



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**CENTRO DE BIOCIÊNCIAS**

**BEATRIZ MENDONÇA ALVES BANDEIRA**

**CONSTRUÇÃO DE VETOR DE EXPRESSÃO PARA DUPLA ANCORAGEM  
DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES NA SUPERFÍCIE DE *Pichia pastoris***

**RECIFE**

**2024**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**CENTRO DE BIOCIÊNCIAS**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

**BEATRIZ MENDONÇA ALVES BANDEIRA**

**CONSTRUÇÃO DE VETOR DE EXPRESSÃO PARA DUPLA ANCORAGEM  
DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES NA SUPERFÍCIE DE *Pichia pastoris***

TCC apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientador(a):** Antonio Carlos de Freitas

**Coorientador(a):** Anna Jéssica Duarte Silva

**RECIFE**

**2024**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Bandeira, Beatriz Mendonça Alves.

Construção de vetor de expressão para dupla ancoragem de proteínas recombinantes na superfície de *Pichia pastoris* / Beatriz Mendonça Alves  
Bandeira. - Recife, 2024.

61 p. : il., tab.

Orientador(a): Antonio Carlos de Freitas

Coorientador(a): Anna Jéssica Duarte Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2024.

Inclui referências.

1. *Pichia pastoris*. 2. SARS-CoV-2. 3. IRES. 4. Dupla ancoragem de proteínas. 5. alfa-aglutinina. I. Freitas, Antonio Carlos de. (Orientação). II. Silva, Anna Jéssica Duarte. (Coorientação). IV. Título.

500 CDD (22.ed.)

BEATRIZ MENDONÇA ALVES BANDEIRA

**CONSTRUÇÃO DE VETOR DE EXPRESSÃO PARA DUPLA ANCORAGEM  
DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES NA SUPERFÍCIE DE *Pichia pastoris***

TCC apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico da Vitória, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 26/07/2024.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Benigno Cristofer Flores Espinoza (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Gustavo Barbosa de Lima (Examinador Externo)

Instituto Aggeu Magalhães

## AGRADECIMENTOS

Muito de mim vem de pessoas incríveis que passaram por mim e deixaram ensinamentos que levo até hoje, e de algumas que estão na minha vida e me inspiram a continuar todos os dias.

A princípio, agradeço a minha mãe, Ely, que sempre foi essencial como minha base. Todo esforço, toda luta, tudo que já enfrentamos juntas foi importante para construção de quem eu sou hoje. Obrigada por toda renúncia, todo sacrifício feito para que chegássemos até aqui. Agradeço também a Flávio, que escolheu ser meu pai, e que me mostra todo o dia que a vida pode ser leve e que às vezes a gente tem que rir até nos momento difíceis. Obrigada por tudo que vocês fizeram para que eu chegasse até aqui. Amo vocês com tudo que eu sou. A toda minha família também vai meu agradecimento por sempre acreditarem em mim.

Agradeço a Angela, que tem sido a melhor parceira do mundo pelos últimos sete anos. Obrigada pela paciência e compreensão. Por todo cuidado, todo amor, toda torcida. Por acreditar em mim quando nem eu acredito, e me dar esperanças de que no final vai dar tudo certo. Obrigada por segurar minha mão nos momentos bons, e principalmente nos ruins. Que sigamos juntas construindo nosso amor lindo.

Agradeço ao Prof. Dr. Antonio Carlos por todo conhecimento repassado durante meu tempo no laboratório. Sou grata pela paciência, pelos conselhos e pelas conversas que sempre me ajudam e me dão incentivo para continuar. Tenho enorme admiração no profissional e pessoa que és.

A minha co-orientadora, Dra. Anna Jéssica, nenhum agradecimento será o suficiente, por isso insisto em repetir rotineiramente. É incrível conseguir trabalhar com alguém que tanto se admira e que sorte quando essa admiração cresce cheia de carinho e amizade. Obrigada por tanta paciência em me ensinar e me escutar, por acreditar em mim e por repassar as ferramentas para que eu trilhe esse caminho. Sou grata por toda preocupação que tens, e pela chance de retribuir o cuidado.

A família LEMTE, agradeço por ter me recebido de braços abertos. O laboratório se tornou minha segunda casa, tanto pelo tempo que passo quanto pelo acolhimento. Vocês tornam a jornada do dia a dia mais leve, sei que em algum momento vou cair na risada com vocês. Que sorte é encontrar pessoas incríveis e

especiais como vocês. Todos têm um espaço em meu coração, e que nossas trocas possam continuar mais ainda. Em especial agradeço Larissa, que tem um coração lindo e que eu admiro imensamente. A Pedro Novis, meu irmãozinho, minha duplinha de lab, tenho enorme carinho e sou grata por todo apoio e pelos momentos de surto compartilhados. Bruna, Vanessa, Conceição, Samara, Bianca, Lígia, Ingrid, Marco, os Pedros, Bia Eda, Gabriel, Micaela e todos que estão no meu dia a dia e em meu coração. Aos meus amigos de universidade, que me deram força durante a graduação, vocês tiveram um papel muito importante para que eu chegasse até aqui. Minhas meninas, Beatriz Tenório e Mayara Letícia, que estiveram comigo no começo, trocaram de rota, mas permaneceram na minha vida, muito obrigada por todos os momentos compartilhados até agora. Vocês fazem muita falta no meu dia a dia, mas cada encontro nosso vale a pena. Os bezerrinhos bonitinhos, Julieta, Renan, Rafael, Bia Luna e Gabriel, que foram surgindo e se aproximando durante a graduação e fizeram meus dias e momentos mais especiais e engraçados. A Renanzinho, Nara, Gab, Leo, Hebert, muito obrigada, vocês são muito especiais.

A Maria Júlia, a gente sabe que nenhuma palavra vai expressar tudo que a gente passou juntas, mas obrigada por tudo. Obrigada por me entender de um jeito que eu nem sabia que era possível, por compartilhar tantos momentos incríveis e difíceis comigo. Que venham muitos cupuaçus para nós e que a vida seja tão leve quanto nossas risadas.

A Laura, minha irmã que a vida graciosamente me deu, obrigada por estar comigo literalmente desde o nosso primeiro dia na faculdade. Obrigada por me mostrar o que é amizade e irmandade. Por ser luz e deixar a vida mais leve com gargalhadas. Por atender todas as minhas ligações, por entrar nas minhas loucuras, por dividir frutinhas e a vida.

“Nada na vida é para ser temido,  
apenas para ser compreendido.  
Agora é a hora de compreender mais,  
para que possamos temer menos.”

Marie Curie

## RESUMO

O SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 - Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2), agente causador da doença do coronavírus 2019 (COVID-19), ainda é considerado uma ameaça, mesmo após o fim da pandemia, principalmente pelas diferentes variantes que continuam surgindo. Por isso se destaca a importância da vacinação contra o vírus. Dentre as possibilidades de tecnologias vacinais estão as vacinas de subunidade carregadas por leveduras, uma abordagem promissora para estimular respostas imunológicas eficazes contra os antígenos vacinais. O presente trabalho propõe a construção de vetores de expressão que permitam a exposição de proteínas derivadas do SARS-CoV-2 na superfície da levedura *Pichia pastoris*. Para isso, os genes SCoV-Sint $\Delta$  (gene sintético multiepítopos) e RBDwt do SARS-CoV-2 foram amplificados para posterior clonagem no vetor de expressão pPGKPVY\_Ag $\alpha$  a ser construído. O cassete de expressão em construção para o vetor inclui o gene promotor PGK1, o peptídeo sinal MF- $\alpha$ , sequência IRES PVY (que permitirá a dupla ancoragem) e, posteriormente incluirá os genes de interesse fusionados à uma tag de 6xHIS e a proteína âncora  $\alpha$ -aglutinina. No vetor de expressão pPGK foi adicionada a sequência IRES PVY para recrutamento de ribossomos e garantia da continuidade da síntese de proteína. A  $\alpha$ -aglutinina I, II, que contém a mesma sequência, porém com sítios diferentes para serem inseridas em diferentes posições no cassete, permitirão a exposição das proteínas recombinantes na superfície da levedura, e o MF- $\alpha$  (fator alfa), que irá secretar as proteínas produzidas, também foram amplificados e preparados para inserção no cassete de expressão. Após a construção do vetor e inserção dos genes, espera-se a obtenção de linhagens de *P. pastoris* recombinantes a partir de transformação, para então avaliar a expressão das proteínas virais, a dupla ancoragem e sua validação a partir de análises imunológicas *in vitro* e *in vivo*. O carregamento de mais de uma proteína recombinante na superfície da levedura abre novas perspectivas na produção de vacinas contra uma ampla gama de agentes infecciosos. Com a construção deste vetor, espera-se contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de vacinação profilática contra o SARS-CoV-2, além de demonstrar a utilização de leveduras como plataforma vacinal.

**Palavras-chave:** *Pichia pastoris*; SARS-CoV-2; IRES; Dupla ancoragem de proteínas;  $\alpha$ -aglutinina.

## ABSTRACT

SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), the causative agent of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), is still considered a threat even after the end of the pandemic, primarily due to the different variants that continue to emerge. Therefore, the importance of vaccination against the virus is highlighted. Among the possible vaccine technologies are yeast-carried subunit vaccines, a promising approach to stimulating effective immune responses against vaccine antigens. This study proposes the construction of expression vectors that allow the display of proteins derived from SARS-CoV-2 on the surface of the yeast *Pichia pastoris*. To achieve this, the SCoV-Sint $\Delta$  (synthetic multi-epitope gene) and RBDwt genes of SARS-CoV-2 were amplified for subsequent cloning into the expression vector pPGKPVY\_Ag $\alpha$  to be constructed. The expression cassette being constructed for the vector includes the PGK1 promoter gene, the MF- $\alpha$  signal peptide, the IRES PVY sequence (which will allow dual anchoring), and will later include the genes of interest fused to a 6xHIS tag and the  $\alpha$ -agglutinin anchor protein. The IRES PVY sequence was added to the pPGK expression vector for ribosome recruitment and to ensure the continuity of protein synthesis. The  $\alpha$ -agglutinin I, II, containing the same sequence but with different sites to be inserted in different positions in the cassette, will allow the display of recombinant proteins on the surface of the yeast, and MF- $\alpha$  (alpha factor), which will secrete the produced proteins, were also amplified and prepared for insertion into the expression cassette. After vector construction and gene insertion, recombinant *P. pastoris* strains are expected to be obtained from transformation to evaluate viral protein expression, dual anchoring, and validation through in vitro and in vivo immunological analyses. Carrying more than one recombinant protein on the yeast surface opens new perspectives in vaccine production against a wide range of infectious agents. With the construction of this vector, it is expected to contribute to the development of new prophylactic vaccination strategies against SARS-CoV-2, as well as to demonstrate the use of yeast as a vaccine platform.

Keywords: *Pichia pastoris*; SARS-CoV-2; IRES; Double protein anchoring;  $\alpha$ -agglutinin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Proteínas estruturais do SARS-CoV-2.....  | 22 |
| Figura 2 - Ciclo de replicação do SARS-CoV-2.....  | 24 |
| Figura 3 - Número total de casos de COVID-19 reportados para OMS até Junho de 2024 e distribuição de casos mundialmente..... | 26 |
| Figura 4 - Ilustração da ancoragem dos antígenos vacinais na superfície da levedura .....                                    | 34 |
| Figura 5 - Mapa esquemático do vetor de expressão pPGK $\Delta$ 3 .....  | 36 |
| Figura 6 - Gene sintético multiepítomos .....  | 37 |
| Figura 7 - Esquema correspondente ao cassete de expressão .....  | 41 |
| Figura 8 - Amplificação de SCOV-Sint $\Delta$ e RBDwt de SARS-CoV-2 .....  | 42 |
| Figura 9 - Confirmação de PVY em pPGK a partir de PCR convencional .....   | 43 |
| Figura 10- Ilustração da construção pPGKPVY .....  | 43 |
| Figura 11 - Digestão enzimática da proteína âncora $\alpha$ -aglutinina I e pPGKPVY .....                                    | 44 |
| Figura 12 - Resultados de corridas eletroforéticas .....   | 45 |
| Figura 13 - Digestão enzimática com as enzimas EcoRI e KpnI do SCOV-Sint $\Delta$ e pPGKPVY .....                            | 45 |
| Figura 14 - Esquema geral do cassete de expressão com genes .....  | 46 |

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| Quadro 1- Taxonomia de Coronavírus .....   | 18 |
| Quadro 2 - Resumo das principais funções das proteínas não estruturais (NSPs) do Coronavírus.....                      | 20 |
| Quadro 3 - Principais plataformas empregadas no desenvolvimento de vacinas contra a COVID-19 .....                     | 28 |
| Quadro 4 - Vantagens e desvantagens de diferentes sistemas hospedeiros para expressão de proteínas recombinantes ..... | 30 |
| Quadro 5 - <i>Linkers</i> adicionados à construção do gene sintético multiepítipo .....                                | 37 |

## LISTA DE ABREVIACOES

|          |   |
|----------|---|
| 6xHIS    | Hexahistidina                                       |
| +ssRNA   | RNA de fita simples e senso positivo                |
| ACE2     | Enzima conversora de angiotensina 2                 |
| Aga      | a-aglutinina  |
| Aga      | $\alpha$ -aglutinina                                |
| AOX1     | Álcool oxidase 1                                    |
| CDC      | Centros de Controle e Prevenção de Doenças          |
| CGS      | Grupo de Estudos de Coronavírus                     |
| COVID-19 | <i>Coronavirus disease</i> ou Doença do Coronavírus |
| CP       | Citoplasmático                                      |
| DMVs     | Vesículas de Membrana Dupla                         |
| E        | Envelope  |
| FP       | Peptídeo de fusão                                   |
| GPI      | Glicosilfosfatidilinositol                          |
| GRAS     | <i>Generally Recognized as Safe</i>                 |
| HCoV     | Coronavírus humano                                  |
| HR       | Repetições heptad                                   |
| ICTV     | Comitê Internacional de Taxonomia Viral             |
| IL       | Interleucinas                                       |
| IRES     | Sítio Interno de Entrada de Ribossomo               |

|              |  |
|--------------|--|
| LB           | Luria-Bertani  |
| M            | Membrana   |
| MERS         | Síndrome Respiratória do Oriente Médio                           |
| MF- $\alpha$ | Fator Alfa   |
| MHC-I        | Complexo principal de histocompatibilidade I                     |
| MHC-II       | Complexo principal de histocompatibilidade II                    |
| N            | Nucleocapsídeo   |
| NAbs         | Anticorpos neutralizantes  |
| NSPs         | Proteínas não estruturais  |
| NTD          | Domínio N-terminal   |
| OMS          | Organização Mundial da Saúde                                     |
| ONU          | Organização das Nações Unidas                                    |
| ORFs         | Quadros de leitura abertos                                       |
| PCR          | <i>Polymerase Chain Reaction</i> /Reação em Cadeia da Polimerase |
| PP1a         | Poliproteína 1a  |
| PP1ab        | poliproteína 1ab   |
| PVY          | Potato virus Y   |
| RBD          | Domínio de ligação ao receptor                                   |
| rDNA         | DNA recombinante   |
| RE           | Retículo Endoplasmático  |
| RTC          | Complexo replicase-transcriptase                                 |

|            |   |
|------------|---|
| S          | Spike   |
| SAM        | S-adenosilmetionina                                     |
| SARS       | Síndrome Respiratória Aguda Grave                       |
| SCOV-SintΔ | Gene sintético multiepítomos do SARS-CoV-2              |
| SIBIA      | Salt Institute Biotechnology/Industry Associates, Inc.  |
| TAP        | (Transportador Associado ao Processamento de Antígenos) |
| TM         | Transmembrana   |
| TMPRSS2    | Protease Transmembranar Serina 2                        |
| UTRs       | Regiões não traduzidas                                  |
| YSD        | <i>Yeast Surface Display</i>                            |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>  | <b>16</b> |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>   | <b>18</b> |
| 2.1 SARS-CoV-2   | 18        |
| <b>2.1.1 Histórico e Origem</b>  | <b>18</b> |
| <b>2.1.2 Estrutura e Ciclo Viral</b>                                     | <b>20</b> |
| <b>2.1.3 Epidemiologia e Transmissão</b>                                 | <b>25</b> |
| <b>2.1.4 Vacinas</b>   | <b>27</b> |
| 2.2 Utilização de leveduras como vetores vacinais                        | 29        |
| <b>2.2.1 Caracterização</b>  | <b>29</b> |
| <b>2.2.2 Produção de proteínas heterólogas em <i>Pichia pastoris</i></b> | <b>32</b> |
| 2.3 Ancoragem de proteínas recombinantes em leveduras                    | 32        |
| <b>2.3.1 Aspectos gerais</b>   | <b>32</b> |
| <b>2.3.2 Dupla ancoragem</b>   | <b>34</b> |
| <b>3 OBJETIVOS</b>   | <b>35</b> |
| 3.1 Objetivo Geral   | 35        |
| 3.2 Objetivos Específicos  | 35        |
| <b>4 METODOLOGIA</b>   | <b>36</b> |
| 4.1 Materiais  | 36        |
| <b>4.1.1 Plasmídeo</b>   | <b>36</b> |
| <b>4.1.2 Genes Multiepítipo e RBDwt</b>                                  | <b>37</b> |
| <b>4.1.3 Linhagem de Microrganismo e Meios de cultura</b>                | <b>38</b> |
| <b>4.1.4 Géis para Eletroforese e Tampão</b>                             | <b>38</b> |
| 4.2 Métodos  | 39        |
| <b>4.2.1 Amplificação dos Genes</b>                                      | <b>39</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>4.2.2 Amplificação dos “biobricks” e Construção do Cassete de Expressão</b> | <b>39</b> |
| <b>4.2.3 Clonagem dos genes no Vetor de Expressão</b>                          | <b>41</b> |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>  | <b>42</b> |
| <b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>  | <b>47</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>   | <b>48</b> |

## INTRODUÇÃO

O coronavírus é um vírus que pertence à subfamília Coronavirinae, dentro da família Coronaviridae e da ordem Nidovirales. Essa família é composta por quatro gêneros:  $\alpha$ -coronavírus e  $\beta$ -coronavírus, que podem infectar humanos, e  $\gamma$ -coronavírus e  $\delta$ -coronavírus, identificados apenas em animais. O surgimento do novo coronavírus SARS-CoV-2, inicialmente reportado em Wuhan, China, em dezembro de 2019, foi marcado por um surto de pneumonia grave que rapidamente se espalhou globalmente, levando à pandemia de COVID-19. O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de cadeia simples e senso positivo, com um genoma de aproximadamente 30 kilobases, organizado de forma a codificar múltiplas proteínas essenciais para seu ciclo de vida. As proteínas estruturais Spike (S), Membrana (M), Envelope (E) e Nucleocapsídeo (N), se destacam, sendo a proteína Spike crucial para a entrada do vírus nas células hospedeiras através da ligação ao receptor Enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2). Essa interação é central para a infecção e propagação do vírus, tornando a proteína Spike um alvo importante para o desenvolvimento de vacinas e terapias. Após a entrada na célula hospedeira, o vírus passa por um ciclo de replicação e transcrição, culminando na montagem e exocitose de novos vírions infecciosos.

A pandemia de COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, infectou cerca de 775 milhões de pessoas e resultou em aproximadamente 7 milhões de mortes até maio de 2024, conforme dados da OMS. Embora a OMS tenha encerrado a Emergência de Saúde Pública Internacional em 5 de maio de 2023, o vírus continua representando uma ameaça, exigindo vigilância e vacinação contínuas. A vacinação se mostra como o caminho crucial para prevenir formas graves da doença, com várias tecnologias de vacinas já desenvolvidas, incluindo as de vírus inativado, vetor viral e adenovírus, porém há uma margem para o desenvolvimento de novas abordagens como a vacina de subunidade carregada em levedura. Esta última utiliza fragmentos de proteínas antigênicas do vírus, levando a um estímulo para uma resposta imune específica. Espera-se que combinado a utilização de leveduras como veículo de carregamento a eficácia da vacina seja intensificada, induzindo respostas imunes humoral e celular.

O uso de leveduras como vetores vacinais, de maneira geral, tem sido promissor na indução de respostas imunológicas específicas contra alvos desejados, tanto em vacinas terapêuticas quanto profiláticas, demonstrando ativar células dendríticas e gerar

respostas robustas de linfócitos T citotóxicos. Diferentes leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, têm *status* GRAS (*Generally Recognized as Safe*), sendo seguras para utilização como vetores vacinais em diferentes abordagens. Um dos caminhos a seguir dentro da utilização de leveduras na produção de proteínas recombinantes é a ancoragem de tais proteínas na parede celular da levedura. Chamado de *Yeast Surface Display*, tal sistema tem sido utilizado para ampliar o reconhecimento específico dos antígenos virais, desencadeando uma resposta imunológica mais robusta.

Neste contexto, o presente trabalho propõe a construção de um vetor possibilitando a co-expressão de antígenos derivados do SARS-CoV-2 para dupla ancoragem na superfície de *Pichia pastoris*, como parte do desenvolvimento de uma nova abordagem vacinal profilática. Além de também utilizar a sequência IRES (Sítio Interno de Entrada de Ribossomo), aparato que permite a expressão policistônica em células eucarióticas, como em leveduras, e conseqüentemente a co-expressão de antígenos na superfície da levedura, como ferramenta para aumentar a apresentação antigênica.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 SARS-CoV-2

#### 2.1.1 Histórico e Origem

O coronavírus é um vírus que faz parte da subfamília Coronavirinae, dentro da família Coronaviridae e da ordem Nidovirales (Figura 1). A família Coronaviridae é composta por quatro gêneros:  $\alpha$ -coronavírus e  $\beta$ -coronavírus, que têm a capacidade de infectar seres humanos, e  $\gamma$ -coronavírus e  $\delta$ -coronavírus, os quais foram identificados apenas em animais (Groot *et al*, 2012). Os casos de infecção por coronavírus em seres humanos mais conhecidos eram causados pelo coronavírus humano (HCoV), e estavam relacionados a resfriados comuns (Geller *et al*, 2012). Até que em 2002 ocorreram casos de pneumonia grave e contagiosa de origem desconhecida na província de Guangdong, no sul da China, que alertou a Organização Mundial da Saúde (OMS) quando começou a se espalhar rapidamente para outros países. Em Março de 2003, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos designaram tais casos como causados pela Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) (Tsang *et al*, 2003). Dita a primeira doença do século XXI a representar uma ameaça epidemiológica global, a SARS, doença causada pelo SARS-CoV, destacou a importância da colaboração internacional e de uma constante vigilância de doenças emergentes para o combate, e principalmente, na prevenção de doenças infecciosas (Li *et al*, 2005).

#### Categoria Coronavírus

|            |   |
|------------|---|
| Reino      | <i>Riboviria</i>  |
| Ordem      | <i>Nidovirales</i>  |
| Subordem   | <i>Cornidovineae</i>  |
| Família    | <i>Coronaviridae</i>  |
| Subfamília | <i>Orthocoronavirinae</i>   |
| Gênero     | <i>Betacoronavirus</i>  |
| Subgênero  | <i>Sarbecovirus</i>   |
| Espécies   | <i>SARS-CoV</i>   |
| Indivíduos | SARS-CoVUrbani, SARS-CoVGZ-02, Bat SARS CoVRf1/2004, SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1, SARS-CoVRatG13, entre outros. |

**Quadro 1.** Taxonomia de Coronavírus. Apresentação da taxonomia completa dos Coronavírus selecionados. Fonte: Nature Microbiology (2020) (Adaptado de Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses).

Em 2012, foram reportados casos da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS) causada por um novo  $\beta$ -coronavirus na Arabia Saudita, considerada o epicentro da infecção, se espalhando rapidamente para outros países (Asaad *et al*, 2020; Groot *et al*, 2013). De acordo com a OMS, até Março de 2024, foram confirmadas 2610 infecções pelo MERS em 24 países, e 940 mortes confirmadas relacionadas à infecção. Foi observado que o vírus descendente da linhagem 2C beta-coronavirus, além de infectar seres humanos e camelos, pode infectar também primatas não-humanos, porcos, morcegos, coelhos, entre outros (Ramadan e Shaib, 2019). Com essa nova epidemia, alertou-se novamente ao risco contínuo dos Coronavírus à saúde pública mundial, e a importância de uma compreensão da distribuição de transmissão (Ali *et al*, 2024).

A partir de dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, na China, foi reportado um surto de pneumonia grave, inicialmente sem origem associada. Tendo seu início em um mercado local de frutos do mar, a doença se espalhou rapidamente, infectando 2.761 pessoas na China até janeiro de 2020, sendo associada a 80 mortes e a infecção de 33 pessoas em outros 10 países. Após testes moleculares e testes sorológicos, juntamente com o estudo de sintomas clínicos, foi determinado que a doença se caracterizava por uma pneumonia induzida por vírus. Apesar da maioria dos casos iniciais serem através do contato com o mercado de frutos do mar, a transmissão passou a ser considerada de humano para humano (Zhou *et al*, 2020). Ao perceber ser um novo vírus circulando, o vírus foi nomeado provisoriamente como 2019-nCoV. Contudo, a partir de comparações com o SARS-CoV, o Grupo de Estudos de Coronavírus (CGS) do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) observou uma semelhança genética significativa entre os dois vírus, apesar do SARS-CoV-2 não ser um descendente. Concluindo que suas filogenias e características evolutivas eram mutuamente informativas, além da semelhança nos sintomas, foi decidido nomear definitivamente o agente etiológico como SARS-CoV-2 (Gorbalenya *et al*, 2020). Para a patologia causada pelo novo Coronavírus deu-se o nome de COVID-19, do inglês *Coronavirus disease* ou *Doença do Coronavírus* (Fiocruz, 2020).

Após se estabelecer e causar uma pandemia, que, segundo a OMS, infectou até abril de 2024 cerca de 775 milhões de pessoas e ocasionou cerca de 7 milhões de

mortes, o SARS-CoV-2 apresentou uma diversidade em mutações genéticas com diferentes consequências e implicações clínicas, com alto potencial de impacto na saúde humana (Hussein *et al*, 2024).

### 2.1.2 Estrutura e Ciclo Viral

O SARS-CoV-2 possui RNA de cadeia simples e senso positivo (+ssRNA). Seu genoma tem aproximadamente 30 kilobases e é organizado de maneira policistrônica, o que implica que contém múltiplas regiões codificadoras transcritas em diversas proteínas virais (Raskin, 2020; Wei *et al*, 2023). O genoma do vírus contém 14 quadros de leitura abertos (ORFs), onde os ORF1a e ORF1ab, que constituem cerca de 2/3 do genoma viral, codificam a poliproteína 1a (PP1a) e a poliproteína 1ab (PP1ab) replicase, respectivamente, que são clivadas em um total de 16 proteínas não estruturais (NSPs) (Romano *et al*, 2020; Finkel *et al*, 2021). O outro terço do genoma codifica 4 proteínas estruturais, sendo elas a glicoproteína Spike (S), Membrana (M), Envelope (E) e Nucleocapsídeo (N), além de algumas proteínas acessórias, como ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 e ORF10 (Helmy *et al*, 2020).

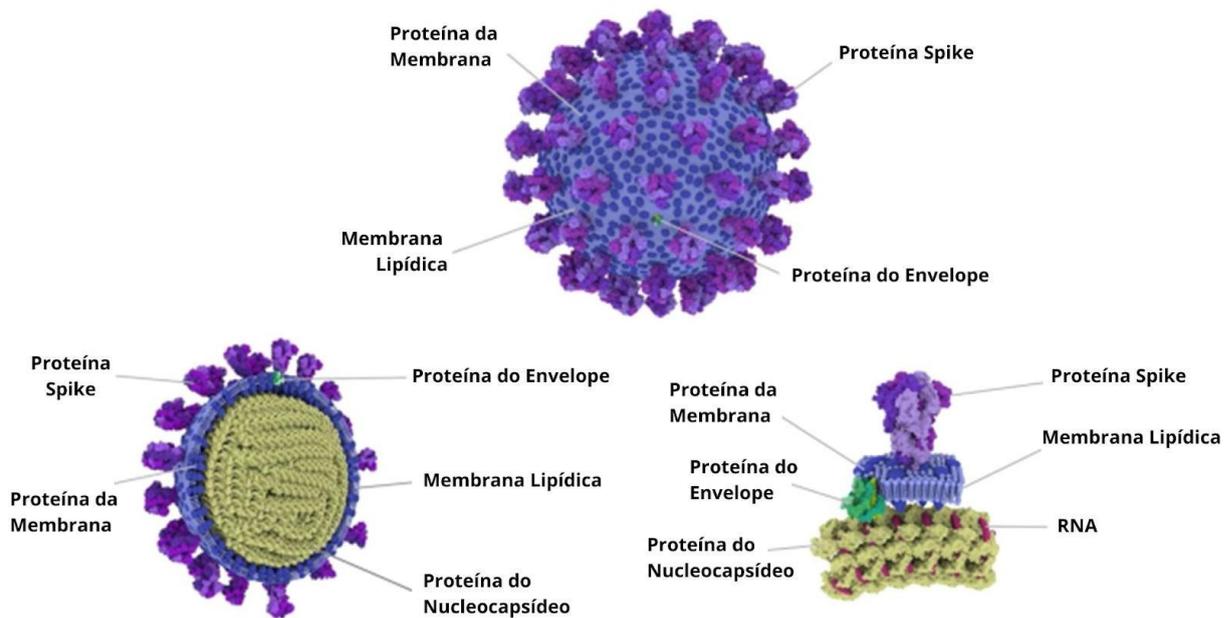
As NSPs 1 a 11 são sintetizadas pelas regiões da ORF1a, enquanto a ORF1ab sintetiza as NSPs 12 a 16. As NSPs são proteínas importantes que auxiliam em processos fundamentais dos vírus como transcrição, produção de proteínas do envelope e replicação viral (Chakraborty *et al*, 2024), como descrito na Quadro 2.

| <b>Proteína</b> | <b>Papel no ciclo de vida do vírus</b>  |
|-----------------|---|
| Nsp1            | Inibe a maquinaria de tradução e a produção de fatores de defesa imunológica  |
| Nsp2            | Suposto papel na indução da apoptose  |
| Nsp3            | Envolvido no complexo de replicação viral Nsp3-4-6 para modificação de Retículo Endoplasmático (RE) e formação de Vesículas de Membrana Dupla (DMVs) domínio de protease semelhante à papaína |
| Nsp4            | Complexo Nsp3-4-6 para modificação do RE e formação de DMVs   |
| Nsp5            | Protease principal  |

|       |  |
|-------|--|
| Nsp6  | Complexo Nsp3-4-6 para modificação ER e formação de DMVs   |
| Nsp7  | Parte do complexo de replicação-transcrição, envolvido na replicação de vírus  |
| Nsp8  | Parte do complexo de replicação-transcrição, envolvido na replicação de vírus  |
| Nsp9  | Replicação de RNA  |
| Nsp10 | Modula as atividades Nsp14 e Nsp16; Complexo Nsp10-Nsp11-Nsp14-Nsp16   |
| Nsp11 | Nenhuma função conhecida   |
| Nsp12 | Parte do complexo de replicação-transcrição, envolvido na replicação de vírus  |
| Nsp13 | Helicase, parte do complexo RNA polimerase, envolvido na replicação do vírus   |
| Nsp14 | Atividade da exonuclease e atividade da N7-MTase; Complexo Nsp10-Nsp11-Nsp14-Nsp16                                   |
| Nsp15 | RNA endonuclease   |
| Nsp16 | Dependente de S-adenosilmetionina (SAM), 2'-O-Metiltransferase; Complexo com Nsp10; Complexo Nsp10-Nsp11-Nsp14-Nsp16 |

**Quadro 2.** Resumo das principais funções das proteínas não estruturais (NSPs) do Coronavírus. (Adaptado de Mariano *et al*, 2020).

A estrutura do vírus é composta principalmente por três proteínas estruturais, sendo elas a Spike, Membrana e Envelope, que estão incorporadas na membrana externa e dão ao vírus a sua morfologia e estrutura distinta. Dentro do vírus, o RNA é revestido pela quarta proteína estrutural, o Nucleocapsídeo, que protege o material genético viral (Figura 1) (Raskin, 2020).



**Figura 1.** Proteínas estruturais do SARS-CoV-2. Spike, Membrana e Envelope estão incorporadas na membrana externa, proporcionando morfologia e estrutura distinta do vírus. Dentro da partícula viral, o RNA se encontra firmemente enrolado e revestido com a quarta proteína, Nucleocapsídeo. (Adaptado de Raskin, 2020).

A proteína Spike é uma glicoproteína transmembrana de classe I que confere ao SARS-CoV suas características morfológicas distintas (Hussein *et al*, 2024). Com um comprimento de 200 nm, ela se localiza na superfície da membrana viral e desempenha um papel crucial na fusão com a membrana da célula hospedeira (Kakavandi *et al*, 2023). A proteína Spike é formada pelas subunidades S1, responsável pela ligação ao receptor, e S2, responsável pela fusão da membrana celular (Lu *et al*, 2020). A subunidade S1 possui um peptídeo sinal, seguido por um domínio N-terminal (NTD) e um domínio de ligação ao receptor (RBD), que é altamente conservado. Por sua vez, a subunidade S2 inclui um peptídeo de fusão conservado (FP), repetições heptad (HR) 1 e 2, um domínio transmembrana (TM) e um domínio citoplasmático (CP). Além disso, a subunidade S2 é altamente conservada e mostra uma grande semelhança com as de dois coronavírus semelhantes ao SARS de morcegos e o SARS-CoV humano (Chan *et al*, 2020).

Graças a interação com receptores celulares para mediar a fusão de membranas e a presença de múltiplos epítomos conformacionais que podem induzir anticorpos neutralizantes potentes, a proteína Spike é possivelmente a principal indutora de

anticorpos neutralizantes (NAbs), e por isso é um grande alvo no desenvolvimento de vacinas e imunoterapias (Mousavizadeh e Ghasemi, 2021; Tregoning *et al*, 2020).

A proteína da Membrana é uma glicoproteína transmembrana de classe III, sendo a proteína mais abundante na superfície viral. É composta por três domínios principais, sendo um longo domínio C-terminal que está embutido no envelope, um domínio que atravessa a membrana três vezes e um curto domínio N-terminal que se projeta para fora da partícula viral (Liu *et al*, 2020; Thomas, 2020). A proteína da Membrana apresenta pouca similaridade com as proteínas M de outros coronavírus, e desempenha um papel importante para a formação de vírions entre o RE e o corpo de Golgi da célula, e na estabilização da estrutura da proteína do Nucleocapsídeo, pois está localizada no núcleo interno dos vírions (Alharbi e Alrefaei, 2021; Lu *et al*, 2021).

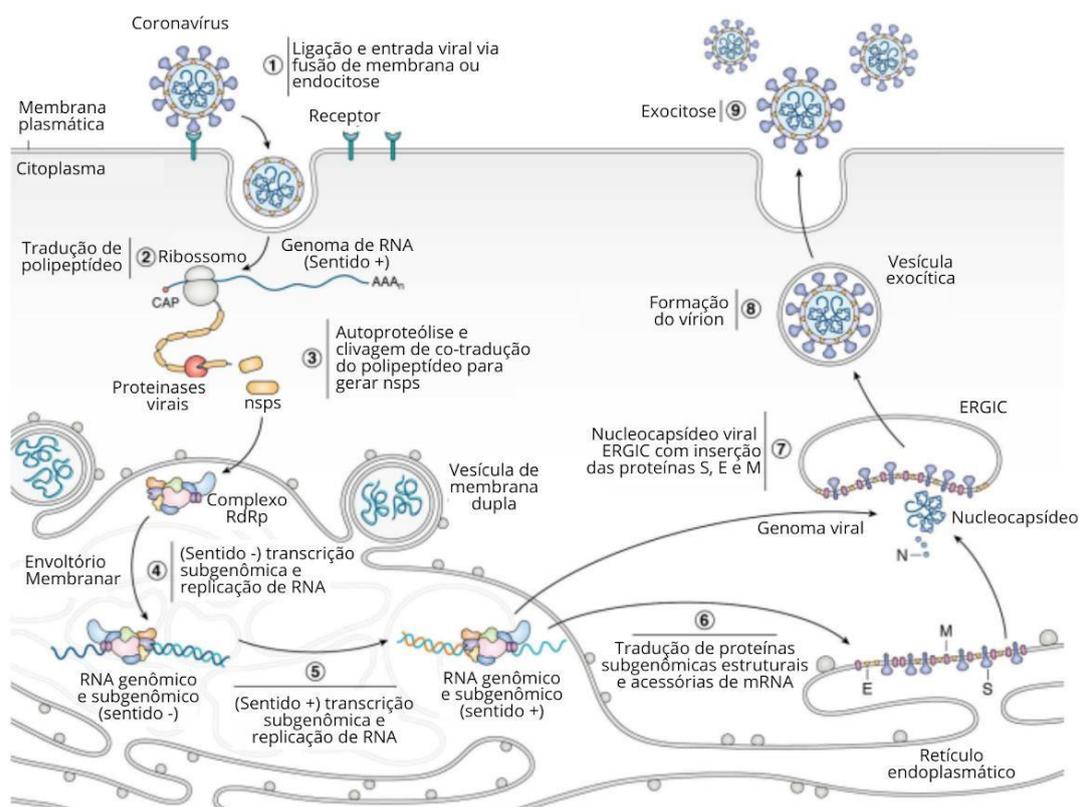
Apesar de ser a menor proteína estrutural, a proteína Envelope é crítica para a patogênese do vírus através da interação com as proteínas do hospedeiro, causando estresse nas células (Tripathi *et al*, 2020). Sabe-se se que a proteína E se localiza principalmente no RE e no complexo de Golgi, onde participa da montagem, brotamento e tráfego intracelular de vírions infecciosos, e, apesar de ser altamente expressa dentro da célula infectada durante o ciclo de replicação, apenas uma porção pequena é incorporada no envelope do vírion (Schoeman e Fielding, 2019).

A proteína Nucleocapsídeo é uma proteína estrutural, abundante nos vírus, que se liga ao genoma do RNA viral e forma o núcleo ribonucleoprotéico, além de apresentar uma alta imunogenicidade. Análises estruturais da proteína N recombinante de comprimento total revelaram uma alta proporção de região desordenada sem ácido nucleico associado, que pode favorecer a interação transitória da proteína com diversas moléculas, mantendo a sua conformação adequada (Zeng *et al*, 2020; Wu *et al*, 2023). Com a alta imunogenicidade e sua abundante expressão durante a infecção, a proteína N é um grande alvo como antígeno vacinal (Dutta *et al*, 2020).

As proteínas acessórias são associadas ao papel na virulência e interação com o hospedeiro. Porém, apesar do compartilhamento das proteínas estruturais e das proteínas não estruturais entre os coronavírus, as proteínas acessórias apresentam uma conservação diminuída e uma distribuição diferente quando comparadas a outros coronavírus, com exceção do SARS-CoV (Mariano *et al*, 2020).

Em relação ao ciclo viral, inicia-se através da ligação entre a proteína S e a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), que atua como receptor da célula hospedeira, promovendo a entrada do vírus. Essa interação desempenha um papel

crucial na infecção do coronavírus na célula hospedeira e tem sido objeto de estudos devido à propensão do vírus à ACE2 (Fehr e Perlman, 2015). O estudo de Luan *et al*, 2020 teve foco na semelhança do receptor em outras espécies de mamíferos e como a ampla gama de hospedeiros pode facilitar o desenvolvimento de novas cepas do vírus. Após a ligação ao receptor, o vírus atravessa a membrana da célula hospedeira, essa etapa é mediada pela clivagem da proteína S, seguida pela fusão das membranas viral e celular. A clivagem ocorre em dois locais na proteína S, facilitando a exposição do peptídeo de fusão. O peptídeo de fusão se insere na membrana, promovendo a fusão das membranas e liberando o genoma viral no citoplasma. Seguido a isso, ocorre a replicação e transcrição, com os vírions descendentes construídos no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. Em seguida, sofrem exocitose para finalizar o ciclo viral (Fehr e Perlman, 2015; Eslami *et al*, 2022; Yang e Rao, 2021) (Figura 2).



**Figura 2.** (1) A proteína S localizada na superfície viral se liga ao receptor da enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) na membrana plasmática da célula-alvo, facilitando a adesão do vírus. Entretanto, para que o vírus possa entrar na célula, é necessária a ativação da proteína S pela Protease Transmembranar Serina 2 (TMPRSS2), que cliva essa proteína, permitindo a entrada do vírus na célula.

(2) Sendo um vírus de RNA de fita simples de sentido positivo (+ssRNA), ele pode ser imediatamente traduzido nos ribossomos da célula hospedeira. As ORF1a e ORF1b são traduzidas, produzindo duas

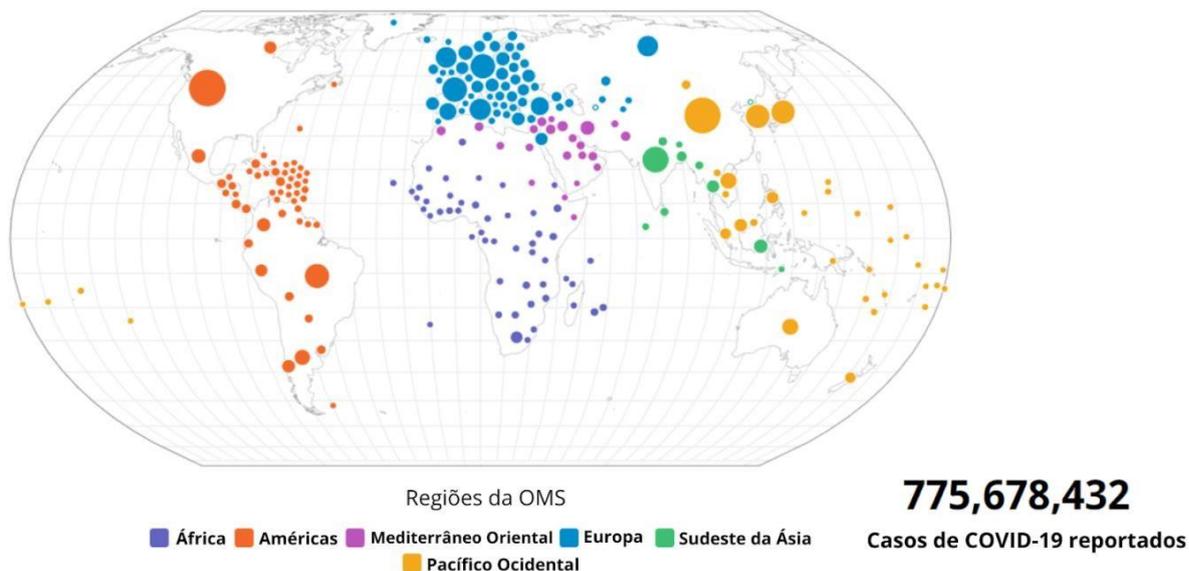
poliproteínas, pp1a e pp1b, que são clivadas por proteases do complexo replicase-transcriptase (RTC), que, durante a replicação, gera cópias de RNA negativo do genoma. (3) O RNA negativo serve como molde para a produção do genoma de RNA positivo. (4) Durante a transcrição, um conjunto de RNAs subgenômicos é produzido por transcrição descontínua. (5) Esses RNAs subgenômicos são utilizados como moldes para a síntese de genomas progenitores de +ssRNA e mRNAs subgenômicos. (6) As outras ORFs produzem as proteínas estruturais N, M, E e S. (7) formação dos vírions maduros ocorre através da interação das proteínas S, E e M na formação da partícula completa no compartimento intermediário do retículo endoplasmático de Golgi. (8) Após a montagem e aquisição do envelope viral, os vírus se acumulam em vesículas, onde finalizam a maturação. (9) Os vírus são transportados através de vesículas para a superfície celular e liberados por exocitose. (Adaptado de Hartenian *et al*, 2020; Fiuza *et al*, 2020).

### 2.1.3 Epidemiologia e Transmissão

Em dezembro de 2019, o governo chinês notificou a ONU sobre um surto de pneumonia, que até então tinha causa desconhecida, e que logo se espalharia para outros países. Causada por um novo coronavírus, mais tarde nomeado SARS-CoV-2, a infecção pelo vírus apresentou desde o início um espectro que abrange infecção assintomática, doenças leves do trato respiratório superior, pneumonia grave com insuficiência respiratória, e até a morte (Zhou *et al*, 2020). A doença causada pelo SARS-CoV-2 foi denominada de COVID-19, e foi associada a sintomas variados, mas que comumente incluem febre, tosse, fadiga, falta de ar, dor de cabeça, e até perda de olfato e paladar (Sultana *et al*, 2024).

Em março de 2020, com o crescimento rápido do número de casos confirmados e mortes, a ONU declarou a pandemia da SARS-CoV-2. Com mais de 118 mil infecções e 4.291 mortes, o vírus circulava em 114 países e continuava a se espalhar pelo globo (OMS, 2020). Atualmente o número de casos de infecções globalmente é de cerca de 775 milhões, com 7 milhões de mortes total (OMS, 2024).

Número de casos de COVID-19 reportados a OMS (Total acumulativo)



**Figura 3.** Número total de casos de COVID-19 reportados para OMS até Junho de 2024 e distribuição de casos mundialmente. (Adaptado de OMS, 2024).

No Brasil, o primeiro caso do novo coronavírus foi confirmado em 26 de fevereiro de 2020. Um homem de 61 anos, morador de São Paulo e recém-chegado da Itália, começou a apresentar sintomas compatíveis com a COVID-19, como febre, tosse, coriza e dor de cabeça, e ao procurar atendimento Hospital Israelita Albert Einstein e testou positivo para a infecção (OPAS, 2020). A partir disso, o número de casos subiu consideravelmente, deixando o país em estado de alerta. Ao todo, o número de casos confirmados até Junho de 2024 é de cerca de 38 milhões de pessoas, com cerca de 712 mil mortes confirmadas, de acordo com o Ministério da Saúde. Após 4 dias do primeiro caso de infecção, todos os estados brasileiros relataram ao menos um caso confirmado de COVID-19, levando o Ministério da Saúde a declarar um surto de transmissão comunitária em larga escala do vírus. Os altos números de casos e óbitos relacionados a COVID-19 no Brasil fizeram a América Latina um epicentro da pandemia (Giovanetti *et al*, 2022).

A transmissão do vírus ocorre principalmente de indivíduo para indivíduo, através de gotículas emitidas por pessoas infectadas. Ao descobrir que a disseminação acontece por vias respiratórias e extra respiratórias, se pôde inferir a razão com que a disseminação da doença acontecia de forma tão rápida (Srinivas *et al*, 2020; Ferreira *et*

*al.*, 2020). Para conter a disseminação, foram adotadas medidas como isolamento, quarentena, distanciamento social e uso de máscaras. Essas medidas foram escolhidas especialmente por sua eficácia em interromper a transmissão quando a detecção precoce é possível antes que a disseminação viral seja evidente, e também por sua histórica utilização no controle de surtos de doenças transmissíveis. Desde o surto de SARS em 2003, a China se preparou para pandemias futuras aplicando lições aprendidas e agindo rapidamente na implementação de protocolos como esses (Wilder-Smith e Freedman, 2020).

#### **2.1.4 Vacinas**

Devido à falta de eficácia dos tratamentos contra o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), a vacinação emergiu como a principal estratégia para conter a pandemia, prevenindo a forma grave da COVID-19. A longo prazo, a conquista da imunidade de rebanho tornou-se extremamente crucial para reduzir o risco de infecção entre os indivíduos suscetíveis, limitando não apenas a propagação do vírus de pessoa para pessoa, mas também protegendo indiretamente os indivíduos não vacinados de alto risco (Liu e Ye, 2022; Fine *et al.*, 2001). Com o avanço da pandemia, a OMS em 2021 estabeleceu alguns objetivos estratégicos para combater a COVID-19 por meio da vacinação em nível global. Entre esses objetivos, destacam-se: (a) minimizar as mortes, as doenças graves e a carga geral da doença; (b) reduzir o impacto no sistema de saúde; e (c) restaurar a atividade socioeconômica. A partir da vacinação, houve uma redução significativa na forma grave da COVID-19, diminuindo também os casos de hospitalizações e mortes (OMS, 2022).

O processo para liberação e utilização de vacinas pode chegar até 15 anos, passando por da pesquisa até o mercado. Porém, durante grandes surtos, como na pandemia da COVID-19, as agências regulatórias podem sobrepor as diferentes fases de testes, com a finalidade de acelerar os processos (Liu e Ye, 2022). Em dezembro de 2020, cerca de 200 possíveis candidatos vacinais para COVID-19 foram avaliados, e 52 deles estavam em fases de testes clínicos em humanos (OMS, 2022). Para implementação da vacinação, diversas plataformas vacinais foram utilizadas, variando de formas tradicionais como vírus inativado, vírus atenuado, até abordagens mais recentes como vetores virais e ácidos nucleicos (Quadro 3).

| <b>Tipo de Vacina</b>        | <b>Tecnologia utilizada</b>   | <b>Vantagens</b>   | <b>Desvantagens</b>  | <b>Exemplos</b>  |
|------------------------------|---|--|--|--|
| <b>Ácido nucléico</b>        | Seção do material genético (DNA/RNA) que fornece as instruções para proteínas específicas | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Relativamente simples de fabricar;</li> <li>- Desenvolvimento rápido;</li> <li>- Sem componentes vivos, portanto, sem risco de a vacina desencadear doenças.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Lipossomas requerem armazenamento ultrafrio;</li> <li>- Eletroporação pode ser complicada;</li> <li>- Sistemas de distribuição diferentes podem ser necessários.</li> </ul> | DNA vaccine:<br>ZyCoV-D<br>mRNA vaccines:<br>Pfizer-BioNTech and Moderna<br>COVID-19 |
| <b>Vírus total atenuado</b>  | Vírus enfraquecido  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alta imunogenicidade;</li> <li>- Bom histórico de utilização.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Risco de reversão para forma patogênica;</li> <li>- Lento para desenvolver novas versões;</li> <li>- Risco de infecção em pacientes imunocomprometidos.</li> </ul>          | Codagenix Inc., Serum Institute of India, Indian Immunological Ltd.                  |
| <b>Vírus total inativado</b> | Vírus causador de doenças inativado por produtos químicos, radiação ou alta temperatura   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tecnologia bem estabelecida;</li> <li>- Sem componentes vivos;</li> <li>- Relativamente simples de fabricar.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Risco de doença agravada pela vacina;</li> <li>- Doses de reforço podem ser necessárias.</li> </ul>   | COVAXIN-Bharat Biotech, Coronavac-Sinovac, Sinopharm                                 |
| <b>Subunidade</b>            | Antígenos específicos do patógeno   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tecnologia bem estabelecida;</li> <li>- Sem componentes vivos, portanto, sem risco de a vacina desencadear</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Relativamente complexo de fabricar;</li> <li>- Adjuvantes podem ser necessários;</li> <li>- Determinar a melhor combinação de antígenos leva</li> </ul>                     | Novavax, Moderna   |

|   |  |   |  |   |
|---|--|---|--|---|
|   |  | doenças;<br>- Relativamente estável.  | tempo.   |   |
| <b>Vetor viral recombinante</b>                                   | Vírus inofensivos modificados para produzir material genético selecionado            | - Tecnologia bem estabelecida;<br>- Segurança;<br>- Produção em larga escala;<br>- Forte imunogenicidade.   | - Imunidade pré-existente ao vetor pode reduzir a resposta imunológica;<br>- Relativamente complexo de fabricar. | Oxford/Astra Zeneca, Janssen/Johnson and Johnson, Sputnik Light— Gamaleya |
| <b>Vacinas baseadas em partículas semelhantes ao vírus (VLPs)</b> | Preparações supramoleculares multiproteicas com características equivalentes a vírus | - Pode produzir respostas imunológicas celulares e humorais fortes;<br>- Sem risco de reversão porque não contém nenhum material genético do vírus. | - Risco de conformação incorreta;<br>- Fabricação lenta e mais cara.   | Medicago Inc, Saiba GmbH  |

**Quadro 3.** Principais plataformas empregadas no desenvolvimento de vacinas contra a COVID-19, destacando a definição, suas vantagens e desvantagens e exemplos de vacinas desenvolvidas com essas tecnologias (Adaptado de Ghildiyal *et al*, 2024; Hadj Hassine, 2022; Tregoning *et al*, 2020; Liu e Ye, 2022).

## 2.2 Utilização de leveduras como vetores vacinais

### 2.2.1 Caracterização

Tanto para terapia quanto para pesquisa, diferentes sistemas de hospedeiros de expressão são utilizados para a produção de proteínas recombinantes, com a escolha do sistema variando conforme o objetivo desejado. As plataformas em uso incluem bactérias, leveduras, fungos filamentosos e células de eucariotos superiores, cada uma com suas vantagens e desvantagens (Quadro 4), considerando suas características

específicas e aspectos econômicos envolvidos na sua produção (Gomes *et al*, 2016). O uso de diferentes sistemas surgiu a partir da necessidade de aplicar a tecnologia de DNA recombinante (rDNA). Utilizada para a clonagem e expressão de um gene de interesse em um sistema de expressão adequado, o rDNA tem sido utilizado para superar as dificuldades na produção de grandes quantidades de vacinas ou agentes diagnósticos (Balamurugan *et al*, 2006). A partir do rDNA, a produção de proteínas recombinantes se tornou uma das principais aplicações biotecnológicas, se estabelecendo com a introdução da insulina recombinante e do hormônio de crescimento humano na década de 1980 (Huang *et al*, 2018).

| Sistema hospedeiro       | Vantagens  | Desvantagens  |
|--------------------------|--|---|
| <i>Escherichia coli</i>  | Fácil<br>Rápido<br>Econômico<br>Taxa de crescimento rápido<br>Capacidade para fermentação contínua   | Não possui a maquinaria necessária para remover íntrons dos transcritos<br>O gene estrangeiro pode conter sequências que atuam como sinais de terminação, resultando em terminação prematura e perda da expressão gênica<br>Viés de códons<br>Falta de modificações pós-traducionais<br>A glicosilação é extremamente incomum em bactérias<br>Produção de proteínas em forma insolúvel ou na forma de corpos de inclusão<br>Degradação de proteínas<br>Acúmulo de endotoxinas |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Não produz LPS/endotoxinas<br>Pode ser transformada facilmente com muitos bacteriófagos e plasmídeos<br>Capaz de secretar proteínas extracelulares funcionais diretamente no meio de cultura | Produção de proteases extracelulares que podem reconhecer e degradar proteínas heterólogas<br>Instabilidade de plasmídeos<br>Redução ou ausência de expressão da proteína de interesse  |
| Leveduras                | Crescimento rápido em meio de baixo custo<br>Modificações pós-traducionais apropriadas   | Hiperglicosilação de proteínas<br>Viés de códons<br>Ineficiência na secreção das proteínas para o meio de crescimento, resultando em retenção intracelular  |

|                         |  |   |
|-------------------------|--|---|
|                         | Segurança do sistema garantida<br>Ausência de produção de<br>endotoxinas   |   |
| Fungos<br>filamentosos  | Alto nível de expressão  | Complexo<br>Falta de conhecimento sobre fisiologia                              |
| Células de<br>Mamíferos | Dobramento correto de proteínas<br>Modificações pós-traducionais<br>apropriadas e montagem do produto<br>Glicosilação adequada | Alto custo<br>Tecnologia complicada<br>Potencial contaminação com vírus animais |

**Quadro 4.** Vantagens e desvantagens de diferentes sistemas hospedeiros para expressão de proteínas recombinantes (Adaptado de Gomes *et al*, 2016).

As leveduras expandiram sua importância além do uso tradicional na fermentação na indústria alimentícia para diversos setores da saúde, incluindo a produção de proteínas recombinantes. Inicialmente utilizada na produção de pães e bebidas, estes organismos unicelulares ganharam espaço nas últimas décadas graças às vantagens únicas que oferecem (Kim *et al*, 2014). Como organismos eucarióticos, as leveduras são capazes de realizar diferentes processos de modificações pós-traducionais, como glicosilação e fosforilação, que muitas vezes são limitados ou não estão presentes nas bactérias. Além de terem uma taxa de crescimento rápida e grande robustez, possibilitando seu cultivo em larga escala e são de fácil manipulação genética (Yang *et al*, 2023). Por apresentarem *status* GRAS (*Generally Recognized as Safe*), que garante segurança na utilização de diversas espécies de leveduras em alimentos, bebidas e processos industriais, algumas leveduras podem ser utilizadas como vetores vacinais. Espécies como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* e *Hansenula polymorpha* se apresentam como modelos de estudo para aplicações biotecnológicas, incluindo a produção de proteínas recombinantes (Roohvand *et al*, 2017).

A utilização de leveduras como vetor vacinal demonstrou ser uma abordagem promissora, capaz de gerar respostas imunológicas específicas ao antígeno de interesse, ativar células dendríticas e desencadear respostas robustas de linfócitos T citotóxicos específicos para o antígeno. Essa estratégia tem sido explorada tanto para vacinas terapêuticas quanto para vacinas profiláticas (Ardiani *et al*, 2010).

### 2.2.2 Produção de proteínas heterólogas em *Pichia pastoris*

*Pichia pastoris*, atualmente reclassificada como *Komagataella phaffii*, foi introduzida nos anos 60' como uma levedura metilotrófica, utilizando metanol como fonte de carbono e energia. Já nos 70', foi desenvolvida como um sistema de expressão heterólogo pela Philips Petroleum junto a Salt Institute Biotechnology/Industry Associates, Inc. (SIBIA) (Vijayakumar *et al*, 2024). Duas características principais marcam *P. pastoris* como alternativa interessante a outros modelos já utilizados para produção de proteínas heterólogas, como *S. cerevisiae*. Uma delas é o promotor AOX1, derivado do gene da álcool oxidase, utilizado na transcrição de genes heterólogos, e sendo altamente induzido por metanol e reprimido por glicose, glicerol e etanol. Graças a essa característica de regulação e características controláveis, esse promotor é uma ótima opção para direcionar a expressão de proteínas recombinantes (Torres & Moraes, 2000; Mastropietro *et al*, 2021).

Outra característica importante na escolha de *P. pastoris* como modelo para expressão de proteínas heterólogas, é a ausência do “efeito Crabtree”, visto que esta levedura não é considerada como forte fermentadora. A maioria das leveduras ao fermentar gera etanol, o que, em culturas de alta densidade, pode atingir rapidamente níveis tóxicos de etanol, o chamado “efeito Crabtree”. Por estar dentro do grupo de leveduras que não possuem este efeito, *P. pastoris* apresenta uma baixa demanda energética para manutenção, possibilitando sua cultura em larga escala e densidade mais facilmente (Torres & Moraes, 2000; Montañó *et al*, 2010).

Existem diferentes linhagens de *P. pastoris*, como Y-11430, KM7121, MC100-3, porém uma das mais utilizadas para expressão de proteínas é a GS115, especialmente para indústria e medicamentos.

## 2.3 Ancoragem de proteínas recombinantes em leveduras

### 2.3.1 Aspectos gerais

Dentre as diferentes formas que se pode utilizar as leveduras na produção de proteínas recombinantes na parede celular da levedura encontra-se a técnica de *Yeast Surface Display* (YSD), que compreende diferentes aplicações, como seleção de proteínas, produção de anticorpos, biorrefinaria (Ye *et al*, 2021). Com a abordagem, é

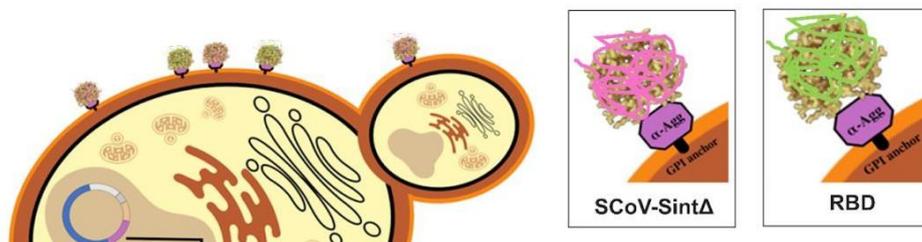
possível expressar peptídeos alvos ou proteínas na superfície celular utilizando *linkers* ou proteínas âncoras para diferentes finalidades, incluindo o desenvolvimento de estratégias vacinais (Tanaka *et al*, 2012). Essa estratégia surge também como um caminho para contornar um dos desafios encontrados na produção de proteínas heterólogas em leveduras, que é a capacidade de gerar proteínas que se liguem com alta afinidade e especificidade aos alvos, visto a habilidade de melhorar não só a afinidade e especificidade mas também a expressão e estabilidade dessas proteínas (Gai e Wittrup, 2007; Gera *et al*, 2013). O YSD utiliza algumas vantagens de modificações pós-translacionais encontradas em leveduras, como glicosilação, acilação e fosforilação, que somadas à facilidade de cultura celular, manipulação genética e conhecimento que se tem desses organismos, permite a adesão e exposição das proteínas em sua superfície (Ye *et al*, 2021; Teymennet-Ramírez *et al*, 2022).

A construção de um cassete de expressão a ser utilizado para YSD necessita de algumas características principais, além da proteína de interesse, sendo a) peptídeo sinal no N-terminal da proteína, com a função de secretar a proteína de interesse, b) proteína âncora no C-terminal da proteína, para fixar e expor a proteína na parede da levedura, c) uma tag de epítipo para detecção e análise do funcionamento da exposição. É importante o estudo e avaliação de diferentes opções, para selecionar a mais viável a depender da proteína e promotor de interesse (Ye *et al*, 2021; Kajiwara *et al*, 2020).

Diferentes proteínas âncoras podem ser utilizadas para ancoragem de proteínas na superfície celular de leveduras, tanto na família de proteínas GPI quanto na família Pir. Dentro da família de proteínas Glicosilfosfatidilinositol (GPI), existe um sistema de aglutininas, que se caracterizam como glicoproteínas mediadoras de adesão sexual em células de leveduras e que podem ser extraídas por glucanase, e que secretam a- aglutinina (Aga) e  $\alpha$ -aglutinina (Aga $\alpha$ ) (Ye *et al*, 2021; Chen, 2017). A  $\alpha$ -aglutinina é a proteína âncora mais utilizada para sistemas de fusões em proteínas de interesse a partir de metade da região C-terminal Aga $\alpha$ , sítio que é capaz de imobilizar e expor na parede extracelular as proteínas fusionadas (Piraine *et al*, 2021).

Também foi observado que, ao serem ancoradas na parede das leveduras (Figura 4), as proteínas recombinantes ficam expostas e têm a capacidade de aprimorar a exposição antigênica. Esse fenômeno ocorre principalmente porque as proteínas mantêm sua estrutura conservada, preservando assim seus sítios antigênicos, o que amplia o reconhecimento específico dos antígenos vacinais (Kenngott *et al*, 2016; Lei *et*

al,2016).



**Figura 4.** Ilustração da ancoragem dos antígenos vacinais na superfície da levedura, utilizando a técnica de *Yeast Surface Display*. Fonte: Autor.

### 2.3.2 Dupla ancoragem

Buscando ampliar a resposta imunológica induzida pelas vacinas, além da apresentação antigênica através do YSD, pode ser interessante a utilização de mais de um antígeno no cassete de expressão. O Sítio Interno de Entrada de Ribossomo (IRES) se caracteriza como sequências de mRNA exclusivas em regiões não traduzidas (UTRs) para tradução cap-independente de síntese proteica, presentes em alguns vírus como vírus da poliomielite e da encefalomiocardite. Uma das suas aplicações tem sido na engenharia genética, em construções de vetores com co-expressão de genes. Zitvogel *et al*, 1994 já desenvolviam na década de 90 estudos envolvendo a co-expressão de diferentes subunidades de interleucinas 12 (IL-12) utilizando pela primeira vez IRES para aplicação biomédica. Desde então, diversos trabalhos têm tido como alvo a utilização desta abordagem para expressão simultânea de dois genes. A sequência IRES tem a função de recrutar os ribossomos e garantir continuidade da síntese proteica entre as sequências gênicas das proteínas de interesse, evitando a interrupção antes da síntese do segundo gene de interesse. (Zitvogel *et al*, 1994; Marques *et al*, 2022; Huang *et al*, 2019).

Essas sequências são geralmente derivadas de genomas virais, a partir de vírus como o vírus Potato virus Y (PVY), porém sua funcionalidade da sequência IRES em levedura já foi previamente avaliada por estudos de Huang *et al*, 2019, onde foi observada a possibilidade da sua utilização para introduzir múltiplos genes em *P. pastoris*.

## OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Construção de vetor de expressão com co-expressão de proteínas codificadas por genes derivados do SARS-CoV-2, SCOV-Sint $\Delta$  (gene sintético multi-epítomos) e RBDwt, para dupla ancoragem na superfície de *Pichia pastoris*, como parte do desenvolvimento de estratégias vacinais voltadas para imunização contra a COVID-19.

### 3.2 Objetivos Específicos

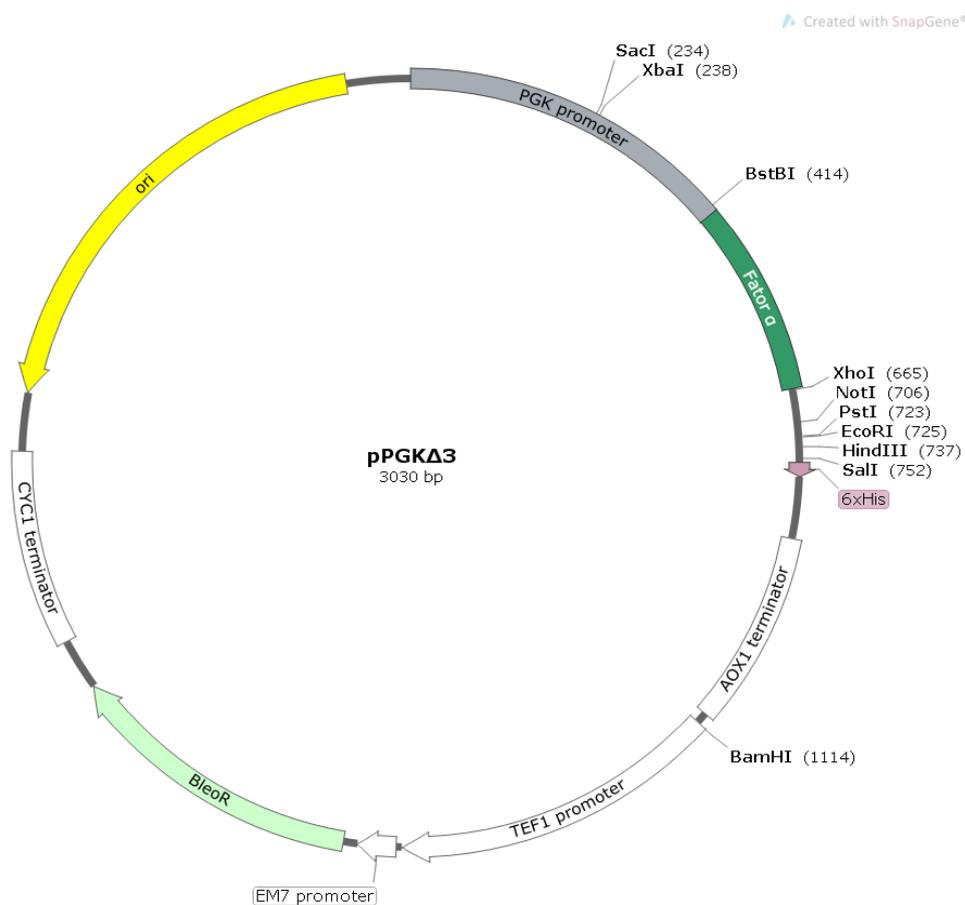
- Amplificação dos genes SCOV-Sint $\Delta$  e RBDwt para clonagem em vetor de expressão;
- Amplificação dos “biobricks”, sequências de DNA padronizadas com diferentes funções específicas que podem ser combinadas para criar sistemas biológicos complexos, do cassete de expressão;
- Construção de vetor de expressão que possibilite a dupla ancoragem dos antígenos vacinais na superfície de *P. pastoris*.

## METODOLOGIA

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Plasmídeo

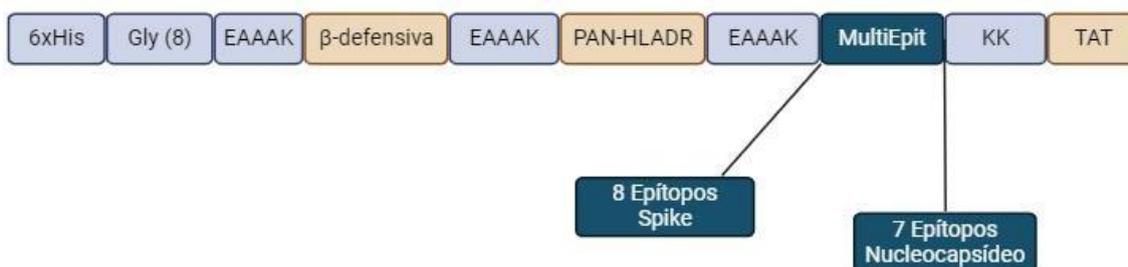
O vetor pPGK $\Delta$ 3 (de Almeida *et al*, 2005; vetor não-comercial cedido pelo Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres/Universidade de Brasília) foi utilizado na construção do trabalho. Apresenta PGK1 como promotor de indução constitutiva, MF- $\alpha$  (Fator Alfa) como peptídeo sinal para secreção de proteínas recombinantes produzidas, AOX1 como terminador de transcrição nativa que permite processamento eficiente de mRNA 3', TEF1 como promotor do gene do fator de alongamento de transcrição 1, BleoR como gene de resistência a Zeocina para seleção em *E. coli*, extremidade 3' do gene CYC1 de *S. cerevisiae* que permite processamento eficiente de mRNA 3' do gene Sh ble para aumento estabilidade e a origem de replicação que permite a replicação e manutenção do plasmídeo em *E. coli*.



**Figura 5.** Mapa esquemático do vetor de expressão pPGK $\Delta$ 3 gerado a partir do SnapGene. Fonte: Autor.

#### 4.1.2 Genes Multiepítopo e RBDwt

Dois genes foram utilizados como modelo de antígenos vacinais neste trabalho. Um deles foi o SCOV-Sint $\Delta$ , gene sintético multiepítopo, que apresenta 8 epítomos de proteína Spike e 7 do Nucleocapsídeo (Figura 6). O gene foi desenhado a partir da dissertação de mestrado de Maria da Conceição Viana Invenção, defendida em janeiro de 2022, pelo Programa de Pós-graduação em Genética, orientada pelo Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas.



**Figura 6.** Gene sintético multiepítopo, contendo regiões da proteína Spike e Nucleocapsídeo do SARS-CoV-2. A construção contém uma tag de hexahistidina (6xHis), linkers Gly(8), EAAAK, KK e sequências adjuvantes como  $\beta$ -defensiva, PAN-HLA DR e TAT; além das sequências de epítomos das proteínas S e N do SARS-CoV-2. Fonte: Autor.

Os epítomos escolhidos foram avaliados *in silico* quanto a capacidade de reconhecimento e ligação com células B e T, cobertura populacional e também em relação às principais variantes. Diferentes linkers foram adicionados (Quadro 5), para diferentes finalidades, incluindo o aumento da estabilidade e acessibilidade a anticorpos dos epítomos, assim como promover a apresentação de antígenos via MHC-II. O SCOV-Sint $\Delta$  apresenta cerca de 900pb.

| Linker  | Localização | Função e Características   | Referências                  |
|---------|-------------|--|------------------------------|
| Gly (8) | Extremidade | Aumenta curvatura e estabilidade dos epítomos, aumenta acessibilidade a anticorpos | Pandey <i>et al.</i> , 2018) |
| EAAAK   | Extremidade | Aumenta curvatura e estabilidade dos epítomos, aumenta acessibilidade a anticorpos | Pandey <i>et al.</i> , 2018) |

|       |                |  |  |
|-------|----------------|--|--|
| AAY   | Entre epítomos | Específico para epítomos de MHC-I, forma sitios para transporte via TAP (Transportador Associado ao Processamento de Antígenos), aumenta apresentação antigênica | Pandey <i>et al.</i> , 2018)   |
| GPGPG | Entre epítomos | Específico para epítomos de MHC-II, estimula resposta T helper   | (Livingston <i>et al.</i> , 2002; Nezafat <i>et al.</i> , 2014; Dong <i>et al.</i> , 2020) |
| KK    | Entre epítomos | Ativa células B, alvo: Catepsina B via MHC-II  | (Nezafat <i>et al.</i> , 2017)   |

**Quadro 5.** Linkers adicionados à construção do gene sintético multiepítomo, SCOV-Sint $\Delta$ , com sua localização e suas principais funções e características. Fonte: Autor

O segundo gene selecionado foi o RBDwt, gene selvagem do Domínio de Ligação ao Receptor, escolhido por ser um dos principais alvos utilizados em diversas vacinas em circulação. Esta região faz parte da proteína Spike, e é essencial durante a infecção do SARS-CoV-2 ao se ligar ao receptor Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) nas células hospedeiras. A região de interesse apresenta fragmento de cerca de 711pb.

#### 4.1.3 Linhagem de Microrganismo e Meios de cultura

A bactéria *E. coli* Top10 foi utilizada como organismo hospedeiro para os experimentos de clonagem. Nas etapas de transformação em *E. coli*, repique e inóculo foi utilizado o meio de cultura Luria-Bertani (LB) low salt, apresentando a seguinte composição: Extrato de levedura 0.5%, NaCl 0.5% e Peptona 1%, adicionando 25  $\mu\text{g/mL}$  de Zeocina (Invitrogen). Para meio sólido, foi acrescentado 1,5% de ágar. O cultivo das colônias foi realizado a 37°C por 16-18h.

#### 4.1.4 Géis para Eletroforese e Tampão

Nas etapas de eletroforese de DNA, foram utilizados géis de agarose a 1% com tampão TAE 1X, composto por 400 mM de Tris base, 190 mM de ácido acético e 10

mM de EDTA, com pH 7,6. Durante o preparo do gel, foi adicionado brometo de etídio (0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) para formação de complexos fluorescentes ao intercalar com o DNA, permitindo a visualização das bandas de DNA por meio de um transluminador de luz ultravioleta. As amostras foram aplicadas junto com tampão de amostra, para dar coloração e peso na aplicação da amostra, e se utilizou como referência o marcador de 1Kb (Gene Ruler DNA Ladder).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Amplificação dos Genes

Os fragmentos SCOV-Sint $\Delta$  e RBDwt foram amplificados por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) a partir de sequências presentes nos vetores pxPGKSCOV e pVAXRBD (a partir da construção de trabalhos prévios do grupo), com primers específicos para cada gene. A reação foi feita utilizando *TransTaq*<sup>®</sup> DNA Polymerase High Fidelity (HiFi) para maior especificidade e maior eficiência na amplificação, e a partir da bula seguiu a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos, extensão 72°C por 1 minuto e extensão final 72° por 5 minutos, sendo o número de ciclos 30. O produto da reação de PCR foi então analisado a partir de uma corrida de Eletroforese em gel de agarose com concentração de 1% em tampão TAE 1X, corrente elétrica de 80V e tempo de duração de 35 minutos. A purificação seguiu a etapa de confirmação de amplificação, e foi realizada utilizando o Easy Pure PCR Purification Kit da *Transgen Biotech*.

### 4.2.2 Amplificação dos “biobricks” e Construção do Cassete de Expressão

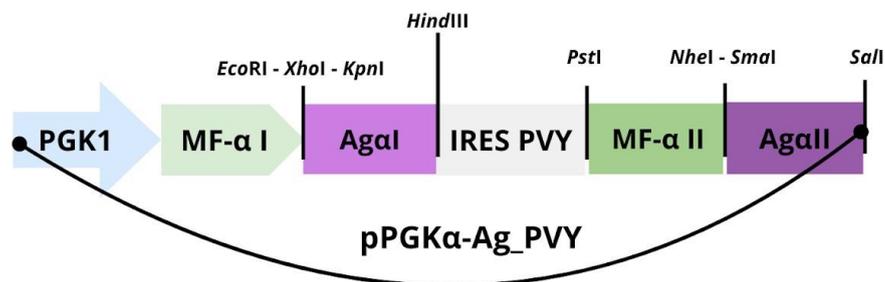
O vetor pPGK $\Delta$ 3 (de Almeida *et al.* 2005) foi sintetizado com o promotor de indução constitutiva PGK1, o primeiro peptídeo sinal MF- $\alpha$  (fator alfa) para secretar as proteínas recombinantes produzidas e uma tag de hexahistidina (6xHIS) que pode ser usada posteriormente para detecção imunológica com Anti-HIS e/ou purificação das proteínas de interesse (Lueking *et al.* 2003). A sequência IRES derivada do vírus PVY (Huang *et al.* 2019), 263pb, foi amplificada e clonada no vetor de passagem pUC57 pela empresa GenOne Biotechnologies. Tanto o vetor pPGK quanto a IRES PVY contêm sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *SalI*, o que permitiu a realização de tratamento enzimático, seguido pela purificação utilizando o Easy Pure PCR

Purification Kit da *Transgen Biotech*. A partir disso, foi realizada a reação de ligação para inserir a sequência de PVY em pPGK com a enzima T4 ligase (Promega), seguindo as instruções da bula, em uma proporção de concentração 3:1 (inserto:vetor), para obtenção da construção pPGKPVY.

O plasmídeo resultante da reação de ligação foi utilizado para transformação de células quimiocompetentes de *Escherichia coli* Top10. O protocolo utilizado já é pré-estabelecido para transformação bacteriana e seguiu as seguintes etapas: 10 $\mu$ L do produto de ligação foi homogeneizado mais 50 $\mu$ L de células quimiocompetentes *E. coli* Top10 e levado ao gelo por 15 minutos, após incubação foi levado ao termobloco a 42°C para choque térmico por 1 minuto. Em seguida, as células foram novamente levadas ao gelo por 1 minuto, adicionadas em 800 $\mu$ L de meio LB líquido, para recuperação e crescimento, e incubadas a 37°C por 1H. Depois da incubação, foram levadas a centrifuga por 10 minutos a 1200rpm. Foram descartados 600 $\mu$ L do sobrenadante, e os 200 $\mu$ L restantes semeados em placas de meio LB com Zeocina (25 $\mu$ g/mL) e incubadas por 16 horas a 37°C.

As colônias que apresentaram resistência ao antibiótico, ou seja, aquelas que cresceram na placa, foram selecionadas, repicadas, inoculadas e posteriormente submetidas a extração de DNA plasmidial. Essas etapas foram realizadas seguindo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* 1989. A confirmação da clonagem foi feita a partir da realização de PCR e analisada por Eletroforese em gel de agarose.

Com o plasmídeo pPGKPVY, a etapa seguinte foi a amplificação da proteína âncora  $\alpha$ -aglutinina I ( $\alpha$ AG), a partir da sequência presente no pPGKmultiepAg $\alpha$ , com *primers* Forward e Reverse específicos. A reação foi feita utilizando *TransTaq*® DNA Polymerase High Fidelity (HiFi), e seguiu a mesma programação anterior. Com a confirmação da amplificação obtida a partir de Eletroforese em gel de agarose, o produto da reação de PCR foi purificado utilizando o Easy Pure PCR Purification Kit da *Transgen Biotech*. Seguindo a construção do cassete (Figura 7),  $\alpha$ -aglutinina I,  $\alpha$ -aglutinina II e o fator alfa II (MF- $\alpha$ ) foram amplificados a partir de PCR convencional, tendo como DNA template o pPGKmultiepAg $\alpha$ , e a reação foi feita utilizando HiFi, também com a mesma programação já citada. Todos amplificados e purificados com Easy Pure PCR Purification Kit da *Transgen Biotech*.



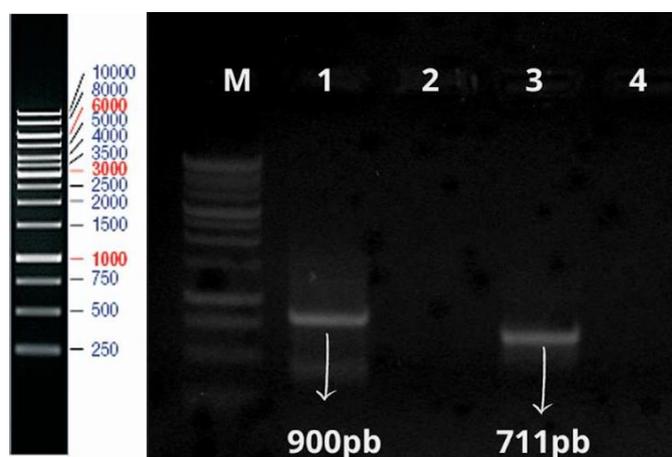
**Figura 7.** Esquema correspondente ao cassete de expressão. Com o PGK1 como promotor de indução constitutiva, o peptídeo sinal MF- $\alpha$  (fator alfa) para secretar as proteínas produzida, a proteína âncora  $\alpha$ -aglutinina ao C-terminal das proteínas de interesse, que tem o propósito de ancorar e expor as proteínas recombinantes na superfície da levedura. Além disso, uma sequência IRES (Internal Ribosome Entry Site - Sítio Interno de Entrada de Ribossomos) PVY com a função de recrutar os ribossomos e garantir a continuidade da síntese das proteínas, evitando a interrupção antes da síntese do segundo gene de interesse e que permitirá alcançar a dupla ancoragem. Fonte: Autor.

#### 4.2.3 Clonagem dos genes no Vetor de Expressão

A partir das purificações, foi realizada digestão enzimática em SCOV-Sint $\Delta$  e no vetor pPGKPVY, a fim de gerar extremidades que permitissem ligação entre o inserto e o vetor. A reação foi realizada utilizando *EcoRI* e *KpnI*. Após digestão, inserto e vetore foram purificados com Easy Pure PCR Purification Kit da *Transgen Biotech*

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

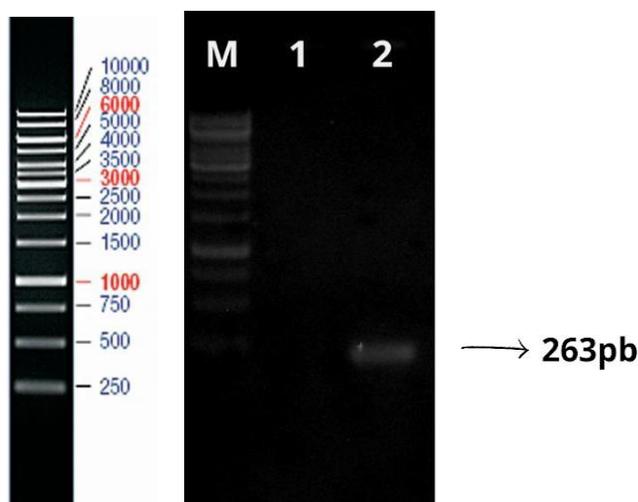
Este trabalho propôs construção de um vetor co-expressando dois antígenos derivados do SARS-CoV-2, o primeiro sendo o SCOV-Sint $\Delta$ , um gene sintético multiepítopo contendo regiões das proteínas estruturais Spike e Nucleocapsídeo, e o segundo o RBDwt, um gene selvagem do Domínio de Ligação ao Receptor encontrado na proteína S. Para isso foi preciso primeiro a amplificação de ambos os genes, que se encontravam em pXPGKSCOV e pVAXRBD, a partir de primers Forward e Reverse específicos. A amplificação foi confirmada através de uma corrida eletroforética com gel de agarose a 1% durante 35 minutos, revelando bandas de fragmentos com 900pb e 711pb, correspondendo respectivamente a SCOV-Sint $\Delta$  e RBDwt (Figura 8). O gene multiepítopo foi escolhido como um dos antígenos por ser um alvo interessante graças ao conjunto de epítomos escolhidos na sua síntese, variando de epítomos das proteínas S e N, e que, nas análises *in silico*, apresentaram resultados promissores quanto a alta capacidade de reconhecimento e ligação com células B e T, cobertura populacional mundial de mais de 90% para MHC-I (Complexo Principal de Histocompatibilidade I) e pouco mais de 50% para MHC-II (Complexo Principal de Histocompatibilidade II) e alta conservação contra possíveis variantes. Enquanto o RBDwt foi escolhido por ser um dos principais alvos de interesse no desenvolvimento de vacinas graças a sua capacidade de ativar células B para produção de anticorpos e células T para atacar as células infectadas, tanto em estudos em desenvolvimento quanto em vacinas em circulação (Yang *et al*, 2020).



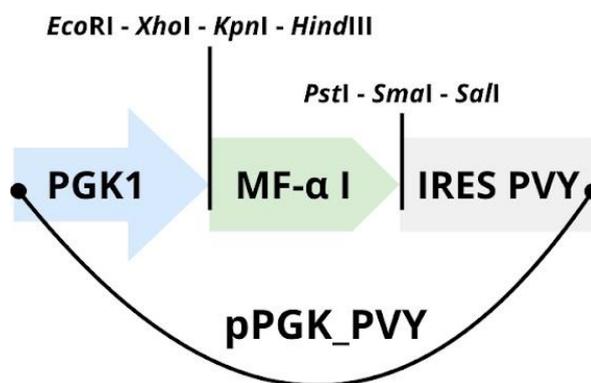
**Figura 8.** Amplificação de SCOV-Sint $\Delta$  e RBDwt de SARS-CoV-2. Eletroforese em gel de agarose 1%, tampão TAE 1X, corrente elétrica de 80V por 35 minutos. **M** - Marcador Ladder GeneRuler 1Kb

(ThermoScientific); **1** - Fragmento de 900pb correspondente a SCOV-Sint $\Delta$ ; **3** - Fragmento de 711pb correspondente a RBDwt; **2, 4** - Controles negativos.

A construção do cassete de expressão foi iniciada a partir da inserção da IRES - Sítio Interno de Entrada de Ribossomos, derivada do vírus Potato virus Y (PVY) com funcionalidade em *P. pastoris* previamente avaliada (Huang *et al.* 2019), no vetor pPGK. A utilização da sequência IRES no vetor de expressão é essencial para realização da co-expressão, e subsequente dupla ancoragem, dos antígenos, visto que garante a continuidade da síntese proteica entre os genes (Marques *et al.*, 2022). A partir de PCR convencional foi confirmada a inserção de PVY em pPGK, construído o plasmídeo pPGKPVY, como mostra a Figura 9.



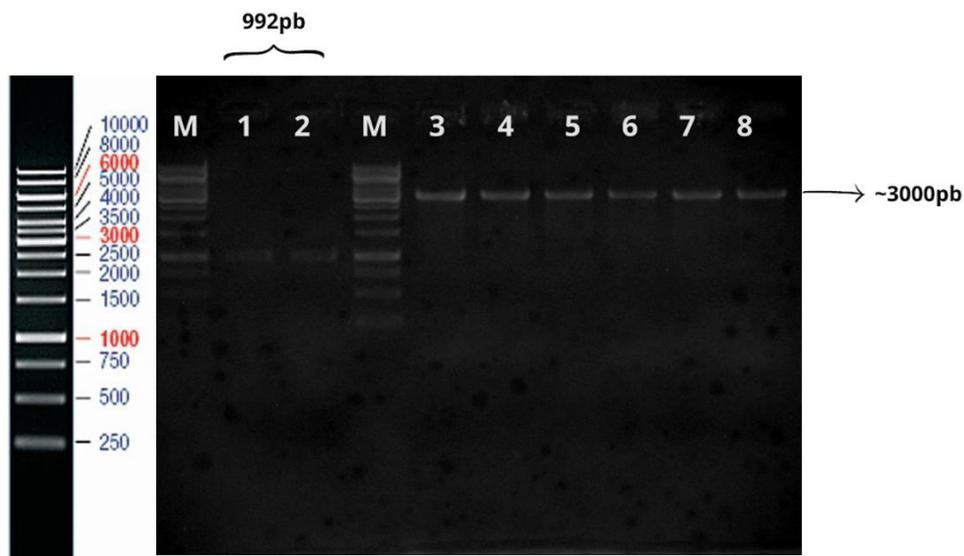
**Figura 9.** Confirmação de PVY em pPGK a partir de PCR convencional. Eletroforese em gel de agarose 1%, tampão TAE 1X, corrente elétrica de 80V por 40 minutos. **M** - Marcador Ladder GeneRuler 1Kb (ThermoScientific); **1** - Controle negativo; **2** - Fragmento de 263pb correspondente a PVY.



**Figura 10.** Ilustração da construção pPGKPVY. Contendo o promotor PGK1 como promotor de indução constitutiva, o peptídeo sinal MF- $\alpha$  (fator alfa) para secretar as proteínas produzida e IRES PVY com a

função de recrutar os ribossomos e garantir a continuidade da síntese das proteínas, evitando a interrupção antes da síntese do segundo gene de interesse e que permitirá alcançar a dupla ancoragem. Além disso, estão incluídos os sítios de restrição para enzimas *EcoRI*, *XhoI*, *KpnI*, *HindIII*, *PstI*, *SmaI* e *SalI*, que serão utilizados para inserção de outros “biobricks”. Fonte: Autor.

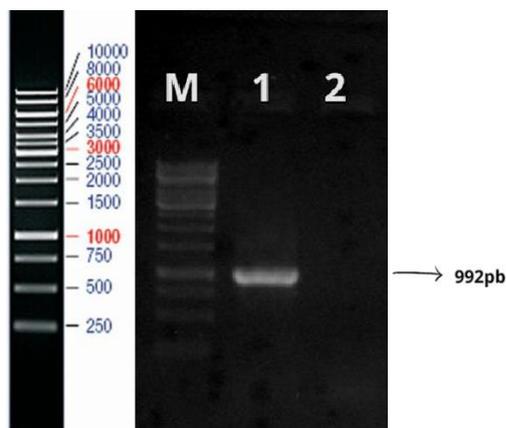
Com a confirmação da presença de PVY no vetor a partir de PCR foi realizada a amplificação, a partir de PCR convencional, e purificação da proteína âncora  $\alpha$ -aglutinina I, e subsequentes digestões de pPGK PVY e  $\alpha$ -aglutinina I com as enzimas *HindIII* e *KpnI* (Figura 11). A proteína âncora AgaI nesta construção apresenta papel de imobilizar e expor SCOV-Sint $\Delta$  na superfície de *P. pastoris*, visto que será fusionada ao C-terminal do antígeno, para aumento da exposição antigênica e ampliação no reconhecimento e resposta imune.



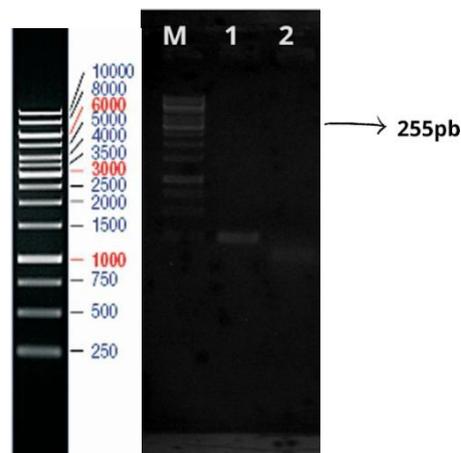
**Figura 11.** Digestão enzimática com as enzimas *HindIII* e *KpnI* da proteína âncora  $\alpha$ -aglutinina I e pPGKPVY. Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, corrente elétrica de 80V por 35 minutos. M - Marcador Ladder GeneRuler 1Kb (ThermoScientific); 1, 2 - Fragmentos de 992pb correspondente a  $\alpha$ -aglutinina I; 4 a 8 - Bandas correspondentes a pPGKPVY.

Também foi realizada a amplificação e purificação da AgaII (Figura 13A), que será fusionada ao C-terminal do RBDwt, para sua ancoragem e exposição na parede celular da levedura, e do segundo peptídeo sinal MF- $\alpha$  (fator alfa), inserido após a IRES PVY a fim de secretar a proteína (Figura 12B).

A)

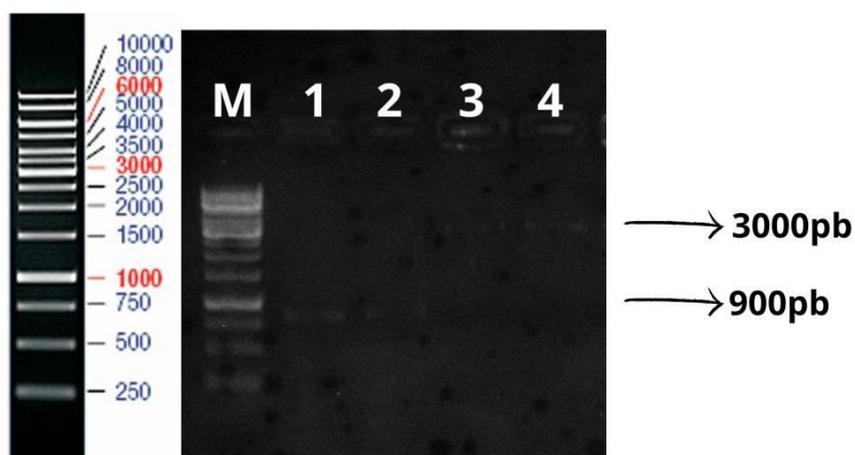


B)



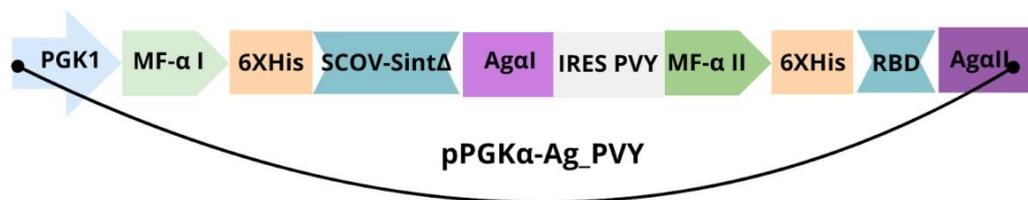
**Figura 12.** Resultados de corridas eletroforéticas. A) Amplificação de  $\alpha$ -aglutinina II com os respectivos primers *Foward* e *Reverse*. Eletroforese em gel de agarose 1%, tampão TAE, corrente elétrica de 80V por 35 minutos. **M** - Marcador Ladder GeneRuler 1Kb (ThermoScientific); **1** - Fragmento de 992pb correspondente a  $\alpha$ -aglutinina II; **2** - Controle negativo. B) Amplificação de MF- $\alpha$  II (fator alfa) com os respectivos primers *Foward* e *Reverse*. Eletroforese em gel de agarose 1%, tampão TAE, corrente elétrica de 80V por 35 minutos. **M** - Marcador Ladder GeneRuler 1Kb (ThermoScientific); **1** - Fragmento de 255pb correspondente a MF- $\alpha$  II; **2** - Controle negativo.

O gene *SCOV-Sint $\Delta$*  também recebeu tratamento enzimático a fim de gerar extremidades que permitam a ligação com o vetor *pPGKPVY* (Figura 13).



**Figura 13.** Digestão enzimática com as enzimas *EcoRI* e *KpnI* do *SCOV-Sint $\Delta$*  e *pPGKPVY*. Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, corrente elétrica de 80V por 35 minutos. **M** - Marcador Ladder GeneRuler 1Kb (ThermoScientific); **1, 2** - Fragmentos de 900pb correspondente a *SCOV-Sint $\Delta$* ; **3 e 4** - Bandas correspondentes a *pPGKPVY*.

Além dos “biobricks”, ou seja, das sequências a serem adicionadas, cada gene foi sintetizado com uma tag de hexahistidina (6xHIS) que pode ser usada tanto para detecção imunológica com Anti-HIS quanto para purificar as proteínas de interesse. O desenho do cassete completo a ser construído compreende: o PGK1, um peptídeo sinal MF- $\alpha$  (fator alfa) antes de cada gene, uma tag de hexahistidina (6xHIS) no N-terminal de cada gene, uma proteína âncora  $\alpha$ -aglutinina ao C-terminal de cada proteína de interesse, além de uma sequência IRES PVY entre a Ag $\alpha$ I e MF- $\alpha$  II, como ilustrado na Figura 14.



**Figura 14.** Esquema geral do cassete de expressão a ser obtido ao fim da construção. Fonte: Autor.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos até o presente momento, o trabalho contará com a finalização da construção do cassete de expressão e clonagem dos genes, para transformação do plasmídeo recombinante em *Pichia pastoris*. Com a obtenção das linhagens recombinantes da levedura, espera-se avaliar a expressão das proteínas virais e posteriormente validar em etapas de análises imunológicas *in vitro*. Vale ressaltar que esse tipo de construção é inédita tanto no que se refere a avaliação da co-expressão dos antígenos vacinais para o SARS-CoV-2. Além disso, a construção contendo a dupla ancoragem poderá ser aproveitada para antígenos vacinais de outros agentes infecciosos, sendo seu desenho e elaboração inéditos. A pesquisa se encontra dentro do desenvolvimento de novas estratégias de vacinação profilática contra o SARS-CoV-2, necessitando de posteriores ensaios *in vitro* e *in vivo* para sua validação quanto abordagem vacinal.

## REFERÊNCIAS

- AHN, J.Y.; BAE, S.; LEE, C.M.; LIM, J.W. Structural characterization of SARS-CoV-2 spike protein and its receptor binding domain using molecular dynamics simulations. *Scientific Reports*, 2022;12(1):22312.
- ALHARBI, S. N.; ALREFAEI, A. F. Comparison of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) M protein with its counterparts of SARS-CoV and MERS-CoV species. *\*Journal of King Saud University - Science\**, [S.l.], v. 33, n. 2, p. 101335, 2021.
- ALI, M. M.; FATHELRAHMAN, E.; EL AWAD, A. I.; ELTAHIR, Y. M.; OSMAN, R.; EL-KHATIB, Y.; ... & REEVES, A. Epidemiology and scenario simulations of the spread and control of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) disease for dromedary camels in the United Arab Emirates (UAE). *Animals*, [S.l.], v. 14, n. 3, p. 362, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ani14030362>>.
- ALMEIDA, J. D.; WILLIAMSON, R. C.; WILSON, M.; THOMSON, R. M.\*\* Coronaviruses. *\*Nature\**, [S.l.], v. 220, p. 650-652, 1968. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/220650a0>>.
- ARDIANI, A., HIGGINS, J. P., HODGE, J. W. (2010). Vaccines based on whole recombinant *\*Saccharomyces cerevisiae\** cells. *\*FEMS Yeast Research\**, 10(8), 1060-1069. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00665.x>
- ASAAD, A.; EL-SOKKARY, R.; ALZAMANAN, M.; EL-SHAFEI, M. Knowledge and attitudes towards Middle East respiratory syndrome-coronavirus (MERS-CoV) among health care workers in south-western Saudi Arabia. *Eastern Mediterranean Health Journal*, [S.l.], v. 26, n. 4, p. 435-442, 16 Apr. 2020.
- BAI, Y. Y., LIU, Y., LI, Y., TANG, L., YAN, H., & XU, S. (2023). *COVID-19: A review of the current understanding*. *Journal of Clinical Medicine*, 12(5), 1564. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm12051564>.
- BALAMURUGAN, V.; JAYARAMAN, S.; VENKATARAMAN, S.; MUTHUKUMAR, R.; SWAMY, K. M.; MOHAN, M.; MANICKAM, C. Biotechnology in the production of vaccine or antigen for animal health. *\*Journal of Animal & Veterinary Advances\**, [S.l.], v. 5, n. 6, p. 487–495, 2006.
- BANERJEE, A., WATSON, M., & GUPTA, K. (2021). *Epidemiology, Transmission, and Control of COVID-19*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(18), 9472. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph18189472>.

BAO, L., LI, L., ZHANG, C., & DONG, J. (2020). *The origin and early spread of SARS-CoV-2*. *Nature*, 583(7815), 272-275. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2175-7>.

BUI, T. T., PILLAY, J., & PAUL, S. (2021). *Impact of SARS-CoV-2 Variants on Vaccine Efficacy*. *Frontiers in Immunology*, 12, 750385. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.750385>.

CHAKRABORTY, C.; LAI, H. T.; MANDAL, S.; RAJASEKARAN, S.; MURUGAN, K.; GOUTAM, K.; KADIR, M. F.; REHMAN, Z. U.; PARVEEN, T.; ABDEL-MOHSEN, M.; KAMAL, M. A. Structural landscape of SARS-CoV-2-ssRNA nsp coding regions: A structural genomics approach for drug genome identification, ligand binding pockets, and structure-based drugability. *\*Molecular Biotechnology\**, [S.l.], v. 66, p. 641–662, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12033-022-00605-x>>.

CHAN, J. F. W.; YUEN, K. Y.; YEUNG, M. L.; CHAN, C. C. S.; HUI, K. C.; CHAN, H. S.; CHOW, F. L.; CARMICHAEL, S.; MOK, T. Y.; NG, S. K.; KAN, W. K.; HO, J.; MAK, J.; LI, H. Y.; LAM, K. C.; NG, L. C.; KONG, M.; CHENG, L. L.; PEIRIS, J. S.; CHAN, K. H. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *\*Emerging Microbes & Infections\**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 221–236, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>>.

CHEN, C., WANG, Y., & YANG, Y. (2020). *Current Strategies and Future Directions in COVID-19 Vaccine Development*. *Journal of Infection*, 81(3), 501-518. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.07.023>.

CHEN, H., YANG, L., & LI, Q. (2022). *Vaccine efficacy against SARS-CoV-2 variants of concern*. *Vaccine*, 40(30), 4040-4049. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.05.058>.

CHEN, J.; XU, K.; YANG, H.; LI, C. A computational study on the binding of SARS-CoV-2 spike protein to human ACE2 receptor. *Journal of Computational Chemistry*. 2022;43(16):1415-1427.

CHEN, X. Yeast cell surface display: An efficient strategy for improvement of bioethanol fermentation performance. *\*Bioengineered\**, [S.l.], v. 8, n. 2, p. 115–119, 2017.

CHENG, V. C. C., WONG, S. C. Y., & CHAN, J. F. W. (2020). *Clinical management of COVID-19*. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(6), 683-694. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30211-7).

CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, [S.l.], v. 5, p. 536-544, 2020. Available at: <<https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>>.

DA SILVA, S. A., MENDES, M. C., & MOREIRA, A. (2021). *A Comprehensive Review of COVID-19 Variants*. *Journal of Clinical Virology*, 135, 104745. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.104745>.

DE WILDE, A. H.; SNIJDER, E. J.; KIKKERT, M.; VAN HEMERT, M. J. Host factors in coronavirus replication. In: TRIPP, R.; TOMPKINS, S. (eds.). *Roles of host gene and non-coding RNA expression in virus infection*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 419. Cham: Springer, 2017. p. 177-203. doi: 10.1007/82\_2017\_25.

DE MORAES, R. M., BAPTISTA, J., & RIBEIRO, M. (2021). *Emerging SARS-CoV-2 Variants and Their Impact on the COVID-19 Pandemic*. *Journal of Infection*, 83(1), 1-16. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.01.002>.

DING, Y.; WANG, H.; LU, S.; LI, Z.; LI, X.; LI, Y.; LI, Z.; WANG, J. The role of molecular chaperones in the assembly and egress of SARS-CoV-2. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:730631. doi: 10.3389/fmicb.2021.730631.

DONG, R.; LI, X.; CHEN, J.; LIU, Y.; ZHANG, X.; WANG, Z. Contriving multi-epitope subunit of vaccine for COVID-19: Immunoinformatics approaches. *\*Frontiers in Immunology\**, [S.l.], v. 11, p. 1784, 2020.

DUART, G.; ROBERSON, L.; PAULINO, J. B.; PEREIRA, T. F.; GONZÁLEZ, I. C.; CORDEIRO, A. S.; CASTRO, I. R. SARS-CoV-2 envelope protein topology in eukaryotic membranes. *\*Open Biology\**, [S.l.], v. 10, n. 9, p. 200209, 2020.

DUTTA, N. K.; MAZUMDAR, K.; GORDY, J. T. The nucleocapsid protein of SARS-CoV-2: A target for vaccine development. *\*Journal of Virology\**, [S.l.], v. 94, n. 10, p. e00647-20, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/jvi.00647-20>>.

ESLAMI, N.; KAYKHAEI, M.; RAMAZANZADEH, S.; MAHDIYEV, M.; RAZAVI, M. SARS-CoV-2: Receptor and co-receptor tropism probability. *\*Current Microbiology\**, [S.l.], v. 79, n. 5, p. 133, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00284-022-02807-7>>.

FARZI, M.; HEYADAT, M.; NOROOZI, A. Modeling and simulation of SARS-CoV-2 spike protein interaction with human ACE2 receptor. *Computational Biology and Chemistry*. 2022;93:107589.

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. In: MAIER, H.; BICKERTON, E.; BRITTON, P. (eds). \*Coronaviruses\*. Methods in Molecular Biology, v. 1282. Humana Press, New York, NY, 2015. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1)>.

FENG, S., CLARKE, C., & LIU, X. (2020). *The effectiveness of interventions to reduce COVID-19 transmission*. The Lancet Public Health, 5(1), e20-e28. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(19\)30216-7](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(19)30216-7).

FERREIRA, E. M. S.; CUNHA, L. M.; DIAS, A. L.; CAMPOS, R. A.; MARQUES, A. A.; CASTRO, L. S.; SOUSA, L. A.; ALMEIDA, P. M. SARS-CoV-2: Aspectos relacionados à biologia, propagação e transmissão da doença emergente COVID-19. \*DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins\*, [S.l.], v. 7, n. Especial-3, p. 9–17, 2020.

FINE, P.; EAMES, K.; HEYMANN, D. "Herd immunity": A rough guide. \*Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America\*, [S.l.], v. 52, n. 7, p. 911–916, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/cid/cir007>>.

FINKEL, Y.; MIZRAHI, O.; NACHSCHON, A.; WEINGARTEN-GABBAY, S.; MORGENSTERN, D.; YAHALOM-RONEN, Y.; STERN-GINOSSAR, N. The coding capacity of SARS-CoV-2. Nature, [S.l.], v. 589, n. 7840, p. 125-130, 2021. Available at: <<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2739-1>>.

FIOCRUZ. Why was the disease caused by the new virus named Covid-19? Available at: <<https://portal.fiocruz.br/pergunta/por-que-doenca-causada-pelo-novo-coronavirus-recebeu-o-nome-de-covid-19#:~:text=COVID%20significa%20Corona%20Virus%20Disease,chin%C3%AAs%20no%20final%20de%20dezembro>>. Acesso em: 29 de Abril de. 2024.

FIUZA, L. V. R.; ALMEIDA, M. M.; SILVA, J. S.; OLIVEIRA, C. S. Ciclo de replicação e diagnóstico da infecção pelo SARS-CoV-2. \*Revista Fontes Documentais\*, [S.l.], 2020.

GAI, S. A.; WITTRUP, K. D. Yeast surface display for protein engineering and characterization. \*Current Opinion in Structural Biology\*, [S.l.], v. 17, n. 4, p. 467–473, 2007.

GAO, H.; LI, X.; ZHANG, Y. Molecular docking and dynamics simulation of SARS-CoV-2 spike protein binding to human ACE2 receptor. Journal of Molecular Graphics and Modelling. 2022;108:107982.

GELLER, C.; VARBANOV, M.; DUVAL, R. E. Human coronaviruses: insights into environmental resistance and its influence on the development of new antiseptic strategies. *Viruses*, [S.l.], v. 4, n. 11, p. 3044-3068, 12 Nov. 2012. doi: 10.3390/v4113044. PMID: 23202515; PMCID: PMC3509683.

GERA, N.; HUSSAIN, M.; RAO, B. M. Protein selection using yeast surface display. *\*Methods\**, [S.l.], v. 60, n. 1, p. 15–26, 2013.

GHILDIYAL, T.; SINGH, R.; RAI, D.; SHARMA, A.; SHARMA, R.; YADAV, V.; KAPOOR, N. Challenges in emerging vaccines and future promising candidates against SARS-CoV-2 variants. *\*Journal of Immunology Research\**, [S.l.], v. 2024, p. 1–15, 2024.

GIOVANETTI, M.; GARCIA, S. M.; RIBEIRO, M.; MARCHINI, R.; ARAUJO, M. E.; BARBOSA, F.; BRUNO, L.; VASCONCELOS, S.; MEDEIROS, M. S.; CARVALHO, S.; FERRAZ, M. L.; MOREIRA, J.; BRAGA, I.; SILVA, A.; PEREIRA, J.; SANTOS, S. Genomic epidemiology of the SARS-CoV-2 epidemic in Brazil. *\*Nature Microbiology\**, [S.l.], v. 7, p. 1490–1500, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41564-022-01191-z>>.

GORBALENYA, A. E.; BAKER, S. C.; BARIC, R. S.; DE GROOT, R. J.; DROSTEN, C.; GULYAEVA, A. A.; HAAS, J.; JIANG, D.; KALYUZHNYAYA, A.; KIRILOV, M.; KONDRATOV, I.; LERCHER, A.; LI, W.; LUBAN, J.; MARTIN, D. P.; NELSON, C. S.; OSMAN, O. A.; REAVELL, R. D.; RHEE, S. K.; SHERWOOD, A.; SINGH, N.; VANGEEL, L.; WADDELL, G.; WALLACE, K.; WIT, J.; ZIEBUHR, J. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: Classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *\*Nature Microbiology\**, [S.l.], v. 5, n. 4, p. 536-544, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>>.

GORDON, D. E., JOFFE, H., & DORSEY, S. (2020). *A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing*. *Nature*, 583(7816), 459-468. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>.

GRANT, R., DAVIES, M., & KELLY, R. (2021). *SARS-CoV-2 variants of concern and their impact on vaccine efficacy*. *Current Opinion in Virology*, 47, 85-92. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.04.002>.

GROOT, R. J.; BAKER, S. C.; BARIC, R.; ENJUANES, L.; GORBALENYA, A. E.; HOLMES, K. V.; PERLMAN, S.; POON, L.; ROTTIER, P. J. M.; TALBOT, P. J.; WOO, P. C. Y.; ZIEBUHR, J. Family Coronaviridae, 2012, p. 806–828. In: KING, A.; ADAMS, M.; CARTENS, E.; LEFKOWITZ, E. (ed.). *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA: Academic Press, 2012.

GROOT, R. J.; BAKER, S. C.; BARIC, R. S.; BROWN, C. S.; DROSTEN, C.; ENJUANES, L.; FOUCHIER, R. A.; GALIANO, M.; GORBALENYA, A. E.; MEMISH, Z. A.; PERLMAN, S.; POON, L. L.; SNIJDER, E. J.; STEPHENS, G. M.; WOO, P. C.; ZAKI, A. M.; ZAMBON, M.; ZIEBUHR, J. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of Virology*, [S.l.], v. 87, n. 14, p. 7790-7792, Jul. 2013. doi: 10.1128/JVI.01244-13. Epub 15 May 2013. PMID: 23678167; PMCID: PMC3700179.

GUO, Y. R., CAO, Q. D., & HONG, Z. S. (2020). *The origin, transmission, and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status*. *Military Medical Research*, 7(1), 11. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0>.

HADJ HASSINE, I. Covid-19 vaccines and variants of concern: A review. *\*Reviews in Medical Virology\**, [S.l.], v. 32, n. 4, e2313, 2022.

HARTENIAN, E.; BAKER, S. C.; BRASS, A.; HARRIS, J. R. The molecular virology of coronaviruses. *\*Journal of Biological Chemistry\**, [S.l.], v. 295, n. 37, p. 12910–12934, 2020.

HELMY, Y.A.; FAWZY, M.; ELASWAD, A.; SOBIEH, A.; KENNEY, S.P.; SHEHATA, A.A. A Pandemia COVID-19: Uma Revisão Abrangente de Taxonomia, Genética, Epidemiologia, Diagnóstico, Tratamento e Controle. *J. Clin. Med.* 2020;9:1225. doi: 10.3390/jcm9041225.

HUANG, M.; WANG, G.; QIN, J.; PETRANOVIC, D.; NIELSEN, J. Engineering the protein secretory pathway of *\*Saccharomyces cerevisiae\** enables improved protein production. *\*Proceedings of the National Academy of Sciences\**, [S.l.], v. 115, n. 47, p. E11025–E11032, 2018.

HUANG, Y.; LI, M.; ZHANG, H.; LIU, Z.; ZHANG, C.; LIU, J.; YANG, M. Screening for functional IRESes using  $\alpha$ -complementation system of  $\beta$ -galactosidase in *\*Pichia pastoris\**. *\*Biotechnology for Biofuels\**, [S.l.], v. 12, p. 300, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-019-1640-3>>.

HUI, D. S., AZHAR, E. I., & KANG, Y. (2016). *Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): clinical characteristics and risk factors*. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 63(4), 492-501. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/ciw352>.

HUSSEIN, H. A.; THABET, A. A.; WARDANY, A. A.; EL-ADLY, A. M.; ALI, M.; HASSAN, M. E.; SULTAN, S. SARS-CoV-2 outbreak: role of viral proteins and genomic diversity in virus infection and COVID-19 progression. *Virology Journal*,

[S.l.], v. 21, n. 1, p. 75, 2024. Available at: <<https://doi.org/10.1186/s12985-024-02342-w>>.

JIANG, X.; ZHANG, Y.; ZHENG, Y.; WANG, Y. Computational investigation of SARS-CoV-2 spike protein interactions with human ACE2 receptor. *Computational and Theoretical Chemistry*. 2022;1227:113307.

KAJIWARA, K.; AOKI, W.; UEDA, M. Evaluation of the yeast surface display system for screening of functional nanobodies. *\*AMB Express\**, [S.l.], v. 10, p. 51, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13568-020-00983-y>>.

KAKAVANDI, S.; ZARE, I.; VAEZJALALI, M.; SHIRANI, S.; AZIMI, A.; SHAFIEI, M.; RAJABIAN, T.; FATTOLLAH, H. Structural and non-structural proteins in SARS-CoV-2: Potential aspects to COVID-19 treatment or prevention of progression of related diseases. *\*Cell Communication and Signaling\**, [S.l.], v. 21, p. 110, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12964-023-01104-5>>.

KANG, S., HONG, Z., & LIU, X. (2021). *COVID-19: viral spread, immunity, and vaccines*. *Emerging Microbes & Infections*, 10(1), 239–261. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1870496>.

KENNGOTT, E. E.; WITTMANN, S.; KOPCZYŃSKI, M.; LANGE, M.; FORSTNER, P.; KÜHL, J. Surface-modified yeast cells: A novel eukaryotic carrier for oral application. *\*Journal of Controlled Release\**, [S.l.], v. 224, p. 1–7, fev. 2016.

KHAN, A., KHAN, M. I., & KHAN, N. (2016). *MERS-CoV: epidemiology and clinical features*. *International Journal of Infectious Diseases*, 47, 14-20. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.04.005>.

KIM, H.; YOO, S. J.; KANG, H. A. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *\*FEMS Yeast Research\**, [S.l.], [n. a.], 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1567-1364.12195>>.

KOEHLER, P., KLOH, M., & STRAWN, J. (2016). *Emergence and spread of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)*. *Annals of Internal Medicine*, 165(4), 284-290. Disponível em: <https://doi.org/10.7326/M16-0669>.

LEI, H.; MA, Y.; XIE, T.; WANG, J.; JIANG, C.; ZHANG, J.; LI, L. Yeast surface-displayed H5N1 avian influenza vaccines. *\*Journal of Immunology Research\**, [S.l.], v. 2016, p. 1–12, 2016.

LI, W.; SHI, Z.; YU, M.; REN, W.; SMITH, C.; EPSTEIN, J. H.; WANG, L. F. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*, [S.l.], v. 310, n. 5748, p. 676-679, 2005.

LIU, X.; WANG, X. J. Potential inhibitors against 2019-nCoV coronavirus M protease from clinically approved medicines. *\*Journal of Genetics and Genomics\**, [S.l.], v. 47, p. 119–121, 2020.

LIVINGSTON, B.; YOUNG, J.; LEE, D.; FRANK, A.; KUMAR, S.; ROGERS, K. A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. *\*The Journal of Immunology\**, [S.l.], v. 168, n. 11, p. 5499–5506, 2002.

LU, R.; WANG, J.; HUI, J.; ZHANG, X.; MA, J.; BAI, L.; XU, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; XU, C.; XIE, X.; HUANG, X.; WANG, X. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *\*The Lancet\**, [S.l.], v. 395, n. 10224, p. 565-574, 2020.

LU, S.; SHI, Z.; YU, Y.; LI, W.; HONG, L.; WANG, X.; ZHANG, L.; LI, J.; YANG, Y.; LOU, Z.; LIU, Q.; WANG, L.; WANG, J.; MA, Y.; SHI, X. The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein. *\*Nature Communications\**, [S.l.], v. 12, p. 502, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41467-020-20768-y>>.

LUAN, J., LU, Y., JIN, X., ZHANG, L. (2020). Spike protein recognition of mammalian ACE2 predicts the host range and an optimized ACE2 for SARS-CoV-2 infection. *\*Biochemical and Biophysical Research Communications\**, 526(1), 165-169. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.047. Epub 2020 Mar 19. PMID: 32201080; PMCID: PMC7102515.

LUEKING, A.; STABENOW, D.; CHEN, C.; BROWN, C.; LI, Y. A dual-expression vector allowing expression in *\*E. coli\** and *\*P. pastoris\**, including new modifications. *\*E. coli Gene Expression Protocols\**, [S.l.], p. 31–42, 2003.

MANCINI, R.; DRUSIAN, A.; MARTIN, S.; GORI, A. Computational modeling of SARS-CoV-2 spike protein and human ACE2 receptor binding. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(24):15542.

MARIANO, G.; FARTHING, R. J.; LALE-FARJAT, S. L. M.; BERGERON, J. R. C. Structural characterization of SARS-CoV-2: Where we are, and where we need to be (Open Access). *\*Frontiers in Molecular Biosciences\**, [S.l.], v. 7, art. no. 605236, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.605236>>.

MARQUES, R.; LACERDA, R.; ROMÃO, L. Internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation and its potential for novel mRNA-based therapy development.

\*Biomedicines\*, [S.l.], v. 10, n. 8, p. 1865, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/biomedicines10081865>>

MASTROPIETRO, G.; AW, R.; POLIZZI, K. M. Expression of proteins in *Pichia pastoris*. In: *Methods in Enzymology*. Vol. 660, p. 53–80. Academic Press, 2021.

MILLER, R.L.; WILKINS, K.; MILLER, J.M. Structural and functional analysis of SARS-CoV-2 spike protein: Implications for vaccine development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2022;593:147-153.

MONTANHO, I. D. C. Otimização dinâmica do cultivo semi-contínuo de *Pichia pastoris* recombinante para produção das enzimas heterólogas alfa amilase e penicilina G acilase. [S.l.], 2010. (Tese de doutorado).

MOUSAVIZADE, H, L.; GHASEMI, S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, [S.l.], v. 54, n. 2, p. 159-163, 2021.

NEZAFAT, N.; RAI, R.; KATZ, A.; DASTAGIR, S.; WILLIAMS, K.; KALAIARASAN, K.; KOLAHDOOZ, M. Designing an efficient multi-epitope oral vaccine against *Helicobacter pylori* using immunoinformatics and structural vaccinology approaches. *Molecular BioSystems*, [S.l.], v. 13, n. 4, p. 699–713, 2017.

NEZAFAT, N.; KIAI, M.; RAZAVILOO, S.; JAFARZADEH, M.; TEHRANI, S. A.; AHMED, A.; HOSSEINI, S. A. A novel multi-epitope peptide vaccine against cancer: An in silico approach. *Journal of Theoretical Biology*, [S.l.], v. 349, p. 121–134, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. MERS Outbreaks [Online]. Available at: <<https://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html>>. Accessed on: 29 Apr. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Statement on the fifteenth meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the coronavirus disease (COVID-19) pandemic. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-%282005%29-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-%28covid-19%29-pandemic>>. Acesso em: 17 de maio de 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Global COVID-19 vaccination strategy in a changing world: July 2022 update. Geneva: OMS, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/m/item/global-covid-19-vaccination-strategy-in-a-changing-world--july-2022-update>>. Acesso em: 21 maio 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). WHO COVID-19 Dashboard - Deaths. Available at: <<https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=o>>. Accessed on: 3 May 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>>. Acesso em: 17 maio 2024.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Brasil confirma primeiro caso de infecção pelo novo coronavírus. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/node/69303>>. Acesso em: 21 maio 2024.

PANDEY, R. K.; SINGH, R.; BANSAL, A.; KUMAR, S.; PATEL, S. A.; VERMA, R. Immunoinformatics approaches to design a novel multi-epitope subunit vaccine against HIV infection. *\*Vaccine\**, [S.l.], v. 36, n. 17, p. 2262–2272, 2018.

PINTO, D.; PARK, Y.; CARLSON, J. Understanding the interaction between SARS-CoV-2 spike protein and human ACE2 receptor through computational studies. *Journal of Molecular Biology*. 2022;434(2):167-180.

PIRAINE, R. E. A.; MARTINEZ, D.; LOPEZ, L.; PEREIRA, M.; DANTAS, J. Expression cassette and plasmid construction for yeast surface display in *\*Saccharomyces cerevisiae\**. *\*Biotechnology Letters\**, [S.l.], v. 43, p. 1649–1657, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10529-021-03142-w>>.

RAMADAN, N.; SHAIIB, H. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): A review. *Germs*, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 35-42, Mar. 2019. doi: 10.18683/germs.2019.1155. PMID: 31119115; PMCID: PMC6446491.

RASKIN, S. Genetics of COVID-19. *Jornal de Pediatria*, [S.l.], v. 97, n. 4, p. 378–386, Jul. 2020.

ROOHVAND, F.; SHOKRI, M.; ABDOLLAHPOUR-ALITAPPEH, M.; EHSANI, P. Biomedical applications of yeast - A patent view, part one: Yeasts as workhorses for the production of therapeutics and vaccines. *\*Expert Opinion on Therapeutic Patents\**, [S.l.], v. 27, n. 8, p. 929–951, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1339789>>.

ROMANO, M.; RUGGIERO, A.; SQUEGLIA, F.; MAGA, G.; BERISIO, R. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells*, [S.l.], v. 9, p. 1267, 2020. Available at: <<https://doi.org/10.3390/cells9051267>>.

SAMBROOK, Joseph. *\*Molecular cloning: A laboratory manual\**. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHOEMAN, D.; FIELDING, B. C. Coronavirus envelope protein: Current knowledge. *\*Virology Journal\**, [S.l.], v. 16, p. 69, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0>>.

SINGH, R.; KUMAR, S.; YADAV, N. Computational study of SARS-CoV-2 spike protein and ACE2 receptor interaction. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2022;20:4409-4419.

SRINIVAS, M.; GOMERSALL, C. D.; FOWLER, R. Critically ill patients with COVID-19. *\*JAMA\**, [S.l.], 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1001/jama.2020.3633>>.

SRINIVAS, N.; LEWIS, N.; HONG, M.; HSU, D. Interactions of SARS-CoV-2 spike protein and its receptor ACE2: A computational study. *Journal of Physical Chemistry B*. 2022;126(21):4065-4077.

SULTANA, N.; NAGESHA, S. N.; REDDY, C. L.; RAMESH, B. N.; SHYAMALAMMA, S.; SHASHIDHARA, K. S.; VIDYADHAR, G. D. Computational analysis of affinity dynamics between the variants of SARS-CoV-2 spike protein (RBD) and human ACE-2 receptor. *Virology Journal*, [S.l.], v. 21, n. 1, p. 88, 2024.

SUNG, T.; YUAN, S.; LIU, Z.; ZHANG, A.; LEE, H.; ZHENG, W.; WANG, S.; YUEN, K.Y. Computational prediction of the interaction between SARS-CoV-2 spike protein and human ACE2 receptor and the implications for COVID-19. *Journal of Biomedical Informatics*. 2022;124:103935.

TANAKA, T.; KISHIDA, M.; KITAGAWA, T.; HIRATA, H.; SHIMIZU, M. Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology. *\*Applied Microbiology and Biotechnology\**, [S.l.], v. 95, p. 577–591, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4175-0>>.

TEYMENNET-RAMÍREZ, K. V.; MARTÍNEZ-MORALES, F.; TREJO-HERNÁNDEZ, M. R. Yeast surface display system: Strategies for improvement and biotechnological applications. *\*Frontiers in Bioengineering and Biotechnology\**, [S.l.], v. 9, p. 794742, 2022.

THOMAS, S. The Structure of the Membrane Protein of SARS-CoV-2 Resembles the Sugar Transporter SemiSWEET. *Pathog Immun*. 2020;5(1):342-363. doi: 10.20411/pai.v5i1.377.

TORRES, F. A. G., MORAES, L. M. P. (2000). Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. *\*Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento\**, 20-22.

TREGONING, J. S.; CLARK, T. R.; BROWN, M. J.; DUVALL, E. J.; WATSON, J. A.; KELLY, M. L.; FISHER, D. A.; ROBINSON, T. B.; PHILLIPS, T. G. Vaccines for COVID-19. *\*Clinical and Experimental Immunology\**, [S.l.], v. 202, n. 2, p. 162–192, nov. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/cei.13517>>.

TREVINO, J.G.; YI, J.; FORLI, S.; PETERS, E.C. Ligand binding studies of the SARS-CoV-2 spike protein: Insights into the interaction between the spike protein and human ACE2 receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2022;65(6):3814-3830.

TRIPATHI, S., PANDEY, M. K., MALIK, Y. S., BILAL, M., DHAMA, K., CHAICUMPA, W., CHANDRA, R. (2020). Novel coronavirus (SARS-CoV-2): molecular biology, pathogenesis, pathobiology and advances in treatment of COVID-19 patients-an update.

TSANG, K. W.; HO, P. L.; OOI, G. C.; YEE, W. K.; WANG, T.; CHAN-YEUNG, M.; LAM, W. K.; SETO, W. H.; YAM, L. Y.; CHEUNG, T. M. et al. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *New England Journal of Medicine*, [S.l.], v. 348, p. 1977–1985, 2003.

VAN DEN HEUVEL, R.; KANNAN, S.; PATEL, K. Structural insights into the SARS-CoV-2 spike protein and its interaction with human ACE2 receptor. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2022;62(5):1774-1785.

VIJAYAKUMAR, V. E.; VENKATARAMAN, K. Uma revisão sistemática do potencial de *\*Pichia pastoris\** (*Komagataella phaffii*) como um hospedeiro alternativo para produção de produtos biológicos. *\*Molecular Biotechnology\**, [S.l.], v. 66, p. 1621–1639, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12033-023-00803-1>>.

WEI, L.-H.; SUN, Y.; GUO, J. U. Genome-wide CRISPR screens identify noncanonical translation factor eIF2A as an enhancer of SARS-CoV-2 programmed –1 ribosomal frameshifting. *Cell Reports*, [S.l.], v. 35, n. 7, p. 112987, 2023. Available at: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112987>>.

WILDER-SMITH, A.; FREEDMAN, D. O. Isolation, quarantine, social distancing and community containment: Pivotal role for old-style public health measures in the novel coronavirus (2019-nCoV) outbreak. *\*Journal of Travel Medicine\**, [S.l.], v. 27, n. 2, taaa020, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The race for a COVID-19 vaccine explained. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-race-for-a-covid-19-vaccine-explained>>. Acesso em: 22 maio 2024.

WU, W.; CHEN, X.; LI, Y.; WANG, H.; ZHANG, J.; WANG, L.; LI, F. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: Its role in the viral life cycle, structure and functions, and use as a potential target in the development of vaccines and diagnostics. *\*Virology Journal\**, [S.l.], v. 20, p. 6, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12985-023-01968-6>>.

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

YANG, J.; RONG, L.; ZHOU, X.; ZHANG, Y.; YANG, X.; GONG, H.; MA, H.; LI, B.; CAO, Z. Uma vacina que tem como alvo o RBD da proteína S do SARS-CoV-2 induz imunidade protetora. *\*Nature\**, [S.l.], v. 586, p. 572–577, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2599-8>>.

YANG, S.; HONG, Y.; LI, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, M.; ZHOU, L.; WANG, S. Engineering *\*Saccharomyces cerevisiae\** for efficient production of recombinant proteins. *\*Engineering Microbiology\**, [S.l.], v. 100122, 2023.

YANG, S.; ZHANG, L.; WANG, Y.; ZHENG, Y. Molecular dynamics simulations of SARS-CoV-2 spike protein binding with human ACE2 receptor. *Molecular Simulation*. 2022;48(2):155-166.

YE, M.; CHEN, X.; LI, Y.; YANG, M.; LIU, J.; ZHANG, W. Cell-surface engineering of yeasts for whole-cell biocatalysts. *\*Bioprocess and Biosystems Engineering\**, [S.l.], v. 44, p. 1003–1019, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00449-020-02484-5>>.

ZENG, W.; XIA, X.; ZHANG, R.; LIU, S.; JIN, Y.; WANG, H.; TANG, Y. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *\*Biochemical and Biophysical Research Communications\**, [S.l.], v. 527, n. 3, p. 618-623, 2020.

ZHANG, Y.; YANG, J.; SHEN, Y.; LI, Q.; CHEN, D.; FANG, X.; LIU, M.; LUO, W.; SHI, H.; ZHANG, C.; LI, J.; LI, Z. Clinical and genomic characteristics of SARS-CoV-2 infections in patients from Wuhan, China. *\*The Lancet\**, [S.l.], v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, 2020.

ZHAO, L.; CHENG, K.; YANG, J.; XU, X. A review of the structural basis of SARS-CoV-2 spike protein and its interactions with human ACE2 receptor. *Journal of Structural Biology*. 2022;210(2):107612.

ZHOU, F.; YU, T.; DU, R.; FAN, G.; LIAO, Y.; MING, D.; MA, S.; SHI, G.; WANG, Z.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y.; JIANG, X.; JIANG, W.; DONG, X.; HU, Y.; LIU, Y.; ZHANG, Z.; LIU, L.; ZHU, Y.; LIU, L.; ZHANG, H.; YAN, B.; XIA, L. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study. *\*The Lancet\**, [S.l.], v. 395, n. 10229, p. 1054- 1062, 2020.

ZHOU, P.; YANG, X. L.; WANG, X. G.; HU, B.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; SHI, Z. L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, [S.l.], v. 579, n. 7798, p. 270-273, 2020.

ZITVOGEL, L.; APOINTMENT, R.; VILARDI, L.; TRUFFA, M.; BONFANTE, A. Construction and characterization of retroviral vectors expressing biologically active human interleukin-12. *\*Human Gene Therapy\**, [S.l.], v. 5, p. 1493–1506, 1994.