



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

MARCO ANTONIO TURIAH MACHADO DA GAMA

**PRODUÇÃO DE ANTÍGENO MULTIEPÍTOPO SINTÉTICO DO
SARS-CoV-2 EM SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTERIANO**

Recife
2022

MARCO ANTONIO TURIAH MACHADO DA GAMA

**PRODUÇÃO DE ANTÍGENO MULTIEPÍTOPO SINTÉTICO DO
SARS-CoV-2 EM SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTERIANO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Recife
2022

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

Machado da Gama, Marco Antonio Turiah.

Produção de antígeno multiepítipo sintético do SARS-CoV-2 em sistema de expressão bacteriano / Marco Antonio Turiah Machado da Gama. - Recife, 2022.
50 : il., tab.

Orientador(a): Antonio Carlos de Freitas

Cooorientador(a): Anna Jéssica Duarte Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

1. Engenharia Genética. 2. Biologia Molecular. 3. Biotecnologia. 4. Genética de Microrganismos. 5. Produção de Imunobiológicos. I. Freitas, Antonio Carlos de. (Orientação). II. Duarte Silva, Anna Jéssica. (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)

MARCO ANTONIO TURIAH MACHADO DA GAMA

PRODUÇÃO DE ANTÍGENO MULTIEPÍTOPO SINTÉTICO DO SARS-CoV-2 EM SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTERIANO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 25 / 11 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 ANTONIO CARLOS DE FREITAS
Data: 19/12/2022 10:07:04-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Orientador: Prof. Dr Antonio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Genética

Documento assinado digitalmente
 LARISSA SILVA DE MACEDO
Data: 19/12/2022 11:53:02-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

MSc. Larissa Silva de Macêdo
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente
 ADALUCIA DA SILVA
Data: 19/12/2022 11:50:39-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr^a Adalúcia da Silva
Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ - PE

Dedico esta monografia à minha mãe,
Marluce, e ao meu pai, Antonio (*in
memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, aos meus pais, Antonio e Marluce, por todo os esforços lançados em suas estruturas para que me fosse concedido uma educação de qualidade, por todo o apoio demonstrado em minhas escolhas e por todo o amor passado.

Ao meu irmão, Silas Henrique, pelo apoio e conselhos. Minhas tias Rose e Solange, por não medirem esforços em me auxiliar em momentos difíceis.

Ao meu orientador Antonio Carlos de Freitas, por ter me dado a oportunidade e o privilégio de fazer parte do seu grupo de pesquisa, assim como a confiança necessária para atuar em seus projetos e todo o conhecimento passado no laboratório e em suas aulas. À minha co-orientadora Anna, por toda a paciência e disposição em ajudar e ensinar. Aos colegas do LEMTE, por passar aprendizados e me fazer sentir querido.

Aos colegas de curso, Lucas, Rimaud, Zion, Anndressa, Almir, Agenor e Carlos por terem permitido que o ambiente acadêmico ficasse mais leve e suportável e por todo o incentivo demonstrado.

À companheira Melissa, por estar ao meu lado na torcida e pelos bons momentos compartilhados nesses 4 últimos anos.

E, no entanto, ela se move.

Galileu Galilei

GAMA, Marco Antonio Turiah Machado da. **PRODUÇÃO DE ANTÍGENO MULTIEPÍTOPO SINTÉTICO DO SARS-CoV-2 EM SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTERIANO**. 2022. 51. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

Atualmente, o processo de imunização da população mundial contra o SARS-CoV-2, responsável pelo quadro pandêmico mais impactante para a saúde pública dos últimos anos, encontra-se em andamento. No entanto, ainda há a necessidade de desenvolver e avaliar novas estratégias vacinais, considerando a potencial de disseminação e mutagênese viral, o estabelecimento de variantes e eventuais novas ondas de infecção. Partindo deste ponto, vacinas de DNA e RNA, assim como vacinas que utilizam o vírus inativado estão suscetíveis à perda de eficácia, uma vez que algumas vacinas desenvolvidas e que estão em uso utilizam como base de confecção o vírus selvagem, o qual já sofreu inúmeras mutações e as que estão atualizadas podem não vir a acompanhar variantes mais recentes. O presente trabalho visou a produção de um antígeno sintético composto por epítomos derivados das proteínas Spike e Nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 como parte do desenvolvimento de abordagens vacinais para o controle da COVID-19. A sequência foi clonada no vetor de expressão pGEX-4T-3, ambas com sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Sall*, e inserida em células de *Escherichia coli* da linhagem BL21, utilizada como biofábrica para produção da proteína-alvo, cuja composição e arranjos dos epítomos são inéditos. Após a confirmação das clonagens, foram realizados ensaios para indução da expressão da proteína-alvo em baixa escala, buscando estabelecer as melhores condições de cultivo e rendimento. A produção da proteína multiepítomo foi verificada por SDS-PAGE e *Western blot*. Foi necessária a realização de solubilização dos pellets pós-lisados para recuperar as proteínas que ficaram nos corpos de inclusão das células e permitir sua purificação. Por fim, o antígeno produzido foi purificado utilizando resina de níquel. O sistema de expressão utilizado se mostrou capaz de produzir a proteína e permitiu sua detecção e purificação, contudo, faz-se necessária otimizações na metodologia para produção em maior escala para avaliar seu potencial imunogênico e protetivo. Este produto gerado é fundamental para avaliação *in vivo* da construção multiepítomo que foi desenhada e predita *in silico* quanto ao seu potencial imunogênico. A construção e avaliação de antígenos contendo epítomos das proteínas virais mais imunogênicas é uma abordagem promissora com potencial de promover respostas imunológicas protetivas e permitir atualização frente às variantes.

Palavras-chave: Coronavírus. Vacina. COVID-19. Proteína Recombinante. Epítomos.

GAMA, Marco Antonio Turiah Machado da. **PRODUCTION OF SYNTHETIC SARS-CoV-2 MULTIEPITOPE ANTIGEN IN BACTERIAL EXPRESSION SYSTEM.** 2022. 51. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ABSTRACT

Currently, the process of immunizing the world's population against SARS-CoV-2, responsible for the most impactful pandemic situation for public health in recent years, is in progress. However, there is still a need to develop and evaluate new vaccine strategies, considering the potential for viral dissemination and mutagenesis, the establishment of variants and possible new waves of infection. Starting from this point, DNA and RNA vaccines, as well as vaccines that use the inactivated virus, are susceptible to loss of effectiveness, since some vaccines developed and that are in use use the wild virus as a basis for making it, which has already suffered countless mutations and those that are up to date may not keep up with newer variants. The present work aimed to produce a synthetic antigen composed of epitopes derived from the Spike and Nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 as part of the development of vaccine approaches to control COVID-19. The sequence was cloned into the pGEX-4T-3 expression vector, both with restriction sites for BamHI and Sall enzymes, and inserted into BL21 Escherichia coli cells, used as a biofactory for the production of the target protein, whose composition and epitope arrangements are unpublished. After confirming the cloning, tests were carried out to induce expression of the target protein on a small scale, seeking to establish the best conditions for cultivation and yield. Production of the multiepitope protein was verified by SDS-PAGE and Western blot. It was necessary to carry out solubilization of the post-lysed pellets to recover the proteins that remained in the inclusion bodies of the cells and allow their purification. Finally, the produced antigen was purified using nickel resin. The expression system used proved capable of producing the protein and allowed its detection and purification, however, it is necessary to optimize the methodology for larger scale production to evaluate its immunogenic and protective potential. This generated product is essential for in vivo evaluation of the multiepitope construct that was designed and predicted in silico as to its immunogenic potential. The construction and evaluation of antigens containing epitopes of the most immunogenic viral proteins is a promising approach with the potential to promote protective immune responses and allow updating against variants.

Key words: Coronavirus. Vaccine. COVID-19. Recombinant Protein. epitopes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Estimativa do total de casos da infecção pelo SARS-CoV-2 ao redor do mundo.	13
FIGURA 2	Componentes estruturais e genômicos do SARS-CoV-2.	16
FIGURA 3	Aspectos gerais da infecção pelo SARS-CoV-2	18
FIGURA 4	Vetor de expressão bacteriano pGEX-4T-3	28
FIGURA 5	Gene sintético Multiepítopo	29
FIGURA 6	Clonagem do gene Multiepítopo em vetor de expressão pGEX-4T-3	36
FIGURA 7	SDS-PAGE e <i>Western-Blot</i> de extrato protéico bruto de células	37
FIGURA 8	SDS-PAGE de solubilização de cultura	38
FIGURA 9	<i>Western-Blot</i> de solubilização de cultura	38
FIGURA 10	SDS-PAGE de purificação proteica	39
FIGURA 11	<i>Western-Blot</i> de purificação proteica	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 SARS-Cov-2	11
2.1.1 Cenário Pandêmico	11
2.1.2 Organização Genômica	13
2.1.3 Aspectos gerais da infecção	16
2.1.4 Aspectos imunológicos	19
2.1.5 Estratégias vacinais	20
2.2. Construções Vacinais Utilizando Antígenos Multiepítomos	24
2.3. E. coli Como Sistema de Expressão Para Antígenos Vacinais	26
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo Geral	27
3.2. Objetivos Específicos	27
4. METODOLOGIA	27
4.1. Materiais	27
4.1.1 Vetor	27
4.1.2. Gene Multiepítomo	28
4.1.3. Linhagens de Microrganismos	29
4.1.4. Meio de Cultura e Condições de Cultivo	29
4.1.5. Soluções e Tampões	30
4.1.6. Géis para Eletroforese de DNA e de Proteínas	30
4.2. Métodos	31
4.2.1. Clonagem	31
4.2.2. Indução da Expressão Gênica	33
4.2.3. Análises de Expressão	33
4.2.4. Solubilização	34
4.2.5. Purificação	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita simples de sentido positivo, identificado pela primeira vez em Wuhan (China) e agente etiológico da doença do coronavírus (COVID-19), responsável por mais de 6 milhões de mortes ao redor do mundo desde 2019. Ele é mais suscetível a sofrer mutações por ter RNA como seu material genético e, devido a essas mutações pode mudar seu tropismo no hospedeiro e escapar de anticorpos neutralizantes, ameaçando a eficácia de vacinas construídas para combater a doença causada pelo mesmo, e promovendo o aparecimento de novas variantes (YESUDHAS et al., 2020; GARCIA-BELTRAN et al., 2021).

Até o momento, 12 vacinas contra a COVID-19 foram aprovadas para uso em humanos. Duas delas (Pfizer e Moderna) são baseadas na entrega de nanopartículas lipídicas de mRNA que codifica uma forma estabilizada da proteína Spike derivada do SARS-CoV-2 isolada da epidemia inicial em Wuhan. Outras vacinas são à base de adenovírus (Astrazeneca e Johnson & Johnson), à base de nanopartículas (Novavax) e de proteína inativada (Coronavac). Ensaios recentes demonstraram que essas últimas apresentaram redução da eficácia global, sugerindo que as variantes resistem à neutralização (GARCIA-BELTRAN et al., 2021).

Desde dezembro de 2020 foram identificadas 5 variantes de preocupação, as quais compartilham mutações entre si e provocaram novas ondas de infecções ao redor do mundo. As variantes de preocupação são: Alpha (identificada no Reino Unido), Beta (Identificada primeiramente na África do Sul), Gamma (identificada primeiramente no Brasil), Delta (primeiramente identificada na Índia) e a Ômicron (identificada primeiramente na Botswana). Essas variantes complicam a agenda de pesquisa do COVID-19 e exigem mais esforços em pesquisas laboratoriais, epidemiológicas e clínicas (TAO et al., 2021; KARIM & KARIM, 2021).

A construção e avaliação de antígenos que contém epítomos das principais proteínas imunogênicas virais são abordagens com interessante potencial a ser explorado, pela capacidade de promover respostas imunológicas protetivas específicas direcionadas para ativação tanto de células B, quanto de células T, além de permitirem fácil edição mediante a necessidade de atualização frente às

variantes. Portanto, projetos como o aqui proposto, que visam o estudo de sequências multiepítotos, podem contribuir no combate à COVID-19, representando uma estratégia alternativa às que já estão sendo avaliadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SARS-Cov-2

2.1.1 Cenário Pandêmico

As primeiras infecções pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2), causador da COVID-19, começaram a surgir em dezembro de 2019, em Wuhan, China. Até aquele momento, o impacto que esse vírus causaria em humanos e na saúde pública era pouco compreendido, até o momento em que o vírus foi isolado em 7 de janeiro de 2020 e o número de infecções aumentou em pouco tempo, ganhando proporções internacionais, o que fez com que a Organização Mundial da Saúde desse a classificação de pandemia já em 30 de março de 2020 (Figura 1) (SINGH e SOOJIN, 2021; BOBAN, 2020). Até outubro de 2022, 627.104.342 milhões de casos ao redor do mundo foram confirmados, assim como 6.567.552 mortes (WHO, 2022).

No Brasil, o primeiro caso da doença foi confirmado em 26 de fevereiro de 2020, na cidade de São Paulo, a maior metrópole do país e importante porta de entrada de doenças infecciosas (PRADO et al., 2021). O Brasil é o país da América Latina com maior número de mortes pela doença, com uma taxa de letalidade diferente ao longo de sua extensão territorial, que pode estar relacionada à composição demográfica diversificada, controle das medidas adotadas para conter as infecções e a ocorrência de diferentes variantes (WOLF et al., 2022).

As variantes virais são resultantes de mutações que ocorrem ao longo da replicação viral. A alteração no genoma viral pode decorrer de uma substituição de nucleotídeo, deleção ou inserção. Os vírus de RNA têm uma maior taxa de mutação em relação aos seus hospedeiros, o que está associado a mudanças na virulência e evolvibilidade, ambas consideradas favoráveis à adaptabilidade viral. Até o momento, 5 variantes de preocupação foram identificadas pela Organização Mundial da Saúde: Alpha (B.1.1.7), primeiramente identificada no

Reino Unido em setembro de 2020, Beta (B.1.351), reportada primeiramente na África do Sul em outubro de 2020, tendo se expandido em dezembro do mesmo ano, Gamma (P.1), reportada no Brasil em janeiro de 2021, Delta (B.1.617.2), reportada na Índia no final de 2020 e a Ômicron (B.1.1.529), reportada também na África do Sul em novembro de 2021. Todas as variantes possuem mutações na proteína de ligação ao receptor (RBD) (proteína utilizada pelo vírus para infectar células) e no Domínio N-terminal (NTD). No Brasil, além da variante de preocupação P.1, foi identificada uma variante de interesse, a Zeta (P.2). A variante P.1 pode levar a uma neutralização reduzida por anticorpos monoclonais, soros convalescentes e soros pós-vacinação. Já a variante P.2, possui potencial para reduzir a neutralização por tratamentos com anticorpos e soros vacinais (ALEEM et al., 2022; ZHANG et al., 2022; MALIK et al., 2022).

Desde o início da pandemia, várias vacinas foram desenvolvidas, testadas e tiveram concedida a autorização para uso emergencial. Uma revisão feita por Zheng et al. (2022) demonstrou que as vacinas atualmente aprovadas para uso têm um bom efeito protetor contra os principais desfechos relacionados ao COVID-19, especialmente para desfechos críticos. Eles observaram que houve alta heterogeneidade para a eficácia vacinal contra o SARS-CoV-2 entre indivíduos totalmente vacinados. Em outro estudo, Liu et al. (2021) analisaram um total de 58 estudos (32 estudos de eficácia da vacina e 26 estudos de segurança da vacina) e observaram que uma única dose de vacinas foi 41% eficaz na prevenção de infecções por SARS-CoV-2, 52% para COVID-19 sintomático, 66% para internação, 45% para internações em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e 53% para óbito relacionado à COVID-19. Já as duas doses foram 85% eficazes na prevenção de infecções por SARS-CoV-2, 97% para COVID-19 sintomático, 93% para hospitalização, 96% para internações na UTI e 95% efetivos para morte relacionada ao COVID-19, respectivamente. Eles viram também que foram eficazes nas variantes e para concluir, possuem segurança tranquilizadora e podem reduzir efetivamente a morte, casos graves, casos sintomáticos e infecções resultantes do SARS-CoV-2 em todo o mundo.

Figura 1: Dashboard da Organização Mundial de Saúde referente à distribuição mundial de casos confirmados de COVID-19.



Fonte: WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. 14 Dez. de 2022. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em 14 Dez. de 2022.

2.1.2 Organização Genômica

O SARS-CoV-2 é membro da linhagem B do gênero Betacoronavirus, que também inclui o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), e pertence à família Coronaviridae e à ordem Nidovirales. Comparativamente ao SARS-CoV, MERS-CoV e o Coronavírus de morcego (RatG13), ele tem 79%, 50% e 96% de identidade de sequência em seu genoma, respectivamente. Como os demais membros da sua família, seu genoma compreende um RNA de fita simples de sentido positivo, envelopado, não segmentado com estrutura 5' cap e cauda 3' poli-A, permitindo, assim, atuar como mRNA para tradução de replicases (RAHIMI et al., 2020). Assim como outros Betacoronavirus, na extremidade 5' do seu genoma há uma poliproteína ORF1ab longa, a qual compreende cerca de 2 terços do genoma, seguida por quatro proteínas estruturais principais, incluindo a proteína Spike (S), Envelope (E), Membrana (M) e Nucleocapsídeo (N) (Figura 2). Sua sequência genômica exibe um comprimento diversificado de 29,8 kb a 29,9 kb (RAHIMI et al., 2020; PHAN, 2020). A ORF1ab é traduzida em duas poliproteínas (pp1a e pp1ab) pelos ribossomos celulares, as quais são processadas por duas proteases virais, a protease

semelhante à papaína (PLpro) e a protease principal (Mpro), para produzir dezesseis proteínas não estruturais (NSPs), Nsp1 - Nsp16 (YAN et al., 2022). As NSPs desempenham múltiplas funções no ciclo de vida do vírus, modulando a imunidade do hospedeiro, atuando proteoliticamente e sintetizando, revisando e modificando o RNA (Tabela 1) (KADAM et al., 2021).

Tabela 1: Proteínas não estruturais do SARS-CoV-2 e suas respectivas funções.

PROTEÍNA	FUNÇÃO
Nsp1	Inibe a tradução da proteína do hospedeiro pela interação com o mRNA do hospedeiro.
Nsp2	Prejudica o ciclo celular da célula infectada.
Nsp3	Atua como protease no ciclo de vida viral; inibe a tradução de proteína do hospedeiro e suprime respostas imunes inatas.
Nsp4	Montagem das vesículas virais durante o ciclo de vida viral.
Nsp5	Atua como protease no ciclo de vida viral.
Nsp6	Indução de autofagossomos.
Nsp7	Síntese de primer e replicação do RNA viral.
Nsp8	Síntese de primer e replicação do RNA viral.
Nsp9	Suosta ligação de ssRNA; Interação com proteína do hospedeiro para facilitar replicação.
Nsp10	Metilação mRNA cap.
Nsp11	Função ainda desconhecida.
Nsp12	Replicação do RNA e capeamento do mRNA.
Nsp13	Atividade helicase durante a replicação de RNA e capeamento do mRNA.

Nsp14	Leitura de prova durante a síntese de RNA; N-metiltransferase durante o capeamento do mRNA.
Nsp15	Cliva o RNA em locais de poliuridilato.
Nsp16	2'-O-ribose metiltransferase durante o capeamento de mRNA

Fonte: Adaptado de Kadam et al., 2021.

Quanto às proteínas estruturais, a proteína S é a responsável pela entrada na célula hospedeira por meio da sua ligação com a enzima conversora de angiotensina-2 (ACE2). Devido a estas características e importância para o ciclo viral, é o principal alvo de vacinas, medicamentos antivirais e anticorpos monoclonais. Durante sua biogênese, ela é clivada por proteases do hospedeiro em duas subunidades, S1 (fragmento de ligação ao receptor) e S2 (fragmento de fusão). A S1 compreende as seguintes regiões: NTD, RBD, um motivo de ligação ao receptor (RBM), e os domínios C-terminais (CTDs), CTD-1 e CTD-2. A subunidade S2 é dividida em peptídeo de fusão (FP), região proximal do FP (FPPR), repetição da Heptad 1 (HR1), hélice central (CH), domínio conector (CD), repetição heptada 2 (HR2) segmento transmembrana (TM) e cauda citoplasmática (CT) (YAN et al., 2022).

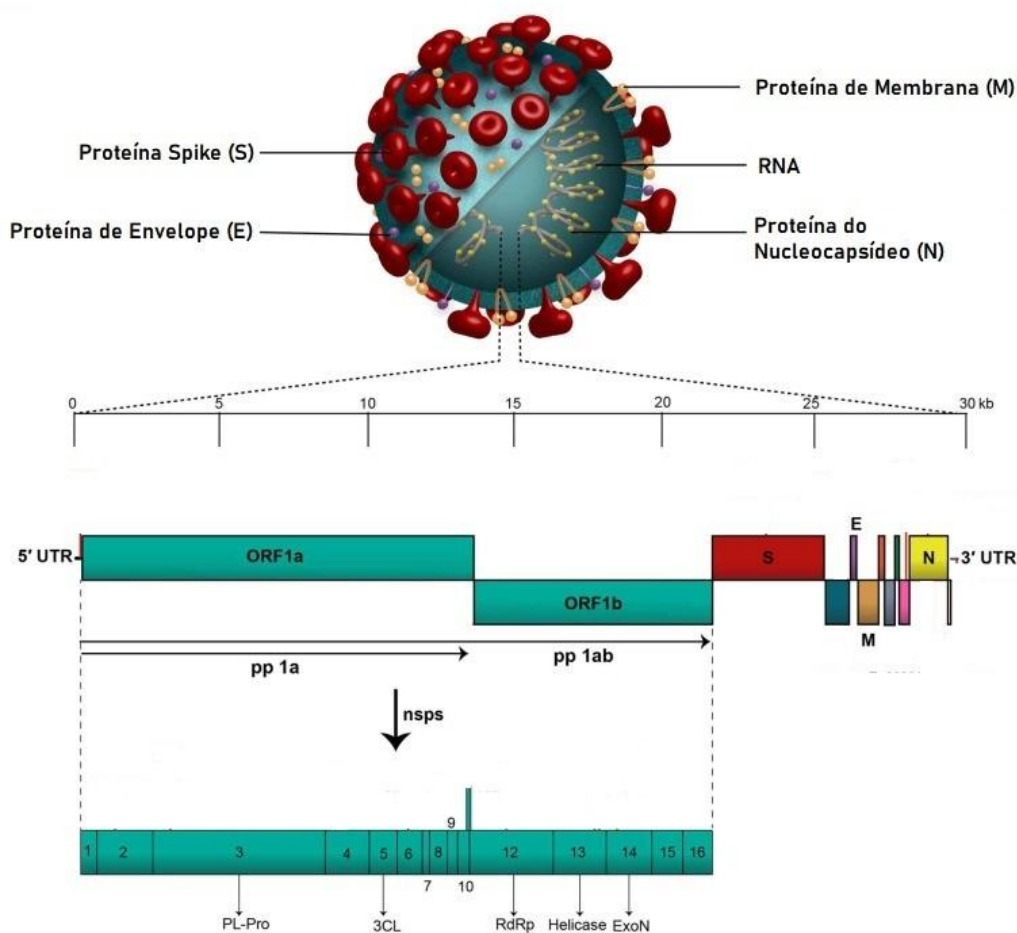
A proteína do Nucleocapsídeo (N) desempenha um importante papel no empacotamento do RNA e interfere também na via do interferon do hospedeiro. Ela contém cerca de 90% de identidade de sequência com a do SARS-CoV, o que sugere que anticorpos contra a proteína N do SARS-CoV podem reconhecer a proteína N do SARS-CoV-2. Esta proteína permite a interação do genoma viral e a proteína M, que são úteis no aumento da transcrição e replicação do RNA viral, tem maior conservação de sequência, possui baixa tendência a sofrer mutação e induz forte resposta imune protetora, permitindo, dessa forma, ser um bom alvo de drogas e vacinas e para uso no diagnóstico (YAN et al., 2022; NAQVI et al., 2020).

A proteína M é a mais abundante no vírus e a que define a forma do envelope viral. Ela interage com outras proteínas virais estruturais e tem um papel organizador central na montagem do coronavírus, pois direciona a formação do envelope e fornece a matriz à qual o nucleocapsídeo pode se ligar para brotamento. É reconhecida pelas respostas imunes humoral e celular e também é capaz de

regular negativamente a resposta imune inata, fazendo com que seja também um alvo interessante para vacinas (BAI et al., 2022).

A proteína do envelope (E) é a menor das proteínas estruturais e são expressas abundantemente dentro das células infectadas durante o ciclo viral, porém uma pequena parte delas se fundem à estrutura do envelope. É uma proteína importante para a patogênese viral (BAI et al., 2022).

Figura 2: Componentes estruturais e genômicos do SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de Rahimi et al. 2021

2.1.3 Aspectos gerais da infecção

A infecção pelo SARS-CoV-2 se inicia pelo contato com o vírus. Em 2019, o surto do vírus foi associado a um mercado em Wuhan, na China, que vendia animais vivos, indicando um provável reservatório zoonótico do SARS-CoV-2. Após a infecção em humanos, a transmissão do vírus é feita por gotículas respiratórias, aerosol, contato direto com superfícies contaminadas e transmissão fecal-oral. A

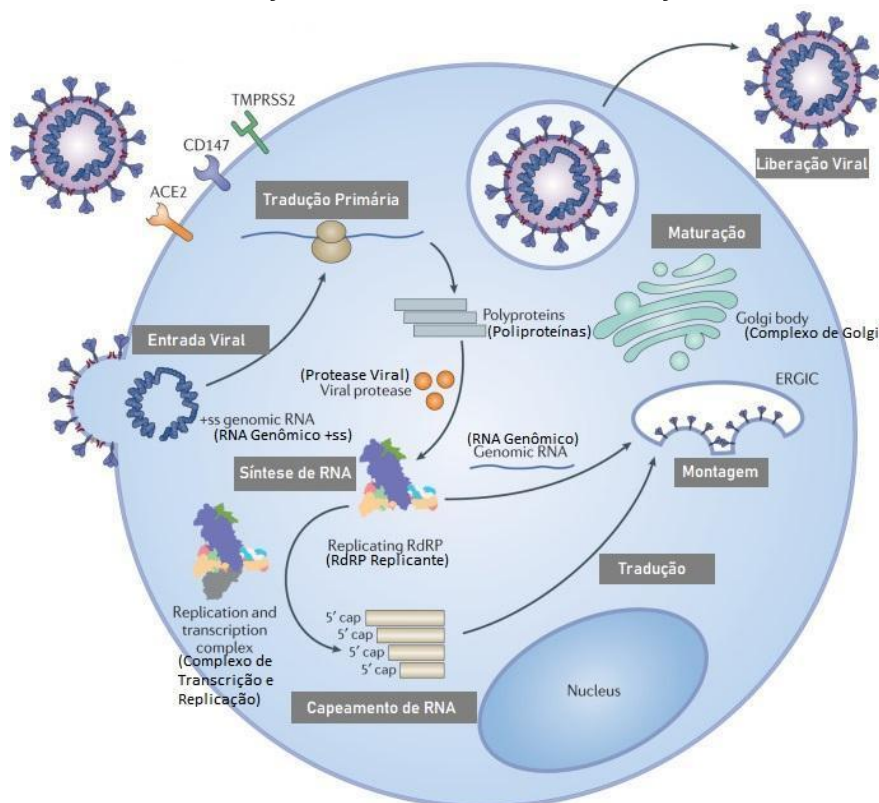
disseminação pode ser feita ainda por pessoas infectadas assintomáticas e no momento pré-sintomático da doença (KIRTIPAL et al., 2020; HARRISON et al., 2020).

A entrada do vírus nas células hospedeiras é mediada pela glicoproteína S, que contém as duas subunidades S1 e S2. A subunidade S1 liga-se à ACE2 através do RBD e a subunidade S2 ancora a proteína S à membrana celular. Além disso, a serina protease 2 transmembrana celular (TMPRSS2) é necessária para a preparação da proteína S do vírus. A entrada do vírus na célula também pode depender das proteases de cisteína endossomal/lisossomal, cathepsina B e L (CTSB, CTSL), mas sua atividade não é essencial. A furina protease também está envolvida no processo de infecção, uma vez que o SARS-CoV-2 contém um local de clivagem de furina incomum para coronavírus na proteína S, e o receptor celular neuropilin-1 (NRP1) potencializa a infectividade do SARS-CoV-2, fornecendo também um caminho para o sistema nervoso central (SNC). O SARS-CoV-2 também pode utilizar o receptor alternativo CD147 (expresso em altos níveis no cérebro) para infectar o SNC (JACKSON et al., 2022; TROUGAKOS et al., 2021). A interação da proteína S com a ACE2 irá mediar a endocitose, após isso, o RNA viral entra na célula e a ORF1a ou ORF1ab será traduzido pelo ribossomo hospedeiro produzindo poliproteínas que serão clivadas e transformadas nas NSPs, obtendo-se, assim, o maquinário de replicação e transcrição. Após o capeamento, o mRNA viral será traduzido. Os vírions serão montados no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi (Figura 3) (YANG et al., 2021).

O período de incubação viral é de 5 - 6 dias e os sintomas mais comuns após a infecção pelo SARS-CoV-2 são febre, tosse e dispnéia, podendo evoluir para a COVID-19 grave acarretando em síndrome respiratória aguda grave (SRAG), pneumonia, insuficiência renal e morte. O quadro grave da doença não se restringe somente à população idosa, estando crianças, adultos e jovens em risco também (Harrison et al., 2020). Supõe-se que o aumento da expressão de ACE2 ou a co-expressão em altos índices de ACE2, TMPRSS2 e CTSB/L nas células aumenta o risco de infecção e gravidade na doença. Os genes para essas proteínas são expressos em maiores níveis nos rins, coração e nos tratos respiratórios e gastrointestinal. Há ainda a super ativação desses receptores em patologias como diabetes, obesidade, hipertensão, doenças cardiovasculares e respiratórias e estas

estão associadas a um maior risco para a COVID-19 grave (TROUGAKOS et al., 2021).

Figura 3: Ciclo viral da infecção pelo SARS-CoV-2. A subunidade S1 da glicoproteína se liga à ACE2 enquanto a subunidade S2 ancora a proteína S à membrana celular. A endocitose é então mediada, o RNA viral entra na célula e a ORF1a ou ORF1ab será traduzido pelo ribossomo hospedeiro produzindo poliproteínas que serão clivadas e transformadas nas NSPs, obtendo-se, assim, o maquinário de replicação e transcrição. Após o capeamento, o mRNA viral será traduzido. Os vírions serão montados no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. No citoplasma irá ocorrer a maturação do vírus e finalmente a liberação.



Fonte: Adaptado de Yang et al., 2021.

Além disso, na COVID-19 estão incluídas alterações patológicas nos pulmões, como edema pulmonar, lesão alveolar difusa, hiperplasia reativa de pneumócitos tipo II, agregados protéicos, exsudatos fibrinosos, monócitos e macrófagos nos espaços alveolares e infiltração inflamatória de células mononucleares intersticiais. Há ainda a confirmação de infiltração da cavidade alveolar e dos alvéolos por macrófagos CD68+, células B CD20+ e células T CD8+ e a liberação local excessiva de citocinas é considerada determinante das manifestações clínicas da SRAG. Dessa forma, a lesão pulmonar grave em pacientes com COVID-19 é considerada como resultado de infecção viral direta e super ativação imune (HU et al., 2021).

2.1.4 Aspectos imunológicos

Informações sobre as respostas imunes inata e adaptativa da infecção pelo SARS-CoV-2 progrediram eficientemente no decorrer da pandemia e têm ajudado no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e profiláticas, principalmente no que diz respeito a vacinas (JORDAN, 2021).

A imunidade inata antiviral conta com o sistema complemento, sistemas de coagulação-fibrinólise, quimiocinas e anticorpos naturais, assim como componentes celulares, como as células natural killers (NK), células linfóides inatas (ILCs) e células T gama delta, que limitam a propagação da infecção viral por ação citotóxica nas células alvo, produção de citocinas e indução de uma resposta adaptativa (BOECHAT et al., 2021). Por outro lado, a interleucina-6 (IL-6), uma citocina pleiotrópica que media funções inatas e adaptativas, foi identificada como potencial fator patogênico para a SRAG no curso da COVID-19. Ela é capaz de direcionar a diferenciação de células imunológicas, resposta sentinela a patógenos invasores e lesão isquêmica. Pacientes com doenças autoimunes e inflamatórias possuem altos níveis de IL-6, além de sua produção ser desregulada. Em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, a transcrição dessa citocina é iniciada e mantida após a infecção do epitélio respiratório. O vírus é capaz de ativar macrófagos alveolares e circulantes, que irão produzir IL-6, e, dessa forma, resultar na tempestade de citocinas, dano endotelial, vazamento capilar e SRAG. Além disso, o SARS-CoV-2 ativa a produção de Interleucina-1 (IL-1), que por sua vez estimula a secreção de IL-6 e TNF, que age como um complexo pró-inflamatório que desencadeia danos pulmonares e sistêmicos (MURALIDAR et al., 2020; JORDAN, 2021; BOECHAT et al., 2021).

Quanto à imunidade adaptativa frente ao SARS-CoV-2, ela envolve a participação de células B e T e é a responsável pela resposta duradoura frente à infecção (JORDAN, 2021). Os seres humanos produzem anticorpos específicos para o vírus, assim como células T CD4⁺ e T CD8⁺. A produção desses componentes tem função protetora na infecção, porém com variabilidade quanto à função e importância de acordo com o tipo de infecção viral (SETTE & CROTTY, 2021).

As respostas das células T são frequentemente detectadas após a infecção pelo vírus, principalmente durante a fase aguda, sendo a resposta CD4⁺ mais proeminentes que as CD8⁺, tendo sido associada à resposta primária à

infecção. Há uma resposta das células T CD4+ a quase todas as proteínas do SARS-CoV-2, sendo a S, M e E as proteínas alvo mais proeminentes dessas células (SETTE & CROTTY, 2021). As células T CD4+ têm a capacidade de se diferenciar em células auxiliares e efectoras, capazes de instruir células B, células T CD8+, recrutar células inatas e possuem capacidades antivirais diretas, pois são capazes de se diferenciarem em células Th1 e células T foliculares, que possuem atividades antivirais e são fornecedoras especializadas de suporte às células B, respectivamente (SETTE & CROTTY, 2021). As células T CD8+ são detectadas 1 mês após a infecção pelo SARS-CoV-2 em 70% dos casos. Essas células expressam e secretam predominantemente IFN γ e granzima B (GzB), expressando em menor quantidade TNF-alfa e Interleucina-2 (IL-2) (SETTE & CROTTY, 2022). Elas reconhecem peptídeos associados ao MHC de classe I e após estimulação dependente do antígeno viral, matam as células infectadas pelo vírus, a partir da secreção de granzimas e perforinas. A partir do reconhecimento do antígeno do SARS-CoV-2, uma cascata de respostas imunes é desencadeada e células B são ativadas, se diferenciando rapidamente em plasmócitos extrafoliculares de vida curta e células B de memória (MBC). Os plasmócitos secretores de anticorpos e as MBCs podem entrar no sangue e mucosa, onde ajudam a combater a infecção viral e a proteger da reinfecção (RÖLTGEN & BOYD, 2021).

A linfopenia é frequentemente associada à COVID-19, principalmente em casos graves, havendo uma relação inversa entre a quantidade de células T e gravidade da doença, com predomínio das células T CD8+. Em casos leves da doença, níveis mais altos de T CD8+/CD4+ foram observadas, enquanto a tendência oposta foi encontrada em casos graves (DIPIAZZA et al., 2020).

2.1.5 Estratégias vacinais

Com o objetivo de se obter uma defesa contra o SARS-CoV-2 e desenvolver um conjunto de efetores imunológicos e memória contra o vírus e controlar a pandemia, vacinas vêm sendo desenvolvidas a uma celeridade inédita (MISTRY et al, 2022). Para diminuir a morbidade e mortalidade de uma doença, uma vacina deve ser considerada eficaz. De acordo com a OMS, para se obter uma vacina aceitável, ela deve atingir aproximadamente 50% de eficácia populacional,

podendo ser avaliada em quatro parâmetros: doença, doença grave, e/ou disseminação/transmissão (HODGSON et al, 2021).

Há dois objetivos principais que devem ser alcançados para qualquer estratégia vacinal: a segurança quanto à aplicação e capacidade de promover uma resposta imune robusta e de longo prazo. A grande maioria das vacinas aprovadas para a COVID-19 tem como foco a indução de anticorpos neutralizantes para o vírus. As vacinas candidatas para controlar a pandemia são agrupadas de acordo com a tecnologia da plataforma utilizada para o desenvolvimento, como as vacinas de mRNA, vacinas de vetor viral não-replicantes, vacinas de patógenos inativados, vacinas de subunidade de proteína, vacinas semelhantes a vírus e as vacinas de DNA (KYRIAKIDIS et al., 2021; CHEN et al., 2020).

As vacinas de mRNA, devido a características únicas, parecem ser as mais eficazes. Elas demonstraram ser mais seguras e eficientes devido, principalmente, à tradução *in vivo* das proteínas alvo, que garante o correto processamento do antígeno codificado. Além disso, devido à necessidade de uma resposta rápida frente à pandemia, essa plataforma permite uma produção ágil, flexível e escalável. Além disso, (ALIMOHAMMADI et al., 2022). Dentre as vacinas que utilizam tal tecnologia que foram aprovadas para uso emergencial, há a BNT162b2 e a mRNA-1273, fabricadas respectivamente pela Pfizer-BioNTech e Moderna. Ambas produzem ampla resposta de células T CD4+, reconhecem variantes do SARS-CoV-2 e foram notavelmente bem-sucedidas na indução da imunidade humoral e celular neutralizante, assim como na redução de infecções, hospitalizações e mortes por COVID-19 (GARCIA-BELTRAN et al., 2022; WOLDEMESKEL et al., 2021).

Quanto às vacinas que utilizam vetores virais, foram introduzidas para uso em 1972 e apresentam uma série de vantagens: transdução gênica de alta eficiência, entrega específica de genes para as células alvo e indução de respostas imunes robustas e aumento da imunidade celular. Quanto à sua segurança, devem abranger imunogenicidade, estabilidade genética, capacidade de escapar de defesas pré-existentes, déficit ou supressão de replicação e genotoxicidade (CHAVDA et al., 2022). Algumas vacinas que utilizam essa tecnologia estão aprovadas para uso emergencial e pode-se citar a Ad26.COV2.S, produzida pela Janssen (Johnson & Johnson), que provou ser eficaz contra casos graves da

doença, incluindo diminuição em casos de hospitalização e morte em uma única dose. Seu uso foi restringido a um grupo distinto de pessoas devido ao risco de provocar coágulos sanguíneos. Outra vacina aprovada é a AZD1222, produzida pela Oxford em colaboração com a AstraZeneca, possui uma eficácia média de 70,4% e possui a vantagem de poder ser armazenada em geladeira a 2 - 8°C por 6 meses. Há também a Sputnik V, capaz de induzir altos títulos de anticorpos contra o SARS-CoV-2 e possui uma eficácia de 91,6% quanto à capacidade de prevenir infecções sintomáticas (DENG et al., 2022).

As vacinas de patógenos inativados, devido ao seu tempo de produção, a colocou em desvantagem frente à pandemia do SARS-CoV-2. Para essa abordagem pode se utilizar a beta-propiolactona para inativar o vírus com posterior adsorção com hidróxido de alumínio, o adjuvante. É considerada, diante de alguns estudos, uma das opções mais seguras quanto a vacinação, porém, o uso do hidróxido de alumínio foi associado à doença respiratória aumentada associada à vacina (VAERD), além disso, vacinas desenvolvidas para o SARS-CoV, da mesma família do SARS-CoV-2, que utilizam a mesma tecnologia, não demonstraram uma imunidade durável (IZDA et al., 2020).

Vacinas de subunidade compreendem as que utilizam somente fragmentos antigênicos de microrganismos para induzir respostas imunes eficazes, podendo ser um polissacarídeo, um ácido nucléico ou uma proteína. Para o SARS-CoV-2, as principais proteínas que podem ser utilizadas para a produção de vacinas de subunidade são a S, M, E e N (HEIDARY et al., 2022). Essas vacinas exibem alto perfil de segurança, envolvem apenas antígenos puros que incluem peptídeos sintéticos ou proteínas recombinantes que expressam fragmentos particulares de imunógenos, que são capazes de promover defesa com células T e B, porém, possuem uma menor imunogenicidade, a relação custo-benefício pode variar e requer adjuvantes apropriados (PANDEY et al., 2020). Uma das vacinas aprovadas que utiliza a tecnologia é a NVX-CoV2373, que produziu títulos de anticorpos mais altos que as vacinas de vetor viral inativado, foi produzida pela Novavax em parceria com o Serum Institute of India e teve como objetivo a produção de uma resposta imune do tipo Th1 (LI et al., 2022).

As vacinas com partículas semelhantes a vírus são estruturas derivadas de vírus compostas por uma ou mais moléculas que imitam a forma e tamanho de um vírus, mas que não possuem material genético, evitando dessa

forma a infecção. Elas são altamente imunogênicas e induzem respostas imunes humoral e celular por vias diferentes das vacinas de vírus inativado (NOORAEI et al., 2021). Quando utilizadas, elas são capturadas e processadas por células apresentadoras de antígenos (APCs) e então, apresentadas a células T auxiliares e citotóxicas. A repetitividade e tamanho das partículas estruturais permitirão o reconhecimento e ativação das células B (PRATES et al., 2021). Algumas das candidatas que utilizam a tecnologia são: COVIVAXX, produzida pela SpyBiotech, CoVLP da Medicago, VBI-2901 e VBI-2902 da VBI Vaccines Inc., ABNCoV2, desenvolvida pela Bavarian Nordic. Todas elas estão em fase clínica (YONG et al., 2022).

Já a vacina de DNA consiste em entregar o ácido nucleico ou fragmentos dele, que codificam antígenos capazes de provocar uma resposta imune nas células do hospedeiro, utilizando plasmídeos de DNA como vetor. O material genético é translocado até a célula do hospedeiro, entra no núcleo, e a região promotora de mamífero presente no vetor é ativada, promovendo a transcrição do gene utilizando do maquinário molecular do indivíduo, sendo as APCs os principais alvos. Após a tradução no citoplasma das células, as APCs processam a proteína em peptídeos que serão apresentados por meio do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe I e II (SILVEIRA et al., 2021). Um desafio frente às vacinas de DNA consiste na necessidade do uso de um método de entrega, como a eletroporação ou um sistema de injeção sem agulha, que atrapalha a utilização das mesmas em larga escala (BLAKNEY & BEKKER, 2022). Uma das vacinas que utilizam essa tecnologia é a ZyCoV-D, que induziu resposta imune contra a proteína Spike utilizando uma construção de plasmídeo que carrega o gene S e foi considerada eficaz, segura e imunogênica. Atualmente está em uso na Índia (KHOBRADE et al., 2022).

No Brasil, quatro vacinas já receberam autorização da Anvisa para uso, como a CoronaVac, do instituto Butantan e Sinovac, que utiliza a tecnologia de vírus inativado, a Chadox 1 NCOV 19, da AstraZeneca e Universidade de Oxford, com tecnologia de vetor viral, sendo este o gene da proteína S do SARS-CoV-2, há ainda a Comirnaty, vacina da Pfizer em parceria com a BioNTech, que se baseia na tecnologia de mRNA e a vacina AD26.COV2.S, da Janssen-Cilag, que também utiliza a plataforma de vetor viral (BUTANTAN, 2022; ANVISA, 2022).

2.2. CONSTRUÇÕES VACINAIS UTILIZANDO ANTÍGENOS MULTIEPÍTOPOS

Uma plataforma que tem gerado interesse por parte dos pesquisadores para construções vacinais é a que emprega multiepítopos peptídicos como antígenos vacinais, que oferece as vantagens de maior segurança, maior estabilidade, menores respostas alérgicas e autoimunes e produção mais conveniente, devido à capacidade das proteínas se organizarem espontaneamente em estruturas bem ordenadas e à possibilidade de incorporar epítopos e antígenos em uma série de motivos repetitivos quiméricos, permitindo, ainda, a incorporação de adjuvantes. Contudo, intrínseca a essa tecnologia, há a desvantagem da baixa imunogenicidade, devido à susceptibilidade de degradação enzimática *in vivo*, que pode ser contornada com o uso de adjuvantes, sistemas de entrega e nanopartículas (NEGAHDARIPOUR a et al., 2018; SKWARCZYNSKI & TOTH; 2016). Elas são compostas por epítopos individuais ou sobrepostos ladeados por ligantes (pequenas sequências de aminoácidos) e consistem em epítopos de células B, de células T auxiliares (Th) e de células T citotóxicas (ANTONELLI et al., 2022; NEGAHDARIPOUR b et al., 2017). Ligantes são importantes nesse tipo de construção pois tornam a estrutura da proteína mais estável, como exemplo temos AYY, KK e GP GPG e permitem a autoclivagem dos epítopos, como é o caso do ligante EAAAK (DONG et al., 2020; WO et al., 2009).

Estudos *in silico* são capazes de avaliar e descobrir epítopos que podem ativar linfócitos T citotóxicos bem como epítopos para células B, assim como prever as respostas imunes de células T CD4⁺ e CD8⁺ frente a determinados epítopos de diferentes patógenos. O domínio de ferramentas de imunoinformática como o Protein Database, servidores para previsão de alinhamento de antígenos (VaxiJen), para modelagem de proteínas (Phyre 2), para prever epítopos CTL (NetCTL), entre outros, são importantes, pois a partir delas pode-se reduzir o número de experimentos necessários para a produção de uma vacina (DONG et al., 2020).

Inúmeros estudos vêm utilizando a imunoinformática para a construção de vacinas multiepítopos. Nezafat et al. (2014) utilizaram análise de imunoinformática para predição de epítopos e peptídeos na construção de uma vacina para imunoterapia contra câncer, utilizando os epítopos WT-1 e HPV E7 para

CTL, TTFrC e PADRE como peptídeos T auxiliares e HBHA como adjuvante. Neste estudo, os autores fizeram a predição de peptídeos de ligação ao MHC de classe I e II, predição de epítomos para linfócitos T citotóxicos e para receptores de células T auxiliares, assim como para células B e avaliaram também a antigenicidade e alergenicidade dos epítomos selecionados. Em outro estudo, Antonelli et al. (2022) construíram *in silico* uma vacina multiepítomo para o Zika vírus. O grupo reorganizou epítomos das células T CD4+ e CD8+, separando-os por ligantes apropriados e assim elegeram a melhor estrutura vacinal quanto a alergenicidade, antigenicidade e autoimunidade, qualidade da estrutura secundária e terciária e pontuações de epítomos descontínuos.

Quanto a estudos para produção de vacinas multiepítomo para SARS-CoV-2, Jain et al. (2021) examinaram por meio de bioinformática, informações de proteínas do vírus a fim de projetar uma vacina eficaz que abrange epítomos de células B e T. No estudo, foi analisado que todas as proteínas, exceto a NSP 16, apresentaram natureza antigênica. Foi revelada ainda a presença de epítomos de alta afinidade para linfócitos T auxiliares, citotóxicos e células B, inclusive, todos eles foram 100% conservados na família do coronavírus, o que significa que, uma vez utilizados em uma vacina, poderia ser eficaz contra todas as cepas do patógeno. Quanto à análise de interação de epítomos CTL e HTL a seus respectivos alelos do antígeno leucocitário humano (HLA), foi revelada uma interação favorável. Além disso, a análise de cobertura populacional atingiu um número >99% da população mundial, se provou a segurança e eficácia, assim como uma forte ligação entre a construção multiepítomo e o receptor imunológico TLR3. Outro estudo foi feito por Jyotisha et al. (2022), em que se utilizaram da sequência de aminoácidos do RBD da proteína S para projetar uma vacina candidata para o SARS-CoV-2. Foram feitas as predições para epítomos de células T citotóxicas, T auxiliares, linfócitos B, predição de epítomo indutor da produção de Interferon gama, análise de cobertura populacional, avaliação de antigenicidade e estrutura do polipeptídeo e análises moleculares. A partir destas análises, foram selecionados 6 epítomos para a construção da vacina, que foram combinados utilizando ligantes que suportam a estrutura natural dos epítomos. Ao final, a vacina, *in silico*, apresentou alta imunogenicidade, boas propriedades antigênicas e não alergênicas e uma boa cobertura populacional. Além disso, a análise computacional mostrou uma alta solubilidade dentro de um sistema de expressão bacteriano, que seria útil em uma

posterior purificação e produção em larga escala. Apesar dos diversos estudos *in silico* com tais construções, ainda faltam trabalhos que foquem na produção desses antígenos para que sejam validados *in vivo*.

2.3. *E. COLI* COMO SISTEMA DE EXPRESSÃO PARA ANTÍGENOS VACINAIS

Após a manipulação do mecanismo de expressão gênica em *Escherichia coli*, foi permitida a fabricação de bioprodutos a nível industrial e médico a partir deste microrganismo. A expressão de proteínas recombinantes vem sendo bastante utilizada para caracterizar sequências proteicas funcionalmente e produzir peptídeos para avaliação em ensaios de vacinação (KONDO & YUMURA, 2020; CANCELA & MAGGIOLI, 2020). O sistema de expressão que utiliza *E. coli* é o de primeira escolha para a triagem inicial de expressão de proteínas recombinantes devido à fácil manipulação, cultivo de forma barata e rápido crescimento (JIA & JEON, 2016).

Vários estudos utilizam *Escherichia coli* como sistema de expressão para antígenos vacinais. Fitzgerald et al. (2021) utilizaram *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) para expressar um fragmento da glicoproteína S de superfície (S319-640) do SARS-CoV-2, tendo como resultado a ligação deste antígeno em Imunoglobulinas G produzidas pela indução da infecção pelo SARS-CoV-2. Em outro estudo de 2021, He et al. conseguiram expressar a proteína RBD do vírus em *E. coli* e compararam com a proteína RBD expressa em células HEK293. Eles observaram que as estruturas secundárias e terciárias da proteína foram mantidas e ela foi capaz de se ligar ao ACE2 fortemente, e espera-se com isso a aplicação do bioproduto no desenho de vacinas, drogas de triagem e em kit de testes diagnósticos para o vírus.

Em um estudo utilizando imunoinformática, Khan et al. (2021) projetaram uma vacina multiepítopo visando 13 proteínas do SARS-CoV-2. Eles avaliaram epítomos antigênicos, tanto para células B quanto para células T, assim como sua alergenicidade, antigenicidade e toxicidade. Fizeram também análise físicoquímica e de docking molecular. Para a construção da proteína de interesse, utilizaram o sistema de expressão em *E. coli* e foi visto que a construção era solúvel durante a superexpressão. Rahbar et al. (2022) utilizaram também o RBD para ser expresso no sistema de expressão descrito. Após conseguir a purificação da

proteína de interesse, camundongos foram imunizados com a mesma e após a coleta do soro, foi capaz de se detectar, por ELISA, a proteína RBD expressa. Além disso, o SARS-CoV2 inativado foi detectado por anticorpos no soro de camundongos imunizados. Anticorpos séricos de indivíduos recuperados de COVID 19 (tipo selvagem e variante delta) reagiram à proteína expressa e ao se avaliar os anticorpos neutralizantes, observou-se que os anticorpos produzidos por camundongos imunizados impediram que o RBD se ligasse ao ACE2.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa a expressão do gene sintético composto por epítopos derivados das proteínas S e N do SARS-CoV-2, bem como sua produção em *Escherichia coli*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter vetor de expressão bacteriano contendo a sequência do gene sintético multiepítipo do SARS CoV-2;
- Avaliar a expressão do vetor pela detecção da proteína recombinante produzida em *Escherichia coli*;
- Obter a proteína de interesse purificada para viabilizar os subsequentes estudos acerca de seu potencial imunogênico.

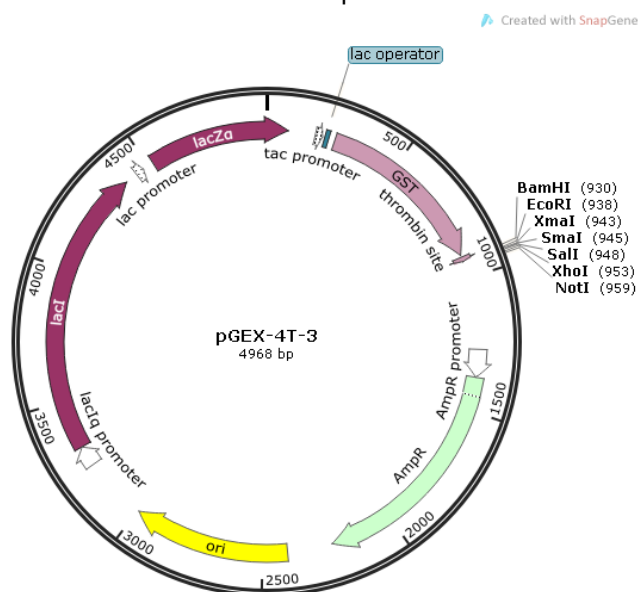
4. METODOLOGIA

4.1. MATERIAIS

4.1.1 Vetor

O vetor pGEX-4T-3 (Cytiva™) foi utilizado tanto para clonagem quanto para expressão do gene de escolha. Esse vetor possui o promotor *tac* para indução em alto nível de proteínas recombinantes fusionadas a GST (Glutathione S-transferase), possui um gene *lacIq* interno para uso em qualquer linhagem de *E. coli* e local de reconhecimento de Trombina protease, para clivagem e separação da proteína desejada do produto de fusão. A estrutura do vetor é descrita abaixo (Figura 4).

Figura 4: Vetor de expressão bacteriano pGEX-4T-3, contendo gene *lacIq* para uso em diferentes linhagens de *E. coli*, local de reconhecimento de Trombina Protease e promotor *tac* para indução em alto nível de proteínas.



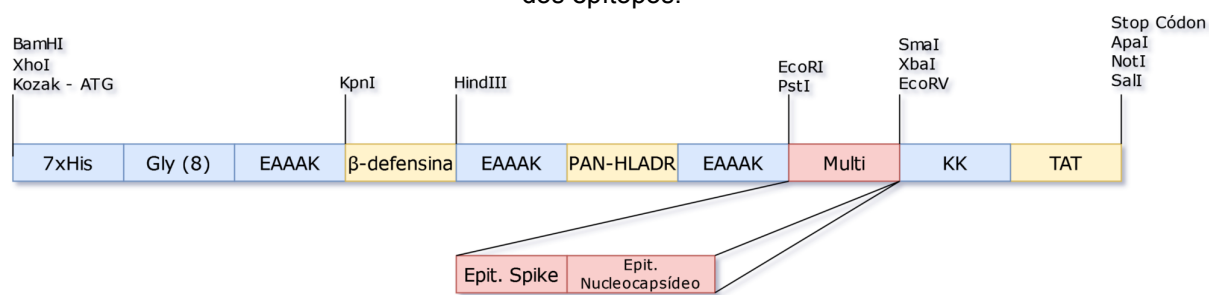
Fonte: pGEX-4T-3 Plasmid. Disponível em <https://lifescience-market.com/plasmid-c-94/pgex4t3-plasmid-p-63181.html>. Acesso em 14 Dez. de 2022.

4.1.2. Gene Multiepítipo

No presente estudo, foi utilizado um gene sintético multiepítipo contendo regiões das proteínas Spike e Nucleocapsídeo do SARS-CoV-2, além de sequências acessórias (adjuvantes) (Figura 5). Esta construção foi desenhada 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 (artigo sob submissão). Esse gene apresenta 1116 pb e, em ocasião de sua síntese, foram adicionados os sítios para as enzimas *BamHI* e *SalI* que são sítios de restrição também presentes no vetor pGEX-4T-3, o

que permitiu a devida inserção do inserto no vetor. Na porção 5' foi adicionada uma *tag* de histidina, que forneceu uma opção para detecção imunológica, por *western blot* e purificação com resina de níquel.

Figura 5: Gene sintético, contendo regiões da proteína Spike e Nucleocapsídeo do SARS-CoV-2, bem como adjuvantes (β -defensina, PAN-HLADR, TAT, EAAAK, KK) e respectivos pontos de restrição. A β -defensina atua aumentando a imunogenicidade, através do estímulo à imunidade inata e recrutamento de células T naive. O PAN-HLADR facilita a ligação a diferentes moléculas do MHC II e induz resposta CD4-helper. A região TAT melhora o delivery do DNA para as células assim como o de antígenos, aumentando a resposta celular. A KK é um potencial alvo para a catepsina B, enzima importante para apresentação de antígenos ao MHC II e o ligante EAAAK permite a clivagem correta dos epítomos.



Fonte: Autor.

4.1.3. Linhagens de Microrganismos

Para os procedimentos de clonagem, foi utilizada a linhagem Top 10 de *Escherichia coli*. Essa linhagem se destaca nesse tipo de aplicação por apresentar uma baixa taxa de degradação por endonucleases, o que garante maiores taxas de transferência de plasmídeo e redução da recombinação homóloga para uma inserção mais estável. Por outro lado, para fins de avaliação da expressão heteróloga, foi empregada a linhagem BL21, que é projetada para aplicações que exigem alto nível de expressão de proteínas recombinantes. Esse sistema de expressão é baseado no promotor T7 e promove uma estabilidade aumentada dos transcritos de RNAm, aumentando, consequentemente, a produção de proteínas. A adição de IPTG (isopropil-b-D-galactosídeo) foi necessária para induzir a expressão das proteínas clonadas nos vetores de expressão utilizados para a transformação das linhagens.

4.1.4. Meio de Cultura e Condições de Cultivo

Para a transformação de bactérias *E. coli* com o vetor pGEX-4T-3, foi utilizado o meio Luria-Bertani (LB) que apresentou a seguinte composição: triptona 1%, extrato de levedura 0.5% e NaCl 1%, adicionando 100 µg/mL de Ampicilina. Para meio sólido, foram acrescentados 1,5% de ágar. As células foram cultivadas a 37°C em agitador orbital (150 rpm).

4.1.5. Soluções e Tampões

Soluções para extração de DNA plasmidial, segundo protocolo descrito por Maniatis et al. (1989): Solução I: Tris-HCl 25 mM, EDTA (Ácido Tetracético Etilendiamina) 10mM, glicose 50mM, água destilada estéril; Solução II: NaOH 0,4N, SDS 2%; Solução III: Acetato de Potássio 5M, Ácido Acético Glacial, água destilada estéril.

Tampão de corrida para eletroforese de DNA: TAE 10x: Tris base 400mM, Ácido Acético 190mM, EDTA 10mM pH 7.6.

Soluções para SDS-PAGE: Tampão de corrida (10x, pH 6.8): Tris 25mM, SDS 0,1%, glicina 192mM; Tampão de Amostra 2X (*Laemmli*): Tris-HCl (pH 6.8 - 0.5M), glicerol 100%, SDS 10%, Azul de bromofenol, 2-Mercaptoetanol; *Coomassie Brilliant Blue*: azul de Coomassie-blue C-250 (0,05%), metanol (45%), ácido acético (10%); Solução descorante: ácido acético 10%, metanol (45%).

Soluções para transferência e *Western blot*: Tampão de transferência: Tris 60mM, Glicina 48mM, SDS 10%, metanol 20%; PBS (Tampão fosfato - salina): Fosfato de Potássio 50mM, NaCl 150 mM pH 7.2; Solução tampão TBS (Tris-Salina) 10x: Tris-HCl 0.5M, NaCl 1.5M pH 7.6 (para solução de lavagem com TBS-Tween, diluir 1:10 e acrescentar 500mL de Tween para 1L de TBS 1x).

Soluções para purificação: Tampão pra lise e equilíbrio da resina de níquel: Tris-HCl (50mM), NaCl (300mM) e Imidazol (10mM); Tampão de Lavagem Tris-HCl (50mM), NaCl (300mM) e Imidazol (20mM); Tampão de eluição: Tris-HCl (50mM), NaCl (300mM) e Imidazol (500mM).

4.1.6. Géis para Eletroforese de DNA e de Proteínas

Para realização de eletroforese para DNA foram utilizados géis de agarose com concentração de 1 e 1,5% com o tampão TAE 1X. Os géis foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/ml) para promover a visualização das bandas de DNA por meio de um transluminador com luz ultravioleta. O material foi aplicado junto com tampão de amostra (*Loading Dye* 6X), tendo como referencial o marcador comercial (Sinapse) de 1Kb (GeneRuler DNA Ladder, *Loading Dye* e água ultra pura).

Os géis de poliacrilamida com concentração de 12,5% foram preparados utilizando o detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS). As amostras do extrato protéico foram ressuspensas em tampão desnaturante (*Laemmli* 2x) e aquecidas a 75°C por 10 minutos. Foi empregado o tampão de corrida para SDS-PAGE 1X. As corridas de eletroforese foram realizadas com fonte de tensão constante e ajustável, seguindo os seguintes parâmetros: 120 V e 25mA por 90 minutos. Para visualização das bandas de proteínas, os géis foram corados com *Comassie Brilliant Blue* e descorados com solução descorante.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Clonagem

Diante da análise do sítio de policlonagem do vetor pGEX-4T-3, as enzimas de restrição mais adequadas para trabalhar com o multiepítipo foram *BamHI* e *Sall* (Promega™). O vetor foi digerido com tais enzimas e purificado para que fosse ligado ao inserto, por meio de reações de ligação com a enzima T4 DNA ligase (Takara™), na proporção de concentração de DNA 3:1 (inserto:vetor). As reações de ligação foram incubadas a 4°C por 16 horas. Após o período de incubação, os plasmídeos resultantes da reação foram usados como agente transformante para *Escherichia coli* (Top 10), conforme metodologia de clonagem molecular descrita por Sambrook et al. 2001. Para a transformação, 10µL do produto de reação de ligação foram adicionados a 50µL de células competentes. Depois de homogeneizada, a solução foi mantida no gelo por 15 minutos, sendo, depois, submetida a incubação em banho seco a 42°C por 1 minuto e incubada em gelo por

mais 2 minutos. Após o choque-térmico, foi acrescido 800µL de meio LB sem antibiótico a cada tubo e o produto da transformação foi incubado por 45 minutos a 37°C. Esse pré-inóculo foi, então, centrifugado (1200 rcf por 10 min), foi desprezado 600µL do sobrenadante e a porção restante, utilizada para ressuspensão das células e plaqueamento das mesmas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas para posterior análise.

As colônias resistentes ao antibiótico foram selecionadas e repicadas (plaqueadas e incubadas sob as mesmas condições após a transformação). Os repiques resultantes que apresentaram melhor crescimento foram selecionados para análise por meio de mini extração plasmidial descrita por Sambrook *et al* (1989). Foi realizado inóculo de 5mL com LB acrescido de ampicilina a partir dos repiques, permanecendo incubados a 37°C por 16 horas sob agitação. Após esse período, 1,5mL da cultura foi transferido para tubo de microcentrífuga e centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Após formação do *pellet* bacteriano, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100µL da Solução I gelada, que sensibiliza a parede bacteriana e inibe a atividade de enzimas celulares capazes de degradar o DNA. A mistura foi ressuspendida em vórtex. Em seguida, 200µL da Solução II recém-preparada foi adicionada com o intuito de promover o rompimento das membranas celulares e consequente lise. O homogeneizado foi mantido em gelo por 5 minutos e em seguida, foi acrescido 150µL da Solução III gelada (precipitação das proteínas e do DNA genômico) e nova incubação no gelo por 5 minutos. A mistura foi então centrifugada a 13000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido para um tubo novo junto com o mesmo volume de isopropanol e foi mantido por 30 minutos na temperatura de -80°C. Após nova centrifugação (13000 rpm por 5 minutos), o sobrenadante foi descartado para obtenção de *pellet*, no qual foi adicionado 1mL de etanol 70% gelado para lavagem mediante centrifugação final por 5-10 min. Após remoção do sobrenadante e secagem do *pellet* na estufa (37°C), este foi ressuspendido em 50 µL de água “nuclease-free” contendo RNase (20 µg/mL). Por fim, o estoque da extração foi acondicionado a -20°C.

O material resultante da extração foi analisado quanto a composição plasmidial por meio de reação de digestão dupla com as mesmas enzimas utilizadas para a clonagem com o intuito de verificar a liberação do fragmento clonado no

vetor. Foram preparados criopreservados dos clones confirmados (500µL de Glicerol a 100% + 500µL de inóculo) e acondicionados a -80°C.

4.2.2. Indução da Expressão Gênica

As células de *E. coli* (BL21) contendo o plasmídeo de interesse foram selecionadas e repicadas, obtendo-se culturas frescas para início dos ensaios de indução da expressão heteróloga, que foi feita conforme descrito por Hurtado-Melgoza et al. 2016, com adaptações. Ensaios em pequena escala foram realizados com o intuito de observar quais os clones que produziam a proteína com melhor rendimento. No primeiro ensaio, foi feito inóculo de 500µL de cultura fresca em 2mL de meio LB com 100µg/mL de ampicilina. Após 2 horas de incubação a 37°C a 150rpm, 0,1mM de IPTG foi adicionado, como agente indutor, e a cultura foi mantida a 25°C por 4 horas sob agitação de 150rpm. Ao fim do período de indução, 1mL da cultura foi aliquoteado e centrifugado a 8000rpm por 10 minutos. O *pellet* protéico foi ressuspensionado em 200µL do tampão desnaturante *Laemmli* (2x) e submetido a banho-maria a 75°C por 10 minutos. Em seguida, 20µL das amostras foram aplicados no gel de poliacrilamida (12,5%). Foi promovida uma eletroforese de cerca de 1h e 30 minutos (40mA). Para visualização das bandas, o gel foi corado com *Comassie Brilliant Blue*, e a confirmação da produção ocorreu por *western blot*.

Posteriormente, foi feita uma indução com um maior volume de cultura (100ml) para que pudesse ser feita a purificação das proteínas.

4.2.3. Análises de Expressão

Os clones que apresentaram níveis detectáveis da proteína heteróloga após os ensaios de indução foram avaliados por SDS-PAGE e por meio de ensaios imunoenzimáticos por meio de *Western blot*, conforme descritos por Hurtado-Melgoza et al. 2016, com adaptações. As amostras foram preparadas para aplicação em gel SDS-PAGE e submetidas a corrida eletroforética por cerca de 1 hora e 30 minutos. Para tornar as proteínas acessíveis à detecção pelo anticorpo, as amostras foram transferidas do gel para uma membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride) em cuba semi-seca. Para realizar a transferência, o protocolo para imunodeteção seguiu os seguintes passos: bloqueio da membrana com solução

Leite 5% em TBS-Tween por cerca de 60 minutos, sob agitação, em temperatura ambiente; Hibridização com o Anticorpo primário Anti-His (Sigma-Aldrich) 1:3000 em leite 1% em TBS-Tween e incubação à temperatura ambiente por 60 minutos sob agitação; Lavagem da membrana com TBS-Tween (3 lavagens por 10 minutos sob agitação). A membrana sensibilizada foi enxuta e incubada com NBT/BCP (Sigma-Aldrich) por 5 - 10 minutos em temperatura ambiente e lavada com água destilada para leitura de bandas.

4.2.4. Solubilização

Para a solubilização de pellets após o processo de lise, foi utilizado o protocolo descrito por Hurtado-Melgoza (2016), com adaptações.

Resumidamente, os pellets foram lavados com 50 mL de PBS e incubados a 37°C sob agitação constante por 20 min. Após isso, foram centrifugados a 4500 RPM a 4°C por 10 min. O processo se repetiu 2 vezes. Os pellets foram ressuspendidos no vórtex com 10mL PBS (1x) pH 7.4 contendo 2 M de uréia por 2 min, foram incubados a 37°C sob agitação constante por 30 min e centrifugados a 4500 RPM a 4°C por 10 min. O sobrenadante correspondente ao extrato protéico solubilizado foi recuperado após a centrifugação. Para a etapa de purificação subsequente, foi necessário trocar o tampão PBS-Ureia para TRIS-NaCl-Imidazol (solução 1 da etapa de purificação com resina de níquel) e para isso, se utilizou o kit Spin-x UF-20 (30K MWCO PES), utilizando o protocolo do kit (Corning).

4.2.5. Purificação

Para a purificação, foi realizada uma outra indução dos clones específicos para posterior lise e obtenção dos lisados, seguindo protocolo padrão do grupo de pesquisa. Resumidamente, os pellets obtidos da indução feitas com 100 ml de cultura foram pesados e foi adicionado aos mesmos a solução de lise (5mL de solução para cada 1g de pellet) e PMSF (1mM); em seguida foram adicionadas pérolas de vidro à mistura e foi então congelada a -80°C por 5 minutos e descongelada com auxílio de agitação em vortex, processo repetido 5 vezes; após

isso, foi então centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante (lisado - extrato proteico solúvel) foi guardado para purificação.

Para as bandas que foram visualizadas no *Western blot* correspondentes a proteína de interesse, foi feita a purificação com resina de níquel (Sigma-Aldrich), conforme orientações do fabricante.

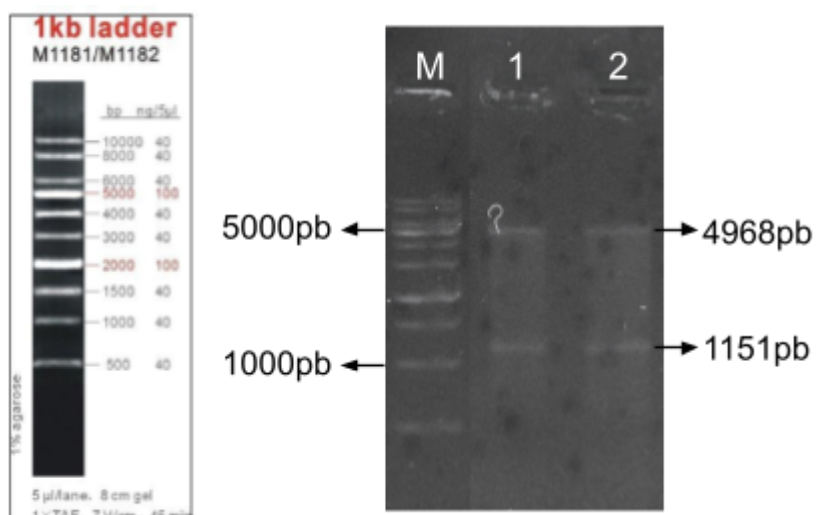
Para preparação da resina de níquel (Sigma-Aldrich) com pré-equilíbrio, foi adicionado 1mL da resina em falcon de 15mL mais 10mL de tampão de lise; a mistura foi agitada por 2 minutos e em seguida centrifugada a 4000 rpm por 3 minutos, processo esse que foi repetido 4 vezes. Após o pré-equilíbrio da resina, cerca de 3mL do lisado foi adicionado à mesma e a mistura foi incubada sob agitação de 100 rpm com falcon deitado a 4°C por 1h. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 10000 g a 4°C; o sobrenadante, correspondente à fração não adsorvida (flow-through), foi armazenado. O pellet obtido foi ressuspendido com 1mL de tampão de lavagem, a mistura foi agitada por 5 minutos a 100 rpm, centrifugada a 13000 g por 2 minutos a 4°C e as alíquotas foram guardadas, processo repetido 3 vezes. Após a lavagem e obtenção das alíquotas, foi adicionado 500 µL do tampão de eluição, a mistura foi agitada entre 15 - 30 minutos a 4°C e em seguida, centrifugada a 13000 g por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante foi armazenado, processo repetido 3 vezes. Ao final da purificação, as alíquotas para análise em SDS-PAGE foram: lisado, Flow-Through, 3 lavagens, 2 ou 3 eluições e resina.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse estudo propôs a produção de um antígeno multiepítopo sintético do SARS-CoV-2 contendo regiões das proteínas Spike e Nucleocapsídeo, além de sequências adjuvantes. Para isso, o primeiro passo foi a obtenção do vetor recombinante pGEX_MULTI.

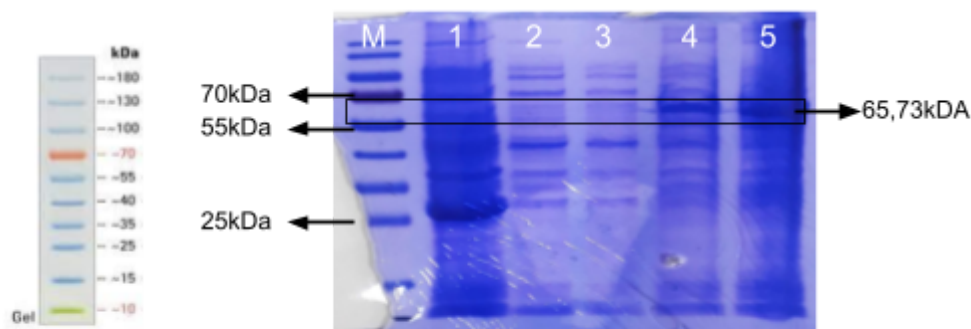
A figura 6 mostra o resultado da reação de digestão feita para demonstrar a composição plasmidial pGEX_MULTI. Nela, é possível observar duas bandas distintas, uma correspondente ao vetor pGEX-4T-3, com cerca de 4.9kb e outra menor, com cerca de 1151pb, tamanho correspondente ao gene multiepítopo sintético.

Figura 6: Clonagem do gene multiepítipo em vetor de expressão pGEX-4T-3; Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE; 80V/cm² aplicados; M - Marcador Ladder GeneRuler 1Kb Sinapse ; 1 e 2 - digestões com enzimas de restrição *Bam*HI/*Sa*II apresentando o vetor vazio pGEX-4T-3 (4986pb) e o gene multiepítipo com região GST da vetor pGEX-4T-3 (1151pb).

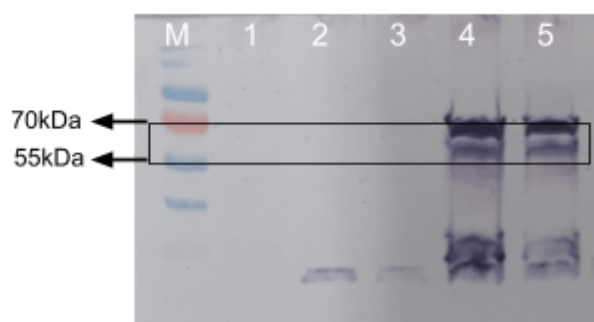


Diferente da clonagem, onde a linhagem de *E. coli* utilizada foi a Top 10, para ensaios de expressão se utilizou a linhagem BL21, que é adequada para essa finalidade, devido a ausência de dois genes de protease (Lon e OmpT) que são capazes de degradar proteínas heterólogas (GOOPAL & KUMAR, 2013). Os clones recombinantes foram submetidos à indução por IPTG e investigados quanto à produção da proteína multiepítipo. Foi feita a indução em uma escala maior a fim de obter maior rendimento da proteína e permitir a purificação da mesma. Nestes ensaios, 1mL da cultura foi aliqotado e o pellet obtido foi ressuspendido a *Laemmli* (2x). O restante da cultura foi utilizado para obtenção do extrato protéico através da lise celular, que foi testada por sonicação e congelamento/descongelamento (protocolo padronizado no grupo de pesquisa). As análises de expressão foram feitas primeiramente por SDS-PAGE com confirmação por WB (Figura 7).

Figura 7: A - SDS-PAGE 12,5% corado com Azul de Coomassie do extrato protéico bruto de células de *E. coli* obtidas de alíquotas de 1mL da indução de maior escala e do lisado (extrato proteico) do restante da cultura. B - Western blot colorimétrico em membrana de PVDF. Ordem para ambas as amostras: M - Marcador de peso molecular pré-corado PageRuler™ (ThermoScientific); 1 - Controle negativo (colônia induzida com vetor pGEX-4T-3 vazio); 2 e 3 - Lisados das colônias induzidas em maior escala contendo o vetor recombinante pGEX_MULTI; 4 e 5 - Extrato de alíquotas celulares induzidas contendo o vetor recombinante pGEX_MULTI e apresentando a construção protéica na região que corresponde ao seu tamanho de 65,73kDa.



A



B

Como observado nas figuras acima, houve a produção das proteínas pela *E. coli* BL21, porém, o processo de lise adotado (congelamento e descongelamento) não permitiu uma boa obtenção da proteína-alvo, o que inviabilizou o processo de purificação. Uma alternativa a isso, se deu por meio da solubilização dos pellets da cultura como descrito por Hurtado-Melgoza (2016) (Figuras 8 e 9), uma vez que as proteínas podem ter ficado retidas em corpos de inclusão, já que em bactérias recombinantes a superexpressão de genes codificados por plasmídeos pode desencadear a transcrição de genes de respostas ao estresse que muitas vezes resulta na agregação da proteína codificada, como esses corpos

(VILAVERDE & MAR CARRIÓ, 2003). Na metodologia empregada para a solubilização foi utilizada a ureia, uma vez que corpos de inclusão, tradicionalmente, são solubilizados com uso de desnaturantes e caotrópicos. No caso, a baixa concentração de ureia utilizada foi vantajosa devido à permissão da extração da proteína recombinante sem a necessidade de uma etapa de redobragem (SINGH et al., 2015).

Figura 8: SDS-PAGE 12,5% corado com Comassie. M - Marcador de peso molecular pré-corado PageRuler™ (ThermoScientific); 1 - Solubilização de pellet resultante do processo de lise de cultura induzida contendo vetor recombinante pGEX_MULTI; 2 e 3 - Extrato de alíquotas celulares das culturas induzidas; 4 - Lisado obtido de cultura induzida contendo o vetor recombinante pGEX_MULTI (sobrenadante); 5 - Solubilização de pellet de cultura sem passar pelo processo de lise anteriormente.

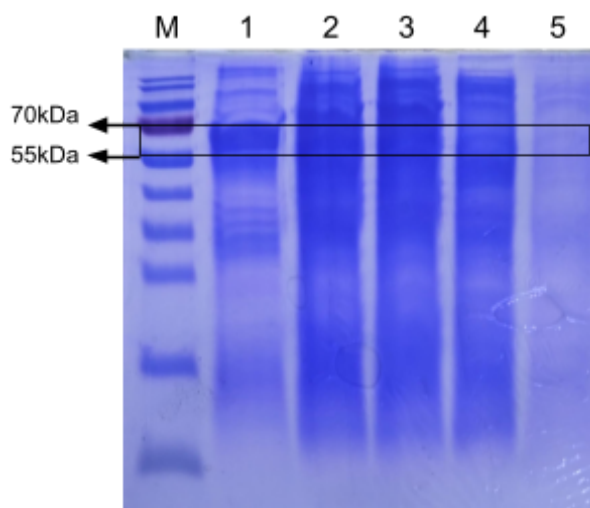
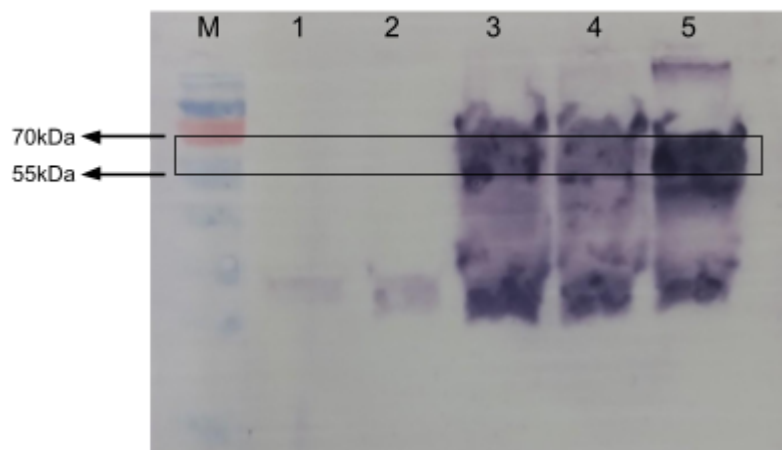


Figura 9: *Western-Blot* em membrana de PVDF; M - Marcador de peso molecular pré-corado PageRuler™ (ThermoScientific) na membrana; 1 - Solubilização de pellet de cultura induzida sem passar pelo processo de lise anteriormente; 2 - Lisado de cultura induzida; 3 e 4 - Extratos de alíquotas celulares induzidas contendo o vetor recombinante; 5 - Solubilização de pellet resultante do processo de lise de cultura induzida contendo vetor recombinante pGEX_MULTI.



Após a obtenção de um extrato protéico considerado satisfatório

com o aumento do volume de cultivo das bactérias recombinantes e a solubilização dos pellets resultantes do processo de lise, foi feita a purificação utilizando resina de níquel, seguindo protocolo do fabricante (Figuras 10 e 11), uma vez que será necessária a proteína purificada para testes imunológicos em estudos posteriores.

Figura 10: SDS-PAGE 12,5% corado com Comassie de purificação da solubilização. M - Marcador de peso molecular pré-corado PageRuler™ (ThermoScientific); 1 - Solubilização de pellet resultante do processo de lise de cultura induzida contendo vetor recombinante pGEX_MULTI ; 2 - Fração não adsorvida da primeira etapa da purificação; 3 e 4 - 1ª, 2ª e 3ª lavagem, respectivamente, da resina de níquel; 5, 6, 7 e 8 - Eluições seriadas da resina de níquel.

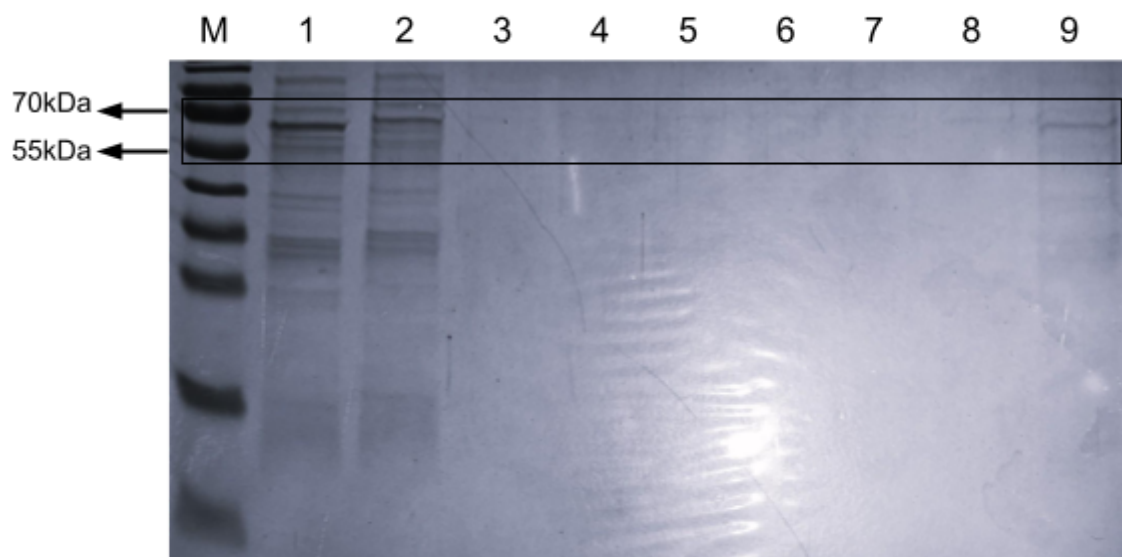
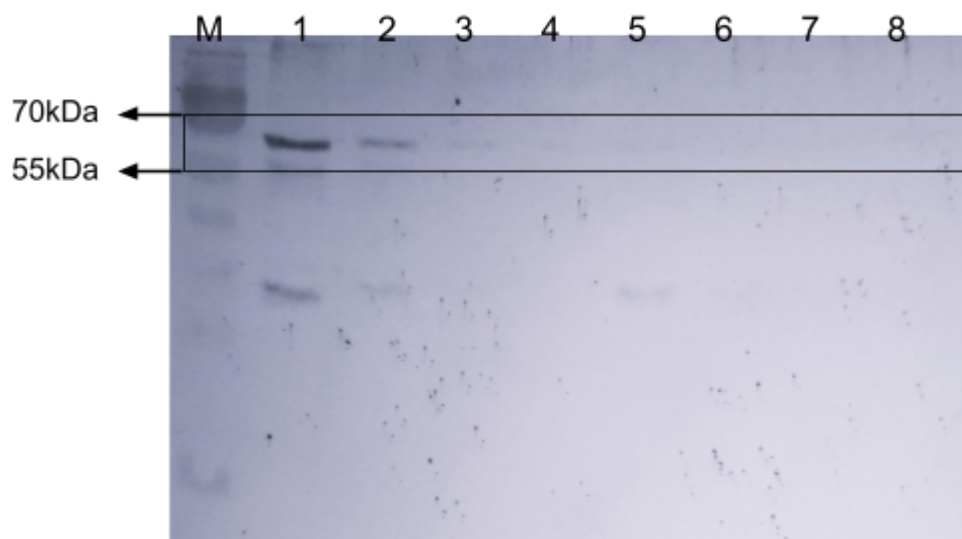


Figura 11: *Western-Blot* em membrana de PVDF. M - Marcador de peso molecular pré-corado PageRuler™ (ThermoScientific); 1 - Fração não adsorvida da primeira etapa da purificação; 2, 3 e 4 - 1ª, 2ª e 3ª lavagem, respectivamente, da resina de níquel; 5, 6, 7 e 8 - Eluições seriadas da resina de níquel.



Como observado, a solubilização permitiu que a purificação fosse

realizada, como é visto nas bandas que representam as lavagens e eluições, no entanto, não foi muito satisfatória, em termos de rendimento, uma vez que parte das proteínas não estão sendo ligadas à resina, como é observada na amostra 1, o que leva à necessidade da otimização da metodologia empregada na purificação.

Algumas das alternativas para melhorar a purificação está no uso da glutationa no lugar da resina de níquel, uma vez que o GST é um marcador de afinidade bem estabelecido com base na sua forte afinidade para a glutationa imobilizada (ZHAO, LI, LIANG, 2013). Outra alternativa também seria modificar algumas proporções, como aumentar a quantidade de resina utilizada, uma vez que foram observadas muitas proteínas não ligadas na primeira etapa da purificação, assim como modificar tempos de incubação que possibilitem um maior tempo de interação entre as proteínas e a resina.

O sistema utilizado para a produção do antígeno, apesar da necessidade de adaptações e outras etapas adicionais, se mostrou viável para a produção da proteína recombinante, uma vez que o objetivo foi alcançado. Esse tipo de trabalho é importante devido a necessidade de se testar novas abordagens vacinais frente à pandemia e avaliar sua capacidade de promover uma resposta imune eficaz.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que a proteína multiepítopo foi produzida satisfatoriamente no sistema de expressão bacteriano, o que permitiu sua detecção imunológica e purificação para posteriores ensaios de imunização.

Faz-se necessária a otimização da metodologia empregada na produção da proteína para que ela possa ser produzida em uma maior escala, uma vez que há falta de estudos avaliando seu potencial imunogênico, estando restrita à avaliação *in silico*. Nesse sentido, o presente trabalho permitiu demonstrar que o sistema de expressão bacteriano em *E. coli* se mostrou capaz de produzir o antígeno de interesse, sendo necessários posteriores estudos para avaliar sua viabilidade como antígeno vacinal.

REFERÊNCIAS

ALEEM, A.; AKBAR SAMAD, A. B.; SLENKER, A. K. Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19). Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

ALIMOHAMMADI, R. et al. SARS-CoV-2 mRNA-vaccine candidate; CORENAPCIN®, induces robust humoral and cellular immunity in mice and non-human primates. **npj Vaccines**, v. 7, n. 1, p. 105, 2 set. 2022.

ANTONELLI, A. C. B. et al. In silico construction of a multiepitope Zika virus vaccine using immunoinformatics tools. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 53, 7 jan. 2022.

ANVISA. Estudos clínicos com vacinas. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas/estudos-clinicos>. Acesso em: 23/10/2022

BAI, C.; ZHONG, Q.; GAO, G. F. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. **Science China Life Sciences**, v. 65, n. 2, p. 280–294, fev. 2022.

BLAKNEY, A. K.; BEKKER, L.-G. DNA vaccines join the fight against COVID-19. **The Lancet**, v. 399, n. 10332, p. 1281–1282, abr. 2022.

BOBAN, M. Novel coronavirus disease (COVID-19) update on epidemiology, pathogenicity, clinical course and treatments. **International Journal of Clinical Practice**, v. 75, n. 4, abr. 2021.

BOECHAT, J. L. et al. The immune response to SARS-CoV-2 and COVID-19 immunopathology – Current perspectives. **Pulmonology**, v. 27, n. 5, p. 423–437, set. 2021.

BUTANTAN. Quais são as diferenças entre as vacinas contra Covid-19 que estão sendo aplicadas no Brasil?. Disponível em: <https://butantan.gov.br/covid/butantan-tira-duvida/tira-duvida-noticias/quais-sao-as-dif>

[erencias-entre-as-vacinas-contra-covid-19-que-estao-sendo-aplicadas-no-brasil.](#)

Acesso em: 23/10/2022

CANCELA, M.; MAGGIOLI, G. Cloning and Heterologous Expression of Protein-Coding Sequences in Escherichia coli. Em: CANCELA, M.; MAGGIOLI, G. (Eds.). **Fasciola hepatica**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US, 2020. v. 2137p. 51–66.

CHAVDA, V. P. et al. Replicating Viral Vector-Based Vaccines for COVID-19: Potential Avenue in Vaccination Arena. **Viruses**, v. 14, n. 4, p. 759, 6 abr. 2022.

CHEN, W.-H. et al. The SARS-CoV-2 Vaccine Pipeline: an Overview. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 7, n. 2, p. 61–64, jun. 2020.

DENG, S. et al. Viral Vector Vaccine Development and Application during the COVID-19 Pandemic. **Microorganisms**, v. 10, n. 7, p. 1450, 18 jul. 2022.

DIPIAZZA, A. T.; GRAHAM, B. S.; RUCKWARDT, T. J. T cell immunity to SARS-CoV-2 following natural infection and vaccination. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 538, p. 211–217, jan. 2021.

DONG, R. et al. Contriving Multi-Epitope Subunit of Vaccine for COVID-19: Immunoinformatics Approaches. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1784, 28 jul. 2020.

FITZGERALD, G. A. et al. Expression of SARS-CoV-2 surface glycoprotein fragment 319–640 in E. coli, and its refolding and purification. **Protein Expression and Purification**, v. 183, p. 105861, jul. 2021.

GARCIA-BELTRAN, W. F. et al. mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant. **Cell**, v. 185, n. 3, p. 457- 466.e4, fev. 2022.

GARCIA-BELTRAN, W. F. et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization

by vaccine-induced humoral immunity. **Cell**, v. 184, n. 9, p. 2372- 2383.e9, abr. 2021.

GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. **The Protein Journal**, v. 32, n. 6, p. 419–425, ago. 2013.

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 12, p. 1100–1115, dez. 2020.

HE, Y. et al. Purification and characterization of the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein from *Escherichia coli*. **Engineering in Life Sciences**, v. 21, n. 6, p. 453–460, jun. 2021.

HEIDARY, M. et al. A Comprehensive Review of the Protein Subunit Vaccines Against COVID-19. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 927306, 14 jul. 2022.

HODGSON, S. H. et al. What defines an efficacious COVID-19 vaccine? A review of the challenges assessing the clinical efficacy of vaccines against SARS-CoV-2. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. e26–e35, fev. 2021.

HU, B.; HUANG, S.; YIN, L. The cytokine storm and COVID-19. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 1, p. 250–256, jan. 2021.

HURTADO-MELGOZA, M. L. et al. Differential humoral and cellular immunity induced by vaccination using plasmid DNA and protein recombinant expressing the NS3 protein of dengue virus type 3. **Journal of Biomedical Science**, v. 23, n. 1, p. 85, dez. 2016.

IZDA, V.; JEFFRIES, M. A.; SAWALHA, A. H. COVID-19: A review of therapeutic strategies and vaccine candidates. **Clinical Immunology**, v. 222, p. 108634, jan. 2021.

JACKSON, C. B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 3–20, jan. 2022.

JAIN, N. et al. Scrutinizing the SARS-CoV-2 protein information for designing an effective vaccine encompassing both the T-cell and B-cell epitopes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 87, p. 104648, jan. 2021.

JIA, B.; JEON, C. O. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. **Open Biology**, v. 6, n. 8, p. 160196, ago. 2016.

JORDAN, S. C. Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: relevance to acquired immunity and vaccine responses. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 204, n. 3, p. 310–320, 13 maio 2021.

JYOTISHA; SINGH, S.; QURESHI, I. A. Multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2 applying immunoinformatics and molecular dynamics simulation approaches. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 7, p. 2917–2933, 3 maio 2022.

KADAM, S. B. et al. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 180–202, mar. 2021.

KARIM, S. S. A.; KARIM, Q. A. Omicron SARS-CoV-2 variant: a new chapter in the COVID-19 pandemic. **The Lancet**, v. 398, n. 10317, p. 2126–2128, dez. 2021.

KHAN, MD. T. et al. Immunoinformatics and molecular modeling approach to design universal multi-epitope vaccine for SARS-CoV-2. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 24, p. 100578, 2021.

KHOBRADE, A. et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of the DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): the interim efficacy results of a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study in India. **The Lancet**, v. 399, n. 10332, p. 1313–1321, abr. 2022.

KIRTIPAL, N.; BHARADWAJ, S.; KANG, S. G. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, p. 104502, nov. 2020.

KONDO, T.; YUMURA, S. Strategies for enhancing gene expression in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 9, p. 3825–3834, maio 2020.

KYRIAKIDIS, N. C. et al. SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates. **npj Vaccines**, v. 6, n. 1, p. 28, dez. 2021.

LI, M. et al. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 146, dez. 2022.

LIU, Q. et al. Effectiveness and safety of SARS-CoV-2 vaccine in real-world studies: a systematic review and meta-analysis. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 10, n. 1, p. 132, dez. 2021.

MALIK, J. A. et al. The SARS-CoV-2 mutations versus vaccine effectiveness: New opportunities to new challenges. **Journal of Infection and Public Health**, v. 15, n. 2, p. 228–240, fev. 2022.

MISTRY, P. et al. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 809244, 3 jan. 2022.

MURALIDAR, S. et al. The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. **Biochimie**, v. 179, p. 85–100, dez. 2020.

NAQVI, A. A. T. et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 10, p. 165878,

out. 2020.

NEGAHDARIPOUR, M. et al. Harnessing self-assembled peptide nanoparticles in epitope vaccine design. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 5, p. 575–596, set. 2017.

NEGAHDARIPOUR, M. et al. Structural vaccinology considerations for in silico designing of a multi-epitope vaccine. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 58, p. 96–109, mar. 2018.

NEZAFAT, N. et al. A novel multi-epitope peptide vaccine against cancer: An in silico approach. **Journal of Theoretical Biology**, v. 349, p. 121–134, maio 2014.

NOORAEI, S. et al. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 59, dez. 2021.

PANDEY, S. C. et al. Vaccination strategies to combat novel corona virus SARS-CoV-2. **Life Sciences**, v. 256, p. 117956, set. 2020.

PHAN, T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 81, p. 104260, jul. 2020.

PRADO, T. et al. Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-CoV-2 and support public health policies at municipal level in Brazil. **Water Research**, v. 191, p. 116810, mar. 2021.

PRATES-SYED, W. A. et al. VLP-Based COVID-19 Vaccines: An Adaptable Technology against the Threat of New Variants. **Vaccines**, v. 9, n. 12, p. 1409, 30 nov. 2021.

RAHBAR, Z. et al. Recombinant expression of SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD) in Escherichia coli and its immunogenicity in mice. **Iranian Journal of Basic**

Medical Sciences, v. 25, n. 9, p. 1110–1116, set. 2022.

RAHIMI, A.; MIRZAZADEH, A.; TAVAKOLPOUR, S. Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection. **Genomics**, v. 113, n. 1, p. 1221–1232, jan. 2021.

RASKIN, S. Genetics of COVID-19. **Jornal de Pediatria**, v. 97, n. 4, p. 378–386, jul. 2021.

RÖLTGEN, K.; BOYD, S. D. Antibody and B cell responses to SARS-CoV-2 infection and vaccination. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 7, p. 1063–1075, jul. 2021.

SETTE, A.; CROTTY, S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. **Cell**, v. 184, n. 4, p. 861–880, fev. 2021.

SETTE, A.; CROTTY, S. Immunological memory to SARS-CoV -2 infection and COVID -19 vaccines. **Immunological Reviews**, v. 310, n. 1, p. 27–46, set. 2022.

SILVEIRA, M. M.; MOREIRA, G. M. S. G.; MENDONÇA, M. DNA vaccines against COVID-19: Perspectives and challenges. **Life Sciences**, v. 267, p. 118919, fev. 2021.

SINGH, A. et al. Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 41, dez. 2015.

SINGH, D.; YI, S. V. On the origin and evolution of SARS-CoV-2. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 53, n. 4, p. 537–547, abr. 2021.

SKWARCZYNSKI, M.; TOTH, I. Peptide-based synthetic vaccines. **Chemical Science**, v. 7, n. 2, p. 842–854, 2016.

TAO, K. et al. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. **Nature Reviews Genetics**, v. 22, n. 12, p. 757–773, dez. 2021.

TROUGAKOS, I. P. et al. Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications. **Journal of Biomedical Science**, v. 28, n. 1, p. 9, dez. 2021.

VILLAVERDE, A.; MAR CARRIÓ, M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 17, p. 1385–1395, 2003.

WOLDEMESKEL, B. A.; GARLISS, C. C.; BLANKSON, J. N. SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce broad CD4⁺ T cell responses that recognize SARS-CoV-2 variants and HCoV-NL63. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 10, p. e149335, 17 maio 2021.

WOLF, J. M. et al. Temporal spread and evolution of SARS-CoV-2 in the second pandemic wave in Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 3, p. 926–936, mar. 2022.

WU, Y.-J.; FAN, C.-Y.; LI, Y.-K. Protein purification involving a unique auto-cleavage feature of a repeated EAAAK peptide. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 31, p. 4015–4021, dez. 2009.

YAN, W. et al. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 26, 27 jan. 2022.

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

YESUDHAS, D.; SRIVASTAVA, A.; GROMIHA, M. M. COVID-19 outbreak: history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics. **Infection**, v. 49, n. 2, p. 199–213, abr. 2021.

YONG, C. Y. et al. Development of virus-like particles-based vaccines against coronaviruses. **Biotechnology Progress**, 19 ago. 2022.

ZHANG, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, W. SARS-CoV-2 variants, immune escape, and countermeasures. **Frontiers of Medicine**, v. 16, n. 2, p. 196–207, abr. 2022.

ZHAO, X.; LI, G.; LIANG, S. Several Affinity Tags Commonly Used in Chromatographic Purification. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

ZHENG, C. et al. Real-world effectiveness of COVID-19 vaccines: a literature review and meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 114, p. 252–260, jan. 2022.