante via FTL3.	61
Figura 27. Padrões celulares e comunicatórios de perfil <i>in</i> após 1ª dose.	62
Tabela S1. Marcadores transcricionais empregados na classificação e anotação celular.	79
Figura S1. Expressão gênica diferencial em células B.	80

Figura S2. Expressão gênica diferencial em células T.	81
Figura S3. Ontologia gênica de termos ligados a citocinas em células B.	82
Figura S4. Ontologia gênica de termos ligados a vias de sinalização celular em células B.	83
Figura S5. Trajetória de pseudotempo em células B	84
Figura S6. Trajetória de pseudotempo em células T.	85
Figura S7. Sinalização receptor-ligante via FTL3.	86
Figura S8. Sinalização receptor-ligante via BAFF.	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Células apresentadoras de antígenos
CCC	Comunicação célula-célula
cDNA	DNA complementar
CITE-seq	Indexação celular de transcritomas e epítomos por sequenciamento
COVID-19	Doença do coronavírus 2019
DC	Células dendríticas
DGE	Genes diferencialmente expressos
DMT	<i>Disease Modifying Therapies</i>
DMV	Vesícula de dupla membrana
dsRNA	RNA de fita dupla
E	Envelope
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
FLT3	Tirosina kinase 3 tipo FMS
FOXP1	<i>Foxhead P1</i>
GC	Centros germinativos
GEX	<i>Gene expression</i>
GLM	Modelo Linear Generalizado
GO	Ontologia Gênica
HPC	Células humanas pluripotentes
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IAV	Vírus da influenza A
IFN	Interferon
ISG	<i>Interferon Inducible Genes</i>
IVT	Transcrição <i>in vitro</i>
kNN k	Vizinhos mais próximos
LNP	Nanoemulsões lipídicas
M	Membrana
MAIT	<i>Mucosal Associated Invariant T</i>
MDA5	Antígeno de diferenciação melanoma 5
MHCI/II	Complexo maior de histocompatibilidade I/II
MIF	<i>Macrophages Migration Inhibitor Factor</i>
Mpro	Protease principal

mRNA	RNA mensageiro
MST	<i>Minimum Spanning Tree</i>
N	Nucleocapsídeo
NGS	Sequenciamento de próxima geração
OAS 2'-5'	Oligoadenilato sintetase
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Sequência de leitura aberta
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PC	Componentes Principais
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PLpro	Protease tipo papaína
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
RBD	Domínio de ligação ao receptor
RBM	Motivo de pareamento ao receptor
RdRP	RNA-polimerase RNA-dependente
RIG-I	Gene induzível pelo ácido retinóico
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
RTC	Complexo de replicação e transcrição
S	Espícula
SARS-CoV-2	Síndrome respiratória aguda severa do coronavírus 2019
scRNA-seq	Sequenciamento de RNA de células individuais
SHM	Hipermutação somática
SRA	<i>Sequencing Read Archives</i>
ssRNA+	RNA fita simples senso positivo
STAMP	Transcritoma de células únicas acoplados a micropartículas
TI	Inferência de trajetória
TLR	Receptor tipo Toll
TMPRSS2	Serina protease transmembrana 2
UMAP	<i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i>
UMI	Identificadores moleculares únicos
UTR	Regiões não traduzidas
VOC	Variantes de preocupação
WT	Tipo selvagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 SARS-CoV-2	12
1.2 Vacinas baseadas em plataformas de RNA mensageiro	15
1.3 Vacinas mRNA contra SARS-CoV-2 & Mecanismos de ação	18
1.4 Single Cell RNA sequencing (scRNA-seq)	21
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivos Gerais	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3. MÉTODOS	26
3.1 Recursos computacionais	26
3.2 Coleta de dados	27
3.3 Pré processamento	28
3.4 Preparação de ambientes	29
3.5 Análise de dados de scRNA-seq	29
3.6 Anotação de metadados & Controle de Qualidade	29
3.7 Normalização, Integração & Agrupamento	30
3.8 Anotação, Abundância celular & Reagrupamento	32
3.9 Análise de expressão gênica diferencial & enriquecimento de termos	33
3.10 Inferência de trajetória & pseudotempo	33
3.11 Comunicação célula-célula	34
3.12 Repositório GitHub	34
4. RESULTADOS & DISCUSSÃO	35
4.1 Controle de Qualidade, Integração & Anotação Celular	35
4.2 Dinâmicas de Abundância Celular	39
4.3 Análises de Expressão Gênica Diferencial	41
4.4 Análises de Ontologia Gênica	47
4.5 Dinâmicas de Trajetória Celular & Pseudotempo	49
4.6 Análises de Comunicação Célula-Célula	54
5. CONCLUSÃO, LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO I	79

1. INTRODUÇÃO

1.1 SARS-CoV-2

A síndrome respiratória aguda severa do coronavírus 2019 (SARS-CoV-2) consiste no agente etiológico da doença do coronavírus 2019 (COVID-19). O vírus, pertencente à família *coronaviridae*, subgênero *betacoronavirus*, é membro de uma vasta diversidade de coronavírus infectantes de seres humanos e animais, consistindo no terceiro caso de transmissão de coronavírus de caráter zoonótico em humanos no passado recente (RUIZ-ARAVENA *et al.*, 2022).

Em dezembro de 2019, na província Chinesa de Wuhan, foram notificados os primeiros casos de grupos de pacientes com quadros de pneumonia aguda de origem desconhecida. O sequenciamento de amostras nasais destes indivíduos identificou a presença de um novo coronavírus, representando um novo membro da família de coronavírus infectantes de seres humanos, denominado inicialmente de 2019-nCoV, entretanto posteriormente renomeado como SARS-CoV-2 (GORBALENYA *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2020).

A pandemia de COVID-19, declarada em 11 de março de 2020, pela organização mundial de saúde (OMS), até o presente momento já levou a 500 milhões de casos positivos confirmados, com estimativas oficiais de óbitos em torno de 6,3 milhões de pessoas ao redor do mundo (WHO, 2022). Todavia, o número de infecções e óbitos totais reais provavelmente são significativamente maiores, porém camuflados em decorrência do número elevado de subnotificações (PAIXÃO *et al.*, 2021).

O SARS-CoV-2 dispõe de 4 proteínas estruturais básicas, sendo: membrana (M), envelope (E), nucleocapsídeo (N) e espícula (S) (**Figura 1**). Ainda, conta com 15-16 proteínas não estruturais (*nsp*, do inglês, *non structural proteins*) que, em grande parte, constituem o complexo de replicação e transcrição (*RTC*, do inglês, *Replication Transcriptional Complex*), crucial para replicação do genoma viral, além de 7 proteínas acessórias que desempenham importante papel de imunomodulação da resposta imune do hospedeiro e evasão viral (VKOVSKI *et al.*, 2021).

O SARS-CoV-2 detém um genoma de RNA fita simples senso positivo (ssRNA⁺) de aproximadamente 30 kilobases (kb) de comprimento. O genoma viral, em sua extremidade 5', é constituído por dois longos fragmentos de leitura abertos (ORF, do inglês, *Open Reading Frames*): ORF1a e ORF1b. Na extremidade 3' encontram-se ORF's curtas, codificantes das

proteínas estruturais, intercaladas com ORF's responsáveis pela síntese de proteínas acessórias virais (**Figura 2**) (YANG; RAO, 2021).

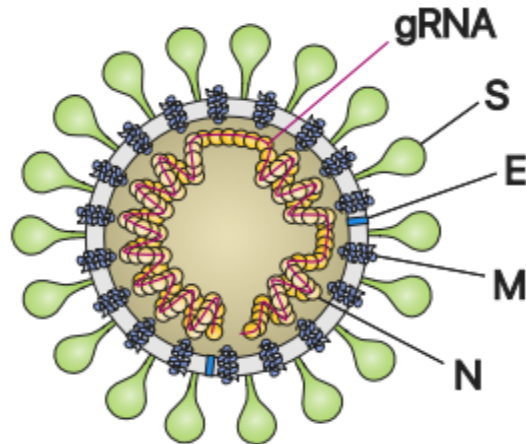


Figura 1. Proteínas estruturais do SARS-CoV-2. Representação das proteínas estruturais virais como espícula (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N) além do genoma de RNA viral (gRNA). Adaptado de (KIM *et al.*, 2020).

A glicoproteína S, consiste em uma proteína de membrana do tipo I, e representa o principal mediador da invasão viral do SARS-CoV-2 em células humanas, onde o receptor prioritário empregado é a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2, do inglês, *Angiotensin Converting Enzyme 2*) (LETKO; MARZI; MUNSTER, 2020). A proteína S divide-se em dois domínios funcionais principais: S1 e S2. A subunidade S1 conta com o domínio de ligação ao receptor (RBD, do inglês, *Receptor Binding Domain*) que é particularmente importante ao promover a interação com a ECA2. A subunidade S2, por sua vez, é crucial para a promoção da fusão da membrana da partícula do vírion com a membrana da célula hospedeira (**Figura 3**) (JACKSON *et al.*, 2022).

A interação inicial do complexo RBD-ECA2 envolve a adoção de uma conformação “up”, caracterizados pela exposição acentuada do RBD, possibilitando o acesso e interação de resíduos de aminoácidos do motivo de pareamento ao receptor (RBM, do inglês, *Receptor Binding Motifs*) ao ECA2 (BENTON *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2021). Particularmente, determinados resíduos de aminoácidos do RBM demonstraram-se cruciais para a promoção de uma maior afinidade ao ECA2 de SARS-CoV-2 (WAN *et al.*, 2020).

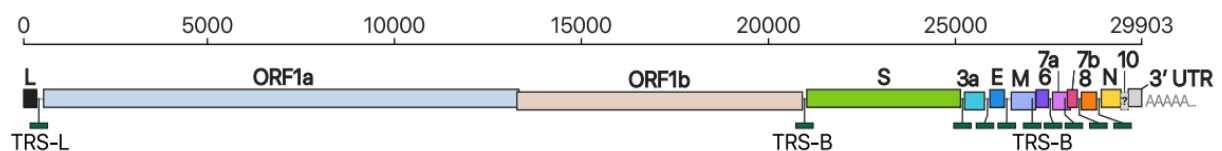


Figura 2. Composição do genoma de RNA viral. Esquematização dos principais constituintes genômicos do SARS-CoV-2 incluindo a ORF1a e ORF1b, codificantes das lipoproteínas pp1a e pp1ab, respectivamente, e demais genes codificantes de proteínas estruturais e nsps. Adaptado de (KIM *et al.*, 2020).

Ainda, através da exposição e clivagem do sítio proteolítico S2' pela serina protease transmembranar 2 (TMPRSS2, do inglês, *Transmembrane Protease Serine 2*) de superfície celular, a subunidade S2 incorre em alterações conformacionais significativas que culminam na injeção do genoma de RNA viral no citoplasma celular em decorrência da fusão da membrana do vírion com a membrana da célula hospedeira (YANG; RAO, 2021).

No citoplasma celular, a ORF1a e ORF1b do genoma de RNA viral são rapidamente traduzidas em polipeptídeo 1a (pp1a) e polipeptídeo 1ab (pp1ab) como resultado de *frameshifting* ribossomal programado -1 (BHATT *et al.*, 2021). Através da clivagem proteolítica da pp1a e pp1ab por duas cisteína proteases, protease principal (M^{pro}) e protease tipo papaína (PL^{pro}), todas as 16 *nsp* maduras e processadas são liberadas das poliproteínas e podem promover suas respectivas funções biológicas. As *nsp*s 2-16 compõem, em sua totalidade, o RTC viral, onde a *nsp1* atua como potente fator de virulência de capacidade inibitória da maquinaria de tradução celular (NARAYANAN *et al.*, 2008; GORKHALI *et al.*, 2021).

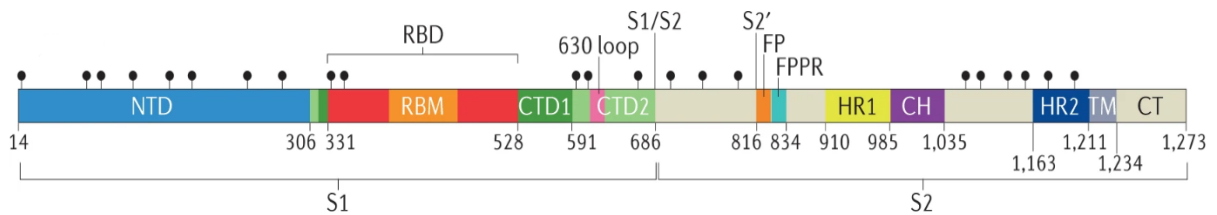


Figura 3. Estruturas da proteína de espícula do SARS-CoV-2. Representação estendida da proteína S viral, e descrição de suas subunidades S1 e S2 e suas respectivas estruturas e subdomínios. Ressalta-se a RBD, contida na subunidade S1, e RBM, compondo uma porção significativa do RBD. Adaptado de (JACKSON *et al.*, 2021).

A replicação do SARS-CoV-2 é marcada, inicialmente, pela síntese de moléculas de ssRNA⁻ a partir do RNA genômico viral. As ssRNA⁻ são utilizadas como molde para síntese de novas moléculas de ssRNA⁺ que, por sua vez, são empregadas para tradução de novas *nsp*s, RTCs ou na incorporação em novos vírions (VKOVSKI *et al.*, 2021). Devido a importância dos mecanismos de replicação e transcrição para a promoção e perpetuação da infecção, muitas estruturas associadas a tais processos, como a RNA-polimerase RNA- dependente (RdRP, do inglês, *RNA dependent RNA polymerase*) são alvos prioritários de drogas anti-COVID-19 (JIANG; YIN; XU, 2021).

A replicação do genoma viral na célula hospedeira ocorre no interior de biomembranas usurpadas do retículo endoplasmático (RE) denominadas de vesículas de dupla membrana (DMV, do inglês, *Double Membrane Vesicles*) (KNOOPS *et al.*, 2008). As DMVs proporcionam um microambiente propício para a replicação viral, além de auxiliarem na evasão imunológica ao esconderem intermediários da transcrição de receptores de reconhecimento de padrões (PRR, do inglês, *Pattern Recognition Receptors*) intracelulares, tais como RIG-I (do inglês, *Retinoic Acid-inducible Gene I*) e MDA5 (do inglês, *melanoma differentiation antigen 5*) (LI; LIU; ZHANG, 2010).

As proteínas estruturais e o genoma ssRNA⁺ viral são translocados das DMVs e montados no RE e complexo de golgi. A liberação de novas partículas de vírions, presumivelmente, emergem e são liberadas da célula infectada via exocitose (STERTZ *et al.*, 2007; KLEIN *et al.*, 2020). Ainda, vias de liberação associadas a tráfico lisossomal já foram relatadas (GHOSH *et al.*, 2020). A liberação das partículas do vírion viabilizam a manutenção do ciclo infeccioso, culminando na disseminação da infecção em outros tecidos e órgãos e possibilitando a transmissão pessoa-pessoa.

1.2 Vacinas baseadas em plataformas de RNA mensageiro

O desenvolvimento de estratégias e adoção de políticas públicas voltadas ao combate à pandemia de COVID-19, foram de suma importância para a minimização de infecções, óbitos e na amenização da crise socioeconômica gerada pela pandemia (DAGAN *et al.*, 2021). A adoção da vacinação em massa, no Brasil e no mundo, certamente foi a estratégia mais eficiente de combate à pandemia, apesar do surgimento de variantes de preocupação (VOC, do inglês, *Variants of Concern*) representarem um desafio na manutenção de uma imunidade vacinal protetora e duradoura (HOFFMAN *et al.*, 2022).

A diversidade de plataformas e estratégias vacinais utilizadas no desenvolvimento de imunizantes contra COVID-19 foram enormes e incluem imunizantes de vírus total inativado (GAO *et al.*, 2020), vacinas de subunidade proteica (KEECH *et al.*, 2020), vetores de adenovírus (FALSEY *et al.*, 2021) entre outras. No entanto, a produção de vacinas utilizando plataformas inovadoras, particularmente de RNA mensageiro (mRNA), representaram um marco biotecnológico histórico na produção de imunizantes (PIZZA; PECETTA; RAPPUOLI, 2020).

Os primeiros grandes avanços quanto ao uso de mRNAs para fins terapêuticos, datam do final dos anos 1980 quando técnicas de entrega de mRNA via lipossoma catiônicas em

células eucarióticas foram descritas *in vitro* (MALONE; FELGNER; VERMA, 1989). Ao longo das décadas subsequentes com aperfeiçoamento de estratégias de síntese de mRNA *in vitro* (WOLFF *et al.*, 1990), comprovação de capacidade imunoestimulante dos transcritos de mRNA (MARTINON *et al.*, 1993) e aprimoramento de desenho dos transcritos (KARIKÓ *et al.*, 2005; ASRANI *et al.*, 2018), o uso de mRNAs tornou-se de grande interesse para formulações de estratégias com propostas terapêuticas e profiláticas, incluindo o desenvolvimento de imunizantes (ROTH *et al.*, 2019; ALDRICH *et al.*, 2021).

O alicerce tecnológico de vacinas baseadas em mRNA consistem na mimetização de transcritos de mRNA eucariotos maduros contendo as informações genéticas, codificadas em sequências de nucleotídeos, capazes de serem traduzidas no antígeno de interesse (FANG *et al.*, 2022). Portanto, ao contrário de outros desenhos vacinais, onde o antígeno imunodominante encontra-se prontamente sintetizado, em vacinas de mRNA, o transcrito vacinal atua simplesmente como um veículo de entrega informacional visando a tradução do antígeno prioritário pela maquinaria ribossomal celular (BARBIER *et al.*, 2022).

O desenho de mRNAs vacinais emprega as mesmas estruturas biológicas de transcritos eucarióticos após *splicing* alternativo, indispensáveis para a estabilidade estrutural e tradução, como: 1) sequência de leitura aberta (ORF, do inglês, *Open Reading Frame*); 2) regiões 5' e 3' não traduzidas flanqueando cada extremidade dos transcritos (UTR, do inglês, *Untranscribed Regions*); 3) estrutura de capeamento 7-metilguanossina 5'; 4) poli-A 3' (**Figura 4**) (KNECEVIC *et al.*, 2021).

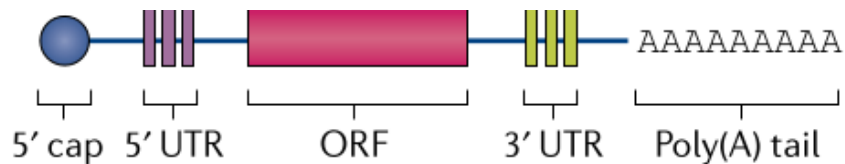


Figura 4. Estruturas de mRNA eucariótico. Ilustração dos componentes básicos constituintes de um mRNA eucariótico após *splicing*. Estes mesmos componentes encontram-se em virtualmente todos os transcritos de plataformas baseadas em mRNA, incluindo a vacina BNT162b2. Adaptado de (CHAUDHARY; WEISSMAN; WHITEHEAD, 2021).

Brevemente, o desenvolvimento de vacinas de mRNA passam pela seleção e otimização da sequência codificadora da proteína imunodominante de interesse, transcrição *in vitro* (IVT, do inglês, *In Vitro Transcribed*) do mRNA vacinal, possuindo os conteúdos estruturais básicos de mRNA fisiológicos, seguidos por etapas básicas de remoção de contaminantes e nano emulsificação dos transcritos vacinais, e finalmente a adsorção,

armazenamento e acondicionamento do composto vacinal completo pronto para uso (**Figura 5**) (CHAUDHARY; WEISSMAN; WHITEHEAD, 2021).

O intrínseco e elevado potencial imunogênico de transcritos de mRNA devem-se a detecção por PRRs, tais como receptores do tipo *toll* (TLR, do inglês, *Toll Like Receptors*) e sensores de mRNA exógenos como o RIG-I que inviabilizam o uso seguro e efetivo de vacinas baseadas em mRNA com transcritos nativos ou inalterados (BOURQUIN *et al.*, 2006; HORNUNG *et al.*, 2006).

Conseqüentemente, modificações adicionais nos transcritos são indispensáveis para obtenção de maior estabilidade molecular e estrutural, redução de imunogenicidade, indução de respostas imunológicas robustas, porém reguladas, maior rendimento de proteína antigênica em sistema de expressão e resultados terapêuticos mais eficientes (KARIKÓ *et al.*, 2005; HOLTKAMP *et al.*, 2006; BAHL *et al.*, 2017). Diversas abordagens de engenharia de transcritos existem atualmente. Algumas destas serão descritas a seguir.

A modificação de nucleosídeos em mRNAs nativos consistem em mecanismos pós transcricionais com envolvimento na regulação traducional e inibição de imunogenicidade (DUECHLER *et al.*, 2016). Em formulações vacinais, a modificação de bases direcionada em transcritos, como pela substituição de uridina por pseudouridina, previne a identificação dos mRNAs por PRRs e contribui na maximização da tradução do antígeno de interesse (ANDERSON *et al.*, 2010). Ainda, outros análogos de nucleosídeos encontram-se disponíveis e podem ser empregados como N1-metilpseudouridina e N6-metiladenosina (SONG; YI, 2017).

Adicionalmente, pelo envolvimento na regulação da tradução e estabilidade do mRNA, a seleção de segmentos UTR 5' e 3' é indispensável para formulação de vacinas de mRNA de sucesso (HOLTKAMP *et al.*, 2006). O capeamento de extremidade 5', controle do comprimento de cauda poli(A) e otimização de códon em ORFs já são práticas comuns em desenhos de mRNA vacinais (TO; CHO, 2021).

Não obstante, apesar de não atrelado a modificação dos transcritos em si, boas práticas de produção de plataformas de mRNA terapêuticos, como na purificação de RNAs de fita dupla (dsRNA, do inglês, *Double Stranded RNA*) através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*) promovem resultados positivos no fármaco final, ao não promoverem inflamação excessiva (KARIKÓ *et al.*, 2011).

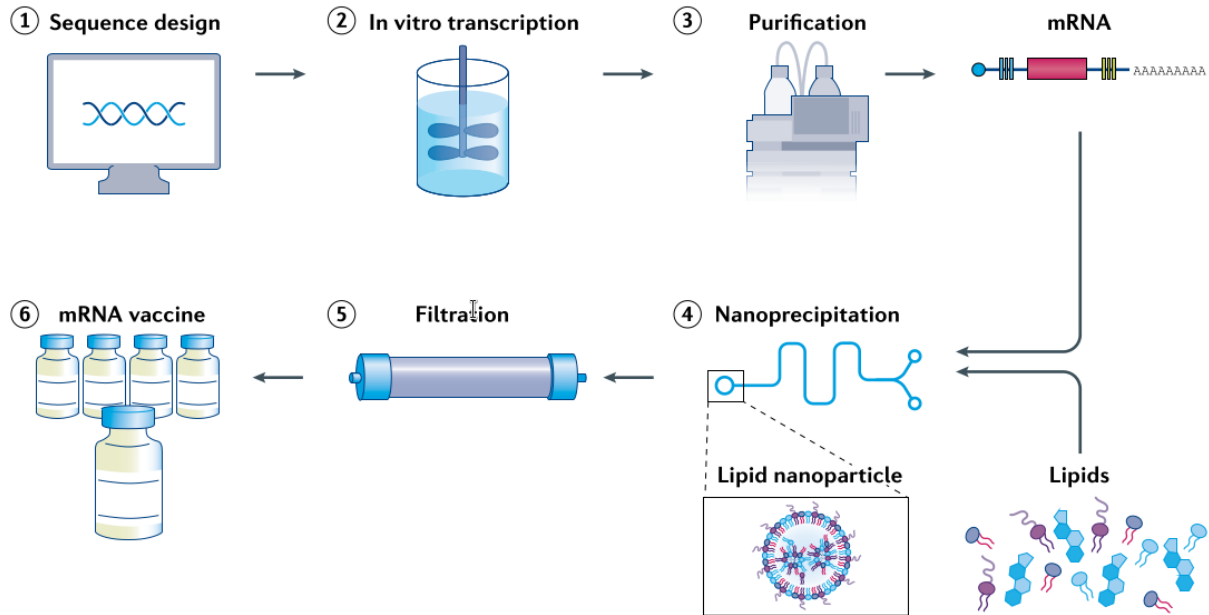


Figura 5. Etapas de produção de mRNA. Esquematização de etapas básicas no desenvolvimento de vacinas de mRNA. Primeiramente, estabelece-se o desenho da sequência a ser expressa (1); transcrição *in vitro* (2); Purificação do mRNA de interesse (3); nano emulsificação dos mRNA e carreadores lipídicos (4); filtração (5); produto vacinal de mRNA final (6). Adaptado de (CHAUDHARY; WEISSMAN; WHITEHEAD, 2021).

Arelado às limitações específicas das moléculas de mRNA, anteriormente descritas, associadas a uma dificultosa difusão entre membranas de bicamada lipídicas celulares em decorrência do tamanho e carga predominantemente negativa (FANG *et al.*, 2022), o emprego de sistemas de entrega, principalmente baseados em nanoemulsões lipídicas (LNP, do inglês, *Lipid Nanoparticles*) ionizáveis, consistem no método “estado da arte” de entrega de mRNA vacinais através de compartimentos biológicos (PARDI *et al.*, 2018).

1.3 Vacinas mRNA contra SARS-CoV-2 & Mecanismos de ação

As primeiras e principais vacinas de mRNA contra COVID-19 aprovadas e liberadas para uso emergencial em humanos, por agências regulatórias mundo afora, foram Pfizer/BioNTech BNT162b2 e Moderna mRNA-1273 (WOUTERS *et al.*, 2021). Ambas são imunizantes de mRNA não replicante que empregam a glicoproteína de espícula *S* completa, inicialmente de tipo selvagem (WT, do inglês, *Wild Type*), em uma construção estabilizada na conformação pré-fusão pela inserção de resíduos de prolina nas regiões K986P e V987P da subunidade S2 (S-2P). Ainda, utilizam-se de modificações de nucleosídeos, principalmente 1-metilpseudouridina, e usam LNPs como sistema de entrega dos transcritos profiláticos (HOGAN; PARDI, 2022).

Em estudos pré-clínicos e clínicos de fase I, as vacinas já demonstraram significativa indução de respostas imunes humorais pela alta titulação total de anticorpos IgG anti-S, bem como a geração de anticorpos neutralizantes, e respostas celulares, caracterizado pela presença de um perfil TCD4+ Th1 predominante, com indução de respostas TCD8+ significativas, particularmente frente à imunização com BNT162b2 (CORBETT *et al.*, 2020; SAHIN *et al.*, 2021).

Em estudo clínicos de fase III, ambas as vacinas se demonstram seguras, com predomínio de reações leves e moderadas, principalmente após a 2ª dose, e com taxas de eficácia média de 95% para BNT162b2 e 94,1% para mRNA-1273 (BADEN *et al.*, 2021; HOGAN; PARDI, 2022). Tais taxas de eficácia permaneceram praticamente idênticas até 2 meses após a 2ª dose, promovendo um grau de proteção efetivo ainda 6 meses após a última dose (THOMAS *et al.*, 2021).

Os mecanismos de ação e indução de imunidade protetora das vacinas de mRNA, iniciam-se na compartimentalização do composto vacinal administrado por células imunes, como células dendríticas (DC, do inglês, *Dendritic Cells*), ou não imunes como células epiteliais e musculares no sítio da injeção (PARDI *et al.*, 2015). Independentemente, através de mecanismos endocíticos, como micropinocitose, o complexo mRNA-LNP pode ser cooptado em endossomas intracelulares e, eventualmente, atingir o compartimento intracelular (PILKINGTON *et al.*, 2021).

A chegada do mRNA vacinal ao citoplasma é marcado pela tradução do transcrito codificador do antígeno imunodominante pela maquinaria ribossômica. O antígeno traduzido pode então ser clivado e processado pelo proteassoma e eventualmente montado e apresentado em superfície celular pelo complexo de histocompatibilidade humana de classe I ou II (MHCI/II, do inglês, *Major Histocompatibility Complex I/II*) por células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês, *Antigen Presenting Cells*) tais como linfócitos B e DC. O complexo epítopo-MHC podem ser reconhecidos por células incluindo TCD4+, TCD8+, B e T foliculares auxiliares em centros germinativos (GC, do inglês, *Germinal Center*), induzindo o desenvolvimento de respostas imunológicas efetoras imediatas e de memória imunológica (**Figura 6**) (FANG *et al.*, 2022).

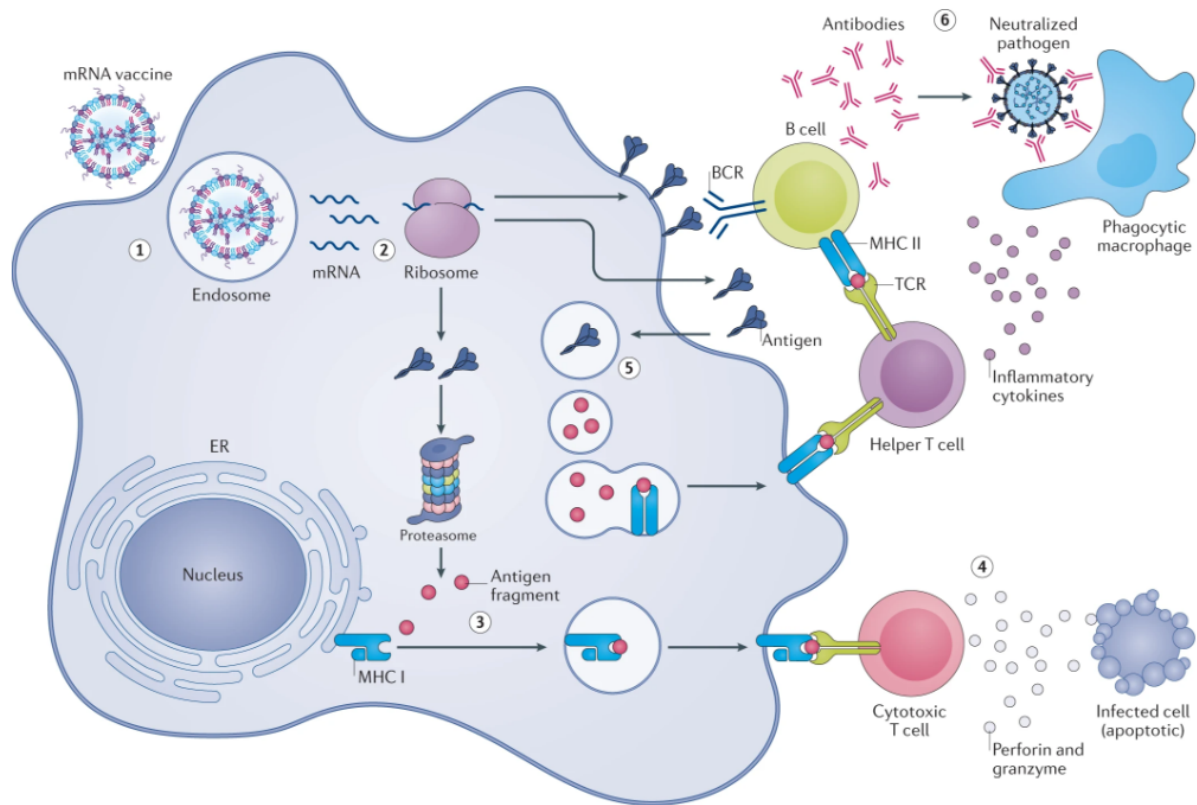


Figura 6. Representação de etapas de transfecção e indução de imunidade via vacina de mRNA. O complexo mRNA-LNP administrado são endocitados por APCs, tais como DCs (1), e o mRNA vacinal no citosol é traduzido pela maquinaria ribossomal celular (2). O antígeno imunodominante viral é processado via proteossoma e apresentado a células T via complexo MHC de classe I (3), induzindo respostas T citotóxicas via granzimas e perforinas (4). Complementarmente, antígenos podem ser processados e apresentados via MHC de classe II, ativando células T auxiliares ou antígenos secretados podem ser reconhecidos via BCR ativando células B, geralmente com ativação T dependente, induzindo a secreção de anticorpos com potencial neutralizante (6). Adaptado de (CHAUDHARY; WEISSMAN; WHITEHEAD, 2021).

A atuação dos mRNA como auto adjuvantes auxilia na promoção de respostas imunes pró-inflamatórias (VERBEKE *et al.*, 2019). O reconhecimento dos transcritos por PRRs endossômicas, principalmente por TLR7 e TLR8, e PRRs citosólicos como TLR3 juntamente com sensores como RIG-I e MDA5, contribuem na secreção de citocinas pró-inflamatórias e produção de interferons (IFN) (CHAUDHARY *et al.*, 2021). Não obstante, a atuação das LNPs não se restringe apenas a sistemas de entrega de mRNA, mas como adjuvantes por si próprios, tendo papel imunomodulatório bem estabelecido (KRANZ *et al.*, 2016; BROOS *et al.*, 2016).

As plataformas vacinais baseadas em mRNA contra SARS-CoV-2 foram indiscutivelmente um sucesso e certamente impulsionam o uso da tecnologia em emergências futuras e em doenças de grande relevância atualmente (CHEN; CHEN; XU, 2022). Todavia, como uma plataforma inovadora, ainda há muito a ser compreendido quanto ao papel e relevância imunomodulatória de cada componente no desenho vacinal tais como modificações

gerais no transcrito e sistema de entrega, visando o aperfeiçoamento da eficácia e viabilidade da plataforma (VERBEKE *et al.*, 2019).

Ainda, os desdobramentos imunológicos celulares efetores e protetores contra a infecção por SARS-CoV-2, induzidos pela imunização, são resultado direto de eventos e mecanismos imunológicos complexos finamente controlados e coordenados na promoção de respostas imunes efetivas. A compreensão à fundo destes mecanismos podem dar à luz à contextos imunológicos pré e pós vacinação não totalmente elucidados, auxiliando no desenvolvimento racional de formulações baseadas em mRNA mais eficazes e seguras, e contribuindo na adoção de novas formulações vacinais em inevitáveis emergências futuras associadas a coronavírus e outros patógenos de relevância.

1.4 Single Cell RNA sequencing (scRNA-seq)

O advento de estratégias de sequenciamento de próxima geração (NGS, do inglês, *Next Generation Sequencing*) propiciaram a aplicação de tecnologias de sequenciamento de baixo custo e alto rendimento na geração massiva e sem precedente de dados biológicos (HU *et al.*, 2011). Neste contexto, o sequenciamento de RNA *bulk* (RNA-seq, do inglês, *RNA Sequencing*) foi crucial na compreensão de sistemas biológicos, ao permitir a avaliação quantitativa precisa da expressão gênica diferencial de eventos e mecanismos biológicos de interesse (STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019).

Percebe-se, todavia, em detrimento da enorme complexidade de composição celular de tecidos biológicos, por exemplo, de sistema nervoso central (HODGE *et al.*, 2019), tecidos embrionários (TYSER *et al.*, 2021) ou tumores (WU *et al.*, 2021), a quantificação média da expressão gênica através de RNA-seq, não é muitas vezes capaz de captar precisamente e especificamente os padrões transcricionais associados a heterogeneidade da composição celular presente (CLARK *et al.*, 2019).

O sequenciamento de RNA de células individuais (scRNA-seq, do inglês, *Single Cell RNA Sequencing*) representa uma estratégia de sequenciamento de RNA baseada no isolamento e sequenciamento individual de células de relevância (CHEN; YE; GUO, 2019). Ao permitir a obtenção de um perfil transcricional de alta resolução, muitas das desvantagens inerentes ao RNA-seq *bulk* puderam ser superadas, viabilizando a compreensão de dinâmicas celulares e moleculares antes obscuras (ANDREWS *et al.*, 2021).

Atualmente, há uma grande diversidade de métodos e protocolos de scRNA-seq, diferindo-se quanto a separação e isolamento celular, coberturas de transcritos, presença de

identificadores moleculares únicos (UMI, do inglês, *Unique Molecular Identifier*), preparação de bibliotecas, custo, rendimento etc. (CHEN; NING; SHI, 2019). Porém, resumidamente, os métodos de scRNA-seq podem ser divididos em: 1) Baseados em sequenciamento de comprimento total de transcrito; 2) Baseados em sequenciamento de ponta 3'. Indiscutivelmente, métodos globalmente denominados de Drop-seq são os mais populares atualmente (KULKARNI *et al.*, 2019) e serão tratados em maiores detalhes a seguir.

A microfluídica, uma tecnologia popular na condução de Drop-seq, são *chips* formados por sistemas de canais, de até 100µm de diâmetro, que possibilitam a passagem controlada de fluidos aquosos, chamados de fase contínua, e líquido oleoso, conhecido como fase dispersa. A convergência destas duas soluções em um ponto de junção, permite que a fase contínua contendo as células únicas sejam repartidas, e estructurem-se como emulsões estáveis chamadas de gotículas, ou *droplets*, em meio de fase dispersa embebida com líquido surfactante (MATUTA; RIVELLO; HUCK, 2020).

O resultado esperado são *droplets* contendo uma única célula e uma micropartícula, denominado de *beads*, revestida com oligonucleotídeos compostos por um segmento de ancoragem de PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), *barcode* celular, UMI e uma cauda poli-(dT) responsável pela captura dos mRNAs após lise celular. A incorporação de transcritos em micropartículas é conhecida como transcrito \acute{m} a de células únicas acoplados a micropartículas (STAMP, do inglês, *Single-cell Transcriptome Attached to Microparticles*) (MACOSKO *et al.*, 2015; SVENSSON; VENTO-TORNO; TEICHMANN, 2018).

Cada *droplet* após o encapsulamento celular e pareamento dos transcritos nas *beads*, são dissolvidos pela adição de desestabilizantes de interface água/óleo, onde as STAMPs passam por etapas de transcrição reversa e síntese de bibliotecas de DNA complementar (cDNA, do inglês, *Complementary DNA*), seguidas para NGS (**Figura 7**) (MATUTA; RIVELLO; HUCK, 2020).

Os dados brutos de sequenciamento, oriundas tipicamente de plataformas *Illumina*, seguem para análises de bioinformática que incluem: 1) Alinhamento e contagem de *reads* em um genoma de referência; 2) Controle de qualidade; 3) normalização; 4) redução de dimensionalidade; 5) Inferência de trajetórias (opcional) e visualização de dados (LUECKEN; THEIS, 2019).

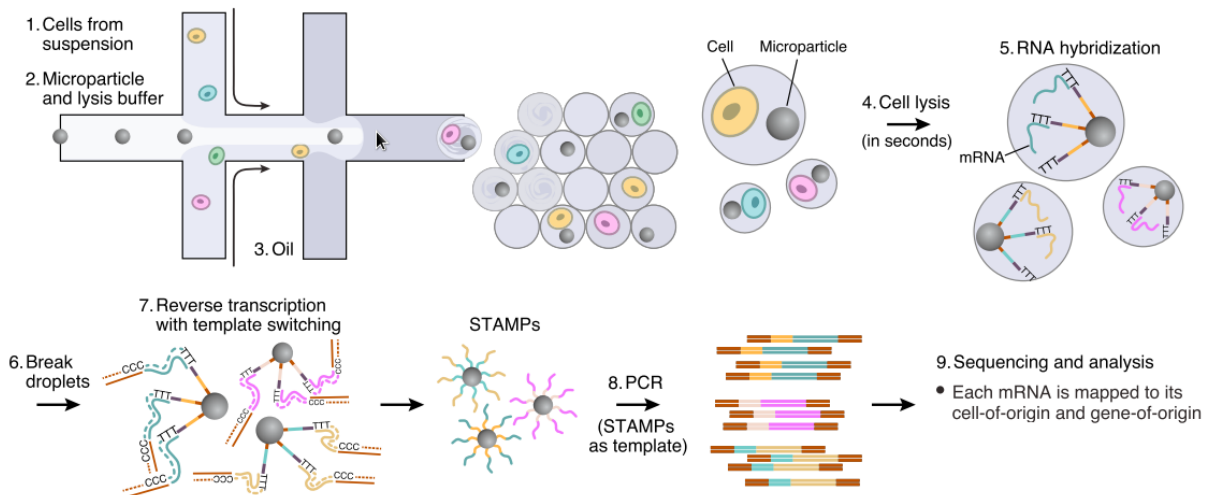


Figura 7. Esquema de separação de células individuais em sistema de microfluídica. Células previamente separadas em suspensão (1) e micropartículas suspensas em solução tampão de lise celular (2) são compartimentalizadas em gotículas aquosas separadas por solução oleosa (3) em sistema de microfluídica. A lise celular (4) dentro de cada *droplet* permite a hibridização dos transcritos de mRNA celular nos *barcodes* adsorvidos em cada micropartícula (5). A dissolução dos *droplets* (6) proporciona a condução de etapas de transcrição reversa (7), seguida por ciclos de amplificação por PCR (8) e, finalmente, sequenciamento e análise de bioinformática das bibliotecas de cDNA sequenciadas (9). Adaptado de (MACOSKO *et al.*, 2015).

As etapas de pré-processamento visam alinhar as *reads* ao genoma de referência, gerando uma matriz de expressão que computa a expressão dos genes expressos, em TPM (do inglês, *Transcripts per Million*), de cada célula. O controle de qualidade tem como intuito remover células que não atendam a critérios mínimos de viabilidade e qualidade celular. A normalização possibilita o escalonamento global da medida de expressão gênica minimizando ruídos experimentais introduzidos ao longo das diferentes etapas da preparação das amostras e sequenciamento. A redução de dimensionalidade permite a preservação de atributos do perfil transcricional dos dados de interesse ao mesmo tempo que viabiliza a visualização dos mesmos num ambiente bidimensional. Por fim, visualiza-se propriedades de interesse como expressão gênica, trajetória e diferenciação celular entre outros (**Figura 8**) (KULKARNI *et al.*, 2019; ANDREWS *et al.*, 2021).

O uso de scRNA-seq vêm ganhando grande atenção na comunidade científica desde a primeira aplicação (TANG *et al.*, 2009) e já é muito utilizado em estudos relacionados a desenvolvimento embrionário (TYSER *et al.*, 2021), sistema nervoso (MASUDA *et al.*, 2019), câncer (WU *et al.*, 2021), lesões e traumas (TOWER *et al.*, 2022), estados saúde e doença (SZABO *et al.*, 2019), resposta a infecções e imunizações (WIMMERS *et al.*, 2021). Não obstante, o conceito de sequenciamento de células individuais tem se expandido em outros ramos das ciências ômicas como genômica (PAOLILLO; LONDIN; FORTINA, 2019), epigenômica (KELSEY; STEGLE; REIK, 2017) e proteômica (VISTAIN; TAY, 2021).

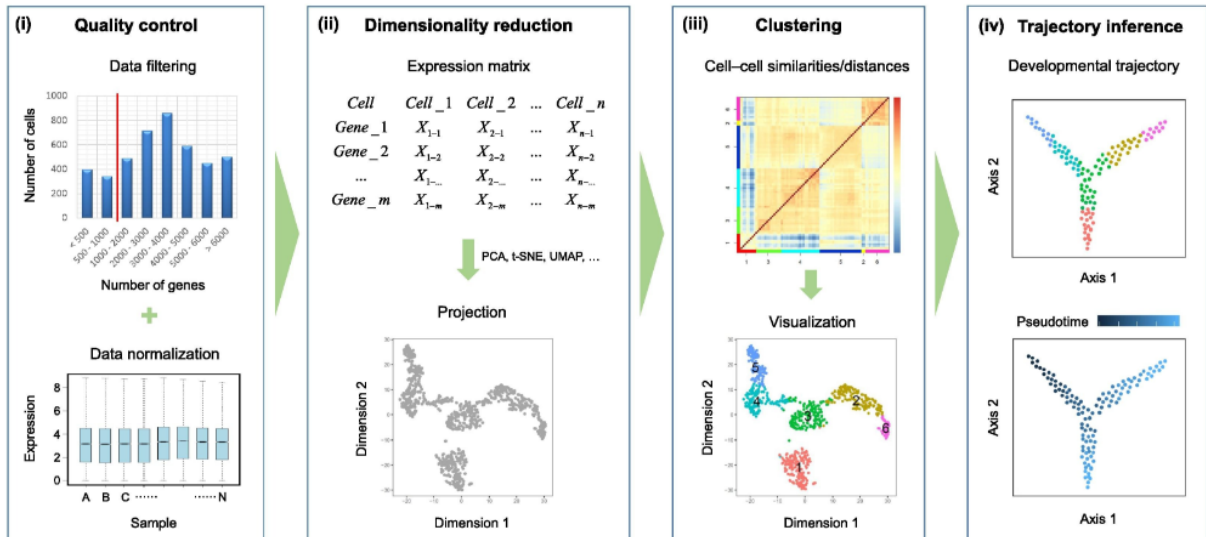


Figura 8. Etapas de análises de bioinformática em scRNA-seq. As análises de bioinformática, uma vez obtida a matriz de expressão, iniciam por controle de qualidade e normalização dos dados (I). A redução de dimensionalidade possibilita a visualização bidimensional e preservação das propriedades básicas dos dados de scRNA-seq (II). O agrupamento celular divide as células projetadas em agrupamentos celulares com perfis transcricionais similares entre si (III). Opcionalmente, análises de inferência de trajetória proporcionam identificar processos de diferenciação celular temporais medidos em unidades de pseudo tempo (IV). Adaptado de (WANG *et al.*, 2023).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral do presente trabalho é caracterizar as dinâmicas e propriedades das respostas imunes celulares, de indivíduos vacinados com imunizantes baseados em plataformas de mRNA contra COVID-19.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho em questão incluem:

- Compreender e contrastar a dinâmica da resposta imune celular em diferentes períodos de tempo após a 1º e 2º dose;
- Aferir mudanças de abundância e proporção celular entre as diferentes imunizações;
- Avaliar o transcritoma, via scRNA-seq, de linfócitos T e B visando a identificação de genes implicados em funções biológicas relevantes e relacionadas à vacinação;
- Analisar comunicação célula-célula visando explorar processos imunológicos promovidos pela imunização.

3. MÉTODOS

A **figura 9** resume as etapas metodológicas desenvolvidas no presente trabalho.

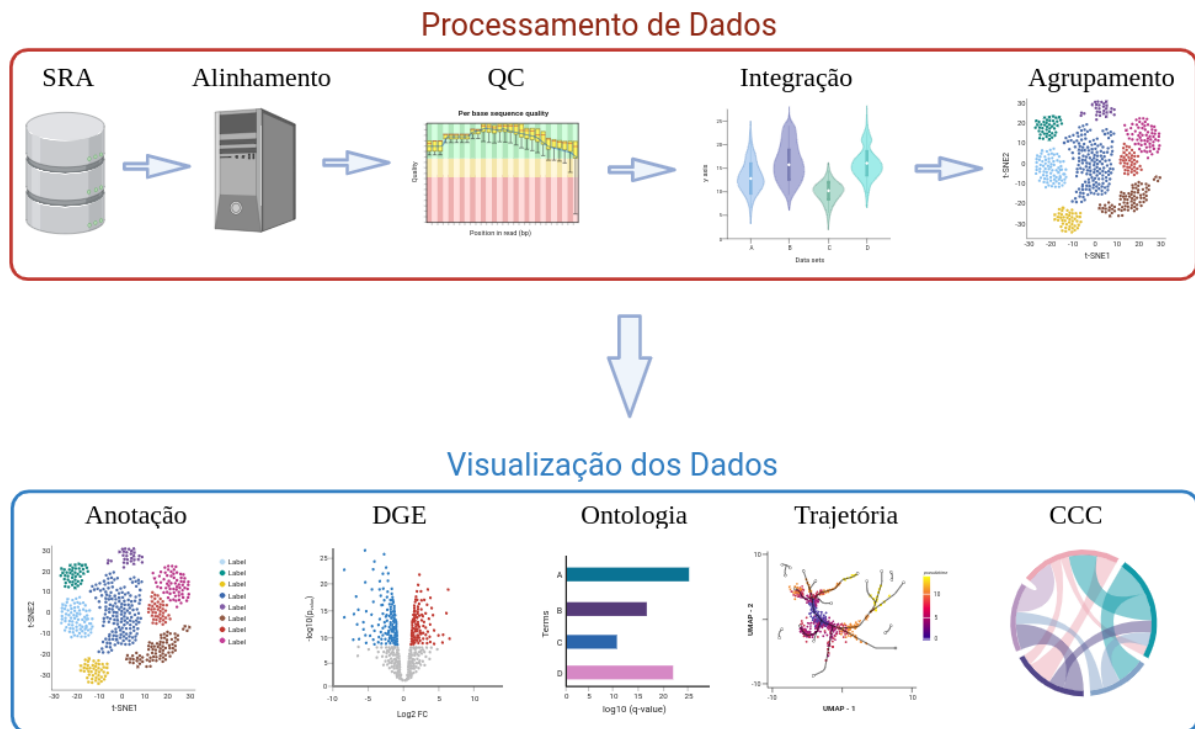


Figura 9. Esquema geral do fluxo metodológico empregado no presente trabalho. A etapa de processamento dos dados consistiu na obtenção dos dados de scRNA no banco SRA, seguidos pelo alinhamento das *reads*, execução do controle de qualidade e etapas de normalização, integração e agrupamento dos grupos celulares identificados. Posteriormente, a visualização dos dados e interpretação biológica foi realizada, após a anotação de identificação dos grupos celulares principais, através de análises de expressão gênica diferencial, ontologia gênica, inferência de trajetória e pseudotempo, terminando finalmente pelas análises de comunicação célula-célula.

3.1 Recursos computacionais

Para execução das análises de bioinformática foram utilizados 3 distintos computadores, formados por dois servidores e um *workstation*:

- O primeiro servidor pertence ao laboratório de bioinformática, do departamento de biologia celular, no instituto de biologia (IB/CEL) da Universidade de Brasília (UnB). Possui um processador de 24 núcleos Intel(R) Xeon(R) X5690 @ 3.47GHz, com 96 gigabytes de memória, 18 terabytes de disco rígido, com sistema operacional Debian GNU/Linux 11.
- O segundo servidor encontra-se no centro interdisciplinar de bioinformática da Universidade de Leipzig, Alemanha. O nó utilizado conta com processador Intel(R)

Xeon(R) CPU E7- 8860 @ 2.27GHz de 80 núcleos, 1 terabyte de memória e 64 terabytes de armazenamento e conta com sistema operacional Fedora Server 24.

- O terceiro computador é uma *workstation* disponível no laboratório de bioinformática da UnB. Este dispõe de um 13th Gen Intel(R) Core(TM) i7-13700F @ 2.1GHz de 16 núcleos, dividindo-se em 8 núcleos de performance e 8 núcleos de eficiência, 96 gigabytes de memória, 2TB de armazenamento e conta com sistema operacional Ubuntu 20.04.6 LTS.

Cada um dos diferentes computadores foi utilizado em distintas etapas ao longo do trabalho. No entanto, o servidor da Universidade de Leipzig foi particularmente importante no pré-processamento dos dados. Em contrapartida, o servidor e *workstation* da UnB foram empregados nas análises subsequentes e visualização dos dados, respectivamente.

3.2 Coleta de dados

A fim de coletar dados de interesse que pudessem ser empregados no respectivo trabalho, artigos experimentais envolvendo análises de scRNA-seq de indivíduos vacinados com imunizantes de mRNA contra SARS-CoV-2 foram pesquisados na literatura. O PubMed v2.0 (WHITE, 2020) e Google Scholar foram as ferramentas de busca usados e os seguintes termos pesquisados foram: “COVID-19”; “SARS-CoV-2”; “Vaccine”; “BNT162b2”; “mRNA-1273”, “scRNA-seq”, “single cell”. Após uma exploração detalhada, foram selecionados dois conjuntos de dados oriundos de dois distintos estudos:

- Brewer e colaboradores (2022) conduziram análises em sangue periférico (PBMC, do inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) de nove indivíduos saudáveis e sem histórico prévio de infecção por SARS-CoV-2. As amostras de PBMC foram coletadas em 4 períodos, antes e após imunizações com BNT162b2, mensurado em dias: pré-vacinação (Dia 0); 7-9 dias (Dia 7) e 21-23 dias após 1ª dose (Dia 21) e 7-9 dias após a 2ª dose (Dia 28). Por fim, foi realizado scRNA-seq, exclusivamente de células B, utilizando protocolo da 10x Genomics.
- Arunachalam e colaboradores (2021) conduziram análises multiparamétricas em 56 indivíduos saudáveis. Destes, apenas amostras de PBMC de 6 indivíduos foram empregadas na condução de scRNA-seq utilizando CITE-seq (do inglês, *Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes by Sequencing*). No total, 7 períodos foram

avaliados: Dia 0, 1-2, 7, 21, 22-23, 28, 42. A aplicação da 1ª dose ocorreu no dia 0 e a aplicação da 2ª dose no dia 21.

Com o intuito de padronizar as condições experimentais entre os diferentes conjuntos de dados, foram obtidos exclusivamente os períodos referentes aos dias 0, 7, 21 e 28. Ainda, nos dados de Arunachalam e colaboradores (2021), foram usados apenas os ensaios de GEX (do inglês, *Gene Expression*) visando a adequação à infraestrutura computacional disponível no momento da condução das análises computacionais. O banco de dados SRA (do inglês, *Sequence Read Archives*), um repositório de dados de NGS, foi acessado para coletar os identificadores das amostras desejadas e o *download* foi feito pela ferramenta SRA toolkit v3.0.5 (LEINONEN *et al.*, 2011).

3.3 Pré processamento

O *software* proprietário CellRanger v7.1.0 (10x Genomics) foi utilizado no alinhamento dos arquivos *.fastq.gz* obtidos pelo SRA. Para isso, os nomes de cada amostra foram modificados a fim de atender às convenções necessárias pela ferramenta para serem utilizados como *input*. A estrutura de nomeação de cada arquivo foi:

$$[id_amostra]_S1_L001_ [read]_001.fastq.gz$$

Onde *id_amostra* é o número identificador específicos de cada amostra e *read* referente a orientação das *reads* (R1/R2) ou presença de *index* (I1/I2). Os dados de Arunachalam e colaboradores (2021), em decorrência do uso da biblioteca TotalSeq-A, continham um arquivo adicional possuindo um *index* de 8 pares de base de comprimento. Nesse arquivo, em *read* substitui-se com I1.

O alinhamento das *reads* contra o genoma de referência GRCh38 foi executado empregando o comando *cellranger count*. O *output* do alinhamento consiste em três arquivos:

- *barcodes.tsv.gz*: Neste arquivo inclui-se uma lista, em coluna, de todos os barcodes identificados no conjunto de dados de scRNA-seq.
- *features.tsv.gz*: Esse arquivo computa a relação de *features* (genes) identificados com o ensaio na qual tais genes foram identificados (Ex: *Gene Expression*, *Antibody Capture* etc.).

- *matrix.mtx.gz*: Neste arquivo encontra-se a matriz de expressão bruta com genes identificados dispostos em linhas e células em colunas. A matriz computa o número de *reads* alinhadas em genes de cada uma das células.

3.4 Preparação de ambientes

O conda é um organizador de pacotes e ambientes, que possibilita a instalação e implantação rápida, consistente e reproduzível de *softwares* em ambientes virtuais. A grande maioria dos *softwares* empregados na condução do estudo foram prioritariamente baixados, organizados e compartimentados em ambiente utilizando conda v4.11.0. Aqueles pacotes não disponíveis para conda, foram baixados diretamente na máquina local.

3.5 Análise de dados de scRNA-seq

O Seurat é um pacote desenvolvido e implementado em linguagem de programação R, especializado nas análises de dados de scRNA-seq (SATIJA *et al.*, 2015). O pacote possibilita a condução de etapas básicas na análise de dados de scRNA-seq como, por exemplo, controle de qualidade, normalização, integração e agrupamento. Adicionalmente, conta com suporte nativo na visualização de dados e provê ferramentas avançadas na integração de dados multi-ômicos. O Seurat v4.3.0 foi a ferramenta base na execução das análises neste trabalho.

3.6 Anotação de metadados & Controle de qualidade

Os metadados associados às amostras e condições experimentais obtidas para o trabalho foram anotados no arquivo *meta.data* do objeto Seurat. No total, três variáveis foram adicionadas, denominadas: *sample*, *time* e *study*. Essas anotações referem-se ao nome das amostras, períodos após vacinação e estudo onde tais células foram obtidas, respectivamente.

No total, 5 parâmetros foram empregados para assegurar a qualidade e viabilidade das células obtidas, sendo estes: 1) UMIs por célula; 2) genes por célula; 3) complexidade de espécies de RNA; 4) contaminação mitocondrial; 5) identificação de *doublets*.

O cálculo de complexidade de espécies de RNA foi feito dividindo o log10 do número de genes por células pelo log10 do número de UMIs por células. O cálculo de contaminação mitocondrial foi realizado pelo uso da função *PercentageFeatureSet()* que possibilita quantificar a proporção de *reads* que se mapearam em genes mitocondriais. O resultado obtido

foi posteriormente dividido por 100. Os cálculos de complexidade e contaminação mitocondrial foram anotados na *meta.data* como *log10GenesPerUMI* e *mitoRatio*, respectivamente.

O pacote *scDbfFinder* (GERMAIN *et al.*, 2021) foi empregado para identificar *doublets* nos dados de scRNA-seq. O *software* tem como estratégia a simulação de *doublets* artificiais, através de um conjunto misto de estratégias estatísticas, e usa kNNs (do inglês, *k-Nearest Neighbors*) para classificar cada *barcode* como *doublets* ou *singlets* com base em características e semelhanças das células de scRNA-seq com os *doublets* artificialmente produzidos. O resultado resume-se à adição das variáveis, em *meta.data* no objeto Seurat, *scDbfFinder.score* e *scDbfFinder.class*. Enquanto a primeira indica a pontuação de *doublet*, onde maior a pontuação maior é a probabilidade de *doublet*, a segunda classifica cada *barcode* como *doublet* ou *singlet*.

A função *subset()* em R foi empregada para excluir ou manter aquelas células atendendo os seguintes limiares: $nUMI \geq 600$; $nGene \geq 350$; $log10GenesPerUMI > 0.82$; $miRatio < 0.10$ e $scDbfFinder.score < 0.80$. Ainda, apenas genes expressos em 10 ou mais células foram retidos. Da matriz inicial gene por células de 36.423 x 350.001, após o controle de qualidade, foram obtidos 29.153 x 275.501.

3.7 Normalização, Integração & Agrupamento

A normalização da matriz de expressão, após controle de qualidade, foi conduzida empregando o pacote em R *sctransform* (HAFEMEISTER; SATIJA, 2019) nativamente suportado pela interface Seurat. A ferramenta baseia-se num modelo GLM (do inglês, *Generalized Linear Model*) visando a normalização e estabilização proporcional da variância da contagem de UMIs em dados de scRNA-seq.

Anteriormente a própria normalização, cada amostra anotada na *meta.data*, foi separada individualmente em diferentes objetos Seurat utilizando a função *SplitObject()*. Subsequentemente, a normalização pode ser conduzida em cada amostra utilizando a função *SCTransform()* explicitando o parâmetro *vars.to.regress = "mitoRatio"*. Finalmente, cada amostra pode ser complexada no mesmo objeto Seurat novamente pela função *merge()*. Essa estratégia de normalização individual por amostras, apesar de mais trabalhosa, é recomendada pelos próprios desenvolvedores do Seurat e aparentemente validada pela comunidade do *single cell* (<https://github.com/satijalab/seurat/issues/4896>).

Visando a integração dos dados de interesse, primeiramente foi necessário identificar as *features* de maior variabilidade entre os diferentes períodos de tempo. Para isso, foi empregado

a função *SelectIntegrationFeatures()*, anterior a execução da função *merge()* descrita anteriormente, com o parâmetro *nfeatures = 3000*. Com a identificação dos genes mais variáveis, pôde-se atribuí-los manualmente ao objeto Seurat utilizando *VariableFeatures()*. A definição dos componentes principais (PC, do inglês, *Principal Components*), pelo PCA (do inglês, *Principal Components Analysis*) que mais contribuem e explicam a variância das *features* definidas anteriormente, puderam ser computadas pela função *RunPCA()* utilizando o parâmetro *assay = "SCT"*.

O pacote em linguagem R Harmony (KORSUNSKY *et al.*, 2019) foi empregado na integração dos dados de scRNA-seq. O programa promove uma integração rápida, escalonável, sensível e precisa em dados altamente complexos, usando-se dos PCs anteriormente obtidos e embebidos no objeto Seurat.

Primeiramente, promove-se um agrupamento difuso celular em agrupamentos específicos, usando a estratégia de *k-means*, seguidos pelo estabelecimento de centróides globais e passando por etapas de correção de cada agrupamento baseados em cada centróide-agrupamento específicos, promovendo a convergência precisa de células em agrupamentos bem definidos. O processo repete-se até a obtenção de uma integração completa. A integração foi obtida pela função *RunHarmony()* definindo os seguintes parâmetros: *group.by.vars = c("sample", "study")*, *reduction = "pca"*, *assay.use = "SCT"*, *reduction.save = "harmony"*.

A visualização da integração foi feita utilizando o algoritmo de redução de dimensionalidade UMAP (do inglês, *Uniform Manifold Approximation and Projection*) (MCINNES; HEALY; MELVILLE, 2018). A função *RunUMAP()* foi utilizada adotando os seguintes parâmetros: *reduction = "harmony"*, *assay = "SCT"*, *dims = 1:30*. Após a visualização e validação da qualidade da integração dos dados, seguiu-se para análises de agrupamento.

A análise de agrupamento possibilita a definição quantitativa dos principais agrupamentos celulares presentes no UMAP, além de viabilizar a posterior identificação dos tipos celulares de cada agrupamento. Inicialmente, visualizou-se o número de PCs que mais contribuíram para a variação nos dados de scRNA-seq. Pelo uso da função *ElbowPlot()*, constatou-se que os 10 primeiros PCs explicavam a maior parte da variedade encontrada. O Seurat conduz o agrupamento de células em grupos adotando uma abordagem baseada em grafos com kNNs, através da função *FindNeighbors()*. A execução do agrupamento foi feita pela função *FindClusters()* com *resolution = 0.6*. Os agrupamentos definidos puderam ser visualizados pela função *DimPlot()*.

3.8 Anotação, Abundância celular & Reagrupamento

A definição e anotação de quais tipos celulares compunham cada agrupamento foi feita por três diferentes estratégias. Primeiramente, uma anotação cega e independente baseada exclusivamente na identificação de marcadores cuja expressão gênica em LogFoldChange2 era maior que 0.10 através da função *FindClustersAll()*. A expressão gênica dos marcadores referentes a cada agrupamento foi computada e tabulada em arquivo *.csv* (do inglês, *Comma Separated Values*).

A segunda anotação independente foi realizada empregando o pacote em linguagem R, SingleR v3.17 (ARAN *et al.*, 2019). A ferramenta possibilita a classificação não enviesada de tipos celulares a partir de dados de scRNA-seq de referência curados e previamente anotados. Dois tipos de dados de referência foram usados para anotação: *DatabaseImmuneCellExpressionData* e *MonacoImmuneData*. Ambos os conjuntos de dados são do pacote em R “*celldex*”, compostos por anotações de tipos celulares de PBMC.

Finalmente, ambas as anotações independentes foram comparadas às anotações dos artigos originais. De forma geral, as anotações individuais foram concordantes entre si, possibilitando uma anotação global final avaliada como altamente confiável e fidedigna quanto ao contexto biológico esperado em termos de composição quantitativa e qualitativa imunológicas.

Ainda, duas anotações gerais foram feitas. Uma contendo apenas os principais tipos celulares presentes, enquanto a outra incluiu também subtipos e subpopulações mais definidas. Para fins didáticos, denominou-se as anotações como *lin* e *sublin*, respectivamente. Isso se deu visando a caracterização não apenas de dinâmicas mais amplas, como também de propriedades células específicas, ainda como na adequação de tempo e objetivos precificados para o presente trabalho. A anotação foi conduzida empregando a função *RenameIdents()* e posteriormente visualizada empregando *DimPlot()*.

A avaliação da abundância e proporção de cada tipo celular, *lin* e *sublin*, entre os diferentes períodos de tempo antes e após as imunizações foram realizadas usando o pacote *speckle* (PHIPSON *et al.*, 2022) e visualizadas empregando a função *geom_hist()* do pacote em R *ggplot2*. Ainda, a proporção de cada subtipo *sublin* foram visualizados adicionando a camada estética *facet_wrap()*.

Aspirando compreender mais à fundo as dinâmicas de respostas celulares, os agrupamentos anotados como linfócitos T, linfócitos B, e suas respectivas subpopulações, foram isolados e separados das demais células pela função *subset()*. As anotações *sublin* “B

memória”, “Plasmablastos” e “B naive” foram usadas para selecionar células B. Em contrapartida, as anotações “Treg”, “TCD8+” e “TCD4+” foram selecionadas para coletas células T. Após a geração de ambos os subconjuntos, foram conduzidas as etapas descritas na seção 3.7. Cada um destes subconjuntos foi convertido e exportado como arquivo *.rds* para análises subsequentes.

3.9 Análise de expressão gênica diferencial & enriquecimento de termos

A análise dos genes diferencialmente expressos (DGE, do inglês, *Differential Gene Expression*) foi conduzida pela função *FindMarkers()* do Seurat. A partir dos dados *lin*, as análises de DGE foram conduzidas exclusivamente em linfócitos T e B entre os seguintes períodos de tempo: T0 contra T7, T21 e T28, T21 contra T28 e T7 contra T21. Todos os genes com expressão média de *LogFoldChange2* acima de 0.10 foram incluídos. O teste estatístico usado para identificação dos DGE foi o MAST (FINAK *et al.*, 2015). A visualização dos dados foi feita por *Volcano plots* pelo pacote R *EnhancedVolcano*. Os genes com um *Fold change* maiores ou menores que 0.25 e valor *p* superior ou iguais a 0.05 foram considerados diferencialmente expressos *up* ou *down*, respectivamente.

A ferramenta web *Enrichr* (CHEN *et al.*, 2013) foi usada para as análises de enriquecimento por ontologia gênica (GO, do inglês, *Gene Ontology*). Os símbolos Entrez dos genes diferencialmente expressos, entre os períodos de tempo, foram usados para enriquecimentos dos termos em processos biológicos (GO:BP). As tabelas referentes a cada enriquecimento foram baixadas e convertidas em formato *.csv*. Apenas os termos enriquecidos com valores *p* menores que 0.05 foram usados para condução de interpretações biológicas.

3.10 Inferência de trajetória & pseudotempo

O pacote *Monocle* (TRAPNELL *et al.*, 2019) foi usado para condução das análises de inferência de trajetória (TI, do inglês, *Trajectory Inference*) e pseudotempo. Apenas os *subgrupos* de células B e T foram selecionados para condução de TI tendo como objetivo compreender mais a fundo as dinâmicas de desenvolvimento e diferenciação dos subtipos celulares frente à vacinação.

Utilizando-se das anotações de metadados do arquivo *meta.data* referentes aos subgrupos de linfócitos B e T, foi possível visualizar as trajetórias e pseudotempo pela função

plot_dimred(), bem como observar os genes mais importantes e expressos em cada agrupamento ao longo das trajetórias pela função *plot_heatmap()*.

3.11 Comunicação célula-célula

O pacote CellChat v1.6.0 (JIN *et al.*, 2021) foi empregado nas análises de comunicação célula-célula (CCC, do inglês, *Cell Cell Communication*). O CellChat possibilita a inferência, visualização e análises de intercomunicações celulares, baseado no banco de dados curados de interações ligante-receptor, CellPhoneDB (EFREMOVA *et al.*, 2020), usando modelos de ação em massa associados a avaliação de expressão gênica entre diferentes agentes contactantes a partir de dados de scRNA-seq. A anotação celular *sublin* foi empregada para CCC entre diferentes períodos de tempo.

Primeiramente, a função *subcluster()* conduziu a separação dos dados de scRNA-seq em períodos de tempo baseando-se na anotação dos metadados. Com isso, 4 arquivos foram gerados: *time0.rds*, *time7.rds*, *time21.rds* e *time28.rds*. Criou-se, individualmente, um objeto CellChat para cada arquivo empregando a função *createCellChat()* e foi usado para inferências de CCC a anotação “*Secreted Signalling*” do CellPhoneDB pela função *subsetDB()*. Adicionalmente, apenas genes expressos significativamente e interações celulares relevantes foram selecionadas pelas funções *identifyOverExpressedGenes()* e *identifyOverExpressedInteractions()*, respectivamente. A computação da probabilidade de interação de todos os complexos ligantes-receptores foi executada pelo *computeCommunProbPathway()*.

3.12 Repositório GitHub

Os códigos utilizados na execução dos programas, assim como arquivos referentes aos DGE e GO, entre os períodos de tempo, serão depositados e encontram-se publicamente disponíveis no repositório do GitHub (<https://github.com/dimitrisokolowski/scScripts>)

4. RESULTADOS & DISCUSSÃO

4.1 Controle de Qualidade, Integração & Anotação Celular

Os dados utilizados no presente estudo foram coletados no banco de dados SRA, do NCBI, oriundos de dois trabalhos independentes descritos anteriormente no item 3.2. Para fins

de convenção, os dados de Arunachalam e colaboradores (2021) e Brewer e colaboradores (2022) serão referidos como “A” e “B”, respectivamente. No total, foram analisados 15 indivíduos em 4 períodos de tempo, totalizando 60 amostras de scRNA-seq. A **tabela 1** descreve em detalhes os identificadores de cada amostra e seus respectivos metadados.

Tabela 1. Descrição dos identificadores de amostra e seus respectivos metadados.

Estudo	SRA	Amostras	Tecido	Protocolo	Período
Arunachalam (2021)	PRJNA721461	2047, 2049, 2051, 2052, 2053, 2055	PBMC	CITE-seq	T0, T7, T21, T28
Brewer (2022)	PRJNA775994	P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9	PBMC	scRNA-seq	T0, T7, T21, T28

Em termos de controle de qualidade, pode-se constatar, em praticamente todos os indivíduos, a presença de uma porção significativa de células cujo expressão de genes totais foram inferiores a 350, e continham uma elevada concentração de contaminação mitocondrial, sugerindo o alinhamento de *reads* contra genes associados a DNA mitocondrial. Todavia, em menor extensão, houve a presença de células com contaminação mitocondrial cuja expressão gênica foram acima do limiar estabelecido, indicando graus amenos, porém não menos importantes, de comprometimento e viabilidade celular. Tais graus de comprometimento celular são mitigados por adoção de boas práticas laboratoriais e experimentais, porém indissociáveis de protocolos de scRNA-seq baseados em microfluídica (MAZUTIS *et al.*, 2013).

Pode-se constatar uma evidente correlação linear de número de genes presentes com número de UMI sequenciadas em cada célula, ressaltando a relação entre profundidade de sequenciamento e genes detectados (LIU; ZHOU; WHITE, 2014). A execução do controle de qualidade não apenas reforçou uma correlação entre número de UMI/genos detectados, como reduziu em aproximadamente uma ordem de magnitude a contaminação mitocondrial previamente observada. Na **figura 10** visualiza-se para cada amostra analisada, os efeitos da filtragem de dados indicando o sucesso do controle de qualidade conduzidos e indicando um

alto grau de confiança da qualidade dos dados que seguiram para as etapas de bioinformática subsequentes.

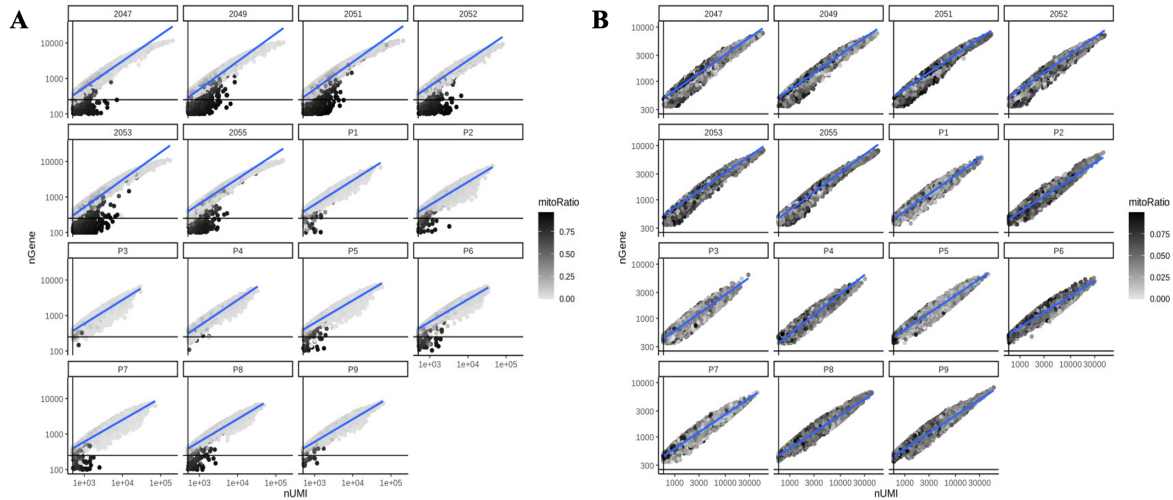


Figura 10. Controle de qualidade pré e pós filtragem. Visualiza-se o número de genes, no eixo y, e número de UMIs, no eixo x, para cada indivíduo empregado no presente trabalho. A concentração de contaminação mitocondrial pode ser avaliada pela legenda “MitoRatio”. Observa-se o resultado de viabilidade celular pré filtragem (A) e após filtragem (B). Nota-se aqui que “mitoRatio” da imagem B é uma ordem de magnitude menor do que da imagem A.

A anotação de agrupamentos celulares em experimentos de scRNA-seq é feita mediante a identificação de genes marcadores diferencialmente, e principalmente, expressos em cada agrupamento, viabilizando a inferência de vínculo transcricional com um possível perfil fenotípico particular. Apesar de amplamente empregada, essa estratégia é sujeita a erros, tanto em decorrência da natureza heurística da maioria dos algoritmos de agrupamento (ANDREWS; HEMBERG., 2018), quanto da possibilidade de expressão de mRNA não implicar necessariamente em tradução celular e síntese proteica (RADHAKRISHNAN; GREEN, 2016).

O surgimento de protocolos de scRNA-seq que vinculam métodos proteômicos de marcação fenotípica, em associação com avaliação de expressão gênica, como o CITE-Seq, contribuem com anotações celulares mais confiáveis e robustas (STOECKIUS *et al.*, 2017). No entanto, tratando-se de PBMC, contendo células dispostas de marcadores transcricionais associados a fenótipos muito bem estabelecidos, foram empregados, no presente trabalho, apenas a expressão de transcritos para anotação celular.

A definição das anotações *lin* e *sublin* utilizou-se de marcadores canônicos e/ou particularmente associados a tipos celulares específicos. A expressão significativa de *MS4A1*, por exemplo, é um marcador em nível de células únicas, praticamente exclusivo de linhagem

linfóide B. Por outro lado, a presença de *CD3E* é um grande indicativo de células comprometidas com linhagem linfóide T. Os demais marcadores podem ser predominantes vistos em determinados agrupamentos como *CD14* e *CD1c* característico de monócitos e DCs, respectivamente. Na **figura 12** mostra-se alguns marcadores básicos usados na definição dos principais agrupamentos.

Observou-se que o agrupamento “Desconhecido” dispõe da presença de marcadores antagônicos e totalmente discrepantes. O mesmo apresenta na metade à direita a expressão de *MS4A1*, enquanto a metade à esquerda tem uma expressão relevante de *CD3E*, marcadores de células B e T, respectivamente. Ao modificar o parâmetro *resolution* da função *FindClusters()* para valores de *0.8*, *1.0* e *1.2*, tal grupo não se dissociou em novos agrupamentos, indicando um perfil transcricional altamente similar. A **tabela S1** encontram-se na tabela os marcadores transcricionais utilizados na anotação de cada agrupamento.

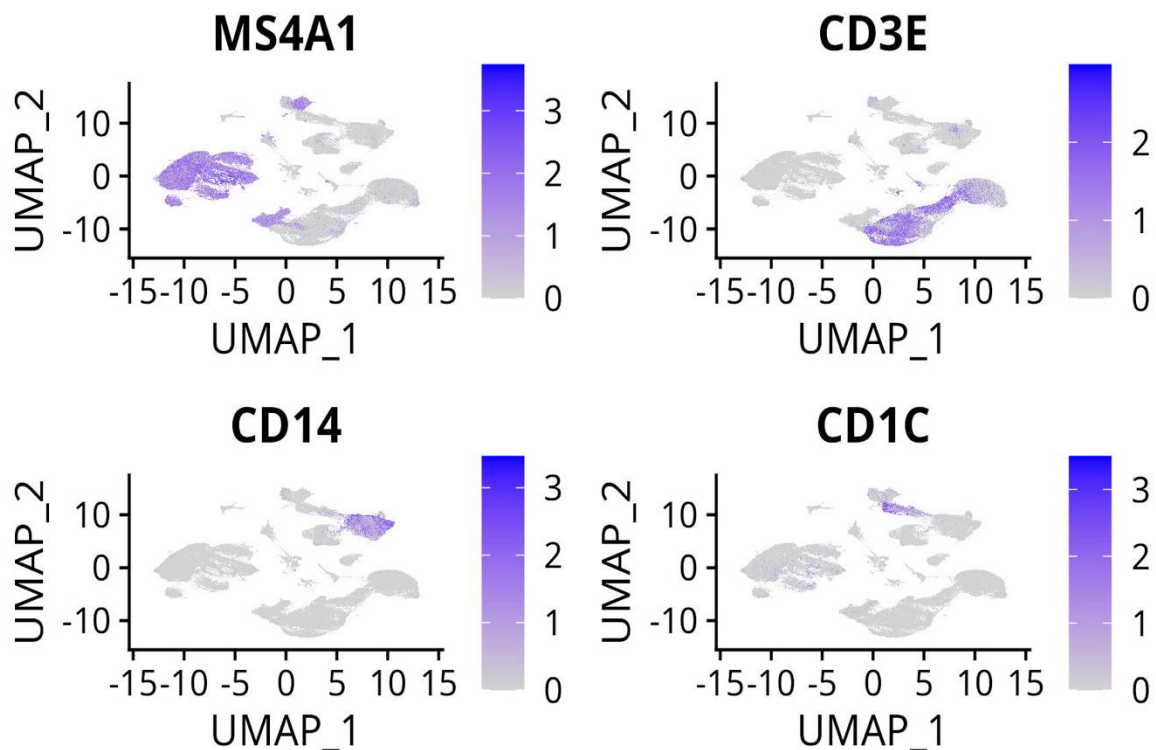


Figura 12. Marcadores transcricionais empregados na anotação dos agrupamentos celulares. Marcadores celulares canônicos foram preferencialmente empregados para anotação dos principais agrupamentos celulares identificados. Utilizou-se uma estratégia “Top-down” onde primeiro foram identificados marcadores generalistas para principais componentes celulares como células B (*MS4A1*) e T (*CD3E*), por exemplo, e posteriormente seguiu-se a busca para marcadores característicos de subpopulações específicas.

Uma população relativamente rara de células *CD3+* e *CD20+*, um marcador fenotípico canônico de células B, já foram descritas, possuindo relevante papel em doenças autoimunes,

infecções crônicas e câncer e são reconhecidamente grandes produtores de citocinas pró inflamatórias como IFN- γ e IL-17 (CHEN *et al.*, 2019). Se o agrupamento “Desconhecido” seria uma composição dessa população específica, no entanto, permaneceu em incógnito.

As etapas de integração e agrupamento seguidas pela anotação de cada agrupamento indicaram a presença esperada de subtipos celulares tipicamente encontrados em PBMC. No total, 16 anotações foram feitas, baseadas na expressão gênica de marcadores canônicos de cada agrupamento. Os seguintes grupos celulares foram caracterizados: 1) Linfócitos B: naïve, memória, plasmoblastos; 2) Linfócitos T: CD4+, CD8+ e regulatórias; 3) Monócitos: CD14+, CD16+ e Alternativos (Alt); 4) Células Dendríticas: cDC1, cDC2 e pDC; 5) Outros: plaquetas e HPC (do inglês, *Human Pluripotent Cells*). Um agrupamento foi anotado como “Desconhecido” pela incapacidade de discerni-lo com confiança, dos demais agrupamentos celulares anotados. Na **figura 11** visualiza-se a redução de dimensionalidade pelo algoritmo UMAP dos dados de scRNA-seq e anotação das linhagens celulares presentes.

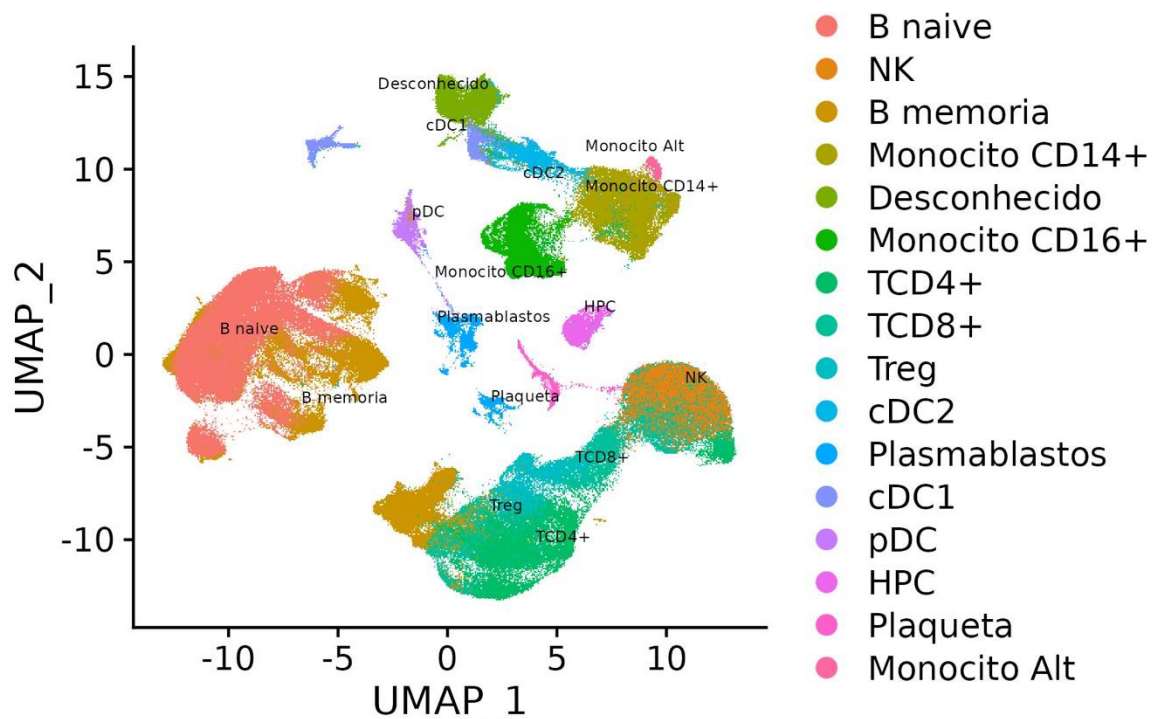


Figura 11. Redução de dimensionalidade e anotação dos agrupamentos. Visualiza-se os principais agrupamentos celulares identificados e anotados após a integração dos dados e redução de dimensionalidade pelo algoritmo UMAP. No total, obteve-se 16 grupamentos celulares, onde 15 foram anotados com sucesso, usando expressão gênica de marcadores fenotípicos canônicos para cada agrupamento, e apenas um fora categorizado como “Desconhecido”.

4.2 Dinâmicas de Abundância Celular

A linfopenia, processo caracterizado pela diminuição de linfócitos circulantes em sangue periférico, representa um dos principais achados fisiopatológicos da infecção por SARS-CoV-2, relacionando-se com severidade clínica e prognóstico da doença (AZKUR *et al.*, 2020; LUO *et al.*, 2020). Achados apontam um desenvolvimento de linfopenia global intensa, dentro de poucos dias até a primeira semana após surgimento dos sintomas, acometendo predominantemente pacientes com quadros graves, porém que dispõe de caráter transitório, retornando gradativamente aos níveis pré-sintomas nas semanas subsequentes (LIU *et al.*, 2020).

A redução global de linfócitos em sangue periférico, impacta concomitante à diminuição de subpopulações T específicas. Tipicamente, as populações mais comprometidas são TCD8+, TCD4+ e Treg, principalmente em indivíduos graves, mas também em moderados (CHEN *et al.*, 2020). Adicionalmente, a diminuição em menor extensão de linfócitos B também é predominante em casos graves (LIU *et al.*, 2020).

Ao avaliar, no presente trabalho, as mudanças na abundância e proporção de tipos celulares, entre os diferentes períodos de tempo, puderam ser visualizadas respostas à nível celular frente ao estímulo antigênico promovido pela vacinação. Primeiramente, usando a anotação *lin*, percebeu-se uma queda relevante de linfócitos T no tempo T7 em relação a pré vacinação, havendo uma recuperação gradativa já a partir do T21, com T28 dispondo de uma abundância celular similar ao tempo 0.

Avaliando a abundância celular usando a anotação *sublin* pode-se avaliar mais à fundo as dinâmicas celulares frente às diferentes administrações vacinais. Interessantemente, grande parte da pequena, porém perceptível alteração de proporção de linfócitos B, é explicada pela retração de células B naïve nos períodos T7 e T21 e uma maior contribuição de B de memória no tempo T28. Em termos de células T, também TCD4+ e TCD8+ caíram proporcionalmente, seguindo o padrão longitudinal relatado na anotação *lin*. Linfócitos T regulatórios, e demais agrupamentos, permaneceram constantes ao longo de todo o período de tempo.

A queda de células B naïve e aumento de células B de memória, após sucessivas imunizações, associa-se primariamente ao processo de desenvolvimento de memória imunológica após estímulo antigênico (PALM; HENRY, 2019). Não obstante, a redução de subpopulações de linfócitos T, particularmente TCD4+ e TCD8+, reiteram mudanças de dinâmicas celulares similarmente vistas na infecção natural (WANG *et al.*, 2020; WILK *et al.*, 2020).

Padrões de mudanças de abundância e proporção celulares pós vacinação já foram descritos na literatura. Por exemplo, em plataformas vacinas de vírus inativado, foram

observadas a diminuição, estatisticamente relevante, de subpopulações TCD4+, TCD8+ e Treg após a vacinação, apesar de uma linfopenia global não ter sido relatada, além de um aumento relevante de células B nos indivíduos vacinados (LIU *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2022). Em contrapartida, em estudos de scRNA-seq de vacinas baseadas em vetores de adenovírus, não foram vistas alterações relativas de abundância celular principalmente em nenhum período de tempo após a vacinação, ressaltando aspectos regulatórios vacina específicos (CAO *et al.*, 2021).

O agrupamento “Desconhecido” apresentou uma dinâmica excêntrica com uma significativa e rápida expansão no T7 e manutenção no T21, com retorno da abundância pré vacinação no período T28. Apesar da visualização de pequenas variações em abundância de linfócitos B ao longo do tempo, não aparenta ser significativo. Em contrapartida, há uma expansão clara de plasmoblastos no período T7, indicando a promoção de respostas humorais já na primeira semana de desafio imunológico. Quanto aos demais agrupamentos, permaneceram estáveis e/ou inalterados ao longo dos demais tempos. Na **figura 13** pode-se visualizar as modificações de abundância celular entre os diferentes períodos de tempo nas anotações *lin* e *sublin*.

Interessantemente, em desacordo com observações na literatura, que ressaltam um aumento relativo de abundância de células mononucleares, particularmente monócitos CD14+, tanto em quadros graves de COVID-19 (WEN *et al.*, 2020) quanto em imunizações (WANG *et al.*, 2022), não foram observadas alterações significativas, nos presentes dados, de populações monocíticas em nenhum período de tempo.

Nossas observações, no entanto, corroboram com Singh e colaboradores (2022), que ao comparem dinâmicas imunológicas de diversas vacinas contra COVID-19 via scRNA-seq, encontraram resultados similares ao presente estudo, onde alterações de populações monocíticas frente a vacinação, por BNT162b2, não foram vistas, sugerindo possíveis dinâmicas regulatórias BNT162b2 específicas. Todavia, se quaisquer alterações totais de monócitos em vacinação por BNT162b2 contribuem relevantemente em aspectos importantes, tais como eficácia vacinal, ainda requerem maiores investigações.

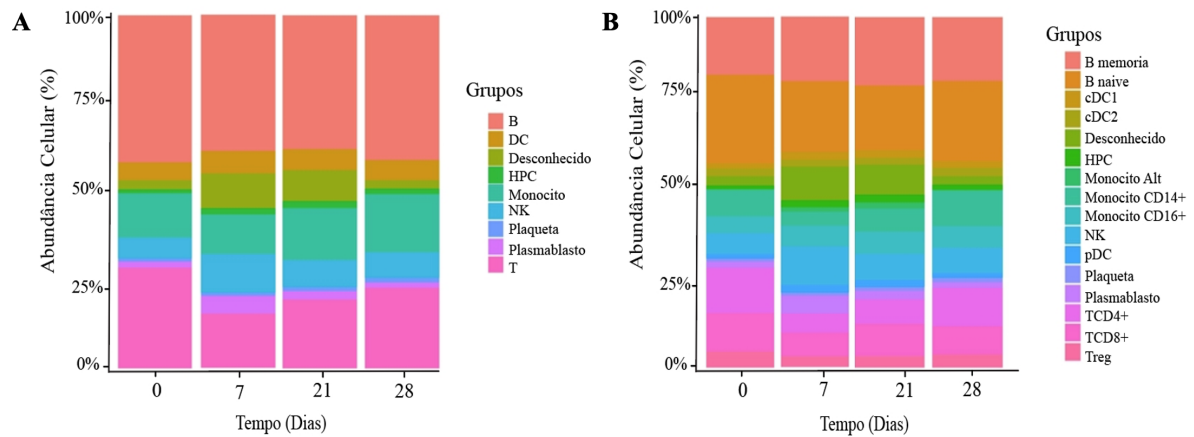


Figura 13. Proporção e abundância de agrupamentos celulares. Gráficos de composição celulares entre diferentes períodos de tempo pré e pós vacinação por BNT162b2 usando anotação *lin* (A) e sublin (B).

4.3 Análises de Expressão Gênica Diferencial

A avaliação de expressão de genes diferencialmente expressos, ou DGE, são amplamente empregados em estudos de sistemas biológicos pois viabilizam a compreensão de dinâmicas globais e específicas de estados, por exemplo, de saúde e doença nos mais diversos contextos biológicos (MARCO-PUCHE *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2022). No contexto de vacinação, análises transcritômicas, incluindo scRNA-seq, já foram amplamente empregadas em investigações de respostas imunes frente a imunização (WANG *et al.*, 2022; WAICKMAN *et al.*, 2019), prospecção de novos vetores virais vacinais (DORING *et al.*, 2021) e avaliação de eficácia entre esquemas vacinais heterólogos (LEE *et al.*, 2022) e de diferentes plataformas vacinais (CAO *et al.*, 2021).

As análises de DGE foram conduzidas a partir da anotação *lin* visando observar genes suficientemente expressos e estatisticamente significantes em linfócitos B e T. Inicialmente, em células B, os gráficos do tipo vulcão, apontaram perfis transcricionais diferenciados ao longo de cada período de tempo, indicando padrões de respostas imunológicas características frente ao estímulo vacinal em relação à pré-vacinação. Dinâmicas próprias e alteradas de expressão também foram observadas em linfócitos T. Na **figura 14** e **figura 15** visualiza-se genes diferencialmente expressos entre os dias 7, 21 e 28 em relação a dia 0 em linfócitos B e linfócitos T, respectivamente.

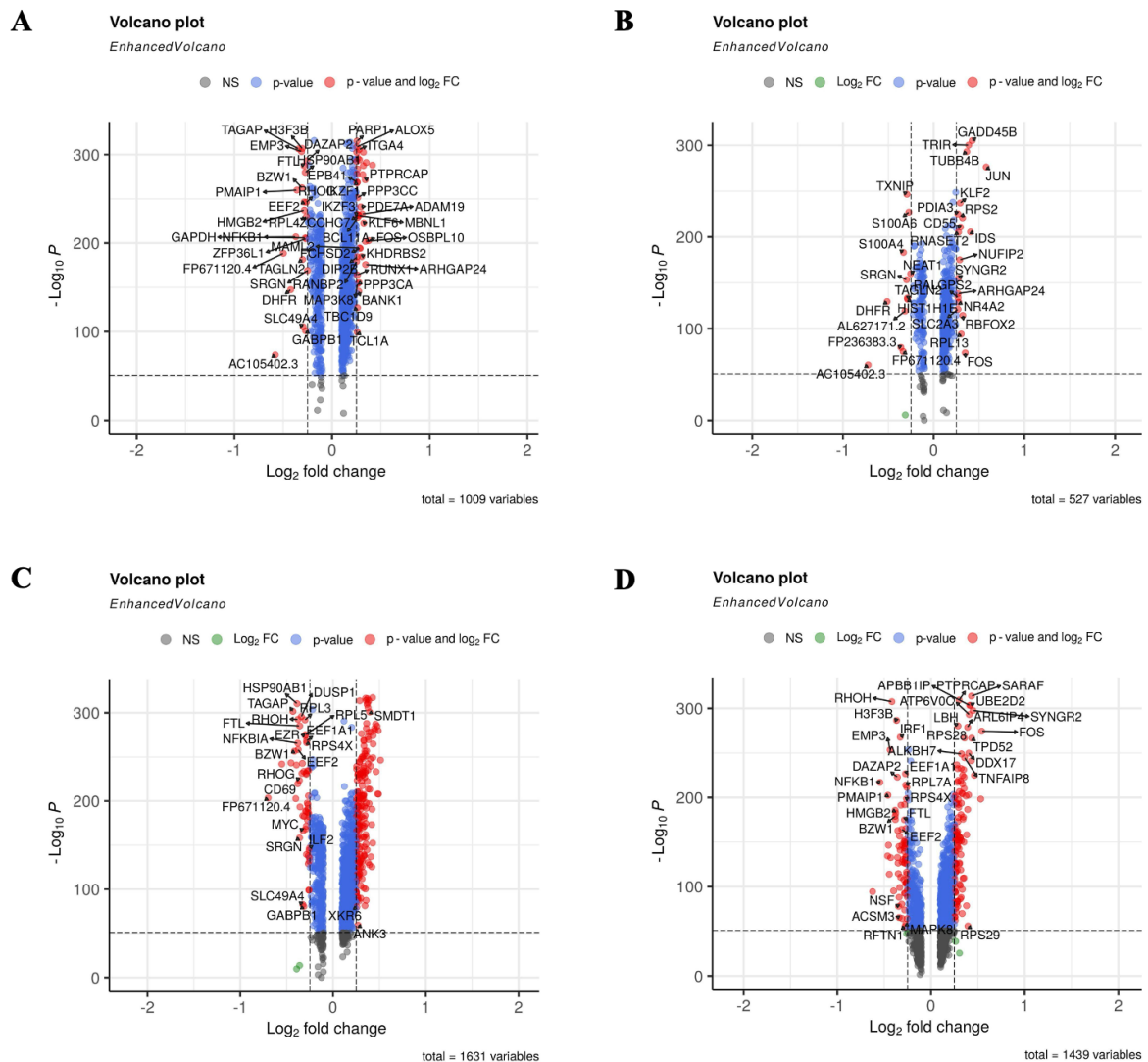


Figura 14. Expressão gênica diferencial em células B em relação ao Dia 0. Gráfico vulcão representando os genes diferencialmente expressos no agrupamento correspondente aos linfócitos B entre diferentes períodos de tempo em relação ao Dia 0. A imagem A, B, C e D, mostram os perfis transcricionais entre os períodos T0, T7, T21 e T28, respectivamente.

Observou-se, em células B, já no dia 7, a superexpressão de genes relacionados à ativação e proliferação de células B tais como JUN, TUB4B. Foram também vistos uma sub-expressão significativa de marcadores de células B *naive* como TXNIP. Em contrapartida, a sub-expressão de CD69 e DUSP1 indicam redução da ativação e proliferação celular na terceira semana após o estímulo antigênico inicial e sub-expressão de FTL evidencia uma redução esperada da apresentação de antígeno via células B. Por fim, no dia 28, há a presença de marcadores como SELL, JUNB, KLF2 e PFN1 sugerindo ativação, proliferação e indução de memória imunológica B específicas.

Ao se comparar os dias 21 vs. 7, pode-se ver marcadores atrelados à ativação e regulação de proliferação celular como CD69, DUSP1 e genes associados à via pró-inflamatória do NF-

kB, como o NFkB1. Em relação a 28 vs. 21 foram observados muitos genes ligados à rRNA, apesar de marcadores de interferon como IRF1 terem sido observados também. Na figura S1 pode-se visualizar os principais DGE dos dias 21 vs. 7 e 28 vs. 21 de células B, respectivamente.

JUN e JUNB são fatores de transcrição associados e produzidos em decorrência da indução da via de sinalização MAPK (do inglês, *Mitogen Activated Protein Kinases*) após estimulação de co-receptor celular CD40 no contexto de ativação de células B dependente de células T (LAIDLAW; CYSTER, 2020). Ainda, marcadores como CD69 e DUSP2 estão envolvidos na indução e regulação de proliferação de células B após estímulo antigênico, com envolvimento regulatório das vias MAPK/JNK (CIBRIAN; SANCHEZ-MADRID, 2019).

De fato, em trabalhos de caracterização de perfis imunes humorais e repertório em tonsilas via scRNA-seq, ressaltam estes genes como marcadores de ativação celular de células B e indicam outros genes como KLF2 e PFN1 como marcadores de indução de memória imunológica e indução de perfil de citotoxicidade celular, respectivamente (KING *et al.*, 2021).

A presença de DGE na população T demonstrou-se mais restrita e desafiadora. Possivelmente a menor quantidade total de linfócitos T em comparação a B nos dados do presente trabalho tenha impactado na presença de genes superexpressos. Todavia, a visualização de genes com JUN, JUNB e IFITM1 indicam ativação celular e expressão de genes relacionados a via de interferon do tipo I. No dia 21, ainda percebe-se a presença de genes como JUN, juntamente com expressão de FOXP1 e ST6GAL1. Por fim, após a 2ª dose, constata-se a reiterada presença de marcadores de ativação como JUNB, TRIR, NFAT e ST6GAL1.

A fim de compreender em maiores detalhes os perfis de expressão gênica promovidos pela vacinação entre os períodos de tempo, foram comparados os dias 21 vs 7 e dia 28 vs 21. Primeiramente, é notável a expressão de CXCR4, IRF1, IFITM1 duas semanas após o dia 7. Adicionalmente, em 28 vs 21, é perceptível visualização JUN, STAT1, CD69, KLF6, DUSP1, IL6ST. Na figura S2 pode-se visualizar os principais DGE dos dias 21 vs 7 e 28 vs 21 de células T, respectivamente.

Além da expressão relevante de marcadores de ativação celular amplos como JUN, JUNB, DUSP2 e CD69, a expressão de NFAT destaca a ativação de células T em períodos pós vacinação. NFAT (do inglês, *Nuclear Factor of Activated T Cells*) desempenha papel essencial na ativação de células T, secreção de citocinas T proliferativas como IL-2 e diferenciação de células T em perfis efetores como Th1. Ainda, a transcrição de STAT1 indiretamente correlaciona-se com ativação de linfócitos T, pela sua participação em apresentação de antígenos MHC dependentes, sendo também uma proteína altamente sensível à ligação de IFN- γ (CHATTERJEE-KISHORE *et al.*, 1998; LEE; KIM; CHOI, 2018).

No entanto, pode-se constatar a expressão de genes atrelados à imunorregulação T após a vacinação. Por exemplo, FOXP1 (do inglês, *Foxhead P1*) consiste num fator de transcrição importante na regulação da diferenciação de células T e regulação da expressão de FOXP3, constituindo um importante componente na manutenção da estabilidade celular de populações T regulatórias (KONOPACKI *et al.*, 2019; KAMINSKIY *et al.*, 2022).

Aprofundando-se no perfil transcricional de genes e vias relacionadas a IFN, pode-se ver globalmente uma expressão maior de genes como IRF9, ISG15 e JAK2 no dia 7, com uma atenuação no dia 21 (**Figura 16**) No entanto, uma elevada expressão fora vista no dia 28, portanto após o reestímulo antigênico vacinal, corroborando com achados prévios na literatura (LI *et al.*, 2022).

IFN consiste numa ampla família de citocinas pró inflamatórias e com abrangentes propriedades imunomodulatórias que influenciam, por exemplo, na promoção e apresentação antigênica, proliferação celular e atividades antimicrobianas (KAK; RAZA; TIWARI, 2018). No entanto, frente a infecções virais, são citocinas de potente atividade antiviral, atuando na inibição de transcrição de mRNA viral pela ativação da via de 2'-5' oligoadenilato sintetase (OAS, do inglês, 2'-5' oligoadenylate synthase) (CHOI *et al.*, 2015).

Particularmente, Interferons do tipo I apresentam um importante e complexo envolvimento na COVID-19, onde fatores como local de produção, período de tempo e duração da secreção contribuem tanto na resolução quanto na fisiopatologia da doença (HADJADJ *et al.*, 2020). De fato, uma disrupção de secreção de IFN-I nos primeiros dias após surgimento de sintomas, ligados com uma produção tardia, foram amplamente relatados em indivíduos com COVID-19, sendo um indicativo de mau prognóstico e gravidade clínica (TROUILLET-ASSANT *et al.*, 2020; LAING *et al.*, 2020).

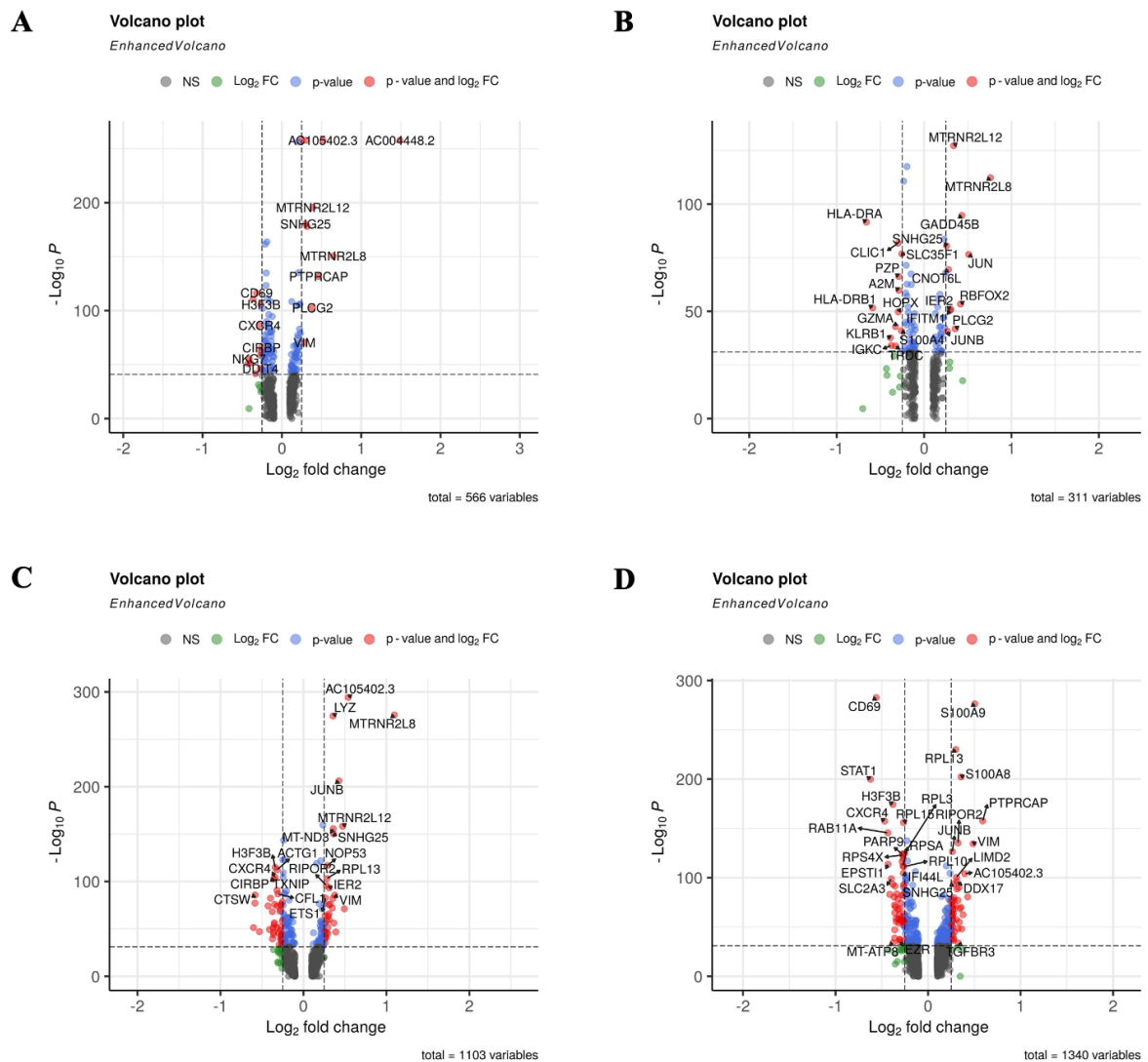


Figura 15. Expressão gênica diferencial em células T em relação ao Dia 0. Gráfico vulcão representando os genes diferencialmente expressos no agrupamento correspondente aos linfócitos B entre diferentes períodos de tempo em relação ao Dia 0. A imagem A, B, C e D, mostram os perfis transcricionais entre os períodos T0, T7, T21 e T28, respectivamente.

Percebe-se, todavia, que os benefícios quanto ao desenvolvimento de respostas IFN-I elevadas frente à vacinação por plataformas de mRNA são amplamente debatidos. Isso se deve a dualidade imunomodulatória da citocina num contexto de imunização via mRNA. Por exemplo, como citocina pró inflamatória, interferons indiscutivelmente conduzem à ativação de respostas imunes robustas, contribuindo na apresentação de antígenos e geração de memória imunológica (CHEN; LIU; CAO, 2017). Em contrapartida, IFN-I pode contribuir na condução de mecanismos de bloqueio traducionais e de degradação de mRNA exógeno, podendo limitar a geração de uma imunidade protetora (POLLARD *et al.*, 2013; LI; MACDONALD; RICE, 2015).

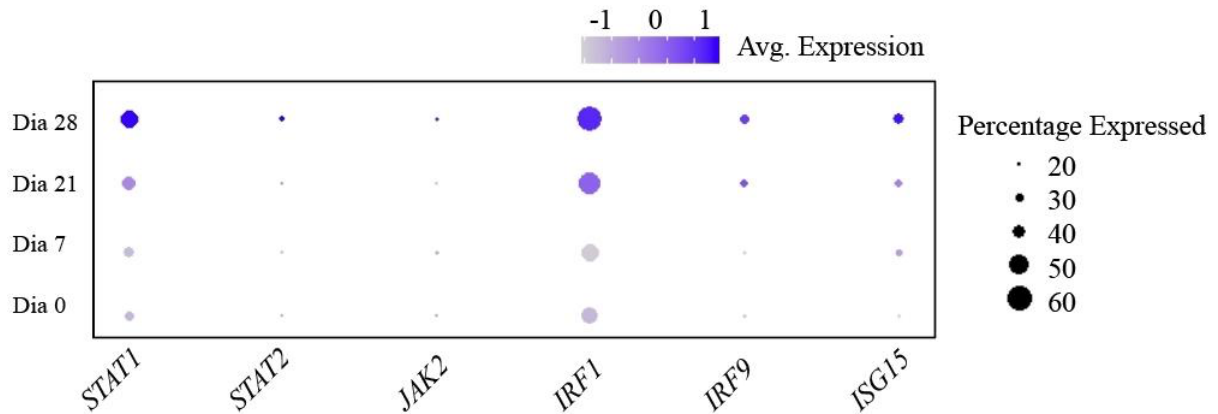


Figura 16. Expressão de IFN e vias relacionadas em células T. No gráfico do tipo ponto, observa-se a expressão de genes ou vias associadas à produção de IFN em células T em termos de expressão média e número total de células expressas. No eixo Y encontra-se os períodos de tempo, e no eixo X, visualiza-se os genes em questão.

Em estudos com indivíduos vacinados com BNT162b2, em comparação a indivíduos com COVID-19, não demonstrou-se a produção relevante de IFN-I e, consequentemente, de ISG (do inglês, *Interferon Inducible Genes*), ao mesmo tempo que desenvolveram-se respostas humorais efetoras com capacidade neutralizantes plenas (IVANOVA *et al.*, 2021). Ainda, indivíduos com imunodeficiências inatas à produção de IFN não tiveram atividades de células B comprometidas em respostas à vacinação por BNT162b2 detendo respostas de células B de memória S-específicas similares à indivíduos vacinados saudáveis (SOKAI *et al.*, 2022).

Por outro lado, existem resultados conflitantes na literatura quanto à indução e relevância do papel IFN-I no contexto da vacinação por BNT162b2. Li e colaboradores (2022) estudaram mecanismos de respostas inatas e adaptativas frente à vacinação por BNT162b2 em camundongos apontando uma elevada produção de IFN- γ , particularmente após 2^o dose, e evidenciando respostas TCD8⁺ específicas dependentes de IFN- γ via sinalização por MDA5 sugerindo, portanto, um envolvimento importante da citocina na ativação e geração de respostas imunológicas efetivas frente à imunização.

A identificação da expressão de genes atrelados à interferon ou vias tendo interferon como ligantes, no presente trabalho, apontam a expressão da citocina e sua influência em dinâmicas imunes pós vacinação. O sucesso indiscutível da vacina BNT162b2 (THOMAS *et al.*, 2021; MOREIRA *et al.*, 2022) sugere um papel importante de IFN-I neste contexto, ou pelo menos não impeditivo na indução de imunidade efetiva, sugerindo que fatores como desenho vacinal, sistemas de carregamento, dosagem, período de administração e, até mesmo, fatores patogênicos específicos, impactem relevantemente na imunogenicidade vacinal e no envolvimento e relevância de IFN (HASSETT *et al.*, 2021; PAYNE *et al.*, 2021; FANG *et al.*, 2022).

Portanto, percebe-se que os dados obtidos corroboram com a literatura e indicam que a indução de interferon mostra-se um fator importante para geração de imunidade pela vacinação com BNT162b2. Todavia, mesmo na ausência de secreção de IFN, em situações específicas, obteve-se resultados de imunização satisfatórios.

4.4 Análises de Ontologia Gênica

A fim de compreender detalhadamente a possível função e relevância biológica das diferenças de expressão gênica entre os períodos de tempo, em células B e T, foram conduzidas análises de enriquecimento. As análises de enriquecimento compreendem ferramentas computacionais de inferência de função biológica de conjunto de genes de interesse, a partir da comparação com genes similares com função biológica previamente anotada e incorporados em bancos de dados públicos (XIE *et al.*, 2021).

Priorizou-se a busca de termos relacionados à ativação e regulação de respostas de células B e T, visando compreender as dinâmicas de respostas imunes frente à vacinação. Primeiramente, na **figura 17**, observou-se um significativo enriquecimento de termos ligados à ativação, sinalização celular via BCR e diferenciação de células B nos dias 21 e, em menor extensão, no dia 28. Adicionalmente, o baixo enriquecimento de termos relacionados a regulação, incluindo negativa, da ativação e proliferação de linfócitos B, indicam a produção de um estímulo imunogênico agudo, induzindo uma significativa e duradoura resposta humoral já após a primeira dose.

O desenvolvimento de respostas humorais efetivas, particularmente atrelados a produção de anticorpos de caráter neutralizante, é crucial na resolução da infecção por SARS-CoV-2 e geração de imunidade imunológica frente à imunização (FAVRESSE *et al.*, 2021). Apesar da indução de respostas humorais satisfatórias não ser exclusividade de vacinas de plataforma de mRNA (WU *et al.*, 2021), resultados superiores da vacinação em capacidade neutralizante em BNT162b2 em relação outras plataformas vacinais, ressaltam o sucesso dessa plataforma vacinal (TERPOS *et al.*, 2022; PADHIAR *et al.*, 2022).

Apesar da ausência de termos enriquecidos relacionados à ativação e proliferação celular no dia 7, constatou-se um enriquecimento significativo nos dias 21 e 28 em relação à pré vacinação, provavelmente em decorrência da formação de GCs, que se desenvolvem entre 10-14 dias após o estímulo antigênico inicial e, como consequência, viabilizam ativação de células B via T-dependente (VICTORA; NUSSENZWEIG, 2022).

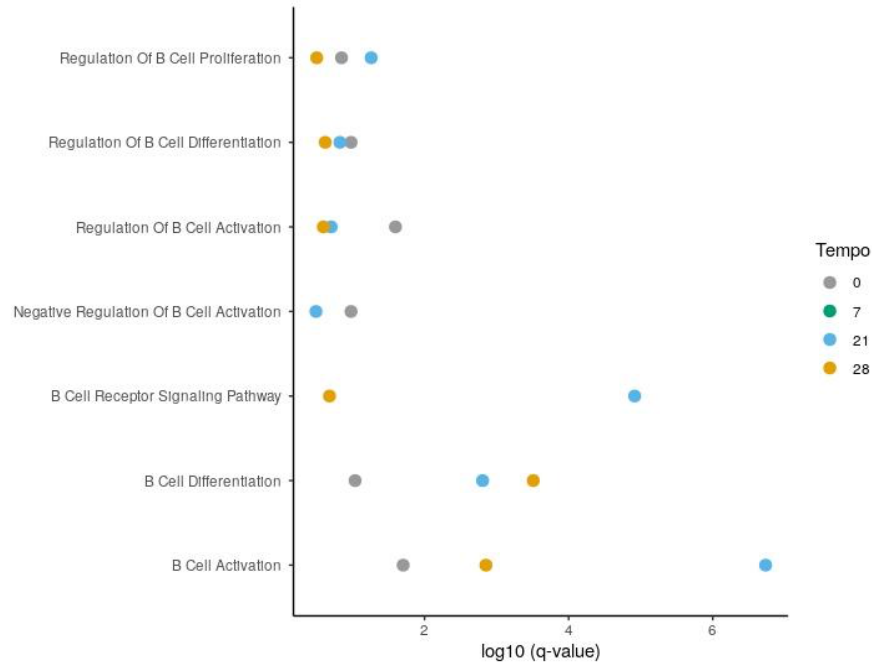


Figura 17. Ontologia gênica em células B. Visualiza-se os principais termos associados à ativação e proliferação celular em linfócitos B entre os diferentes períodos de tempo pré e pós vacinação em termos de Q-value.

De fato, em esquemas vacinais empregando BNT162b2, uma produção relevante de anticorpos anti-S ou anti-RBD foram observados já a partir de 10 dias após a primeira dose do imunizante (DANESE *et al.*, 2021). De modo similar, a produção de anticorpos de potencial neutralizante seguiu um padrão cinético parecido, detectando-se respostas neutralizantes a partir de 10 dias contra diferentes variantes virais (MILETO *et al.*, 2021).

Ainda, a identificação de termos atrelados a produção de citocinas apontou termos relacionados a regulação positiva de produção de IL-2 e TNF no Dia 21. Não obstante, a regulação positiva de vias de sinalização como JNK e MAPK, particularmente no dia 7, indicam uma forte estimulação e possivelmente ativação de células B, e secreção de citocinas linfoproliferativas T específicas como IL-2 (OVERWIJK; TAGLIAFERRI; ZALEVSKY, 2020). As **figuras S3** e **S4** apontam termos GO relacionados à citocinas e sinalização celular em células B, respectivamente.

Em contrapartida, as análises de enriquecimento gênico em linfócitos T apontaram um elevado enriquecimento, já na primeira semana após a 1^o dose, de termos relacionados a processamento e apresentação de antígenos via MHC de classe I, regulação positiva de células T e produção de citocina via células T. Ainda, termos associados a regulação negativa de ativação e diferenciação de populações de linfócitos T mostraram-se, muitas vezes, com enriquecimento menor nos períodos pós vacinação em relação ao dia 0, indicando o desenvolvimento de respostas adaptativas celulares coordenadas e finamente reguladas.

Respostas T específicas com produção de respostas polarizadas Th1 e secreção de IFN- γ robustas foram observadas após vacinação com BNT162b2 (SAHIN *et al.*, 2021). Não obstante, memória imune T específica demonstraram-se duradouras, mantendo-se relevantes até 6 meses após esquema vacinal completo, apresentando ainda uma correlação diretamente proporcional de células B e Tfh (GOEL *et al.*, 2021).

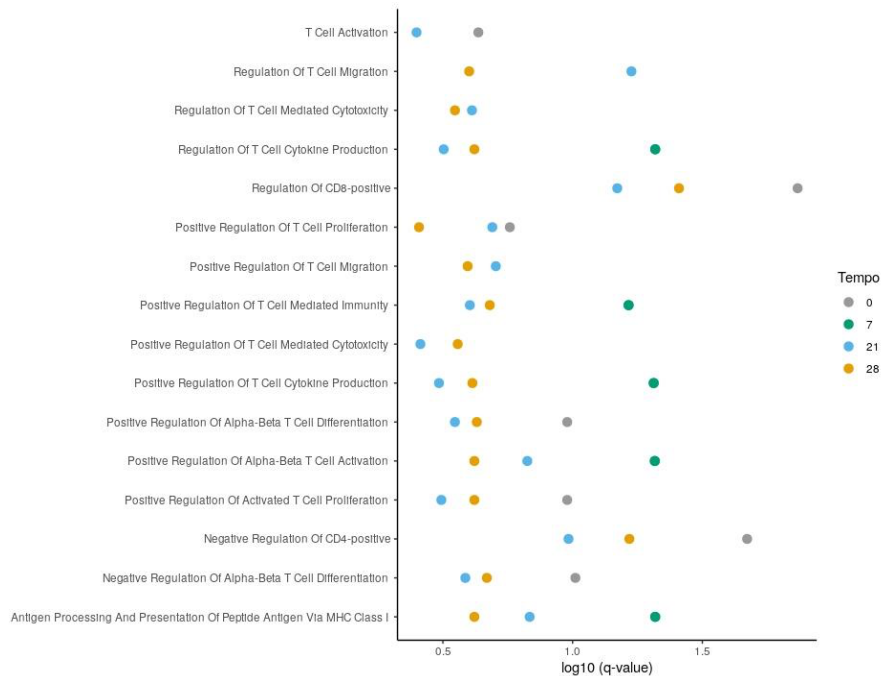


Figura 18. Ontologia gênica em células T. Visualiza-se os principais termos associados à ativação e proliferação celular em linfócitos T entre os diferentes períodos de tempo pré e pós vacinação em termos de Q-value.

4.5 Dinâmicas de Trajetória Celular & Pseudotempo

A fim de identificar as diferentes subpopulações de células B e T no conjunto de dados, foi conduzido o isolamento e reagrupamento dessas subpopulações em relação aos demais agrupamentos como descritos na seção 3.8.

Primeiramente, foram identificadas populações de células B naïve e memória com isotipo convertido (IgM-) e isotipo não convertido (IgM+), compondo o principal agrupamento celular, como indicado pela **figura 19**. Ainda, populações de plasmoblastos encontraram-se presentes, apesar de relativamente distantes do agrupamento principal indicando perfil transcricional populacional particular e diferenciados em relação ao agrupamento principal.

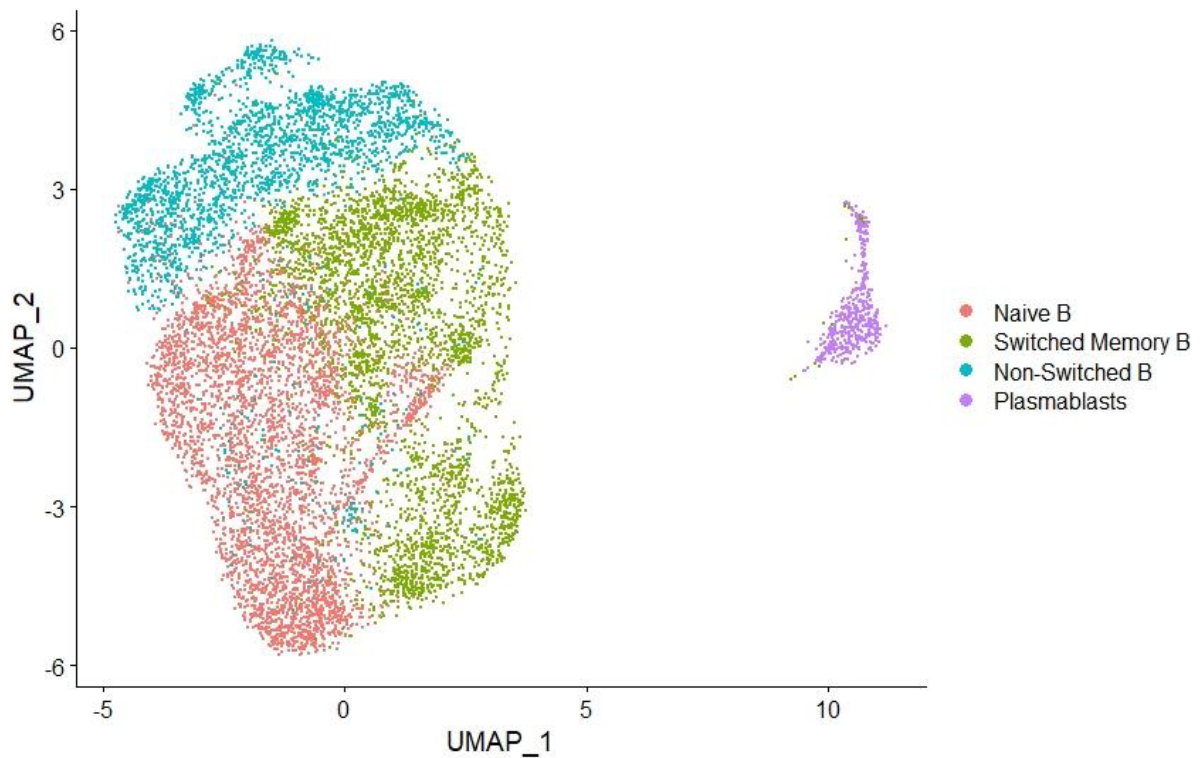


Figura 19. Subpopulações de linfócitos B. O reagrupamento exclusivo de células B da anotação *lin* permitiu identificar e anotar a presença de 4 distintas subpopulações de células B: Células B naïve, células B memória isotipo convertido (IgM⁻), células B memória isotipo não convertido (IgM⁺) e plasmoblastos.

As subpopulações de linfócitos T foram mais amplas e complexas em relação aos subtipos de células B. Observou-se células TCD4⁺ naïve e TCD8⁺ naïve e de memória, células Tfh, assim como populações de células NK, possivelmente de fenótipo NKT. Interessantemente, células T invariantes de mucosa (MAIT, do inglês, *Mucosal-associated Invariant T cell*) estavam presentes assim como uma pequena e distante população, em relação ao agrupamento principal, de monócitos clássicos. Este último pequeno grupo foi removido por se tratar de grupos celulares de linhagem mielóide e não linfóide T. Na **figura 20** visualiza-se todas as subpopulações de células T identificadas.

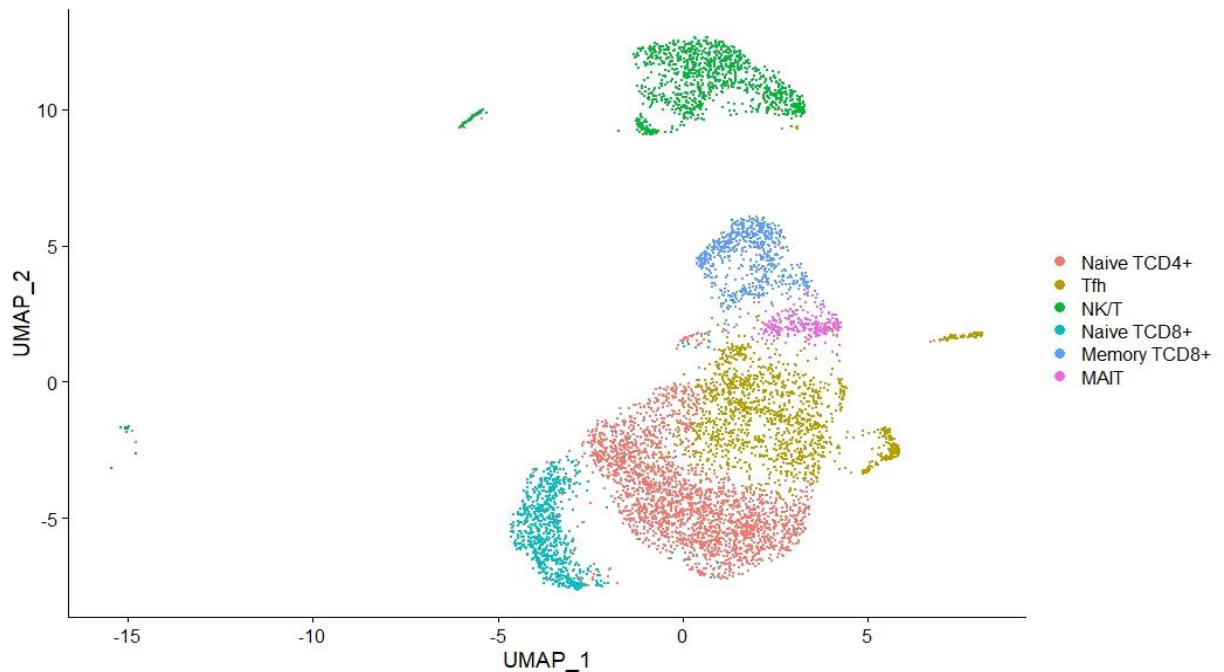


Figura 20. Subpopulações de linfócitos T. O reagrupamento exclusivo de células T da anotação *lin*, permitiu identificar e anotar a presença de 6 distintas subpopulações de células T.

Em seguida, conduziram-se análises de inferência de trajetória e pseudotempo visando identificar dinâmicas de diferenciação e progressão celular estimulados pela vacinação baseados nas anotações anteriormente descritas. Para isso, o *software* Monocle (TRAPNELL *et al.*, 2014) foi empregado. A ferramenta ao representar perfil de expressão celular como pontos em espaço euclidiano e reduzir a dimensionalidade de cada ponto visando obter uma representação bidimensional, consegue construir uma MST (do inglês, *Minimum Spanning Tree*) e traçar o caminho mais longo entre a MST de células transcricionalmente similares, produzindo finalmente uma trajetória celular.

A trajetória celular das subpopulações de células B apontaram dois pontos de bifurcação como visto na **figura 21**. O primeiro, entre o estado 1 e 5, compostos pelos linfócitos B e plasmócitos, respectivamente. Uma segunda bifurcação foi observada, antecedida por uma pequena fração de células de estado 2 e sucedidas pela ramificação de estado 3 e 4, sendo estas duas últimas representando células B de memória com isotipo não convertido e convertido, respectivamente. A **figura S5** mostra em pseudotempo a diferenciação celular das subpopulações de células B.

Tais dinâmicas de diferenciação celular são congruentes quanto às etapas e períodos temporais de geração de memória imunológica, tendo como células B naïve o ponto inicial de ativação imune humoral, culminando no desenvolvimento de células B de memória (INOUE, KUROSAKI, 2023). À propósito, a bifurcação 1 demonstra uma produção relevante de

plasmoblastos e aponta uma ativação e maturação B extrafolicular rápida e associada a desenvolvimento de anticorpos de baixa afinidade, provavelmente pela ausência de hipermutação somática (SHM, do inglês, *Somatic Hypermutation*).

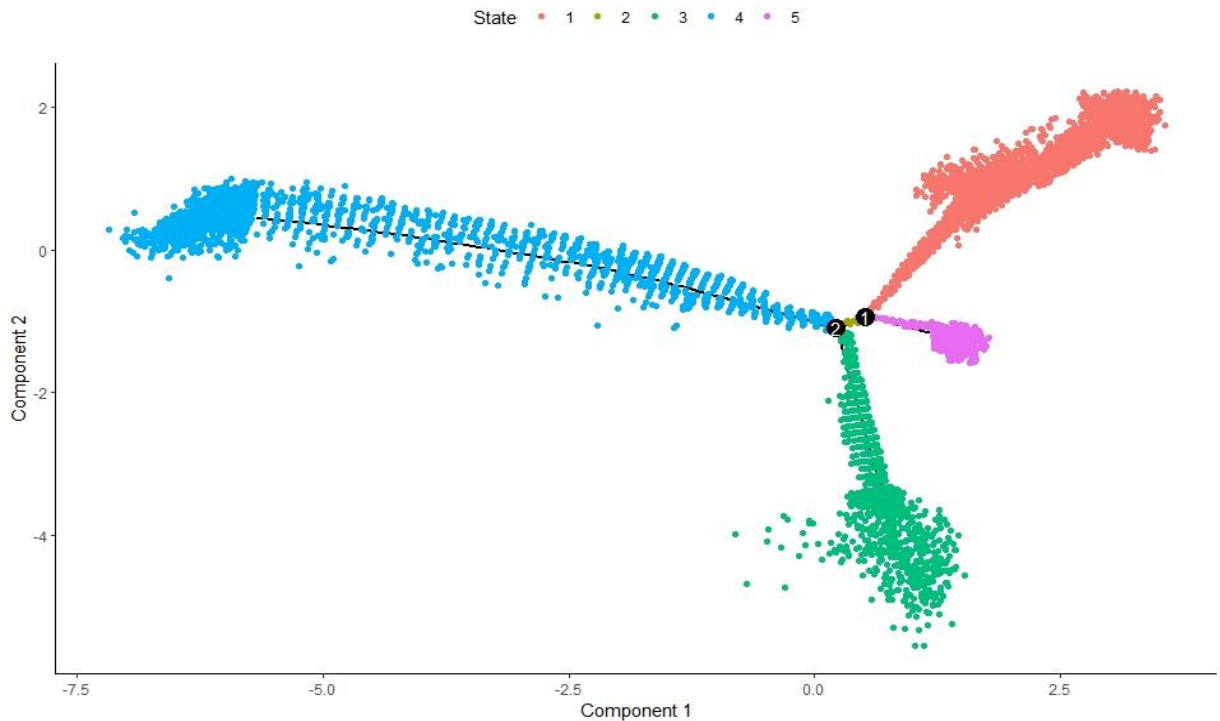


Figura 21. Inferência de trajetória em células B. A análise de trajetória contabilizou 5 diferentes estados de transição celulares com dois distintos pontos de ramificações em subpopulações de linfócitos B. O estado 1, 3, 4 e 5 correspondem a células B naïve, B memória convertido, B memória não convertido e plasmoblastos, respectivamente. O estado 2 consiste num pequeno ponto de transição celular predito entre os pontos de bifurcação.

De fato, a baixa taxa de SHM em repertórios imunes B em indivíduos infectados por COVID-19 fora comumente relatada na literatura (NIELSEN *et al.*, 2020; XIANG *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2022), apesar de maiores taxas de SHM serem observadas em clonotipos expandidos e em anticorpos de isotipo convertido (BIEBERICH *et al.*, 2021). Não obstante, achados similares após vacinação por BNT162b2 foram também constatados (SOKAL *et al.*, 2021). Apesar da baixa SHM em repertórios de células B não serem uma exclusividade da infecção por SARS-CoV-2 (GAO *et al.*, 2019), possíveis causas como comprometimento de formação de GCs durante a infecção (KANEKO *et al.*, 2020) e melhor reconhecimento de epítomos virais via anticorpos da linhagem germinativa (KREER *et al.*, 2020) poderiam explicar tal fenômeno.

O ponto de bifurcação identificado nas análises de TI entre células B de memória de isotipo convertido e não convertido ressalta um transcrito e fenótipo distintos, diferenciando-se em grande parte pela expressão de IgD e/ou IgM. Interessantemente, a redução de populações

B de memória de isotipo não convertido em doenças autoimunes e em infecções, como em indivíduos graves para COVID-19, são amplamente relatados na literatura (ROCHA *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2017).

Castleman e colaboradores (2023) ao analisarem PBMC de indivíduos saudáveis, vacinados com BNT162b2, convalescentes com quadros leves e hospitalizados com quadro grave para COVID-19, observaram uma diminuição significativa de células B de memória com isotipo não trocado neste último grupo. Todavia, como a infecção por ou vacinação contra SARS-CoV-2 modularia as dinâmicas B memória com isotipo não convertido específicas e como essa população celular contribuiria para indução de imunidade protetora, ainda necessitam ser melhor compreendidas.

As trajetórias inferidas nas populações de células T demonstram-se similares em termos de complexidade em relação as células B, apesar do maior número de subgrupos celulares presentes. Como visto na **figura 22**, foram observados 2 pontos de bifurcação e diferenciação celular. Resumidamente, pôde-se interpretar a partir da bifurcação 1 a separação de células T naive e população de Tfh, com ponto de bifurcação 2 indicando a diferenciação pseudotemporal mais longa ou distal composta de TCD8⁺ de memória, MAIT (do inglês, *Mucosal Associated Invariant T*) e NK/T. A **figura S6** mostra em pseudotempo a diferenciação celular das subpopulações de células T.

A importância de linfócitos T na proteção contra COVID-19 e indução de imunidade protetora via vacinação reside no desenvolvimento de subpopulações T com funções amplas e específicas, incluindo produção de citocinas com propriedades antivirais, tais como IFN-I, auxílio na promoção de respostas humorais neutralizantes e memória humoral duradoura e respostas citotóxica antivirais potentes (LEE; ASHKAR., 2018).

As funções de subpopulações como TCD4⁺ naive e TCD8⁺ memória são muito bem estabelecidas no contexto de infecção e vacinação contra SARS-CoV-2 (PRIMORAC *et al.*, 2023). Em contrapartida, populações T não convencionais, que compreendem células T não restritas a reconhecimento de antígenos via MHC, e não dependentes de TCR, como MAIT e NKT apresentam um papel mais obscuro nos contextos de infecção e/ou vacinação contra COVID-19 (BJORKSTROM; PANZETTA, 2021).

Alguns achados sugerem, todavia, um envolvimento e possível contribuição de populações MAIT em indivíduos graves para COVID-19. Particularmente, a expressão de genes associados a quimiotaxia, juntamente com enriquecimento de vias de piroptose, além de evidências de elevada infiltração pulmonar de células MAIT, principalmente em indivíduos graves, implicam essa população celular com papel relevante na fisiopatologia da COVID-19

(PARROT *et al.*, 2020; SHI *et al.*, 2021). Ainda, a expressão de CD69, um marcador de proliferação celular, em populações MAIT, correlaciona-se com gravidade de COVID-19 (JOUAN *et al.*, 2020).

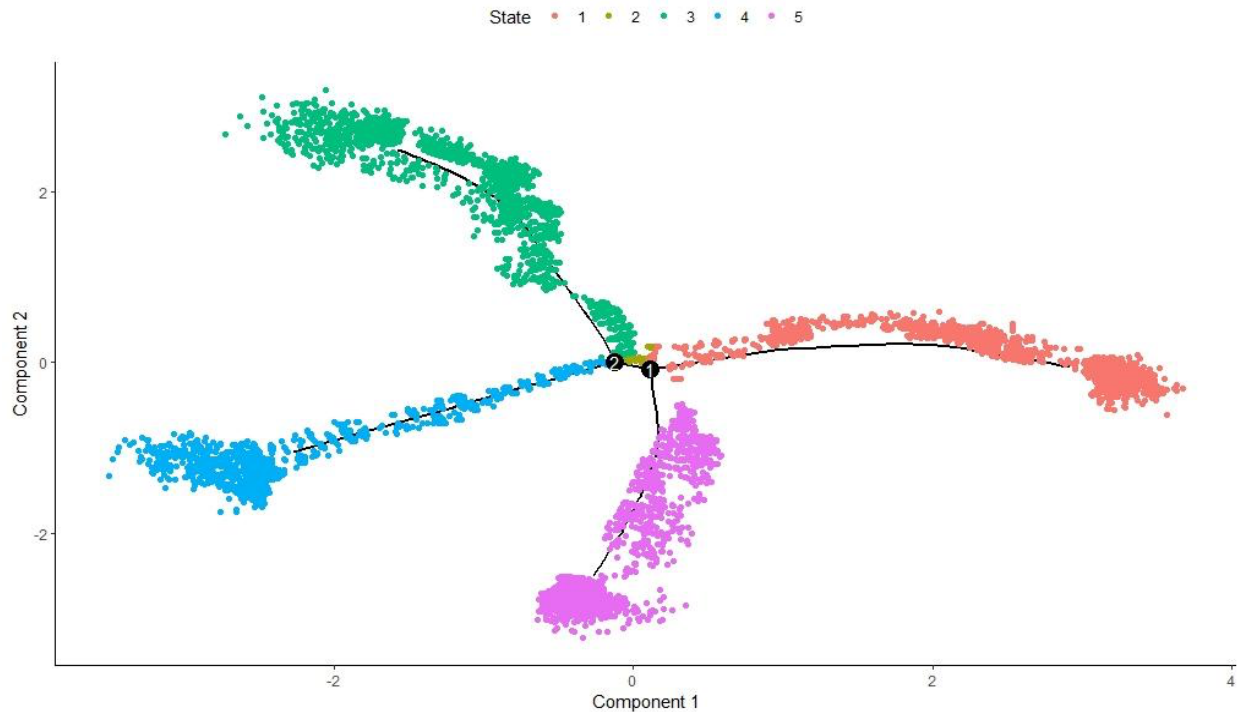


Figura 22. Inferência de trajetória em células T. A análise de trajetória contabilizou 5 diferentes estados de transição celulares com dois distintos pontos de ramificações em subpopulações de linfócitos T. O estado 1 e 5 correspondem a possivelmente células T naive e Tfh, respectivamente. Os demais estados indicam a composição por grupos de TCD8+ memória, MAIT e NK/T, respectivamente.

Células NK, no âmbito da COVID-19, apresentam-se disfuncionais, em quadros graves, tipicamente hiperativas por estimulação IL-15 dependente e, com alguns trabalhos, indicando sub-expressão de genes atrelados a citotoxicidade (LIU *et al.*, 2021; YAO *et al.*, 2021). No contexto da vacinação por BNT162b2, não foram observadas diferenças em frequência, subtipo, fenótipo ou funcionalidade de NK até 1 mês após a vacinação inicial, apesar da frequência de células NK NKG2C+ pré vacinação correlacionaram-se positivamente com titulação de anticorpos anti-SARS-CoV-2 35 dias após a 1ª dose (CUAPIO *et al.*, 2022).

4.6 Análises de Comunicação Célula-Célula (CCC)

A exposição a antígenos virais via imunização promove alterações substanciais nas dinâmicas celulares e moleculares dos componentes de imunidade inata e adaptativo (GERMIC *et al.*, 2019). Tal processo decorre, em grande medida, por mecanismos finamente controlados

de comunicação célula-célula mediados, por exemplo, pela secreção de citocinas pró-inflamatórias que auxiliam na proliferação celular e desenvolvimento de perfis efetores, assim como de freios moleculares que inibem a promoção de respostas excessivas e desproporcionais (LATZ; XIAO; STUTZ, 2013; CUI *et al.*, 2014).

As análises de CCC viabilizam a identificação do número e força de interações entre os tipos celulares presentes, propiciando um entendimento mais compreensivo quanto aos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nas respostas imunes frente à vacinação e geração de uma imunidade protetora. Para fins de simplificação, o termo “interatoma” será empregado para descrever as diferentes interações inferidas entre os distintos grupos celulares previamente anotados. Ainda, os termos *in* e *out* serão empregados para designar grupos celulares tidos como promotores de sinalização celular, ou simplesmente sinalizadores, e receptores de sinalização, ou receptores, respectivamente.

Ao avaliar globalmente, o interatoma entre cada tipo celular, entre os distintos períodos de tempos pré e pós vacinação, percebe-se uma rede interativa altamente complexa, independente do período de tempo, revalidando e ressaltando a complexidade celular e molecular imunes envolvidos na indução de uma imunidade protetora e duradoura. Na **figura 23** visualiza-se o interatoma da anotação *lin* em cada período de tempo. Não obstante, análises de CCC ainda possibilitam avaliar padrões de sinalização celulares ao indicarem o papel de cada grupo celular definido como sinalizadores e/ou receptores, possuindo como métrica a força de interação inferida entre cada período de tempo.

Inicialmente, percebe-se um padrão de sinalização bem definido no período pré-vacinação. Nota-se, um primeiro grande grupo constituído por monócitos clássicos, não clássicos e alternativos, pDC e B memória com papéis “passivos” no contexto de sinalização, atuando como grandes receptores interacionais como pode-se notar na **figura 24**. Ainda, um segundo grande grupo, na metade inferior do gráfico, encontra-se grupos celulares com padrão “inertes”, não estabelecendo ou recebendo interações de grande magnitude. Todavia, os diferentes tipos de cDC, principalmente cDC2, são interacionalmente muito ativas, onde células Treg e TCD8+ também se diferenciam do grupo celular inferior como células de perfil *out* mais robustas.

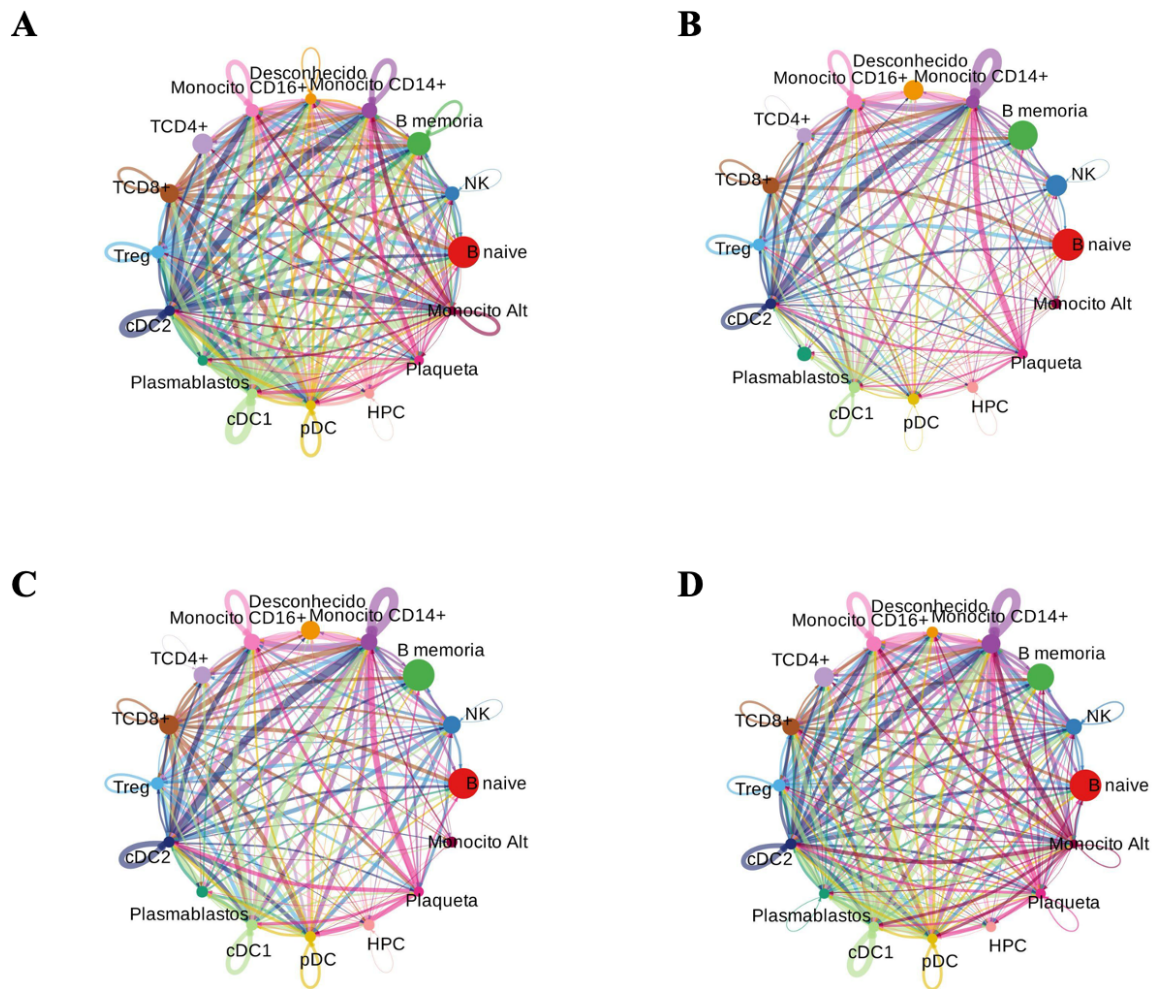


Figura 23. Interatoma global entre grupos celulares. Gráfico do tipo circos apresentando a força de interações entre cada linhagem celular de anotação *lin*. Cada linha (conector) conectando um grupo celular ao outro representa interações sinalizatórias entre eles, ao passo que a largura de cada conector se traduz na força de interação entre grupos. As imagens **A**, **B**, **C** e **D**, mostram o interatoma entre os períodos T0, T7, T21 e T28, respectivamente.

As cDCs atuam como células sentinelas do sistema imunológico, constantemente coletando antígenos oriundos de seus respectivos microambientes, processando-os e apresentando-os via MHC a diferentes subpopulações linfocíticas como Tregs e TCD8+ (HILLIGAN; RONCHESE, 2020). Portanto, o enriquecimento de perfil *in* e *out* em cDC1 e cDC2, ainda no contexto pré vacinação, corrobora o papel especializado destas células na apresentação de antígenos e evidencia as DCs como uma ponte de comunicação entre a imunidade inata e adaptativa (HUA; HOU, 2020).

Após a 1ª dose, observou-se uma redução global de força de interação *in* e *out* em relação à pré-vacinação. Apesar de sutis, houve perceptíveis alterações no panorama interatômico geral. Os monócitos CD14+ adotam papel interacional particularmente ativo *out*, comparado ao dia 0, e observou-se a inversão do perfil interacional *out* dominante de cDC1

para cDC2. Curiosamente, é possível constatar um papel interacional neutro de plasmoblastos, monócitos alternativos e agrupamento “desconhecido”, enquanto os demais grupos celulares permanecem praticamente inalterados, apesar da redução interacional *out* global.

Monócitos clássicos, fenotipicamente caracterizados como CD14^{hi}/CD16^{low}, são células com relevante participação na promoção de respostas pró inflamatórias através da secreção de citocinas e, conseqüentemente, recrutamento de células imunes para sítios específicos de lesão e/ou infecção (PINTI *et al.*, 2016). Portanto, diante do estímulo antigênico promovido pela vacinação, o estabelecimento de perfil *out*, ressalta o papel destas células num contexto inflamatório vacina induzido.

No dia 21 não é visto nenhuma dinâmica interacional particularmente discrepante em relação ao dia 7^o, com exceção de um desenvolvimento de caráter *out* de plasmoblastos levemente acentuados. Por fim, a 1^a semana após a 2^a dose apresenta um panorama interacional global *out* expandido, particularmente de células como cDC1 e monócitos clássicos e não clássicos.

Apesar da presença de diferentes subpopulações de DCs nos dados obtidos, há um predomínio visível de perfil *out* de cDC1 em relação a cDC2 em quase todos os períodos de tempo pós vacinação. Reconhecidamente, as cDC1 são as únicas APC capazes de conduzir apresentação cruzada de antígenos no contexto *in vivo* (DEN HAAN; LEHAR; BEVAN, 2000). Ainda, cDC1 são potentes ativadores de células TCD8⁺, sendo uma população celular em foco no desenvolvimento de terapias antivirais e antitumorais (PATENTE *et al.*, 2019; PEREZ; DE PALMA, 2019).

Vias de sinalização celular imunes são essenciais na promoção de respostas efectoras imunes básicas, que variam desde a maturação e desenvolvimento celular até no reconhecimento de PAMPs, secreção de citocinas e apresentação de antígenos (PINTI *et al.*, 2016; HUA; HOU, 2020). Ainda, com plataforma vacinais de mRNA dispondo uma enorme diversidade de estratégias de *design*, o entendimento de vias de sinalização contribui na compreensão de como plataformas de mRNA, como BNT162b2, atuam e como possíveis modificações de *design* vacinal influenciam em aspectos atrelados a imunogenicidade, eficácia e segurança vacinal (PARDI; HOGAN; WEISSMAN, 2020).

O programa CellChat além de inferir interações células específicas ao atribuir a cada interação valores probabilísticos de contato, computa a probabilidade de comunicação celulares biologicamente relevantes atreladas a vias de sinalização previamente conhecidas e experimentalmente validadas na literatura (EFREMOVA *et al.*, 2020). No total, foram

identificadas 18 vias de sinalização distribuídas e/ou específicas aos diferentes períodos de tempo pós vacinação por BNT162b2.

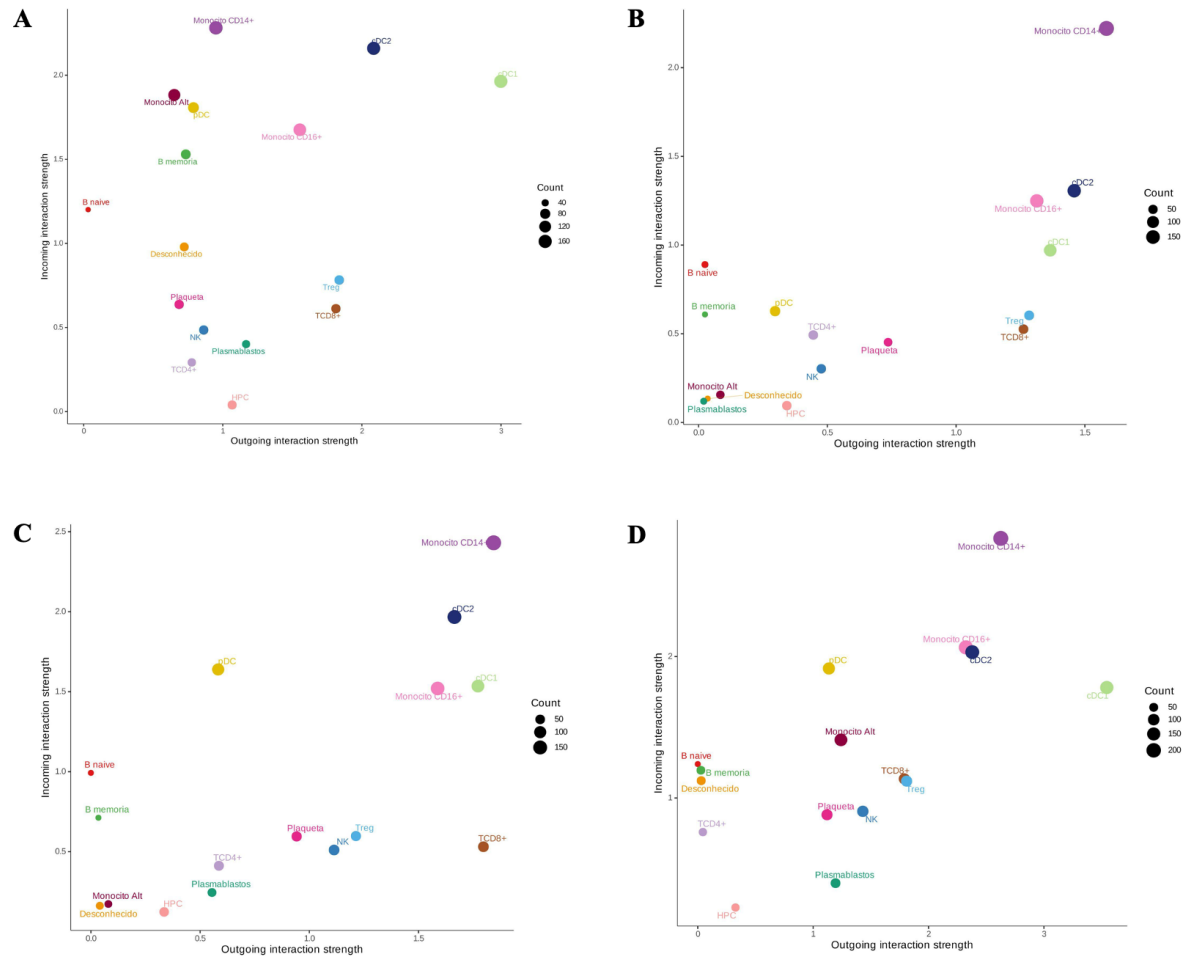


Figura 24. Força de perfis interacionais in e out. Gráficos do tipo bolha apontam dinâmicas de perfil in e out de cada grupo celular previamente anotado entre cada período de tempo. As imagens A, B, C e D, representam os períodos de tempo de dia 0, 7, 21 e 28, respectivamente.

Foram observadas alterações relevantes de redes de sinalização atrelados a via do fator inibitório de migração macrocítica (MIF, do inglês, *Macrophages Migration Inhibitor Factor*). No período de 7 dias, células B naive tornaram-se os principais receptores de sinalização MIF, cujos sinalizadores primários consistiram em células Treg e TCD8+. Todavia, nos períodos de tempo 21 e 28, houve uma transição de receptores sinalizadores majoritários para cDC1, cDC2 e pDC. A **figura 25** visualiza-se o envolvimento de grupos celulares específicos e seus respectivos papéis em sinalização MIF específicos.

A MIF é uma poderosa citocina rapidamente secretada por células de imunidade inata em resposta a estímulos antigênicos ou a outras citocinas pró inflamatórias, auxiliando na proliferação e sobrevivência celular (CALANDRA; ROGER, 2003; KANG; BUCALA, 2019).

Adicionalmente, MIF também é uma citocina secretada por linfócitos, possuindo importante funções imunomodulatórias sobre a imunidade adaptativa (HARRIS *et al.*, 2019), corroborando com achados do presente trabalho, onde Tregs e TCD8+ são principais fontes de MIF, não apenas da imunidade celular, mas da totalidade das reações imunes MIF dependentes em respostas a vacinação por BNT162b2.

Outras vias de sinalização apresentaram mudanças interessantes entre os períodos de tempo como a via tirosina kinase 3 tipo FMS (FLT3, do inglês, *FMS-like Tyrosine Kinase 3*) com elevação de perfil *in* em células cDC1, cDC2 e pDC até uma semana após cada dose. De fato, FLT3 consiste numa proteína de superfície celular, expressas abundantemente em diferentes populações de DCs, com envolvimento no desenvolvimento, maturação celular, e apresentação de antígenos mediado por cDCs (CUETO; SANCHO, 2021), indicando um papel crucial desta via na apresentação de antígenos e, conseqüentemente, ativação de respostas adaptativas efetoras. Na **figura 26** pode-se observar interações receptor-ligante da via FTL3 no dia 7. Na **figura S7** visualiza-se a respectiva via nos demais períodos de tempo.

Apesar de estudos com foco no envolvimento da interação Ftl3-Ftl3L no âmbito da vacinação contra COVID-19 serem pouco compreendidos, o desenho de esquemas vacinais terapêuticos contra neoplasias usando-se ligantes de Ftl3 como via de estimulação de cDCs são muito explorados e, alguns trabalhos, encontram-se em fase de estudos clínicos (BHARDWAJ *et al.*, 2020; WILSON; VILLADANGOS; MINTERN, 2021). Ainda, em modelos de infecção por vírus da influenza A (IAV, do inglês, *Influenza A Virus*) a hiperexpressão de Ftl3L durante a infecção, contribuiu para a repopulação de cDCs pulmonares, antes suprimidas, atenuou o recrutamento de monócitos inflamatórios e protegeu parcialmente camundongos contra infecções bacterianas secundárias (BESHARA *et al.*, 2018).

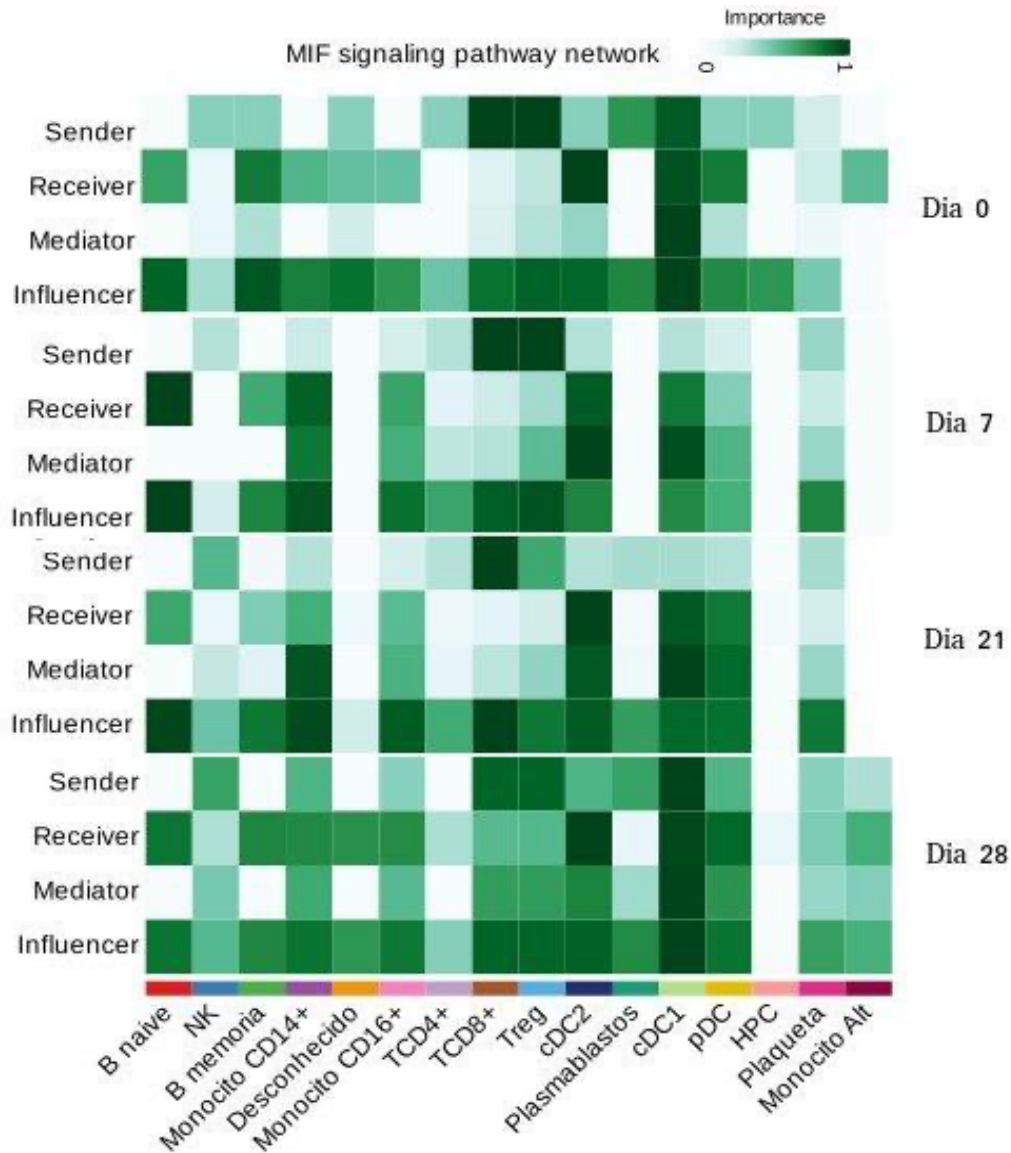


Figura 25. Envolvimento celular com sinalização MIF. O heatmap aponta grupos celulares envolvidos como sinalizadores, receptores, mediadores e influenciadores da via MIF entre diferentes períodos de tempo pós vacinação.

Padrões similares de vias sinalizadoras intimamente associadas à ativação de células B como APRIL e BAFF (do inglês, *B-cell Activation Factor*) também foram identificadas. A interação ligante-receptor de APRIL/BAFF demonstraram-se enriquecidas em todos os períodos de tempo. No entanto, após a vacinação, houve uma inibição generalizada de células de perfil *out* para BAFF, onde as plasmoblastos de perfil *in* foram sinalizadas praticamente por monócitos clássicos *out*. Padrão similar foi visto na via APRIL. As demais vias de sinalização não demonstraram alterações de interação relevantes nos demais dias. Na **figura S8** pode-se observar interações BAFF e seus respectivos ligantes entre diferentes períodos de tempo pré e pós vacinação.

BAFF e APRIL são proteínas transmembrana da superfamília de fator de necrose tumoral (TNF) com possuem um profundo impacto na maturação, desenvolvimento, ativação e proliferação de linfócitos B (MAGLIOZZI; MARASTONI; CALABRESE, 2020). Em estados de doença, como por exemplo, indivíduos com esclerose múltipla em tratamento com DMT (do inglês, *Disease Modifying Therapies*) vacinados com 3ª dose de BNT162b2, mostrou-se o aumento relevante de APRIL e CD40L, e equiparável expressão de BAFF em relação ao grupo controle saudável, indicando a indução e importância desta via pós vacinação, mesmo em indivíduos severamente imunocomprometidos (DOMINELLI *et al.*, 2022).

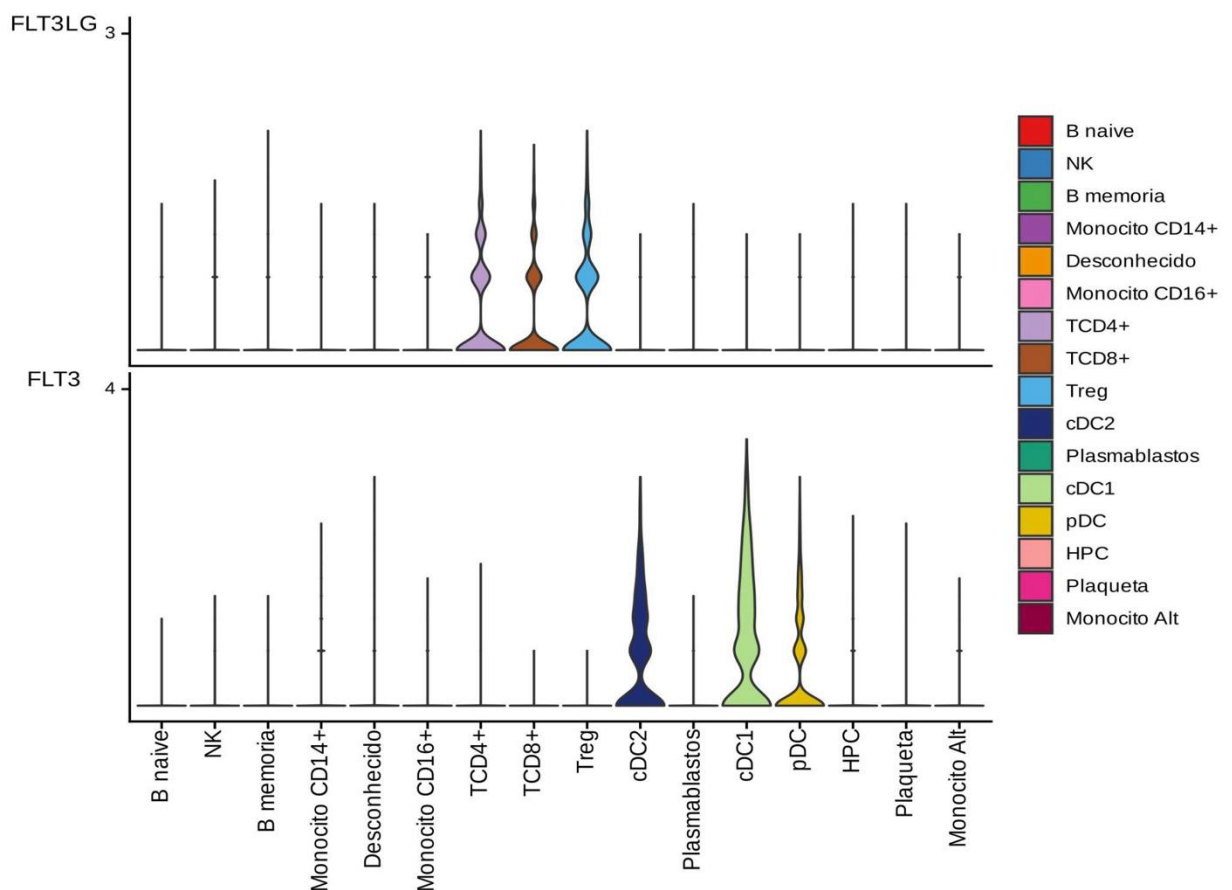


Figura 26. Sinalização receptor-ligante via FTL3. Os gráficos de violino apontam grupos celulares envolvidos como sinalizadores e receptores FTL3 no Dia 7. O gráfico superior indica os grupos celulares expressando ligante de FTL3 e o gráfico inferior representa os grupos celulares expressando o receptor FTL3. Quanto mais “alto” os violinos são, maior é a expressão gênica. A largura dos violinos é proporcional ao número de células do grupo em questão expressando tais ligantes/receptores.

Com isso, diante da importância destas proteínas, e suas respectivas vias de sinalização, para o desenvolvimento de imunidade humoral efetiva, estratégias vacinais empregando BAFF/APRIL como adjuvantes moleculares vêm sendo estudadas no âmbito de infecções

virais, demonstrando-se promissoras na estimulação de respostas B efectoras (LIU *et al.*, 2020; HONG *et al.*, 2019).

As análises de CCC permitem ainda identificar padrões específicos de atividades de grupos celulares e vias de sinalização que possibilitam elucidar as dinâmicas coordenadas e finamente reguladas de respostas imunes frente a vacinação por BNT162b2. No dia 0, puderam ser notados padrões de agrupamento celulares fortes entre os diferentes tipos de monócitos (padrão 1) e subpopulações de células B juntamente com cDC1 e cDC2 (padrão 2). Similarmente, observaram-se agrupamentos de vias como ANGPTL, CD30, ANEXINAS, GRN e CCL (padrão 1) e BAFF, APRIL, IL1, FLT3, MIF e BAG (padrão 2). A **figura 27** mostra padrões celulares e de comunicação no dia 7.

Já no dia 7 padrões muito bem estabelecidos compostos por monócitos CD14+ e CD16+ (padrão 1), com células B, T, plaquetas e células inatas (padrão 2) foram identificados. Ainda, dois padrões de comunicação se mostraram relevantes: um formado por ANEXINA, GRN, CCL, CD30 e TGFb (padrão 1), e um segundo padrão com vias atreladas a ativação e proliferação de células B, incluindo BAFF/APRI, BAG e FTL3.

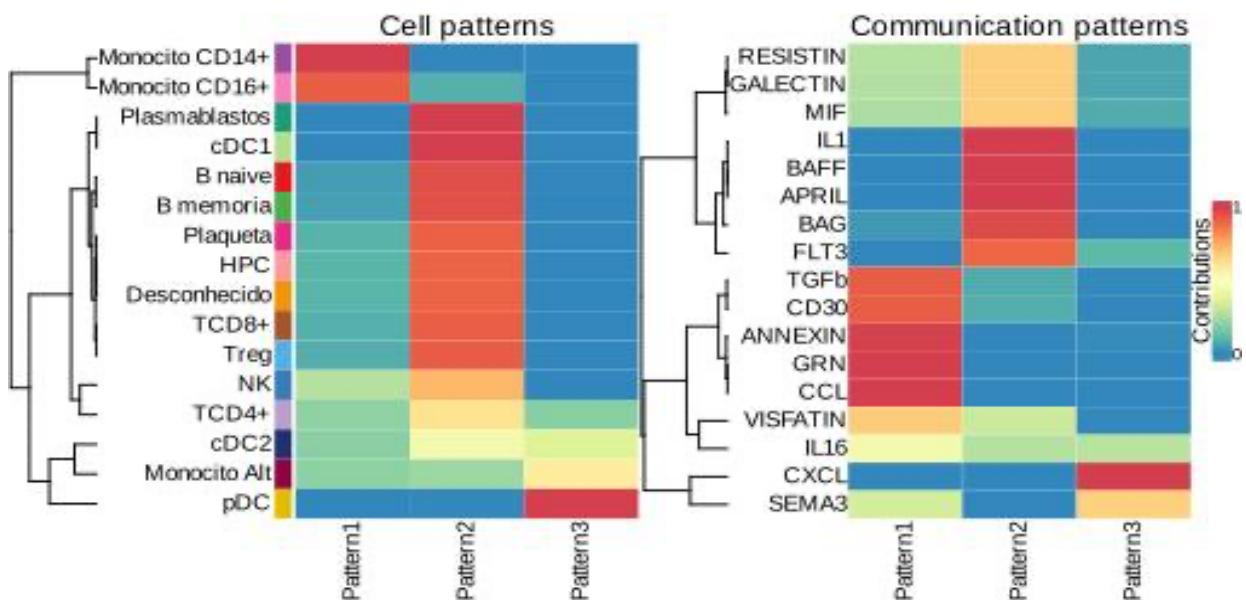


Figura 27. Padrões celulares e comunicatórios de perfil *in* após 1ª dose. Heatmaps descrevem padrões de agrupamentos celulares e vias de comunicação de maior contribuição no Dia 7.

Aproximadamente duas semanas após a 1ª dose, houve um modelo de contribuição celular formado em grande medida por subpopulações de células T, com presença de plasmablastos e células inatas como NK e monócitos alternativos. Finalmente, no dia 28, foram vistos padrões de comunicação quase idênticos aos do dia 7, certamente por conta do estímulo antigênico proveniente da 2ª dose.

Os padrões de contribuição celular e comunicação de perfil *out* indicaram em todos os períodos de tempo uma relevante participação de subtipos de monócitos agrupados com distintas subpopulações de cDCs. Percebeu-se padrões associados a populações de linfócitos próprias e segregadas em relação às populações monocíticas. Nos dias 7 e 28, portanto 1 semana após cada dose, houve padrões particularmente definidos e enriquecidos, o que não fora visto no dia 21, onde predominou-se padrões celulares amplos e difusos.

Quanto aos padrões de comunicação de sinalização houve, em todos os períodos de tempo, relevante contribuição de vias como GALECTINA, RESISTIN, ANNEXIN, BAG e GRN. Interessantemente, houve uma elevada contribuição de vias como IL-1, BAFF/APRIL, indicando um papel importante de monócitos na ativação de respostas de células B e, conseqüentemente, em respostas imunes humoral após a imunização.

5. CONCLUSÃO, LIMITAÇÕES e PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no presente trabalho descrevem características e dinâmicas imunológicas adaptativas frente a imunização por BNT162b2, uma vacina de mRNA, em diferentes períodos de tempo após administração de um esquema vacinal completo. Observou-se alterações de propriedades imunes a nível celular e molecular, avaliando parâmetros como abundância e frequências de populações celulares imunes, expressão gênica diferencial com concomitante enriquecimento gênico, inferência e análise de trajetórias de grupos celulares de interesse, assim como análises de vias de sinalização cruciais para promoção de respostas imunes adaptativas de sucesso.

Apesar dos objetivos almejados, no presente trabalho, terem sido alcançados com êxito, viabilizando uma compreensão mais aprofundada do objeto de estudo proposto, algumas limitações devem ser enfatizadas. Primeiramente, o uso de dados públicos, oriundos de diferentes estudos, inevitavelmente acarreta a introdução de vieses e ruídos que podem comprometer a confiabilidade dos resultados obtidos, potencialmente induzindo a interpretações biológicas imprecisas. Não obstante, a composição integral por células B de um dos conjuntos de dados empregados, ao mesmo tempo que enriqueceu e possibilitou um entendimento biológico deste grupo em particular mais à fundo, dificultaram a condução de análises de células T mais amplas e detalhadas. Por último, apesar da vacinação por BNT162b2 ter indiscutivelmente induzidos dinâmicas imunes particulares, torna-se difícil distinguir quais dinâmicas são de fato específicas ao imunizante em questão, já que não foram comparados dados de scRNA-seq de vacinação por outras plataformas vacinais.

O entendimento das propriedades imunológicas elucidadas pela vacinação por BNT162b2, evidencia mecanismos celulares e moleculares importantes num contexto vacinal e propõe o desenvolvimento futuro de vacinas baseadas em mRNA mais eficazes, seguras e racionais frente a doenças infecciosas relevantes e emergentes como novos possíveis coronavírus.

REFERÊNCIAS

- ALDRICH, C. *et al.* Proof-of-concept of a low-dose unmodified mRNA-based rabies vaccine formulated with lipid nanoparticles in human volunteers: A phase 1 trial. **Vaccine**, Amsterdam, v. 39, n. 8, p. 1310-1318, fev. 2021.
- ANDERSON, B.R. *et al.* Incorporation of pseudouridine into mRNA enhances translation by diminishing PKR activation. **Nucleic Acid Research**, Londres, v. 38, n. 17, p. 5884-5892, set. 2010.
- ANDREWS, T. S.; HEMBERG, M. Identifying cell populations with scRNASeq. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 59, p. 114–122, fev. 2018.
- ANDREWS, T.S. *et al.* Tutorial: guidelines for the computational analysis of single-cell RNA sequencing data. **Nature Protocols**, Londres, v. 16, p. 1-9, jan. 2021.
- ARAN, D. *et al.* Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. **Nature Immunology**, Londres, v. 20, n. 2, p. 163-172, fev. 2019.
- ARUNACHALAM, P.S. *et al.* Systems vaccinology of the BNT162b2 mRNA vaccine in humans. **Nature**, v. 596, n. 7872, p. 410-416, ago. 2021.
- ASRANI, K.H. *et al.* Optimization of mRNA untranslated regions for improved expression of therapeutic mRNA. **RNA Biology**, Georgetown, v. 15, n. 6, p. 756-762, mar. 2018.
- AZKUR, A. K. *et al.* Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. **Allergy**, v. 75, n. 7, p. 1564–1581, jul. 2020.
- BADEN, L.R. *et al.* Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 384, n. 5, p. 403-416, fev. 2021.
- BAHL, K. *et al.* Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses. **Molecular Therapy**, San Diego, v. 25, n. 6, p. 1316-1327, jun. 2017.
- BARBIER, A.J. *et al.* The clinical progress of mRNA vaccines and immunotherapies. **Nature Biotechnology**, Nova Iorque, v. 40, n. 6, p. 840-854, jun. 2022.
- BENTON, D.J. *et al.* Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. **Nature**, Londres, v. 588, n. 7837, p. 327-330, dez. 2020.
- BESHARA, R. *et al.* Alteration of Flt3-Ligand-dependent de novo generation of conventional dendritic cells during influenza infection contributes to respiratory bacterial superinfection. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 10, p. e1007360, 29 out. 2018.
- BREWER, R.C. *et al.* BNT162b2 vaccine induces divergent B cell responses to SARS-CoV-2 S1 and S2. **Nature Immunology**, v. 23, p. 33-39, jan. 2022.

- BHARDWAJ, N. et al. Flt3 ligand augments immune responses to anti-DEC-205-NY-ESO-1 vaccine through expansion of dendritic cell subsets. **Nature Cancer**, v. 1, n. 12, p. 1204–1217, 16 nov. 2020.
- BHATT, P.R. *et al.* Structural basis of ribosomal frameshifting during translation of the SARS-CoV-2 RNA genome. **Science**, Nova Iorque, v. 372, n. 6548, p. 1306-1313, jun. 2021.
- BIEBERICH, F. et al. A Single-Cell Atlas of Lymphocyte Adaptive Immune Repertoires and Transcriptomes Reveals Age-Related Differences in Convalescent COVID-19 Patients. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 12 jul. 2021.
- BJÖRKSTRÖM, N. K.; PONZETTA, A. Natural killer cells and unconventional T cells in COVID-19. **Current Opinion in Virology**, v. 49, p. 176–182, ago. 2021.
- BOURQUIN, C. *et al.* Immunostimulatory RNA oligonucleotides trigger an antigen-specific cytotoxic T-cell and IgG2a response. **Blood**, Nova Iorque, v. 109, n. 7, p. 2953-2960, abr. 2006.
- BROOS, K. *et al.* Particle-mediated Intravenous Delivery of Antigen mRNA Results in Strong Antigen-specific T-cell Responses Despite the Induction of Type I Interferon. **Molecular Therapy Nucleic Acids**, Nova Iorque, v. 5, n. 6, p. 326, jun. 2016.
- CALANDRA, T.; ROGER, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 10, p. 791–800, [s.d.].
- CAO, Q. et al. Integrated single-cell analysis revealed immune dynamics during Ad5-nCoV immunization. **Cell Discovery**, v. 7, n. 1, p. 1–17, 10 ago. 2021.
- CASTLEMAN, M. J. et al. Activation and pro-inflammatory cytokine production by unswitched memory B cells during SARS-CoV-2 infection. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 10 ago. 2023.
- CHATTERJEE-KISHORE, M. et al. Different Requirements for Signal Transducer and Activator of Transcription 1 α and Interferon Regulatory Factor 1 in the Regulation of Low Molecular Mass Polypeptide 2 and Transporter Associated with Antigen Processing 1 Gene Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 26, p. 16177–16183, jun. 1998.
- CHAUDHARY, N.; WEISSMAN, D.; WHITEHEAD, K.A. mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation. **Nature Reviews Drug Discovery**, Londres, v. 20, n. 11, p. 817-838, nov. 2021.
- CHEN, E.Y. *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. **BMC Bioinformatics**, Londres, v. 14, n. 128, abr. 2013.
- CHEN, G. et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 5, p. 2620–2629, 13 abr. 2020.
- CHEN, G.; NING, B.; SHI, T. Single-Cell RNA-Seq Technologies and Related Computational Data Analysis. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 10, n. 317, abr. 2019.

CHEN, H.; YE, F.; GUO, G. Revolutionizing immunology with single-cell RNA sequencing. **Cell & Molecular Biology**, Beijing, v. 16, n. 3, p. 242-249, mar. 2019.

CHEN, J.; CHEN, J.; XU, Q. Current Developments and Challenges of mRNA Vaccines. **Annual Review of Biomedical Engineering**, Palo Alto, v. 24, p. 85-109, jun. 2022.

CHEN, K.; LIU, J.; CAO, X. Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation: A comprehensive review. **Journal of Autoimmunity**, v. 83, p. 1–11, set. 2017.

CHEN, Q. et al. CD3+CD20+ T cells and their roles in human diseases. **Human Immunology**, v. 80, n. 3, p. 191–194, mar. 2019.

CHOI, U. Y. et al. Oligoadenylate synthase-like (OASL) proteins: dual functions and associations with diseases. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 47, n. 3, p. e144–e144, 6 mar. 2015.

CIBRIÁN, D.; SÁNCHEZ-MADRID, F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 6, p. 946–953, jun. 2017.

CLARK, J.Z. *et al.* Representation and relative abundance of cell-type selective markers in whole-kidney RNA-Seq data. **Kidney International**, Nova Iorque, v. 95, n. 4, p. 787-796, abr. 2019.

CORBETT, K.S. *et al.* Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 383, n. 16, p. 1544-1555, out. 2020.

CUAPIO, A. et al. NK cell frequencies, function and correlates to vaccine outcome in BNT162b2 mRNA anti-SARS-CoV-2 vaccinated healthy and immunocompromised individuals. **Molecular Medicine**, v. 28, n. 1, p. 1–12, 8 fev. 2022.

CUETO, F. J.; SANCHO, D. The Flt3L/Flt3 Axis in Dendritic Cell Biology and Cancer Immunotherapy. **Cancers**, v. 13, n. 7, p. 1525, 26 mar. 2021.

CUI, J. et al. Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, n. 11, p. 3270–3285, 2 nov. 2014.

DAGAN, NOA. *et al.* BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Mass Vaccination Setting. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 34, n. 15, p. 1412-1423, abr. 2021.

DANESE, E. et al. Comprehensive assessment of humoral response after Pfizer BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccination: a three-case series. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 59, n. 9, p. 1585–1591, 1 ago. 2021.

DEN HAAN, J. M. M.; LEHAR, S. M.; BEVAN, M. J. Cd8+ but Not Cd8– Dendritic Cells Cross-Prime Cytotoxic T Cells in Vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 12, p. 1685–1696, 11 dez. 2000.

- DOMINELLI, F. et al. Multiple sclerosis-disease modifying therapies affect humoral and T-cell response to mRNA COVID-19 vaccine. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 1 dez. 2022.
- DÖRING, M. et al. Single-cell analysis reveals divergent responses of human dendritic cells to the MVA vaccine. **Science Signaling**, v. 14, n. 697, 24 ago. 2021.
- DUECHLER, M. et al. Nucleoside modifications in the regulation of gene expression: focus on tRNA. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 73, n. 16, p. 3075-3095, ago. 2016.
- EFREMOVA, M. et al. CellPhoneDB: inferring cell-cell communication from combined expression of multi-subunit ligand-receptor complexes. **Nature Protocols**, Londres, v. 15, n. 4, p. 1484-1506, abr. 2020.
- FALSEY, A.R. et al. Phase 3 Safety and Efficacy of AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19) Covid-19 Vaccine. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 385, n. 25, p. 2348-2360, dez. 2021.
- FANG, E. et al. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, Londres, v. 7, p. 94, mar. 2022.
- FANG, E. et al. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1–31, 23 mar. 2022.
- FAVRESSE, J. et al. Neutralizing Antibodies in COVID-19 Patients and Vaccine Recipients after Two Doses of BNT162b2. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1364, 14 jul. 2021.
- FINAK, G. et al. MAST: a flexible statistical framework for assessing transcriptional changes and characterizing heterogeneity in single-cell RNA sequencing data. **Genome Biology**, Londres, v. 16, n. 278, dez. 2015.
- GAO, F. et al. Development of a Potent and Protective Germline-Like Antibody Lineage Against Zika Virus in a Convalescent Human. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 24 out. 2019.
- GAO, Q. et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. **Science**, Nova Iorque, v. 369, n. 6499, p. 77-81, jul. 2020.
- GERMAIN, P. et al. Doublet identification in single-cell sequencing data using *scDblFinder*. **F1000 Research**, Londres, v. 10, n. 979, set. 2021.
- GERMIC, N. et al. Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation. **Cell Death & Differentiation**, v. 26, n. 4, p. 715–727, 8 fev. 2019.
- GHOSH, S. et al. β -Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. **Cell**, Cambridge, v. 183, n. 6, p. 1520-1535, dez. 2020.
- GOEL, R. R. et al. mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern. **Science**, v. 374, n. 6572, 14 out. 2021.

- GORBALENYA, A.E. *et al.* The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, Londres, v. 5, n. 4, p. 536-544, abr. 2020.
- GORKHALI, R. *et al.* Structure and Function of Major SARS-CoV-2 and SARS-CoV Proteins. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 15, p. 1-32, maio. 2021.
- HADJADJ, J. *et al.* Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. **Science**, v. 369, n. 6504, 7 ago. 2020.
- HAFEMEISTER, C.; SATIJA, R. *et al.* Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression. **Genome Biology**, Londres, v. 20, p. 296, dez. 2019.
- HARRIS, J. *et al.* Rediscovering MIF: New Tricks for an Old Cytokine. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 5, p. 447–462, maio 2019.
- HASSETT, K. J. *et al.* Impact of lipid nanoparticle size on mRNA vaccine immunogenicity. **Journal of Controlled Release**, v. 335, p. 237–246, jul. 2021.
- HILLIGAN, K. L.; RONCHESE, F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4⁺ T helper cell responses. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 17, n. 6, p. 587–599, 20 maio 2020.
- HODGE, R.D. *et al.* Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. **Nature**, Londres, v. 573, n. 7772, p. 61-68, set. 2019.
- HOFFMANN, M. *et al.* The Omicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: Implications for control of the COVID-19 pandemic. **Cell**, Cambridge, v. 185, n. 3, p. 447-456, fev. 2022.
- HOGAN, M.J.; PARDI, N. mRNA Vaccines in the COVID-19 Pandemic and Beyond. **Annual Reviews of Medicine**, Palo Alto, v. 73, p. 17-39, jan. 2022.
- HOLTKAMP, S. *et al.* Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. **Blood**, Nova Iorque, v. 108, n. 13, p. 4009-4017, abr. 2006.
- HONG, J.-Y. *et al.* Highly immunogenic influenza virus-like particles containing B-cell-activating factor (BAFF) for multi-subtype vaccine development. **Antiviral Research**, v. 164, p. 12–22, abr. 2019.
- HORNUNG, V. *et al.* 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. **Science**, Nova Iorque, v. 314, n. 5801, p. 994-997, nov. 2006.
- HU, B. *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 19, n. 3, p. 141-154, mar. 2021.
- HU, T. *et al.* Next-generation sequencing technologies: An overview. **Human Immunology**, Nova Iorque, v. 82, n. 11, p. 801-8111, nov. 2021.

HUA, Z.; HOU, B. The role of B cell antigen presentation in the initiation of CD4⁺ T cell response. **Immunological Reviews**, v. 296, n. 1, p. 24–35, 18 abr. 2020.

INOUE, T.; KUROSAKI, T. Memory B cells. **Nature Reviews Immunology**, p. 1–13, 3 jul. 2023.

IVANOVA, E. N. et al. **mRNA COVID-19 vaccine elicits potent adaptive immune response without the persistent inflammation seen in SARS-CoV-2 infection**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory, 21 abr. 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/2021.04.20.21255677>>. Acesso em: 22 set. 2023.

JACKSON, C.B. *et al.* Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Londres, v. 23, p. 3–20, jan. 2022.

JIANG, Y.; YIN, W.; XU, H.E. RNA-dependent RNA polymerase: Structure, mechanism, and drug discovery for COVID-19. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova Iorque, v. 538, p. 47–53, jan. 2021.

JIN, S. *et al.* Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat. **Nature Communications**, Londres, v. 12, p. 1088, fev. 2021.

JOUAN, Y. et al. Phenotypical and functional alteration of unconventional T cells in severe COVID-19 patients. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 12, 4 set. 2020.

KAK, G.; RAZA, M.; TIWARI, B. K. Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. **Biomolecular Concepts**, v. 9, n. 1, p. 64–79, 30 maio 2018.

KAMINSKIY, Y. et al. Neglected, yet significant role of FOXP1 in T-cell quiescence, differentiation and exhaustion. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 4 out. 2022.

KANEKO, N. et al. Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. **Cell**, v. 183, n. 1, p. 143–157.e13, out. 2020.

KANG, I.; BUCALA, R. The immunobiology of MIF: function, genetics and prospects for precision medicine. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 15, n. 7, p. 427–437, 13 jun. 2019.

KARIKÓa, K. *et al.* Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. **Immunity**, Cambridge, v. 23, n. 2, p. 165–175, ago. 2005.

KARIKÓb, K. *et al.* Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA. **Nucleic Acid Research**, Londres, v. 39, n. 21, p. 142, nov. 2011.

KEECH, C. *et al.* Phase 1-2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Nanoparticle Vaccine. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 383, n. 24, p. 2320–2332, dez. 2020.

- KELSEY, G. Single-cell epigenomics: Recording the past and predicting the future. **Science**, v. 358, n. 6359, 6 out. 2017.
- KING, H. W. et al. Single-cell analysis of human B cell maturation predicts how antibody class switching shapes selection dynamics. **Science Immunology**, v. 6, n. 56, 12 fev. 2021.
- KLEIN, S. *et al.* SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. **Nature Communications**, Londres, v. 11, p. 5885, nov. 2020.
- KNEZEVIC, I. et al. Development of mRNA Vaccines: Scientific and Regulatory Issues. **Vaccines**, v. 9, n. 2, 23 jan. 2021.
- KNOOPS, K. *et al.* SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. **PLoS Biology**, São Francisco, v. 6, n. 9, p. 226, set. 2008.
- KONOPACKI, C. et al. Transcription factor Foxp1 regulates Foxp3 chromatin binding and coordinates regulatory T cell function. **Nature Immunology**, v. 20, n. 2, p. 232–242, 14 jan. 2019.
- KORSUNSKY, I. *et al.* Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony. **Nature Methods**, Nova Iorque, v. 16, n. 12, p. 1289-1296, dez. 2019.
- KRANZ, L.M. *et al.* Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. **Nature**, Londres, v. 534, n. 7607, p. 396-401, jun. 2016.
- KREER, C. et al. Longitudinal Isolation of Potent Near-Germline SARS-CoV-2-Neutralizing Antibodies from COVID-19 Patients. **Cell**, v. 182, n. 4, p. 843- 854.e12, ago. 2020.
- KULKARNI, A. *et al.* Beyond bulk: a review of single cell transcriptomics methodologies and applications. **Current Opinion in Biotechnology**, Londres, v. 58, p. 129-136, ago. 2019.
- LAIDLAW, B. J.; CYSTER, J. G. Transcriptional regulation of memory B cell differentiation. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 4, p. 209–220, 6 out. 2020.
- LAING, A. G. et al. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. **Nature Medicine**, v. 26, n. 10, p. 1623–1635, 17 ago. 2020.
- LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 6, p. 397–411, 24 maio 2013.
- LEE, A. J.; ASHKAR, A. A. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 11 set. 2018.
- LEE, H. K. et al. Heterologous ChAdOx1-BNT162b2 vaccination in Korean cohort induces robust immune and antibody responses that includes Omicron. **iScience**, v. 25, n. 6, p. 104473, jun. 2022.
- LEE, J.-U.; KIM, L.-K.; CHOI, J.-M. Revisiting the Concept of Targeting NFAT to Control T Cell Immunity and Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 27 nov. 2018.

- LEINONEN, R. *et al.* The sequence read archive. **Nucleic Acid Research**, Londres, v. 39, p. 19-21, jan. 2011.
- LETKO, M.; MARZI, A.; MUNSTER, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 5, n. 4, p. 562-569, abr. 2020.
- LI, C. *et al.* Mechanisms of innate and adaptive immunity to the Pfizer-BioNTech BNT162b2 vaccine. **Nature Immunology**, v. 23, n. 4, p. 543–555, 14 mar. 2022.
- LI, C. *et al.* Mechanisms of innate and adaptive immunity to the Pfizer-BioNTech BNT162b2 vaccine. **Nature Immunology**, v. 23, n. 4, p. 543–555, 14 mar. 2022.
- LI, J.; LIU, Y.; ZHANG, X. Murine coronavirus induces type I interferon in oligodendrocytes through recognition by RIG-I and MDA5. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 84, n. 13, p. 6472-6482, jul. 2010.
- LI, M. M. H.; MACDONALD, M. R.; RICE, C. M. To translate, or not to translate: viral and host mRNA regulation by interferon-stimulated genes. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 6, p. 320–329, jun. 2015.
- LIU, C. *et al.* Time-resolved systems immunology reveals a late juncture linked to fatal COVID-19. **Cell**, v. 184, n. 7, p. 1836- 1857.e22, abr. 2021.
- LIU, J. *et al.* Comprehensive investigations revealed consistent pathophysiological alterations after vaccination with COVID-19 vaccines. **Cell Discovery**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 26 out. 2021.
- LIU, J. *et al.* Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. **EBioMedicine**, v. 55, p. 102763, maio 2020.
- LIU, J. *et al.* Trimeric HIV-1 gp140 fused with APRIL, BAFF, and CD40L on the mucosal gp140-specific antibody responses in mice. **Vaccine**, v. 38, n. 9, p. 2149–2159, fev. 2020.
- LIU, Y.; ZHOU, J.; WHITE, K.P. RNA-seq differential expression studies: more sequence or more replication?. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 301-304, fev. 2014.
- LUECKEN, M.D.; THEIS, F.J. Current best practices in single-cell RNA-seq analysis: a tutorial. **Molecular Systems Biology**, Londres, v. 15, n. 6, p. 8746, jun. 2019.
- LUO, Y. *et al.* Prediction Model Based on the Combination of Cytokines and Lymphocyte Subsets for Prognosis of SARS-CoV-2 Infection. **Journal of Clinical Immunology**, v. 40, n. 7, p. 960–969, 13 jul. 2020.
- MACOSKO, E.Z. *et al.* Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. **Cell**, Cambridge, v. 161, n. 5, p. 1202-1214, maio. 2015.
- MAGLIOZZI, R.; MARASTONI, D.; CALABRESE, M. The BAFF / APRIL system as therapeutic target in multiple sclerosis. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 24, n. 11, p. 1135–1145, 24 set. 2020.

- MARCO-PUCHE, G. et al. RNA-Seq Perspectives to Improve Clinical Diagnosis. **Frontiers in Genetics**, v. 10, 12 nov. 2019.
- MARONE, R.W.; FELGNER, P.L.; VERMA, I.M. Cationic liposome-mediated RNA transfection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, n. 16, p. 6077-6088, ago. 1989.
- MASUDA, T. *et al.* Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. **Nature**, Londres, v. 566, n. 7744, p. 388-392, fev. 2019.
- MATINON, F. *et al.* Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 23, n. 7, p. 1719-1722, jul. 1993.
- MATUTA, K.; RIVELLO, F.; HUCK, W.T.S. Single-Cell Analysis Using Droplet Microfluidics. *Advanced biosystems*, Weinheim, v. 4, p. 1900188, jan. 2020.
- MAZUTIS, L. et al. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. **Nature Protocols**, v. 8, n. 5, p. 870–891, 4 abr. 2013.
- MCINNES, L.; HEALY, J.; MELVILLE, J. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. **ArXiv**, fev. 2018.
- MILETO, D. et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccine BNT162b2 triggers a consistent cross-variant humoral and cellular response. **Emerging Microbes & Infections**, v. 10, n. 1, p. 2235–2243, 1 jan. 2021.
- MOREIRA, E. D., Jr. et al. Safety and Efficacy of a Third Dose of BNT162b2 Covid-19 Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 20, p. 1910–1921, 19 maio 2022.
- NARAYANAN, K. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 suppresses host gene expression, including that of type I interferon, in infected cells. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 82, n. 9, p. 4471-4479, mar. 2008.
- NIELSEN, S. C. A. et al. Human B Cell Clonal Expansion and Convergent Antibody Responses to SARS-CoV-2. **Cell Host & Microbe**, v. 28, n. 4, p. 516- 525.e5, out. 2020.
- OVERWIJK, W. W.; TAGLIAFERRI, M. A.; ZALEVSKY, J. Engineering IL-2 to Give New Life to T Cell Immunotherapy. **Annual Review of Medicine**, v. 72, n. 1, p. 281–311, 27 jan. 2021.
- PADHIAR, N. H. et al. Comparison of BNT162b2-, mRNA-1273- and Ad26.COV2.S-Elicited IgG and Neutralizing Titers against SARS-CoV-2 and Its Variants. **Vaccines**, v. 10, n. 6, p. 858, 27 maio 2022.
- PAIXÃO, B. *et al.* Estimation of COVID-19 Under-Reporting in the Brazilian States Through SARI. **New Generation Computing**, Tóquio, v. 39, n. 3-4, p. 623-645, mar. 2021.

PALM, A.-K. E.; HENRY, C. Remembrance of Things Past: Long-Term B Cell Memory After Infection and Vaccination. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 31 jul. 2019.

PAOLILLO, C.; LONDIN, E.; FORTINA, P. Single-Cell Genomics. **Clinical Chemistry**, v. 65, n. 8, p. 972–985, 1 ago. 2019.

PARDI, N.; HOGAN, M. J.; WEISSMAN, D. Recent advances in mRNA vaccine technology. **Current Opinion in Immunology**, v. 65, p. 14–20, ago. 2020.

PARDIa, N. *et al.* mRNA vaccines - a new era in vaccinology. **Nature Reviews Drug Discovery**, Londres, v. 17, n. 4, p. 261-279, abr. 2018.

PARDIb, N. *et al.* Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *Journal of controlled release*, Amsterdam, v. 217, p. 345-351, nov. 2015.

PARROT, T. *et al.* MAIT cell activation and dynamics associated with COVID-19 disease severity. **Science Immunology**, v. 5, n. 51, 28 set. 2020.

PATENTE, T. A. *et al.* Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 21 jan. 2019.

PAYNE, R. P. *et al.* Immunogenicity of standard and extended dosing intervals of BNT162b2 mRNA vaccine. **Cell**, v. 184, n. 23, p. 5699- 5714.e11, nov. 2021.

PEREZ, C. R.; PALMA, M. D. Engineering dendritic cell vaccines to improve cancer immunotherapy. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 27 nov. 2019.

PHIPSON, B. *et al.* propeller: testing for differences in cell type proportions in single cell data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 38, n. 20, p. 4720-4726, out. 2022.

PILKINGTON, E.H. *et al.* From influenza to COVID-19: Lipid nanoparticle mRNA vaccines at the frontiers of infectious diseases. **Acta Biomarker**, Kidlington, v. 131, p. 16-40, set. 2021.

PINTI, M. *et al.* Aging of the immune system: Focus on inflammation and vaccination. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 10, p. 2286–2301, out. 2016.

PIZZA, M.; PECETTA, S.; RAPPUOLI, R. Vaccines 2020: The era of the digital vaccine is here. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 13, n. 624, dez. 2021.

POLLARD, C. *et al.* Type I IFN Counteracts the Induction of Antigen-Specific Immune Responses by Lipid-Based Delivery of mRNA Vaccines. **Molecular Therapy**, v. 21, n. 1, p. 251–259, jan. 2013.

PRIMORAC, D. *et al.* Adaptive Immune Responses and Immunity to SARS-CoV-2. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 4 maio 2022.

RADHAKRISHNAN, A.; GREEN, R. Connections Underlying Translation and mRNA Stability. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 18, p. 3558–3564, set. 2016.

- ROCHA, C. et al. Potency of HIV-2-specific antibodies increase in direct association with loss of memory B cells. **AIDS**, v. 31, n. 17, p. 2431–2433, 13 nov. 2017.
- ROTH, C. *et al.* A Modified mRNA Vaccine Targeting Immunodominant NS Epitopes Protects Against Dengue Virus Infection in HLA Class I Transgenic Mice. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 10, n. 1424, Jun. 2019.
- RUIZ-ARAVENA, M. *et al.* Ecology, evolution and spillover of coronaviruses from bats. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 20, n. 5, p. 299-314, maio. 2022.
- SAELENS, W. *et al.* A comparison of single-cell trajectory inference methods. **Nature Biotechnology**, Nova Iorque, v. 37, n. 5, p. 547-554, maio. 2019.
- SAHIN, U. *et al.* BNT162b2 vaccine induces neutralizing antibodies and poly-specific T cells in humans. **Nature**, Londres, v. 595, n. 7868, p. 572-577, jul. 2021.
- SATIJA, R. *et al.* Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. **Nature Biotechnology**, Nova Iorque, v. 33, n. 5, p. 495-502, maio. 2015.
- SHI, J. et al. Single-Cell Transcriptomic Profiling of MAIT Cells in Patients With COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 30 jul. 2021.
- SILVA, W. M. C. et al. Transcriptome Analysis Using RNA-seq and scRNA-seq. In: **Transcriptomics in Health and Disease**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 73–107.
- SINGH, Y. et al. **Comparative multi-OMICS single cell atlas of five COVID-19 (rAdVV and mRNA) vaccines describe unique and distinct mechanisms of action.** [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory, 13 set. 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/2022.09.12.507666>>. Acesso em: 21 set. 2023.
- SOKAL, A. et al. Human type I IFN deficiency does not impair B cell response to SARS-CoV-2 mRNA vaccination. **Journal of Experimental Medicine**, v. 220, n. 1, 7 nov. 2022.
- SOKAL, A. et al. mRNA vaccination of naive and COVID-19-recovered individuals elicits potent memory B cells that recognize SARS-CoV-2 variants. **Immunity**, v. 54, n. 12, p. 2893-2907.e5, dez. 2021.
- SONG, J.; YI, C. Chemical Modifications to RNA: A New Layer of Gene Expression Regulation. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 12, n. 2, p. 316-325, fev. 2017.
- STARK, R.; GRZELAK, M.; HADFIELD, J. RNA sequencing: the teenage years. **Nature Reviews Genetics**, Londres, v. 20, n. 11, p. 631-656, nov. 2019.
- STERTZ, S. *et al.* The intracellular sites of early replication and budding of SARS-coronavirus. **Virology**, Nova Iorque, v. 361, n. 2, p. 304-315, maio. 2007.
- STOECKIUS, M. et al. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. **Nature Methods**, v. 14, n. 9, p. 865–868, 31 jul. 2017.

STREET, K. *et al.* Slingshot: cell lineage and pseudotime inference for single-cell transcriptomics. **BMC Genomics**, Londres, v. 19, p. 477, jun. 2018.

SVENSSON, V.; VENTO-TORNO, R.; TEICHMANN, S.A. Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade. **Nature Protocols**, Londres, v. 13, n. 4, p. 599-604, abr. 2018.

SZABO, P.A. *et al.* Single-cell transcriptomics of human T cells reveals tissue and activation signatures in health and disease. **Nature Communications**, Londres, v. 10, p. 4706, out. 2019.

TANG, F. *et al.* mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. **Nature Methods**, Nova Iorque, v. 6, n. 5, p. 377-382, maio. 2009.

TERPOS, E. *et al.* Comparison of Neutralizing Antibody Responses at 6 Months Post Vaccination with BNT162b2 and AZD1222. **Biomedicines**, v. 10, n. 2, p. 338, 1 fev. 2022.

THOMAS, S. J. *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine through 6 Months. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 19, p. 1761–1773, 4 nov. 2021.

THOMAS, S.J. *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine through 6 Months. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 385, n. 19, p. 1761-1773, nov. 2021.

TO, K.K.W.; CHO, W.C.S. An overview of rational design of mRNA-based therapeutics and vaccines. **Expert opinion on drug discovery**, London, v. 16, n. 11, p. 1307-1317, nov. 2021.

TOWER, R.J. *et al.* Single-cell mapping of regenerative and fibrotic healing responses after musculoskeletal injury. **Stem Cells Reports**, Cambridge, v. 17, n. 10, p. 2334-2348, out. 2022.

TRAPNELL, C. *et al.* The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 381–386, 23 mar. 2014.

TROUILLET-ASSANT, S. *et al.* Type I IFN immunoprofiling in COVID-19 patients. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 146, n. 1, p. 206- 208.e2, jul. 2020.

TYSER, R.C.V. *et al.* Single-cell transcriptomic characterization of a gastrulating human embryo. **Nature**, Londres, v. 600, n. 7888, p. 285-289, dez. 2021.

VERBEKE, R. *et al.* Three decades of messenger RNA vaccine development. **Nano Today**, v. 28, n. 100766, out. 2019.

VICTORA, G. D.; NUSSENZWEIG, M. C. Germinal Centers. **Annual Review of Immunology**, v. 40, n. 1, p. 413–442, 26 abr. 2022.

VISTAIN, L. F.; TAY, S. Single-Cell Proteomics. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 46, n. 8, p. 661–672, ago. 2021.

VKOVSKI, P. *et al.* Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 19, n. 3, p. 155-170, mar. 2021.

- WAICKMAN, A. T. et al. Dissecting the heterogeneity of DENV vaccine-elicited cellular immunity using single-cell RNA sequencing and metabolic profiling. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 14 ago. 2019.
- WAN, Y. *et al.* Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 94, n. 7, Mar. 2020.
- WANG, D. et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, v. 323, n. 11, p. 1061, 17 mar. 2020.
- WANG, Y. et al. Influenza vaccination features revealed by a single-cell transcriptome atlas. **Journal of Medical Virology**, v. 95, n. 1, 6 out. 2022.
- WANG, Y. et al. Single-cell transcriptomic atlas reveals distinct immunological responses between COVID-19 vaccine and natural SARS-CoV-2 infection. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 11, p. 5304–5324, 30 jul. 2022.
- WEN, W. et al. Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing. **Cell Discovery**, v. 6, n. 1, p. 1–18, 4 maio 2020.
- WHITE, J. PubMed 2.0. **Medical Reference Services Quarterly**, Nova Iorque, v. 39, n. 4, p. 382-387, dez. 2020.
- WILK, A. J. et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 7, p. 1070–1076, 8 jun. 2020.
- WILSON, K. R.; VILLADANGOS, J. A.; MINTER, J. D. Dendritic cell Flt3 – regulation, roles and repercussions for immunotherapy. **Immunology & Cell Biology**, v. 99, n. 9, p. 962–971, 2 jul. 2021.
- WIMMERS, F. *et al.* The single-cell epigenomic and transcriptional landscape of immunity to influenza vaccination. **Cell**, Cambridge, v. 184, n. 15, p. 3915-3935, jul. 2021.
- WOLFF, J.A. *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**, Nova Iorque, v. 247, n. 4949, p. 1465-1468, mar. 1990.
- WOUTERS, O.J. *et al.* Challenges in ensuring global access to COVID-19 vaccines: production, affordability, allocation, and deployment. **Lancet**, Londres, v. 397, n. 10278, p. 1023-1034, mar. 2021.
- WU, F. *et al.* Single-cell profiling of tumor heterogeneity and the microenvironment in advanced non-small cell lung cancer. **Nature Communications**, Londres, v. 12, p. 2540, maio. 2021.
- WU, Z. et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) in healthy adults aged 60 years and older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 803–812, jun. 2021.

XIANG, H. et al. Landscapes and dynamic diversifications of B-cell receptor repertoires in COVID-19 patients. **Human Immunology**, v. 83, n. 2, p. 119–129, fev. 2022.

XIE, Z. et al. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. **Current Protocols**, v. 1, n. 3, mar. 2021.

YANG, H.; RAO, Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 19, n. 11, p. 685-700, nov. 2021.

YAO, C. et al. Cell-Type-Specific Immune Dysregulation in Severely Ill COVID-19 Patients. **Cell Reports**, v. 34, n. 1, p. 108590, jan. 2021.

ZHANG, Y. et al. Analysis of B Cell Receptor Repertoires Reveals Key Signatures of the Systemic B Cell Response after SARS-CoV-2 Infection. **Journal of Virology**, v. 96, n. 4, 23 fev. 2022.

ZHU, L. et al. Altered frequencies of memory B cells in new-onset systemic lupus erythematosus patients. **Clinical Rheumatology**, v. 37, n. 1, p. 205–212, 25 out. 2017.

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

ANEXO I

Tabela S1. Marcadores transcricionais empregados na classificação e anotação celular.

Tipos Celulares (Anotação <i>Lin</i>)	Marcadores Celulares
B naïve	MS4A1; CD19; IGHM; IGHD
B Memória	CD19; CD27; CD79A; CD79B
Plasmoblastos	IGHA1; XBP1
TCD4+	CD3E; CD69
TCD8+	CD3E; CD8A; CD8B
Treg	CD3E; KLRB1; CD25
Monócito CD14+	CD14
Monócito CD16+	FCGR3A; MS4A7
Monócito Alt	NCF1; GBP5
cDC1	CD1c; CLEC9A
cDC2	CLEC10A; FCER1A
pDC	IRF7; TCF4
NK/T	KLRD1; KLRF1; PRF1
Plaqueta	PF4
HPC	SPINK2; CDK6
Desconhecido	MS4A1; CD3E

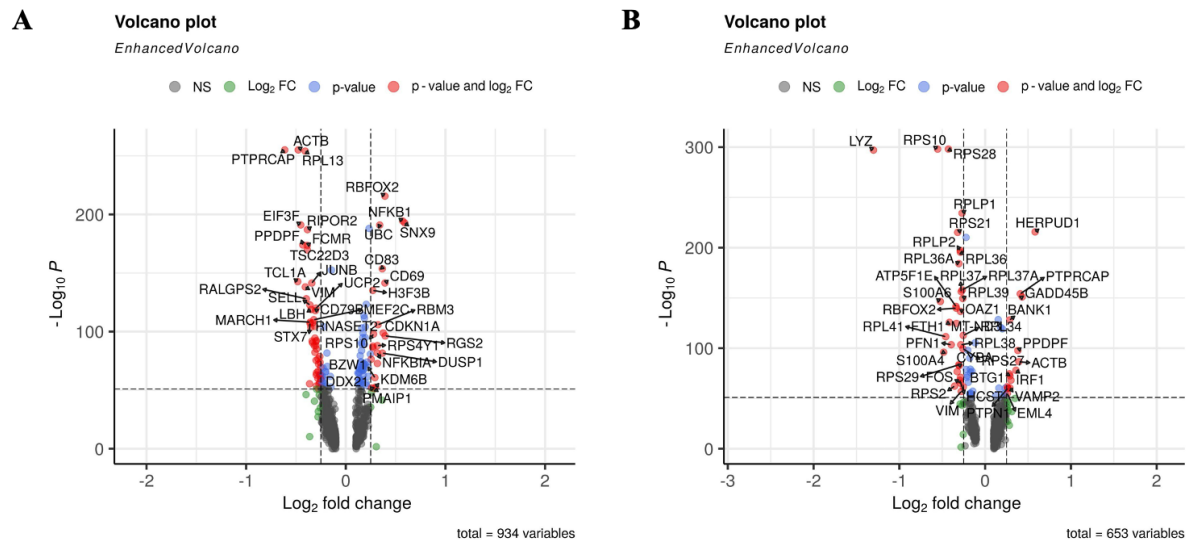


Figura S1. Expressão gênica diferencial em células B. Gráfico vulcão representando os genes diferencialmente expressos no agrupamento correspondente aos linfócitos B. A imagem **A** indica a expressão Dia 21 vs Dia 7. A imagem **B** representa a expressão Dia 28 vs 21.

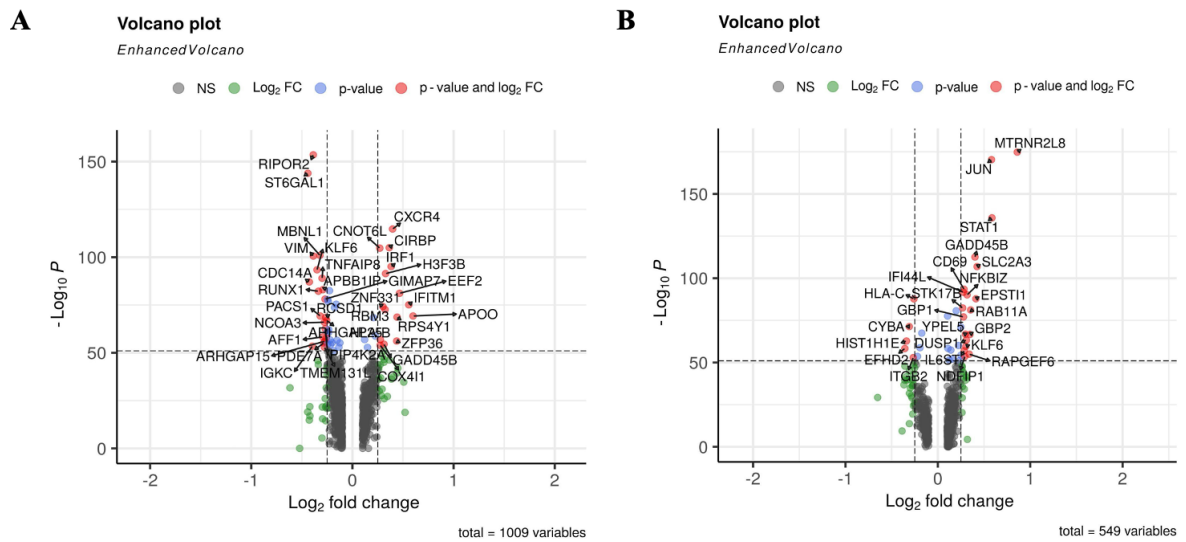


Figura S2. Expressão gênica diferencial em células T. Gráfico vulcão representando os genes diferencialmente expressos no agrupamento correspondente aos linfócitos T. A imagem **A** indica a expressão Dia 21 vs Dia 7. A imagem **B** representa a expressão Dia 28 vs 21.

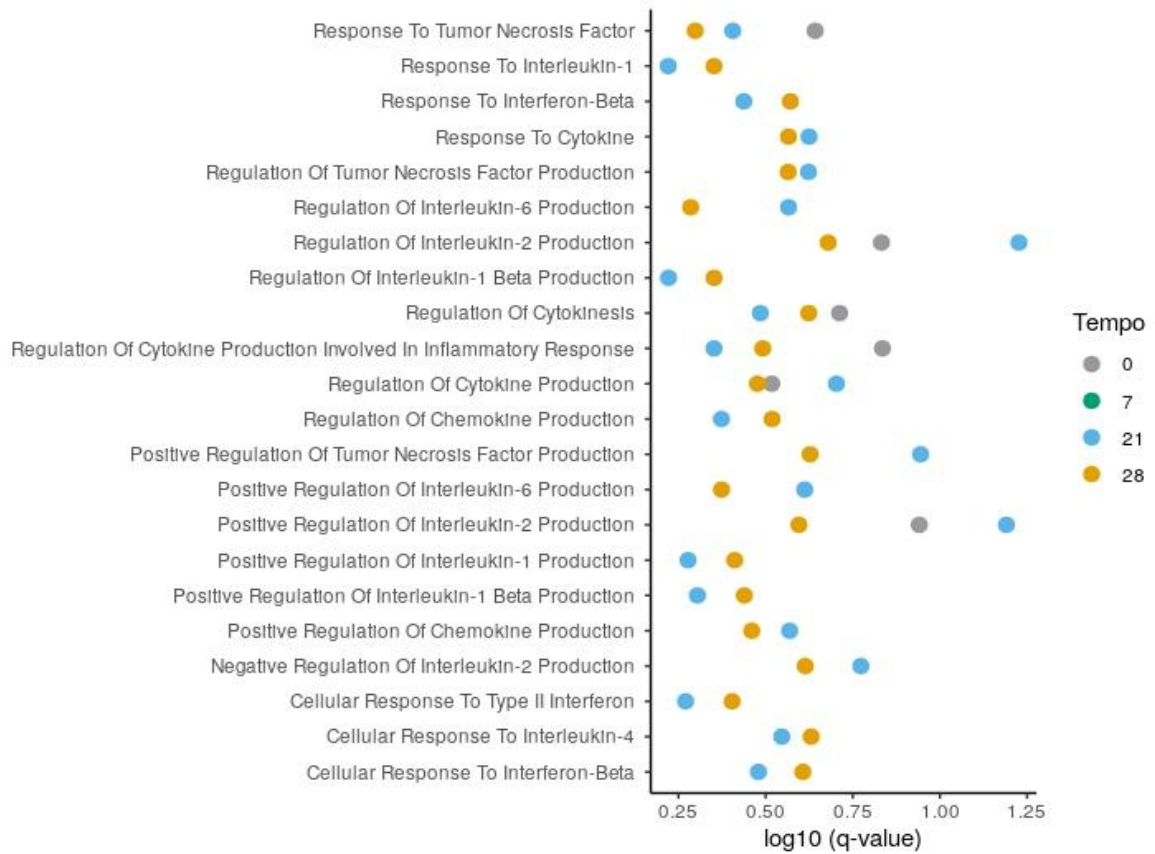


Figura S3. Ontologia gênica de termos ligados à citocinas em células B. Visualiza-se os principais termos associados à respostas e regulação de citocinas em linfócitos B entre os diferentes períodos de tempo pré e pós vacinação em termos de Q-value.

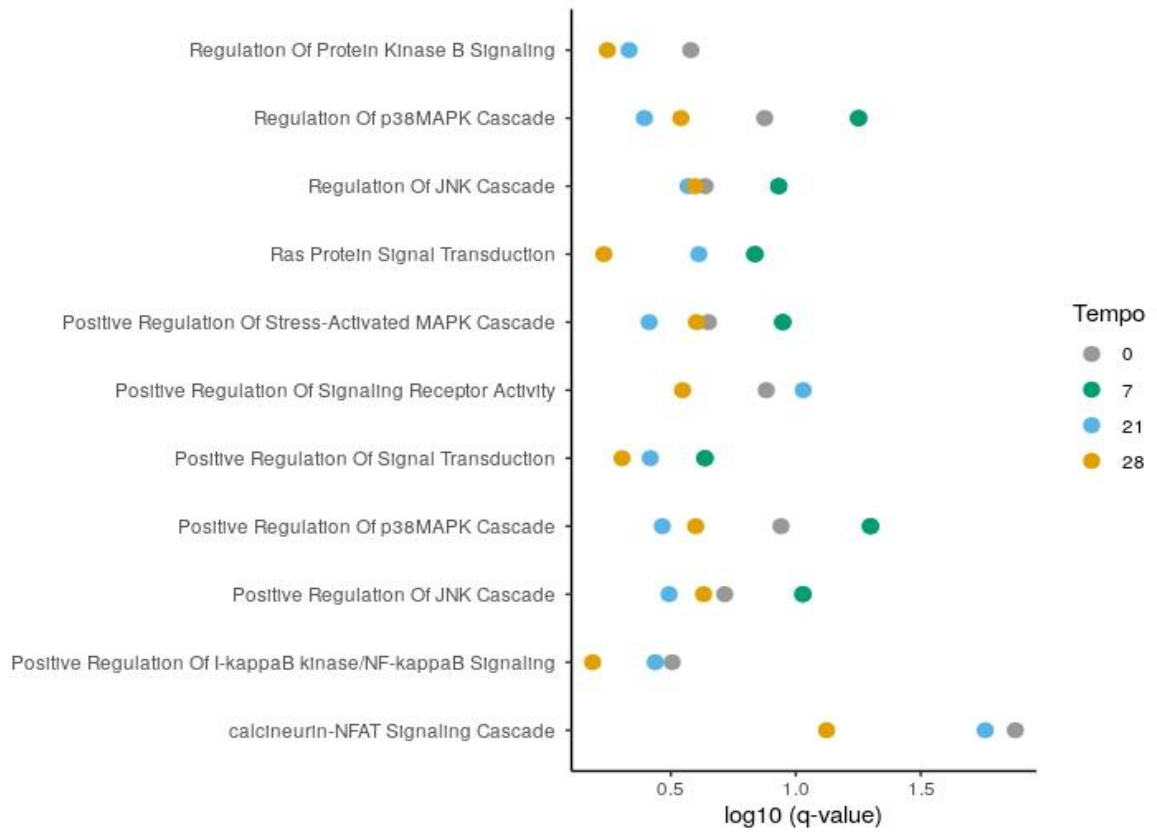


Figura S4. Ontologia gênica de termos ligados à vias de sinalização celular em células B. Visualiza-se os principais termos associados à regulação de vias sinalizadoras em linfócitos B entre os diferentes períodos de tempo pré e pós vacinação em termos de Q-value.

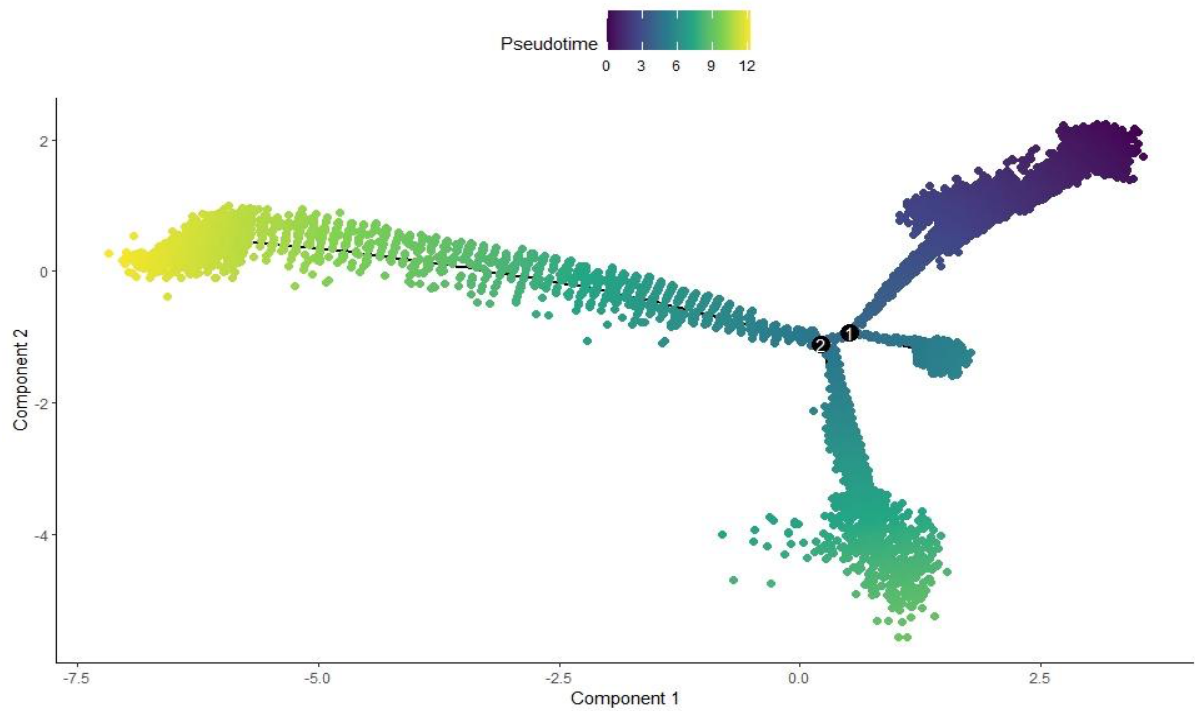


Figura S5. Trajetória de pseudotempo em células B. A análise de trajetória em pseudotempo evidenciou os períodos temporais de diferenciação celular em linfócitos B, tendo como ponto de partida células B naive. Quanto mais claro (amarelado/azul claro) são as células, mais tardio foi a diferenciação destes grupos em particular.

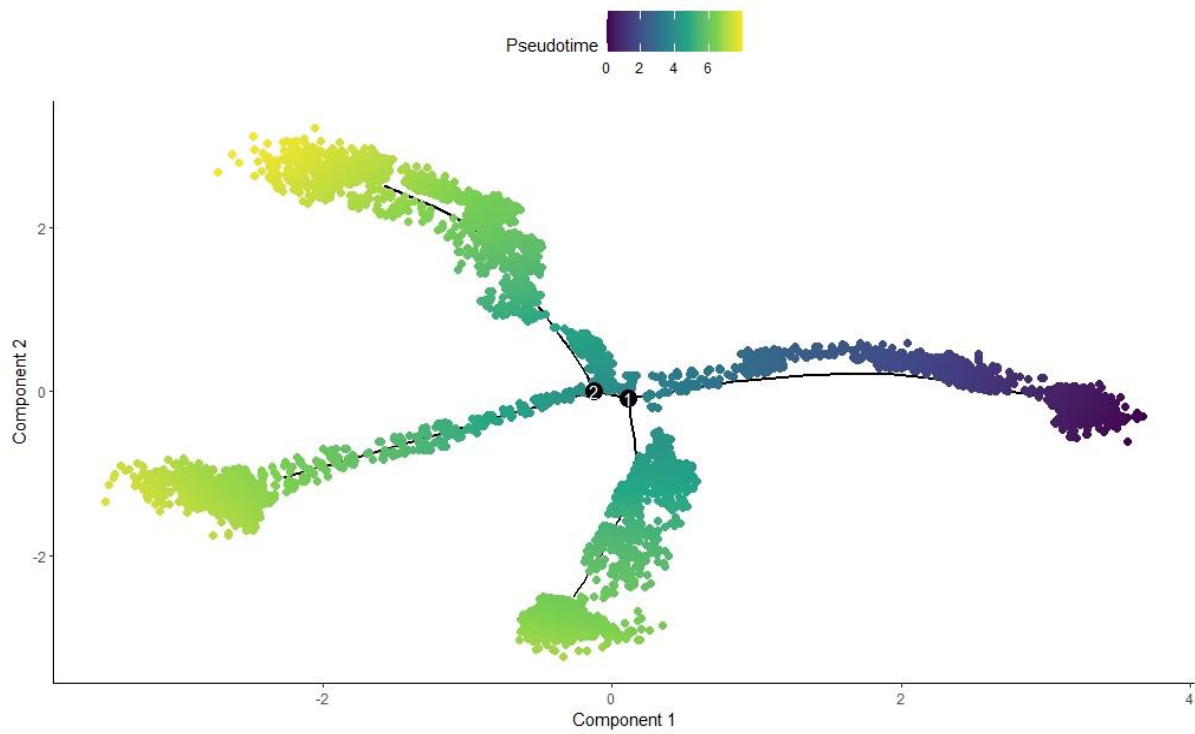


Figura S6. Trajetória de pseudotempo em células T. A análise de trajetória em pseudotempo evidenciou os períodos temporais de diferenciação celular em linfócitos T, tendo como ponto de partida células TCD4+. Quanto mais claro (amarelado/azul claro) são as células, mais tardio foi a diferenciação destes grupos em particular.

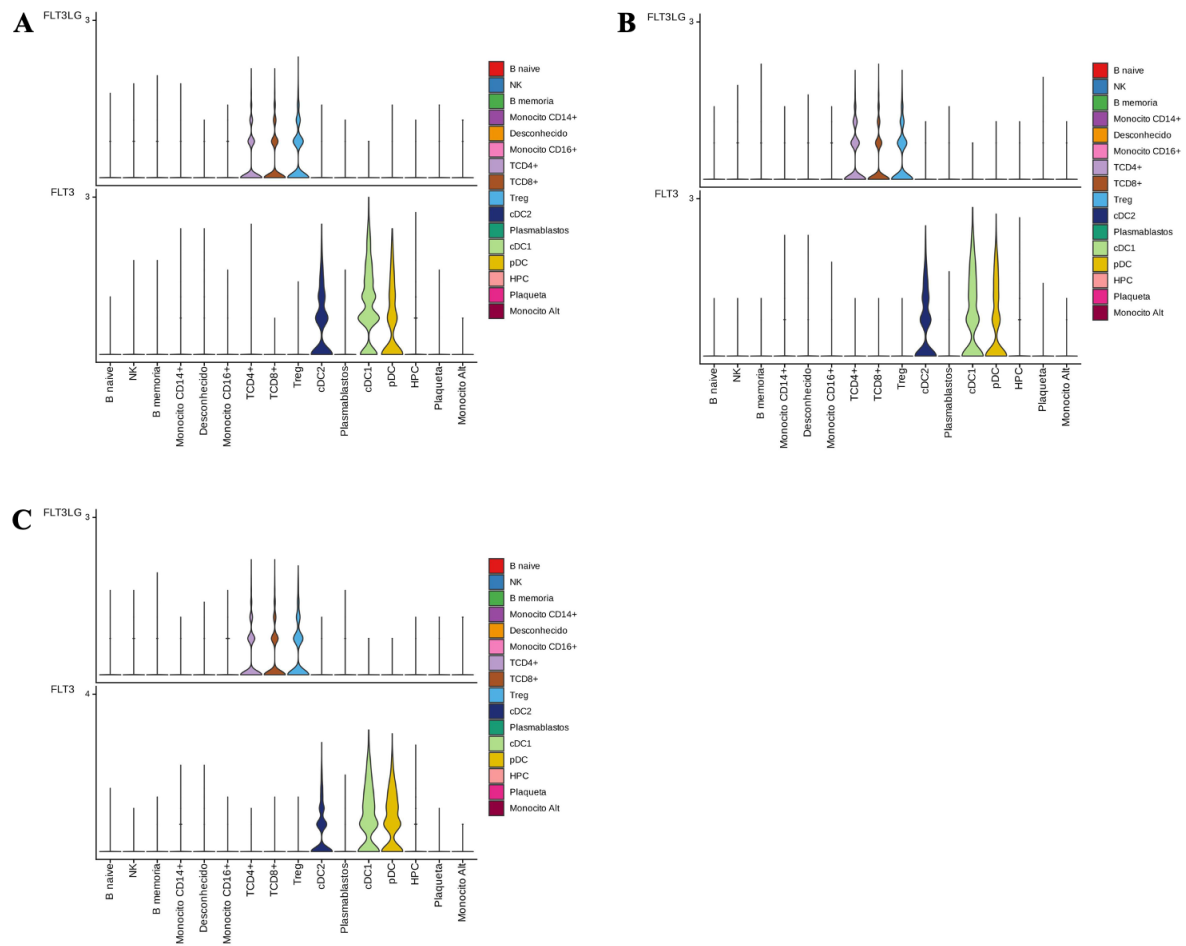


Figura S7. Sinalização receptor-ligante via FTL3. Os gráficos de violino apontam grupos celulares envolvidos como sinalizadores e receptores FTL3 nos dias 0, 21 e 28 indicados pelas figuras **A**, **B** e **C**, respectivamente. O gráfico superior indica os grupos celulares expressando ligante de FTL3 e o gráfico inferior representa os grupos celulares expressando o receptor FTL3. Quanto mais “alto” os violinos são, maior é a expressão gênica. A largura dos violinos é proporcional ao número de células do grupo em questão expressando tais ligantes/receptores.

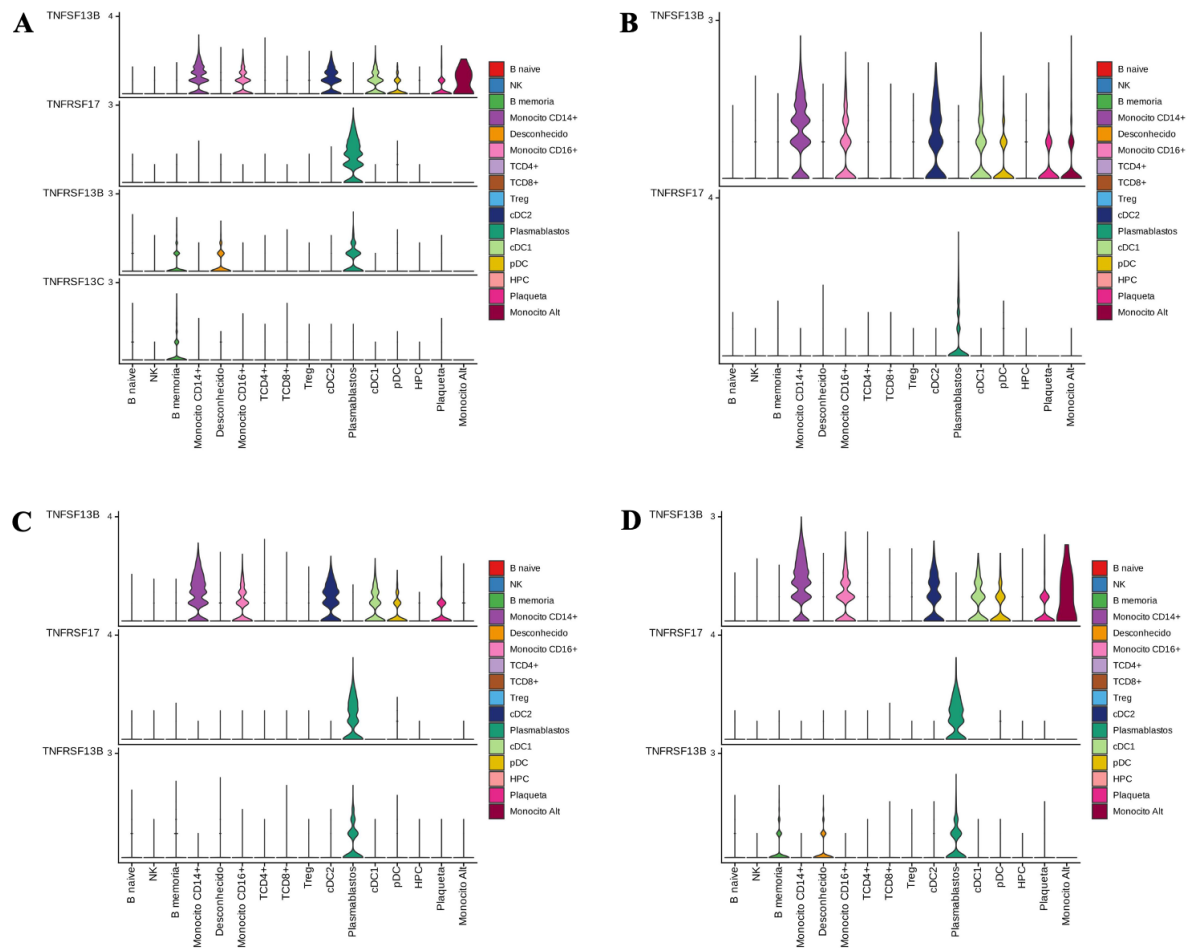


Figura S8. Sinalização receptor-ligante via BAFF. Os gráficos de violino apontam grupos celulares envolvidos como sinalizadores e receptores BAFF nos dias 0, 7, 21 e 28 indicados pelas figuras A, B, C e D, respectivamente. TNFSF13B, TNFRSF13B e TNFSF17 correspondem aos 3 receptores conhecidos como ligantes BAFF/APRIL. Quanto mais “alto” os violinos são, maior é a expressão gênica. A largura dos violinos é proporcional ao número de células do grupo em questão expressando tais ligantes/receptores.