

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE MEDICINA

GABRIEL CORRÊA QUITETE SCHALLER CHAGAS

MAPEAMENTO DOS EPÍTOPOS LINEARES DE ANTICORPOS NA COVID-19

Rio de Janeiro

2025

GABRIEL CORRÊA QUITETE SCHALLER CHAGAS

**MAPEAMENTO DOS EPÍTOPOS LINEARES DE ANTICORPOS NA INFECÇÃO
DE COVID-19**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade Federal do Rio
de Janeiro, como requisito para obtenção
do título de Mestre em Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Morrot Lima

Rio de Janeiro

2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo a Deus, aquele que me deu fôlego de vida e deu forças para completar esse trabalho, devo tudo o que tenho e o que sou a Ele.

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe Flávia, ao meu padrasto Marcio, meu irmão Guilherme ,minha irmã Bárbara e meu pai Antônio, que nos momentos de maiores dificuldades sempre estiveram presentes me apoiando, me amando e sendo como um lugar seguro.

Agradeço à minha namorada, melhor amiga e parceira de todas as horas, Tainá, que sempre orou por mim, me deu forças, me estimulou e tem sido um presente na minha vida.

Agradeço à minha madrinha Marlice e ao meu tio Wilson, que sempre me apoiaram, me incentivaram e foram muito amorosos comigo.

Agradeço aos meus finados avô Volgan e à minha avó Dima, que em todo os momentos que tivemos juntos me deram todo amor, cuidado, ensinamentos e incentivo a buscar sempre ser alguém melhor e mais inteligente.

Agradeço ao meu orientador Profa. Dr. Alexandre Morrot Lima, por ter aberto as portas do grupo de pesquisa, ter acreditado e investido em mim e por todos os ensinamentos.

Às agências de fomento CNPQ, FAPERJ e CAPES por proporcionar a construção de todo esse trabalho e por ter me concedido a bolsa de mestrado.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), localizado no Pavilhão 26-Leonidas Deane da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sob a orientação do Prof. Dr. Alexandre Morrot Lima

RESUMO

A pandemia de COVID-19, que começou no início de 2020, ressaltou não apenas a importância do rápido desenvolvimento de vacinas, mas também as profundas desigualdades no acesso a vacinas em todo o mundo. Enquanto países de alta renda alcançaram ampla cobertura vacinal, muitas nações de baixa renda continuam lutando com disponibilidade limitada. Em busca de soluções mais acessíveis, nosso grupo explorou o potencial de vacinas baseadas em peptídeos, conhecidas por seu menor custo e facilidade de produção. Analisamos amostras de soro de pacientes hospitalizados com COVID-19 com desfechos clínicos distintos para identificar epítomos-chave da proteína spike do SARS-CoV-2. Um paciente que se recuperou (COV690) apresentou uma forte resposta de anticorpos, particularmente visando o domínio de ligação ao receptor, enquanto um paciente com doença grave que posteriormente morreu (COV841) apresentou reatividade mínima. Com base nesses dados, projetamos um peptídeo sintético contendo os epítomos mais frequentemente reconhecidos. Embora os ensaios de ELISA não tenham produzido resultados conclusivos, nossa análise de microarray e modelagem estrutural sugerem que esses epítomos estão localizados em regiões cruciais da proteína spike envolvida na entrada viral. Essas descobertas apontam para o potencial das vacinas baseadas em peptídeos para provocar uma resposta imunológica significativa e oferecer um caminho promissor e mais equitativo, especialmente em cenários onde o acesso a tecnologias complexas de vacinas continua limitado.

Palavras-chave: COVID-19, Coronavírus, Vacina, SARS-CoV-2

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic, which began in early 2020, underscored not only the importance of rapid vaccine development but also the deep inequalities in vaccine access across the globe. While high-income countries achieved broad immunization coverage, many low-income nations continue to struggle with limited availability. In search of more accessible solutions, our group explored the potential of peptide-based vaccines, known for their lower cost and ease of production. We analyzed serum samples from hospitalized COVID-19 patients with distinct clinical outcomes to identify key epitopes from the SARS-CoV-2 spike protein. One patient who recovered (COV690) showed a strong antibody response, particularly targeting the receptor-binding domain, whereas a patient with severe disease who later died (COV841) displayed minimal reactivity. Based on this data, we designed a synthetic peptide containing the most frequently recognized epitopes. Although ELISA assays did not yield conclusive results, our microarray analysis and structural modeling suggest that these epitopes are located in crucial regions of the spike protein involved in viral entry. These findings point to the potential of peptide-based vaccines to elicit a meaningful immune response and offer a promising, more equitable path forward—especially in settings where access to complex vaccine technologies remains limited.

Keywords: COVID-19, Coronavirus, Vaccine, SARS-CoV-2

LISTA DE FIGURAS E TABELA

FIGURA 1. Genoma dos últimos três coronavírus responsáveis por emergências de saúde pública em humanos.	18
FIGURA 2. Como funcionam as vacinas de RNA mensageiro.	21
FIGURA 3. Mecanismo de ação da vacina AstraZeneca/Oxford.	22
FIGURA 4. Distribuição da cobertura vacinal contra a COVID-19 no Brasil.	25
FIGURA 5. Desigualdade na cobertura vacinal contra a COVID-19 nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro.	26
FIGURA 6. Esquema do funcionamento do ensaio de microarranjo.	32
FIGURA 7. Anticorpos liberados em amostras de soro.	37
FIGURA 8. Amostras selecionadas para o Pan-Corona Spike Protein Microarray.	37
FIGURA 9. Modelagem Molecular da proteína Spike de SARS-CoV-2.	40
FIGURA 10. Teste de diluições de peptídeos com pool de amostras de soro.	42
TABELA 1. Amostras de soros de pacientes acometidos por COVID-19	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SARS-CoV-2	-coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave
ORF	- Origem de replicação
COVID-19	– Doença causada por coronavírus 2019
OMS	– Organização Mundial de Saúde
ONU	– Organização das Nações Unidas
SARS-CoV	- Coronavírus causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave
MERS-CoV	- Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MERS	- Síndrome Respiratória do Oriente Médio
FMI	-Fundo Monetário Internacional
PIB	- Produto Interno Bruto
IPEA	-Instituto de Pesquisas Econômicas e Aplicada
UNESP	-Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
PNAD	- Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios
TMPRSS2	-Protease Serina Transmembranar 2
DNA	-Ácido Desoxirribonucleico
PNUD	-Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
IDH	-Índice de Desenvolvimento Humano
CDC	- vírus Semliki Forest
SUS	-Sistema Único de Saúde
HCoV-OC43	-Coronavírus humano OC43
HCoV-HKU1	- Coronavírus humano HKU1
HCoV-NL63	- Coronavírus humano NL63
HCoV-229E	-Coronavírus humano 229E
ELISA	-Ensaio de Imunoabsorbância ligada a enzima
RBD	-Domínio de Ligação ao Receptor

ACE-2	-Enzima conversora da angiotensina 2
ELISA	-ensaio de imunabsorbância ligada a enzima

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	12
2.CONSEQUÊNCIAS	13
2.1 Crise sanitária sem precedentes: uma guerra vivida pelas gerações atuais	13
2.2 Crise econômica	15
3. O VÍRUS	16
4. VACINAS	18
4.1.A esperança do retorno à vida normal	18
4.2.A face social da vacinação: relação entre desigualdades social e vacinal	22
4.3.Vacina baseada em peptídeos: uma alternativa econômica e eficiente	27
5. OBJETIVO	25
6. METODOLOGIA	29
6.1.Aprovação pelo CEP/CONEP	29
6.2.ELISA	29
6.3.Microarray	31
6.4.Peptídeo com epítomos da proteína S	33
6.5.Modelagem Molecular	33
	10

7. AS AMOSTRAS	34
8. RESULTADOS	36
8.1.ELISA para seleção de amostras mais promissoras	36
8.2.Microarray com amostras selecionadas	37
8.3.Modelagem molecular da proteína Spike de SARS-CoV-2	39
8.4.Microarray com amostras selecionadas	41
9. DISCUSSÃO	42
10. CONCLUSÃO	45
11.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, na cidade chinesa de Wuhan, indivíduos ligados a um mercado de frutos do mar, começaram a apresentar sintomas respiratórios semelhantes a uma pneumonia, o que em seguida alastrou-se pela província de Hubei e logo por toda a China (*Centers for Disease Control and Prevention, 2024*).

Posteriormente, no último dia do mesmo ano, a OMS é informada pelas autoridades chinesas de inúmeros casos da doença, ainda sem etiologia conhecida. Pouco tempo depois, é descoberto que era transmitida por um novo Coronavírus, o SARS COV-2, sendo batizada de COVID-19, uma sigla indicando ser uma doença causada por Coronavírus (*Centers for Disease Control and Prevention, 2024*). Foi apenas o início de uma emergência de saúde que, somente em Março de 2020, foi declarada uma pandemia pela OMS. Espalhou-se por todos os continentes e desde o início até janeiro de 2025, registrou mais de 777 milhões de pessoas foram infectadas, com quase 7 milhões de mortos e cerca de 95% dos infectados recuperados, segundo dados do Dashboard COVID-19 da Organização Mundial da Saúde. No Brasil, o mesmo painel de monitoramento das Nações Unidas mostra um número de total de mais de 37,5 milhões de casos e pouco mais de 702 mil óbitos no mesmo período (*Centers for Disease Control and Prevention, 2024; World Health Organization Data, 2025*).

As primeiras recomendações indicadas pelas autoridades de saúde foram o uso de máscara, constante higienização de mãos e distanciamento social. Com isso, nos primeiros meses de 2020 grande parte dos países decretaram lockdown, impondo a trabalhadores e estudantes terem suas atividades realizadas de maneira remota e priorizar o mínimo de contato possível com pessoas de fora da própria

residência (*World Health Organization Data,2020*). Todo esse contexto, colocou todo o globo não apenas na maior crise de saúde das últimas décadas,mas isso também carregou negativos efeitos na economia mundial, no aprendizado e nas dinâmicas e relações de trabalho. O que poderia ser resumido de forma simplista a um problema sanitário, mostrou-se na verdade como uma emergência de razão sanitária,mas que apresentou consequências em diversos aspectos da vida humana (*World Health Organization Data,2025;World Health Organization Data,2020*).

Voltar ao estágio de vida considerado normal, sem necessidade de confinamento e com a mesma interação social e rotinas de trabalho e lazer de outrora,era um anseio universal. Para que isso fosse possível, não bastava somente buscar formas de tratar e recuperar os infectados, mas a solução passava pela imunização em massa. Desde o início dos primeiros casos até a primeira pessoa vacinada passou-se um ano.Tempo bastante curto e singular, visto que grande parte das vacinas levam cerca de uma década para desenvolvimento. Toda essa rapidez foi fundamental para que o número de casos e principalmente de óbitos fosse diminuído e pouco a pouco a situação atingisse a normalidade. Dentre as principais razões que explicam o rápido desenvolvimento da vacina, está a semelhança genética do SARS Cov-2 com outros dois coronavírus causadores de epidemias recentes no início dos anos 2000 e 2010, SARS COV e MERS, respectivamente. Como consequência havia uma base sólida de estudos a respeito desses vírus em busca de produção de vacinas,terapias e entendimento a respeito de como a infecção de ambos ocorre, então com surgimento do causador da COVID-19 foi possível adaptar e aplicar tais conhecimentos na busca por alvos imunogênicos e posteriormente vacinas. Dessa maneira, a humanidade pôde celebrar e assistir a produção e disponibilidade mais rápida de imunizantes da história até então, permitindo então a partir daí o vislumbrar um modo de viver o qual máscaras e demais medidas de prevenção tivessem prazo de validade (*World Health Organization Data,2025;World Health Organization Data,2020;Brown et al,2022*).

2 CONSEQUÊNCIAS

2.1 Crise sanitária sem precedentes:uma guerra vivida pelas gerações atuais

O espalhamento da COVID-19 mundo afora provocou não somente mudanças sociais, mas exigiu que os sistemas de saúde dos países se estruturassem para receber um número enorme e inesperado de indivíduos necessitando de testagem, atendimento e em último caso internação. Tal qual eventos climáticos catastróficos, a pandemia da SARS COV-2 gerou uma demanda de serviços médico-hospitalares imprevista e acima da capacidade planejada pelas autoridades nacionais de grande parte dos países (Arsenault *et al*,2022;Silva *et al*,2021).

Cerca de um ano após o início dos primeiros casos da doença em território nacional, o Brasil se encontrava na situação mais crítica desde então. Cerca de 24 estados e o distrito federal apresentam taxa de ocupação de UTI para COVID-19 acima de 80%, sendo 15 deles acima de 90%. Não somente a baixíssima quantidade de leitos de terapia intensiva disponível, mas também a elevada disseminação e reprodução virais explicam a calamidade vivida à época pela saúde brasileira. Além disso, uma nota técnica do projeto Monitora Covid-19, da Fiocruz, mostrou que de março de 2020 até o segundo semestre de 2021 houve uma diminuição de quase 10% no número de internações pelo país (Nogueira *et al*,2023). Além disso, houveram reduções de pouco mais de 37% dentre os internados por conta de problemas respiratórios e de cerca de 29% dentre os que deram entrada em decorrência de doenças no aparelho digestivo.No mesmo período também, a realização de cirurgias foi 53% menor. Outro fato que vai ao encontro desses dados, é que os picos de morte ocasionados pela COVID-19 são coincidentes com aumento de óbitos causados por outras razões. Tudo isso somente reforça a situação calamitosa vivida pelo sistema de saúde brasileiro nesse período (Arsenault *et al*,2022;Silva *et al*,2021).

Não olhando apenas para números, foi possível observar o caos dos números traduzido na vida das pessoas. Em janeiro de 2021,o estado do Amazonas teve seus piores momentos desde que a pandemia começou (Arsenault *et al*,2022;Silva *et al*,2021). O aparecimento de uma nova variante viral e o afrouxamento popular com as medidas de proteção fizeram com que o vírus aumentasse bastante sua circulação.Issso levou rapidamente a um aumento na ocupação de leitos e ,consequentemente,elevação na demanda por oxigênio para esses pacientes, que comparado aos primeiros meses de 2020 aumentou 160% (Sott *et al*,2022). A demanda foi tamanha que superou a capacidade de produção de

uma das principais fornecedoras, causando a transferência de cerca de 500 pacientes para outros estados e a morte de 60 pessoas na espera. Outro dado alarmante foi o fato de que o número de mortos pela doença na capital amazonense foi cerca de 28% maior nos primeiros 14 dias de 2021 comparado ao período de abril a dezembro do ano anterior. Em outras partes do país, o quadro também era devastador, no estado de São Paulo ao menos 135 pessoas morreram esperando um leito de UTI até março; no mesmo período, no Paraná 500 pessoas tiveram sua vida interrompida pelo mesmo motivo. Além disso, nos primeiros 3 meses de 2021, o número de óbitos foi tão grande que funerárias tiveram dificuldade na produção de caixões por falta de insumos, além disso decretaram interrupção de férias de funcionários. Conseqüentemente, cartórios no Rio Grande do Sul, passaram a operar em horário estendido devido a formação de filas para registro de óbitos (Silva *et al*, 2021; De Foo *et al*, 2023; Medeiros *et al*, BRASIL, 2021).

2.2 Crise Econômica

A saída do então vírus misterioso da província chinesa de Wuhan e, posteriormente, da própria China provocou impactos que não se limitam à saúde. Todo o cenário envolvendo os problemas sanitários repercutiu de forma acentuada nos dados econômicos mundiais. Segundo o Fundo Monetário Internacional (FMI), o Produto Interno Bruto (PIB) global encolheu 3,9% em 2020 quando comparado ao ano anterior, o que os fez considerar a maior crise financeira desde a grande depressão em 1929 (KFF, 2022). Segundo dados do Instituto de Pesquisas Econômicas e Aplicada (IPEA), no primeiro semestre de 2020, no Brasil mais de 700 mil empresas, sendo mais de 99% delas de pequeno porte, encerraram suas atividades (Hatmal *et al*, 2020). Além disso, segundo dados do Jornal da UNESP, somente no setor de serviços, que corresponde a 68% do PIB brasileiro, teve baixa de mais de 1 milhão de postos de trabalho (Silva, S. *et al*, 2023), como consequência disso, dados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua (PNAD Contínua) de 2021, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostram que o país registrou cerca de 15 milhões de desempregados e 6 milhões de desalentados, ou seja indivíduos desempregados que desistiram de procurar emprego. Com todo esse cenário, houve aumento do trabalho informal,

avanço da dívida pública e desaceleração do crescimento econômico brasileiro (KFF,2022;Nogueira *et al*,2023).

Como notória expressão da recessão causada pela pandemia, cerca de 47 milhões de brasileiros terminaram o ano de 2021 na pobreza, destes mais de 10 milhões de pessoas ficaram abaixo da linha da pobreza, utilizando-se como referência a linha de corte do Banco Mundial (renda diária de US\$1,90) (Pormohammad *et al*,2020). Outro dado que corrobora com isso foi mostrado em pesquisa da Fundação Getúlio Vargas (FGV Social), foi visto que o índice de Gini brasileiro aumentou, trata-se de uma métrica usada para medir concentração de renda que varia 0 a 1,sendo quanto mais próximo do limite máximo maior concentração de renda há (Nogueira *et al*,2023). Um complemento a essa informação, foi que em 2021 o Brasil aumentou a quantidade de indivíduos na pobreza saindo de 1,8 para 4,7 pontos percentuais, o maior aumento desde 1990. Em estudo realizado pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS), foi visto que o hiato da pobreza aumentou considerando-se o período entre 2019 e 2021, esse conceito representa a distância entre a renda de indivíduos pobres e outros que estão abaixo da linha de pobreza, ou seja, isso significa que a situação econômica dessas pessoas se agravou, fazendo com que ficassem ainda mais pobres (VIRALZONE,sem data). Em consonância a isso, dados revelam que mais de 30 milhões de indivíduos estão em insegurança alimentar. Além disso, em decorrência de perdas econômicas, dados do Sindicato das Entidades Mantenedoras de Estabelecimentos de Ensino Superior no Estado de São Paulo (SEMESP) mostram que houve aumento de evasão nas universidades privadas tanto em cursos presenciais quanto à distância. Tudo isso, demonstra que toda a crise sanitária global levou impôs à nação brasileira impactos sociais, prejudicando índices econômicos já decadentes e reverberando na renda e qualidade de vida das famílias, sobretudo as menos favorecidas (Sott *et al*,2022;Silva,G. *et al*,2023;Ribeiro *et al*,2020).

3. O VÍRUS

A doença COVID-19 tem como agente etiológico, o SARS Cov-2, vírus de RNA de fita simples senso positivo, pertencente à classe dos Nidovírus,à família dos Coronavírus, à subfamília dos Coronavírus e ao gênero dos betacoronavírus. A

subfamília dos Coronavírus divide-se em quatro gêneros: alphacoronavirus, betacoronavirus, deltacoronavirus e gamacoronavirus, apenas os dois primeiros são capazes de infectar humanos. O novo coronavírus, como inicialmente também ficou conhecido, é um vírus envelopado, esférico, com aproximadamente 120 nanômetros de diâmetro. É classificado como um vírus de RNA fita simples senso positivo, com tamanho de aproximadamente 30 kilobases. Seu o vírion RNA é infeccioso e funciona como mensageiro. Seu genoma codifica 13 origens de replicação (ORF- do inglês *open read frame*). A tradução do seu material genético se dá duas formas, uma primária, na qual uma poliproteína não estrutural é traduzida a partir de ORF1a e ORF1b, as quais originam as poliproteínas 1a e 1b, que atuam como replicases dependentes de RNA. E a outra é a partir de RNAs sub genômicos (sgRNA), que codificam proteínas estruturais. Os sgRNA são criados a partir de descontinuidades na tradução nas sequências reguladoras de tradução, fazendo com que ocorram saltos para regiões, originando assim diversos sgRNAs distintos (Hatmal *et al*,2020;VIRALZONE,sem data).

A entrada do vírus nas células se dá através da interação com o receptor Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE-2, do inglês *Angiotensin-converting enzyme 2*). Após o ancoramento no receptor, a entrada pode se dar por endocitose ou por fusão com a membrana celular, no último caso é requerida uma clivagem mediada pela Protease Serina Transmembranar 2 (TMPRSS2, do inglês *Transmembrane protease serine 2*). Após a entrada, o RNA é liberado no citoplasma, a poliproteína replicase é sintetizada e a replicação é realizada nas fábricas virais. Seu genoma de RNA fita simples dá origem a RNA de dupla fita, que é transcrito e replicado, codificando as proteínas virais. A montagem e o brotamento é feito nas membranas do retículo endoplasmático, processado no Golgi e novos vírus são liberados por exocitose (Hatmal *et al*,2020;VIRALZONE,sem data).

O SARS Cov-2 guarda muitas semelhanças com coronavírus que causaram epidemias recentes em humanos, o SARS-CoV em 2003 e o MERS-CoV em 2012. O novo coronavírus compartilha cerca de 80% de sequências similares no genoma inteiro com o SARS-Cov, e, aproximadamente, 50% com MERS-CoV (Pormohammad *et al*,2020). A proteína *spike* ocupa um papel central na interação com receptores celulares para os três vírus citados, sendo ela integrante de um grupo de proteínas bastante conservadas no genoma dos coronavírus, conforme é visto na Figura 1 abaixo (Hatmal *et al*,2020).

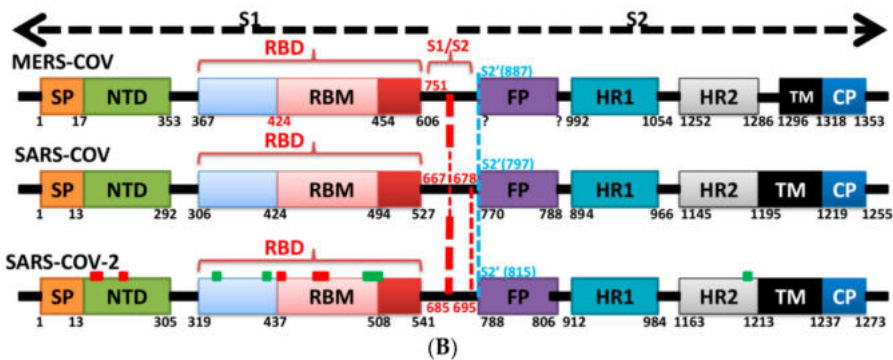
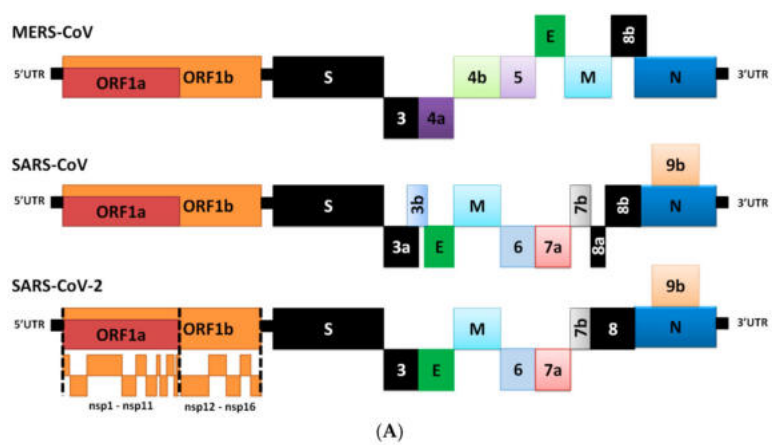


Figura 1. Genoma dos últimos três coronavírus responsáveis por emergências de saúde pública em humanos.

(a) Genoma comparado do MERS-CoV, SARS-CoV e SARS-CoV-2. Estruturas bastante conservadas como a proteína *Spike*, proteína do nucleocapsídeo e proteínas não estruturais. (b) Estrutura da proteína *Spike* dos três vírus. Regiões altamente conservadas como o RBD (receptor-binding domain- domínio de ligação ao receptor em tradução livre), além da região de clivagem S1-S2 e outros domínios essenciais para os vírus. *Hatmal et al, 2020*

Além disso, sintomas semelhantes à gripe como febre, mal estar, dor no corpo e dificuldade de respirar são comuns às três doenças. Por outro lado, os surtos de SARS em 2003 e de MERS em 2012, uma letalidade maior, visto que de 2002 a 2003 o surto de SARS iniciado na China e que se espalhou para outros países infectou cerca de 8000 pessoas e causou a morte de 800; além disso o surto de MERS originado em 2012 na Arábia Saudita e que conta com casos isolados e controlados até os dias atuais, registrou até maio de 2024 mais de 2600 casos e cerca de 940 mortes (Caldas *et al*, 2024). Por outro, desde os primeiros casos no fim de 2019 até janeiro de 2025, a COVID-19 teve mais de 770 milhões de infectados e mais de 7 milhões de vítimas fatais (World Health Organization Data, 2025; Hatmal *et al*, 2020; VIRALZONE, sem data; Pormohammad *et al*, 2020).

4. VACINAS

4.1 A esperança do retorno à vida normal

Desde o século XVII, médicos chineses, notadamente Lu, praticavam um método de imunização conhecido como variolização, que consistia em expor

indivíduos não infectados a amostras de pacientes infectados, podendo ser através de inalação de crostas em pó, aplicação de pus fresco nas narinas ou uso de roupas anteriormente vestidas por infectados. Ainda que muitas vezes, produzisse efeito oposto ao esperado, levando a morte ou quadros graves da doença, foi reportada eficácia. No mesmo período, na Índia, profissionais de saúde desenvolveram um método de “variolização” diferente, inoculando material contaminado com o agente etiológico de forma cutânea, apresentando bons resultados com riscos diminuídos se comparada à maneira chinesa e se espalhando pelo oriente à época. Cerca de um século posterior, Lady Mary Wortley Montague, a esposa do embaixador britânico no Império Otomano, após ter acesso a esse conceito e sofrer da doença e temendo que sua filha passasse pela mesma situação, o utilizou em sua filha para prevenir e obteve sucesso, o que ajudou a disseminar isso pela Europa (Lu et al,1965;Lombard et al,2007;Leung et al,2011).

Anos mais tarde, um médico inglês, Edward Jenner, resolveu testar o efeito da inoculação de amostras de vírus de varíola bovina em um menino de 8 anos, a despeito de todas as implicações éticas, representou um avanço não apenas na saúde pública em si,mas para a ciência. Inicialmente rechaçada, a inovação trazida pelo achado de Jenner começa a ser aceita. No século XIX, Pasteur debruça-se sobre o legado do médico para tentar entender o que poderia explicar a proteção conferida no método de Jenner e durante seus estudos, consegue desenvolver importantes contribuições como imunizantes para Cólera aviária e o Antrax (Cavaillon et al,2019;Rupprecht et al, 2002; Smith et al,2012;Pasteur;1881).

Indiferentemente ao recorte histórico e ao tipo, as vacinas são capazes de conferir proteção aos indivíduos através de estímulos ao sistema imune. Ao inocular partes do patógeno ou o patógeno atenuado ou partículas no organismo, há reconhecimento disso pelo sistema imune inato como um corpo estranho, logo um antígeno. A partir disso, células de defesa como macrófagos e outras atuam englobando a partícula invasora e expondo partes da mesma na própria superfície, em um mecanismo conhecido como apresentação de antígeno. Uma vez que partes do antígeno capturado são expostas, linfócitos T CD4 são recrutados e ativam linfócitos B,que se diferenciam em plasmócitos e atuam sintetizando anticorpos, que se ligam e neutralizam o antígeno, e linfócitos T CD8,que irão agir para eliminar o antígeno e impedir o seu avanço.Após todo esse processo, uma parte das células B e T permanecem em circulação de modo a promover uma espécie de “vigilância”

para estar preparado para um possível novo aparecimento do antígeno, sendo conhecidas como células de memória, que podem durar por décadas e caracteriza a proteção duradoura e preventiva das vacinas (Hato *et al*, 2025;Hoffman *et al*,2016;Benne *et al*,2016;Radbruch *et al*,2006;Ahmed *et al*,1996; Sarkander *et al*, 2016; Pollard *et al*,2021). Na história humana, desde a primeira vacina desenvolvida por Jenner,contra a varíola, no século XVII até os dias atuais, as vacinas ocupam um papel fundamental no controle de epidemias e na erradicação de muitas doenças. A cada episódio de surtos de viroses e demais doenças infecciosas, é ratificado o papel protetivo não apenas individual,mas coletivo dos imunizantes. Dessa forma, é notória a importância e o quão determinante foi o início da vacinação para o controle e fim da pandemia de COVID-19 que assolou o mundo.Ainda que a imagem de uma idosa do Reino Unido recebendo uma dose da vacina da Pfizer não significasse em termos absolutos o fim das restrições e grande número de mortos,a notícia da primeira pessoa vacinada contra a COVID-19 simbolizou o início da retomada da vida normal ao redor do mundo. A partir disso, nos meses subsequentes mais e mais países iniciaram seus esquemas de vacinação contra a doença e uma queda no número de mortos e de internações foi vista e celebrada mundialmente, reforçando a segurança e a eficácia dos diferentes tipos imunizantes adotados.Dentre os mais difundidos globalmente, estão a vacina produzida pela farmacêutica estadunidense Pfizer em parceria com a BioNTECH, a produzida pela empresa também norte-americana Moderna e a produzida pela Astrazeneca em parceria com a universidade de Oxford. As duas primeiras são vacinas baseadas na tecnologia RNA mensageiro(mRNA), e seu mecanismo de ação se baseia na inoculação de RNA mensageiro contendo sequência gênica da proteína spike do SARS COV-2. Uma vez introduzido nas células musculares pela vacinação, a maquinaria celular irá sintetizar a proteína viral,posteriormente a célula exibe a proteína na superfície celular. Com isso, as células imunes detectam a spike como proteína externa e passa a produzir uma resposta imunitária contra, levando a síntese de anticorpos específicos e a memória imunológica. Isso pode ser visto resumidamente no esquema da figura 2 abaixo (*World Health Organization Data*,2025;VIRALZONE,sem data;He *et al*,2020).

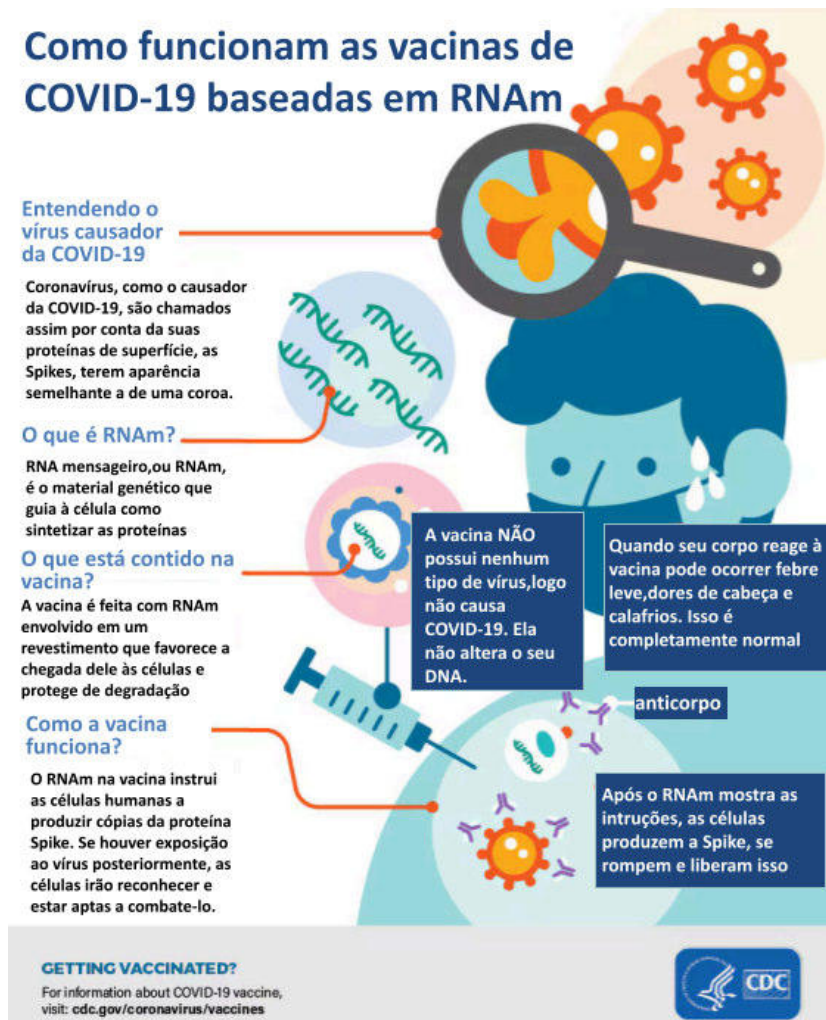


Figura 2. Como funcionam as vacinas de RNA mensageiro.

Esquema desenvolvido pelo Center of Disease Control, órgão de saúde dos Estados Unidos responsável por monitoramento de doenças, que sintetiza e resume as principais etapas do funcionamento das vacinas baseadas na tecnologia de RNA mensageiro. **Adaptado de COVID-19 Vaccine Basics. Disponível em <https://www.cdc.gov/covid/vaccines/how-they-work.html>**

Diferente das vacinas de mRNA, a vacina feita pela Astrazeneca usa a tecnologia de vetores virais. Um DNA de dupla fita contendo genes que codificam a proteína spike do SARS CoV-2 é inserido em um adenovírus modificado geneticamente para não se replicar. Uma vez que o adenovírus é inoculado no organismo através da vacinação, há interação com as células musculares, que o engolfa. Uma vez no interior celular, o vírus vetor escapa de mecanismos imunitários. A partir daí, o adenovírus insere seu DNA no núcleo celular, fazendo com que a spike seja produzida pela síntese proteica celular, após esse processo, de forma análoga às vacinas mRNA, a spike produzida fica exposta na superfície celular, é reconhecida pelas células de defesa e assim são produzidos anticorpos contra a proteína e é gerada memória imunológica. Semelhantemente, a vacina produzida pela Janssen também tem o mesmo modo de ação que a da Astrazeneca, utilizando um adenovírus não replicante como vetor contendo a

sequência da mesma proteína viral, e levando a produção dela pelos mecanismos celulares. A figura 3 resume e ilustra esse processo.

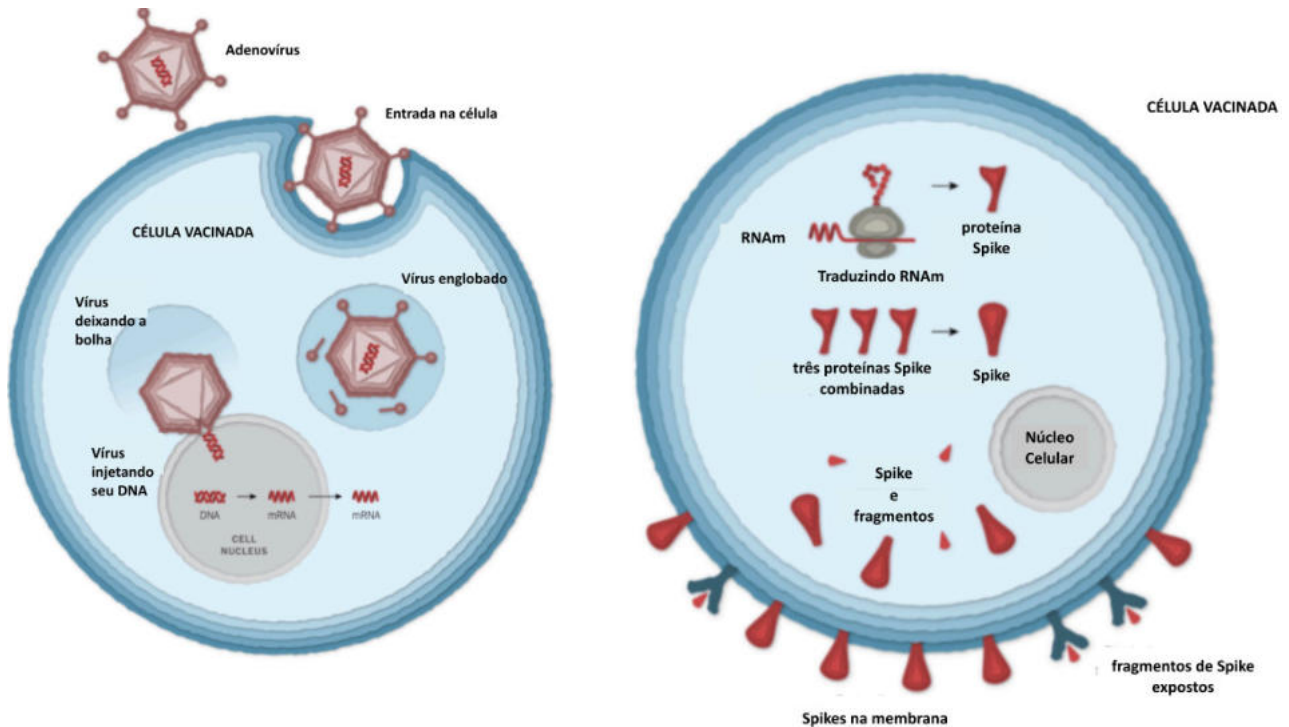


Figura 3. Mecanismo de ação da vacina AstraZeneca/Oxford. A ilustração resume como a vacina desenvolve proteção, mostrando a entrada do adenovírus contendo material genético do SARS-CoV-2 nas células musculares, passando pela internalização do mesmo no núcleo celular, o uso da maquinaria celular para replicar o RNA viral e sintetizar a proteína Spike, até a exposição na proteína viral na superfície da célula. **Adaptado de How the Oxford-AstraZeneca Vaccine Works, escrito por Jonathan Corum e Carl Zimmer**

Além dessas citadas, outra vacina que foi amplamente distribuída e produzida no Brasil foi a Corona Vac, vacina idealizada pela farmacêutica chinesa Sinovac e que em terras brasileiras foi produzida em parceria com o Instituto Butantan. Diferentemente, essa vacina se utiliza do próprio vírus SARS CoV-2 inativado, ou seja, sem capacidade de se replicar. É utilizada beta-propiolactona para inativação, promovendo interação com o genoma e assim impedindo a replicação viral, deixando porém as proteínas intactas. A partir disso, a *Spike* é reconhecida pelo sistema imune, que recruta células imunes como a célula T, levando posteriormente a produção de anticorpos e memória imune.

4.2 A face social da vacinação: relação entre desigualdades social e vacinal

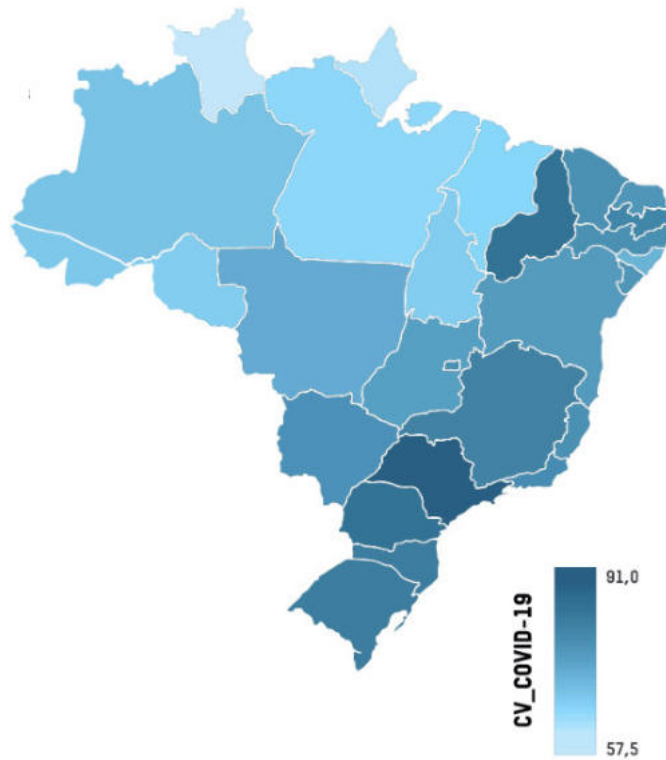
Inquestionavelmente, o início da vacinação em todo o mundo representou a melhoria da saúde pública contra este vírus pandêmico. Esse processo em si só atinge a imunização comunitária quando a maioria da população adere a ela. Neste momento, os grupos de comunicação social e as autoridades sanitárias fizeram campanhas massivas para estimular as pessoas a tomarem a vacina e foram eficazes. Embora este sucesso seja registrado em muitas partes do mundo, quando o foco está fora dos países de rendimento elevado e se dirige às nações pobres, revela-se uma grande desigualdade. Duas das principais vacinas difundidas a nível mundial, Pfizer/BioNTECH e Moderna, são muito dispendiosas para fabricar. A tecnologia envolvida no RNA mensageiro, os trabalhadores altamente especializados, adjuvantes e vários outros encargos que fazem com que as duas vacinas sejam produtos caros. De acordo com um documento dos Médicos Sem Fronteiras, os custos totais para iniciar e produzir 100 milhões de doses destas vacinas foram de 270 milhões de dólares e 127 milhões de dólares, respectivamente, o que mostra que cada uma delas poderia ter custado por dose 2,70 e 1,27 dólares, respectivamente. Por outro lado, um relatório elaborado pela People's Medicines Alliance denominado "*The Great Vaccine Robbery*" ("O Grande Roubo de Vacinas", em português) demonstra que as empresas farmacêuticas cobram preços excessivos nas vacinas contra a COVID-19, com enormes referências robustas ao documento mostrando que, por exemplo, que a Colômbia pagou em excesso 375 milhões de dólares pela Pfizer/BioNTEC e Moderna vacinas e a África do Sul pagaram um preço excessivo de 177 milhões de dólares pela Pfizer/BioNTEC. Outra ilustração asfixiante do problema é o fato de a União Africana ter pago por cada dose da vacina Pfizer/BioNTECH quase o mesmo valor do gasto de Uganda sobre os custos de saúde anualmente por pessoa. Todos os dados deste artigo são capazes de explicar porque, anos após o confinamento e o período crítico da COVID-19, ainda existe uma grande disparidade no número de pessoas vacinadas entre nações desenvolvidas e de baixa renda (World Health Organization Data, 2025; OXFAM BRASIL, 2022).

De acordo com o painel COVID-19 da Organização Mundial da Saúde (OMS), os dados revelam que até 31 de dezembro de 2023 muitos dos países mais pobres do mundo, como Haiti, Senegal, Congo e Papua Nova Guiné, tinham menos de 20% da população vacinada com pelo menos uma dose de vacinas COVID-19, em vez disso, as nações mais ricas e de renda média, como Estados Unidos,

Canadá, Austrália, China e Brasil, vacinaram mais de 80%. que também é da OMS, mostrando que as nações de baixa renda tiveram um aumento de mais de 55% nos gastos com saúde para vacinar 70% da população, em vez disso, esses dados foram inferiores a 1% nos países de alta renda. A publicação demonstra ainda que quando se compara a percentagem de população totalmente vacinada, os países mais pobres têm menos de 30% e os de rendimento médio-baixo e de rendimento alto apresentam 60% e 74%, respectivamente. Ilustra como a disparidade socioeconômica gera uma vacina e uma desigualdade na saúde. Além disso, um dado interessante publicado em 2022 em um documento feito pelo Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD) em parceria com a Universidade de Oxford revelou que as disparidades globais no acesso às vacinas pode ter atrasado a recuperação econômica de países de baixa renda, visto que se essas nações tivessem atingido os mesmos índices de vacinação dos países ricos em 2021 isso poderia resultar em um incremento de mais de US\$ 35 bilhões no PIB desses países. Isso mostra que, de fato, as disparidades socioeconômicas e sanitárias se relacionam de forma bastante forte e dependente (*World Health Organization Data,2025*).

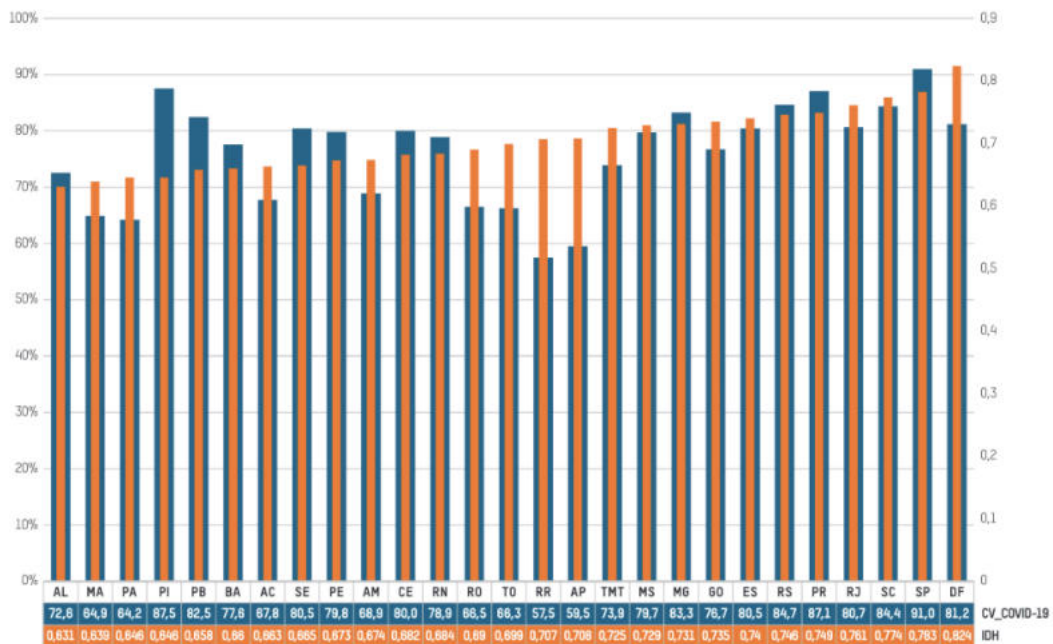
Considerando a realidade vacinal em terras brasileiras, um país de proporções continentais e socialmente desigual, é possível observar que as disparidades observadas globalmente no acesso às vacinas são vistas entre as regiões. De acordo com dados de um relatório publicado pela Oxfam Brasil em 2022, em todo Brasil somente 16% dos municípios tinham atingido 80% de cobertura vacinal. As regiões Norte e Nordeste apresentaram menos de 3% de municípios com mais de 80% da população vacinada, enquanto no Sul e no Sudeste essa proporção supera os 20%. Corroborando essas informações, somente São Paulo aparecia como estado que havia atingido a meta preconizada pelo Ministério da Saúde de atingir 90% de indivíduos vacinados, o Distrito Federal e demais estados variaram entre 62% e pouco mais de 85% nesse dado. O trabalho também expõe uma correlação direta entre IDH e acesso à vacina, mostrando que as unidades da federação com maiores índices apresentam maior parte dos seus habitantes com ao menos uma dose da vacina, enquanto que as menores porcentagens de população imunizada ficam localizadas nos estados com menor desenvolvimento. Os gráficos da Figura 4 mostram esses dados (OXFAM BRASIL,2022; Asundi *et al*,2021).

Gráfico 1 – Brasil: Distribuição da Cobertura Vacinal (CV) contra a covid-19* (para cada 100 habitantes) – 2021 e 2022



*Esquema vacinal primário: Astrazeneca, Pfizer, CoronaVac ou Janssen
 Fonte: Vacinômetro covid-19 (17/01/2021 a 11/10/2022) / IBGE

Gráfico 2 - Brasil: Distribuição da Cobertura Vacinal contra a covid-19* e IDH – 2021 e 2022**



*Esquema vacinal primário completo: Astrazeneca, Pfizer, CoronaVac ou Janssen
 **Índice de Desenvolvimento Humano 2010 (expectativa de vida ao nascer, escolaridade e renda)
 Fonte: Vacinômetro covid-19 (17/01/2021 a 11/10/2022) / IBGE

Figura 4. Distribuição da cobertura vacinal contra a COVID-19 no Brasil. No gráfico 1 é mostrada a distribuição regional para cada 100 mil habitantes, mostrando a desigualdade entre os estados das regiões Sudeste e Sul com os do Norte e Nordeste. Corroborando com isso, no gráfico 2, é vista a correlação entre Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) e cobertura vacinal, mostrando que os estados com maior qualidade de vida e renda apresentam taxas de população vacinada maiores que os estados menos favorecidos e menor IDH. **Desigualdade no Acesso a Vacinas Contra a Covid-19.** Oxfam Brasil, 2021. Disponível em <https://www.oxfam.org.br/justica-social-e-economica/desigualdade-no-acesso-a-vacinas/>

De forma semelhante, essa desigualdade vacinal também se manifesta em cenários menores como nos bairros e regiões das cidades. Em matéria da revista Piauí de 2021 com microdados do Open Data SUS, mostrou-se que na cidade de São Paulo os cinco distritos mais vacinados têm renda média cerca de 8 vezes maior do que os cinco com menor vacinação (Figura 5-esquerda). De forma análoga, na cidade do Rio de Janeiro ao se comparar a região do baixo Leblon, área nobre e com renda média superior a R\$10 mil mensais, com o Vidigal, uma favela e com moradores que recebem em média menos de R\$2 mil, se observa que os residentes da região abastada tem 3 vezes mais chances de estarem vacinados do que aqueles que residem na comunidade (Figura 5-direita) (Sott *et al*, 2022; Silva, G. *et al*, 2023; Ribeiro *et al*, 2020).



Fonte: Dados do Open Data SUS, IBGE e Bacen, compilados pelo Pindograma

Fonte: Dados do Open Data SUS e IBGE, compilados pelo Pindograma

Figura 5. Desigualdade na cobertura vacinal contra a COVID-19 nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro. Os 5 distritos mais vacinados e os 5 menos vacinados da capital paulista são mostrados na esquerda, demonstrando a correlação direta entre renda per capita e taxa de vacinação. Enquanto à direita, é vista a comparação das chances de recebimento da primeira dose entre moradores do Morro do Vidigal, favela, do Baixo Leblon, bairro nobre, ambos localizados na capital fluminense; mostrando a mesma correlação encontrada em solo paulistano. Retirado de "Desiguais até na vacina". Revista Piauí-Folha de São Paulo. Disponível em <https://piaui.folha.uol.com.br/desiguais-ate-na-vacina/>.

Todos esses números mostram que ao redor do mundo e no Brasil, a falta de equidade social caminha ao lado do baixo acesso à imunização contra a COVID-19 e dentre diversos fatores que podem ser explorados e usados como parte da explicação, o inegável alto custo dos imunizantes disponíveis. A eficácia e segurança são comprovadas, o fato de que surgiram e atenderam muito bem a demanda emergencial no mundo também não se pode pôr em discussão. O que tem sido notório desde que as vacinas começaram a ser aplicadas até agora em 2025 é de que, a normalidade retomada no mundo não pode ser considerada completa enquanto uma parte significativa das nações desfavorecidas, das regiões mais carentes e das periferias brasileiras não tiverem esquema vacinal completo. Enquanto fatores sociais e de formação são mais demorados e necessitam de mudanças mais profundas e até mesmo vontade política, o custo das vacinas é um fator que se mostra menos trabalhoso de mudar. É imprescindível que tecnologias de menor custo de produção e maior facilidade logística sejam exploradas e aplicadas em vacinas contra o SARS CoV-2 (Oxfam Brasil, 2021; Medeiros et al, 2021; Asundi et al, 2021).

4.3 Vacina baseada em peptídeos: uma alternativa econômica e eficiente

Depois de mais de três anos após o período crítico da pandemia, o mundo conseguiu voltar ao cotidiano regular. Obviamente, a economia, as relações humanas, o trabalho e diversas áreas foram afetadas. Apesar do regresso aos dias normais e do papel crucial das vacinas neste fato, devido à grande disparidade de pessoas vacinadas entre nações ricas e pobres a pandemia continua a “cobrar uma conta”. A chance de pessoas vulneráveis serem infectadas e a gravidade atual permanece. Muitos países precisam expandir a cobertura de vacinação. Muitas reportagens, artigos e notícias informam o alto preço de diversas imunizações e

como o custo pode aumentar dependendo de qual nação compra. Uma alternativa é o desenvolvimento de vacinas contra a COVID-19 baseadas em peptídeos. Esta tecnologia tem sido utilizada em pesquisas médicas há décadas, grandes exemplos de aplicações são a terapia com insulina na década de 20 e a síntese de ocitocina na década de 50. Existe um forte potencial para utilização de peptídeo como plataforma para vacinas contra SARS-CoV-2, esta técnica é capaz de gerar uma resposta imune duradoura, também é um insumo consolidado em produtos farmacêuticos e requer menos estrutura para ser sintetizada em larga escala. Outra vantagem das vacinas à base de peptídeos é que a fabricação é mais simplificada do que outras técnicas e, por isso, mais barata do que o mRNA ou as técnicas de vírus atenuados. Não só para fabricar, mas utilizando esta tecnologia, os produtos podem ser armazenados liofilizados, o que evita a necessidade de manter uma cadeia de frio no armazenamento, transporte e distribuição, diminuindo também estes tipos de encargos. Os peptídeos podem oferecer grande adaptabilidade às vacinas, com especificidade para epítomos mais imunogênicos, mas podendo ser alterados para se adaptarem a variantes e mutações, mantendo a resposta específica e forte (Magazine et al, 2024; Wang et al, 2024; Skwarczynski et al, 2016; Kathwate et al, 2022).

A ação antiviral de peptídeos já se mostrou eficaz ao inibir contra a fusão de membranas e a replicação como demonstrado por HUAN *et al*, 2020; além disso há evidências do uso in vitro bem-sucedido do peptídeo LL-37 contra alguns vírus como Zika (HE *et al*, 2018), Dengue-2 (ALAGARASU *et al*, 2017) e Hepatite C (MATSUMURA *et al*, 2016). É possível encontrar na natureza também exemplos de peptídeos com ação antimicrobica, como é o caso do peptídeo Pvd1, que tem como fonte o feijão-selvagem, e conta com evidências de ação antifúngica contra o agente etiológico da Candidíase, bem como o peptídeo Pg-AMP1, encontrado na goiabeira, que possui ação antimicrobiana relata na literatura (Games *et al*, 2008; Pelegrini *et al*, 2008, respectivamente).

Ademais, já há grupos ao redor do mundo testando os peptídeos como técnica para produção de vacina contra a COVID-19. Um grupo inglês propôs uma vacina baseada em peptídeo, COVAC-1 e já iniciou ensaios clínicos, até agora o imunizante tem mostrado ser seguro e parece gerar uma robusta resposta de células T. Os testes ainda precisam ser ampliados, mas é inegável que os resultados mostrados por Walz *et al* em 2021 são promissores. Dados mais atualizados

mostram que doses baixas dos imunizantes foram capazes de gerar resposta imune em mais de 80% dos indivíduos e que a vacina gera imunidade de longa duração (Shattockm *et al*,2024).

5. OBJETIVO

O trabalho foi desenvolvido com o seguinte objetivo: Investigar a capacidade de um peptídeo sintético contendo epítomos da proteína Spike de SARS-CoV-2 identificados anteriormente por microarray em estimular a produção de anticorpos.

6.METODOLOGIA

Nosso grupo firmou parceria com um Hospital da Marinha da cidade do Rio de Janeiro e teve acesso a amostras interessantes de pacientes com COVID-19. Os dados clínicos de sete pacientes internados pela COVID-19, demonstraram que mesmo com gravidade, parte deles se recuperou e outra piorou e veio a óbito, todos receberam o mesmo atendimento. Tendo em vista essa diferença de desfechos, surgiram perguntas: o que poderia explicar a recuperação de parte dos pacientes? Será que essa proteção apresentada pelos que sobreviveram poderia ser usada como um potencial imunizante? Buscando responder essas questões, o trabalho foi desenvolvido. Primeiramente, identificando epítomos mais reconhecidos da proteína S de SARS-CoV-2 pelas amostras dos pacientes e posteriormente, verificando se essas partes da proteína viral eram importantes para a infecção e, por fim, produzindo um peptídeo contendo esses fragmentos da proteína viral e avaliando se este era capaz de gerar uma resposta de produção de imunoglobulinas.

6.1 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

Estudo cadastrado na Plataforma Brasil com o seguinte registro:
62688416.0.0000.5256 - Estudos moleculares de Vírus Emergentes no Hospital Naval Marcílio Dias

6.2 ELISA

Fizemos o ELISA em duas ocasiões e ambos os casos os reagentes utilizados foram provenientes de um kit de diagnóstico de sarampo fabricado pela EUROIMMUN (número de referência:EI 2610-9601 G). Foi utilizado o protocolo do kit.

Em um primeiro momento, utilizando um domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína Spike do SARS-CoV-2 como antígeno para verificar se as sete amostras de soro reconheceriam e produziram uma resposta imune. Para medir isso, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 200 nanogramas de RBD para cada poço, em seguida aplicamos o soro de amostras hospitalizadas por COVID-19

e amostras de soro de pacientes não infectados com testes negativos como controle negativo. Como anticorpos secundários utilizamos anti-IgM, anti-IgG e anti-IgA humanos, para testar se os indivíduos infectados estavam produzindo anticorpos contra SARS-CoV-2. As amostras foram testadas em duplicado para cada anticorpo.

Posteriormente, usando o protocolo do kit, testamos uma série de diluições do peptídeo (1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000) para verificar as concentrações adequadas. Além disso, neste momento em que estávamos testando a quantidade indicada de peptídeo, utilizamos como amostras um pool positivo composto por cinco das sete amostras inicialmente infectadas (excluímos o COV 584 e o COV 715 em razão do pequeno volume de ambos). Como controles foi utilizado um kit tampão como negativo e um pool de cinco soros de indivíduos vacinados provenientes do Centro de Triagem Diagnóstica da COVID-19 da UFRJ como positivos. Planejamos usar essas amostras vacinadas às quais tivemos acesso para testar nosso peptídeo mais tarde. As etapas a seguir resumem os ELISAs realizados:

Incubação de amostra: Transferência de 100 µL de amostras de pacientes diluídas em tampão de diluição para poços de microplacas individuais de acordo com o protocolo de pipetagem.

Pendurar o incubo durante a noite em temperatura ambiente (+18°C a +25°C).

Lavagem: Esvaziar os poços e depois lavar 3 vezes com 300 µl de tampão de lavagem diluído para cada lavagem.

Incubação conjugada: Pipetar 100 µl de conjugado enzimático (IgG anti-humano marcado com peroxidase) em cada um dos poços da microplaca.

Pendurar o incubo por 30 minutos em temperatura ambiente (+18°C a +25°C).

Lavando: Lave conforme descrito anteriormente

Incubação de substrato: Pipete 100 µl de solução de substrato em cada um dos poços da microplaca. Incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente (+18°C a +25°C; proteger da luz solar direta).

Parar: Pipete 100 µl de solução de parada em cada um dos poços da microplaca, seguindo a mesma ordem e velocidade de introdução da solução de cromógeno/substrato.

Leitura: Uma leitura fotométrica da intensidade da cor deve ser realizada com comprimento de onda de 450 nm e comprimento de onda de referência entre 620 nm e 650 nm dentro de 30 minutos após a adição da solução de parada. Antes da leitura, agite levemente a microplaca para garantir uma distribuição homogênea da solução.

6.3 Microarray

Empregamos um microarray contendo sequências de proteínas pan-spike de vários coronavírus (SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-NL63 e HCoV-229E). Mapeamos os soros para detectar a produção de anticorpos e identificar epítomos que exibiam maior reconhecimento e interação com a proteína spike. Um microarray peptídico de alta densidade exibindo toda a sequência da proteína spike SARS-CoV-2 foi usado para avaliar a imunorreatividade de amostras de soro COVID-19, levando à seleção e identificação de antígenos peptídicos lineares.

Dos sete peptídeos candidatos mais promissores identificados, apenas dois foram selecionados para análise posterior em uma plataforma de microarray de baixa densidade para imobilização seletiva de antígeno.¹⁰ O PEPperCHIP® Pan-Corona Spike Protein Microarray foi utilizado para este propósito. Neste ensaio, as sequências da proteína spike foram estendidas com neutro GSGSGSGS ligantes nos terminais C e N e convertidos em peptídeos de 15 aminoácidos com uma sobreposição de 13 aminoácidos entre peptídeos consecutivos. O PEPperCHIP® Pan-Corona Spike Protein Microarray contém 4.564 peptídeos distintos impressos em duplicata (totalizando 9.128 pontos de peptídeos) e é enquadrado por peptídeos de controle adicionais - HA (YPYDVPDYAG, 108 manchas) e poliovírus (KEVPALTAVETGAT, 106 manchas).

Antes dos ensaios principais, o microarray foi pré-corado com anticorpos secundários e de controle para avaliar potenciais interações de fundo com os 4.564 peptídeos da proteína spike. Posteriormente, microarranjos PEPperCHIP®

adicionais foram incubados com soros humanos em diluições de 1:500 e 1:100 no tampão de incubação, seguido de coloração com anticorpos secundários e de controle. A leitura foi realizada usando um scanner Innopsys InnoScan 710-IR Microarray com ganhos de varredura de 50/10 (vermelho/verde). Os peptídeos de controle de hemaglutinina que enquadram o microarranjo foram simultaneamente corados com o anticorpo de controle como um controle de qualidade interno para confirmar o desempenho do ensaio e a integridade do microarranjo.

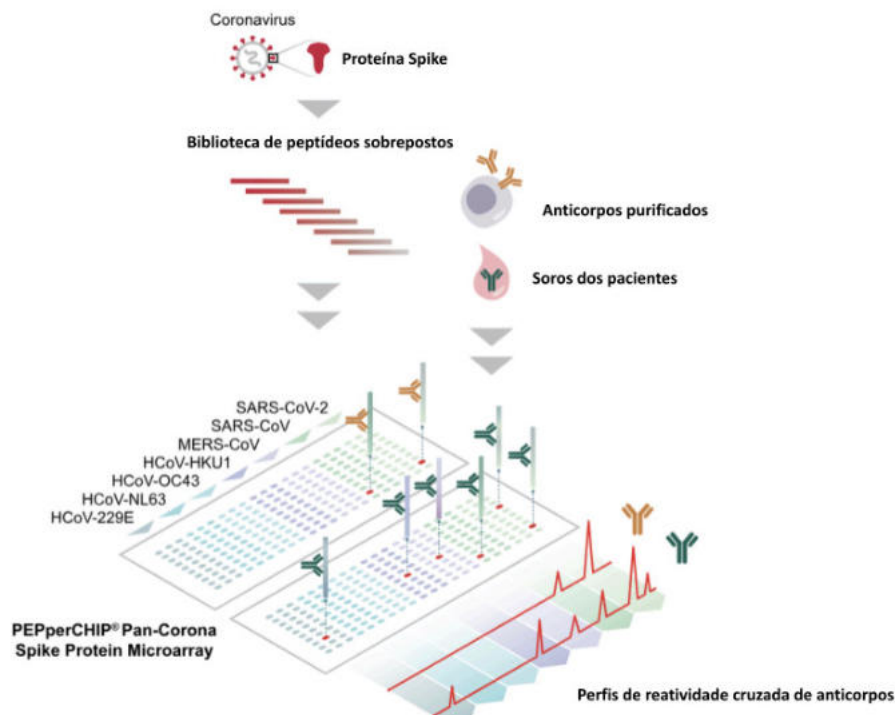


Figura 6. Esquema do funcionamento do ensaio de microarranjo. Análise de impressão digital de anticorpos ou reatividade cruzada usando o PEPperCHIP® Pan-Corona Spike Protein Microarray. Sequências de proteína spike de 7 coronavírus humanos são traduzidas em peptídeos sobrepostos e impressas em lâminas de vidro. Amostras de anticorpos, soros de pacientes ou animais são incubados no chip, seguidos pela ligação do anticorpo aos epítomos de proteína spike correspondentes. Os perfis de epítomos resultantes podem ser comparados entre diferentes amostras para determinar a especificidade e a sensibilidade do anticorpo, ou para identificar sequências alvo específicas do coronavírus para o desenvolvimento de anticorpos diagnósticos ou terapêuticos. Retirado de PEPperCHIP Pan-Corona Spike Protein Microarray. Disponível em <https://www.pepperprint.com/products-services/pepperchip-peptide-microarrays/standard-peptide-microarrays/pepperchip-pan-corona-spike-protein-microarray>.

6.4 Peptídeo com epítomos da proteína S

Nós desenhamos um peptídeo incorporando os epítomos da proteína S que apresentaram maior interação e reconhecimento no microarray. Dessa forma,

contratamos a Aminotech para sintetizar o peptídeo (número do lote 22159; massa molar: 1622,84 Da). A sequência de aminoácidos é a seguinte: NH₂-ASFSTFKCYGVSPK-COOH(NH₂-Serina-Treonina-Fenilalanina-Lisina-Cisteína-Tirosina-Glicina-Valina-Serina-Prolina-Treonina-Lisina-COOH).

6.5 Modelagem Molecular

O arquivo de estrutura da proteína spike (P0DTC2) foi obtido do UniProt (<https://www.uniprot.org/>) e utilizado para gerar imagens de intensidade de resposta para os pacientes 690 e 841. As intensidades de resposta foram mapeadas ao longo da sequência da proteína spike com base nos dados do PEPperCHIP, corrigidos para uma diluição de 1:500. Esse mapeamento foi então utilizado para modificar os valores do fator B no arquivo .pdb, permitindo a visualização das intensidades de resposta em regiões específicas da proteína.

Os peptídeos foram identificados com base em seu posicionamento na proteína utilizando a ferramenta ImmunomeBrowser (Dhanda SK. et al., 2018), disponível no site do IEDB (<https://www.iedb.org/>). Os fatores B modificados foram utilizados para colorir a superfície da proteína, onde os aminoácidos com intensidade zero aparecem em branco, enquanto os valores de intensidade crescente são representados por tons progressivamente mais escuros de azul. A maior intensidade registrada foi de 15.368, correspondendo ao peptídeo FNDGVYFASTKSN1 (posição 86-100) da proteína spike, identificada na resposta imune do paciente 690. Todas as imagens foram geradas usando o software ChimeraX (Meng EC, et al., 2023). É importante ressaltar que os dados de modelagem foram realizados em conjunto com uma doutoranda do grupo, que também apresentará esses dados em sua tese posteriormente.

7. As amostras

As amostras utilizadas inicialmente faziam parte de uma coorte de pacientes provenientes do Hospital Naval Marcílio Dias, vinculada à Marinha do Brasil e com sede na cidade do Rio de Janeiro. Todos pacientes internados acometidos pela

COVID-19 no primeiro semestre de 2020 sem qualquer tipo de vacinação. Após o microarray feito com as 2 amostras mais promissoras dentre as 7 iniciais, conseguimos ter acesso a mais amostras de pacientes internados no mesmo hospital e infectados com SARS CoV-2 no mesmo período dos iniciais. A listagem completa dos dados demográficos e clínicos dos pacientes cujas amostras foram provenientes estão na tabela abaixo, em laranja estão destacados os indivíduos cujos soros foram das sete primeiras amostras.

NÚMERO INTERNO	SEXO	IDADE	COMORBIDADE	GRAVIDADE	EVOLUÇÃO CLÍNICA (ALTA/ÓBITO)
COV0309	MASCULINO	83	DIABETES; HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA	GRAVE	ÓBITO
COV 0379	MASCULINO	51	HIPERTENSÃO; DOENÇA CORONARIANA;	GRAVE	ALTA
COV 0497	MASCULINO	67	DIABETES; CÂNCER	GRAVE	ALTA
COV 0518	MASCULINO	80	NEGA	GRAVÍSSIMO	ÓBITO
COV 0526	FEMININO	55	HIPERTENSÃO; OBESIDADE	GRAVE	ALTA
COV 0528	MASCULINO	76	CIR. HÉRNIA INGUINAL	GRAVE	ÓBITO
COV 0582	MASCULINO	28	NEGA	LEVE	ALTA
COV 0584	FEMININO	61	NEGA	LEVE	ALTA
COV 0628	MASCULINO	67	DIABETES; HIPERTENSÃO; OBESIDADE; TROMBOSE VENOSA PROFUNDA	GRAVE	ALTA
COV 0690	MASCULINO	36	ASMA	LEVE	ALTA
COV 0708	FEMININO	62	HIPERTENSÃO	LEVE	ALTA
COV 0714	MASCULINO	67	HIPERTENSÃO; DOENÇA CORONARIANA	GRAVE	ÓBITO
COV 0715	FEMININO	75	CÂNCER; DOENÇA CORONARIANA	GRAVE	ÓBITO
COV 0726	FEMININO	46	NEGA	GRAVE	ALTA
COV 0800	MASCULINO	68	NEGA	GRAVE	ÓBITO
COV 0814	FEMININO	26	HIPOTIREODISMO;	LEVE	ALTA
COV 0841	MASCULINO	48	HIPERTENSÃO; PRÉ-DIABÉTICO; DISLIPIDÊMICO; CÂNCER;	GRAVISSÍMO	ÓBITO
COV 0843	FEMININO	54	HIPERTENSÃO; INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA; INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	GRAVE	ALTA
COV 0845	MASCULINO	45	BK (BACILO DE KOCH - TUBERCULOSE) TRATADA EM 2003; ESQUIZOFRENIA		ÓBITO
COV 0862	FEMININO	84	ALZHEIMER; HIPERTENSÃO; DISFAGIA; BRADICARDIA; HEMORRAGIA DIGESTIVA BAIXA	GRAVE	ALTA
COV 0864	FEMININO	78	OBESIDADE MÓRBIDA; DIABETES; HIPERTENSÃO; CÂNCER; ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL ISQUÊMICO	GRAVE	ALTA
COV 0870	FEMININO	82	DIABETES; DISLIPIDEMIA;	GRAVE	ALTA

			HIPERTENSÃO; ARTROPLASTIA DE OMBRO (D); INSUFICIÊNCIA CARDÍACA		
COV 0892	FEMININO	55	HIPERTENSÃO; DIABETES	GRAVE	ÓBITO
COV 0897	MASCULINO	74	HIPERTENSÃO; DIABETES; INSUFICIÊNCIA CARDÍACA; EX-TABAGISTA,	GRAVE	ÓBITO
COV 1072	FEMININO	62	HIPERTENSÃO	GRAVE	ÓBITO
COV 1074	MASCULINO	78	HIPERTENSÃO; DIABETES TIPO 2; ASMA; DEMÊNCIA; DOENÇAS RENAL CRÔNICA	LEVE	ALTA
COV 1078	FEMININO	64	HIPERTENSÃO; DIABETES; OBESIDADE	GRAVE	ÓBITO
COV 11070	MASCULINO	67	DIABETES; EX-TABAGISTA	GRAVE	ÓBITO
COV 11168	FEMININO	61	HIPERTENSÃO; DIABETES; OBESIDADE	GRAVE	ÓBITO
COV 1222	MASCULINO	73	HIPERTENSÃO; DOENÇA CORONARIANA; HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA	GRAVE	ÓBITO
COV 1253	FEMININO	17	NEGA	GRAVE	ALTA
COV 1297	MASCULINO	53	HIPERTENSÃO	GRAVE	ALTA
COV 1310	MASCULINO	55	HIPERTENSÃO	GRAVISSÍMO	ALTA
COV 1405	MASCULINO	78	HIPERTENSÃO; DIABETES; DISLIPIDEMIA; OSTEOARTROSE CÉRVICO-LOMBOSSACRA	GRAVE	ÓBITO
COV 1411	MASCULINO	72	HIPERTENSÃO; DIABETES;	GRAVISSÍMO	ÓBITO
COV 1452	MASCULINO	86	ASMA; HIPOTIREODISMO; HIPERTENSÃO; EX-TABAGISTA;	GRAVE	ÓBITO
COV 1460	MASCULINO	62	DIABETES TIPO 2; HIPERTENSÃO	GRAVE	ÓBITO
COV 1471	MASCULINO	62	HIPERTENSÃO; ANGIOPLASTIA (2014); DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA	GRAVE	ÓBITO
COV 1477	MASCULINO	73	MELANOMA METASTÁTICO; ASMA; DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA; REVASCULARIZAÇÃO MIOCÁRDICA; PNEUMONIA (2020)	GRAVE	ÓBITO
COV 1541	FEMININO	69	DIABETES; HIPERTENSÃO; OBESIDADE; TROMBOSE VENOSA PROFUNDA	GRAVE	ÓBITO
COV 1616	FEMININO	62	HIPERTENSÃO; OBESIDADE	GRAVE	ÓBITO
COV 1634	FEMININO	58	DIABETES; HIPERTENSÃO; COLELITÍASE; DOENÇA PSIQUIÁTRICA; DISLIPIDEMIA	GRAVE	ALTA
COV 1670	MASCULINO	65	HIPERTENSÃO; EX-TABAGISMO	GRAVE	ÓBITO
COV 1681	MASCULINO	62	HIPERTENSÃO	GRAVE	ALTA
COV 1695	FEMININO	79	HIPOTIREODISMO; HIPERTENSÃO; EX-TABAGISTA	GRAVE	ÓBITO
COV 1701	MASCULINO	74	HIPERTENSÃO; DEFICIÊNCIA VISUAL; ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO	GRAVISSÍMO	ÓBITO
COV 1766	MASCULINO	67	HIPERTENSÃO; DIABETES	GRAVE	ÓBITO
COV 1768	FEMININO	78	HIPERTENSÃO; EX-TABAGISTA; DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA	LEVE	ALTA

Tabela 1. Amostras de soros de pacientes acometidos por COVID-19 hospitalizados no primeiro semestre de 2020. A presente tabela reúne as informações de sexo, idade, gravidade da doença, desfecho da situação do paciente e comorbidades. Dados disponibilizados pelo Hospital Naval Marcílio Dias.

8.RESULTADOS

8.1ELISA para seleção de amostras mais promissoras

Sabíamos que os sete pacientes apresentavam desfechos e gravidade diferentes da doença, por isso decidimos testar a resposta imunitária destes pacientes, utilizando os seus soros. Nosso foco foi tentar descobrir se as diferenças mostradas na parte clínica poderiam ser causadas pela geração anticorpos contra o SARS-CoV-2. E se caso fosse verdade, selecionar os soros mais promissores para explorar essa propriedade para estudar alvos de vacinas. Diante disso, foi realizado um ELISA com as amostras e como resultado, foram selecionados o COV 690 e o COV 841, pois o primeiro apresentou a maior secreção de anticorpos em todas as imunoglobulinas e o último apresentou a pior resposta de anticorpos, mas entre as amostras de falecidos apresentou níveis mais semelhantes em cada classe de anticorpos. É importante notar que a amostra 690 foi proveniente de um paciente que teve caso leve da doença e conseguiu se recuperar e receber alta, enquanto o soro 841 veio de um indivíduo que ficou internado apresentando COVID-19 severa e veio a óbito, de forma geral foram selecionados os dois soros com maior discrepância em termos de desfecho e liberação de anticorpos.

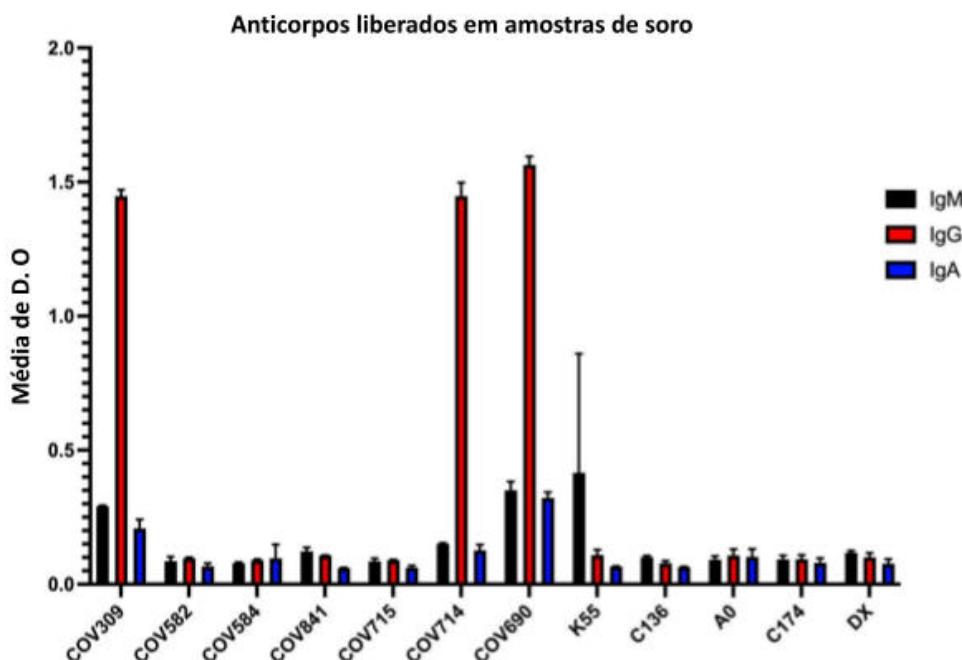
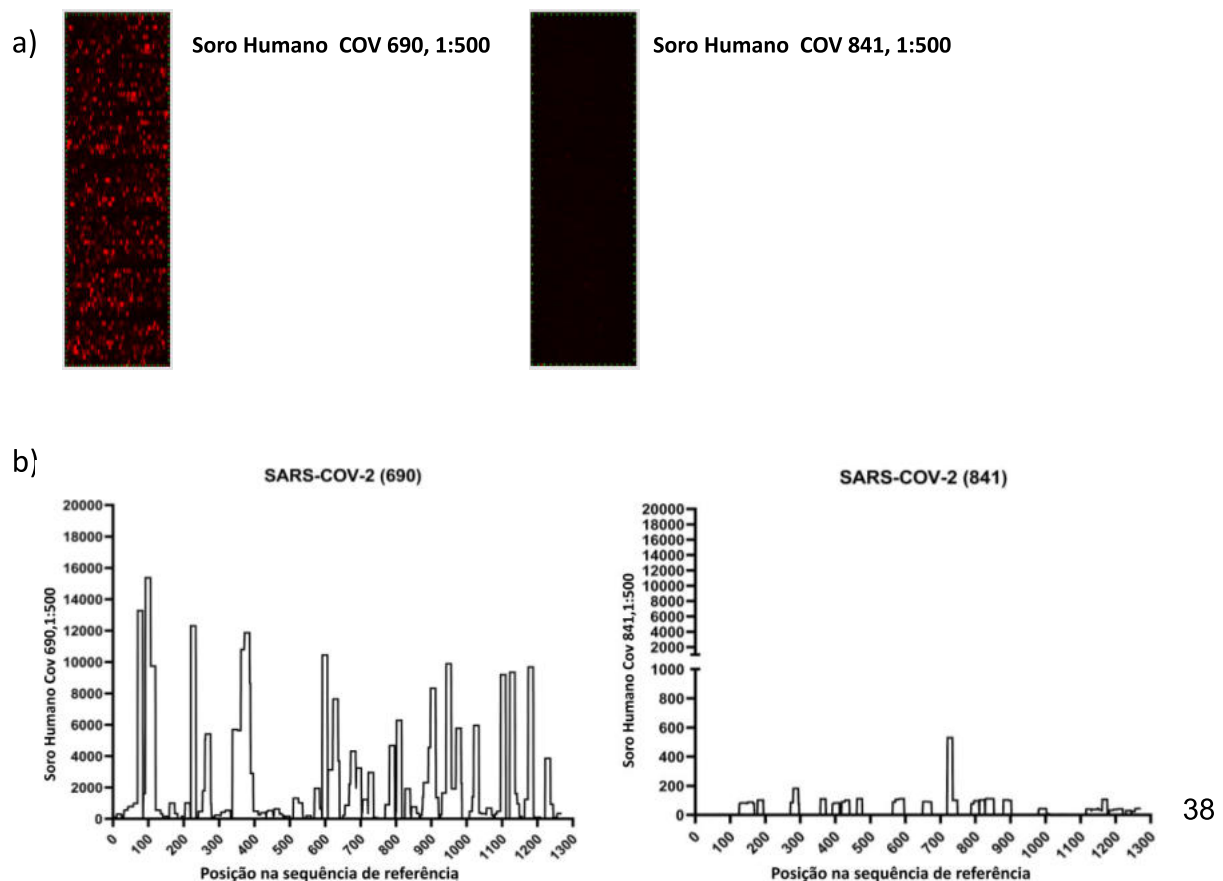


Figura 7. Anticorpos liberados em amostras de soro. As sete amostras iniciais de pessoas hospitalizadas infectadas com SARS-CoV-2 foram testadas para verificar a produção potencial de anticorpos. As amostras infectadas e não infectadas foram aplicadas em placas de ELISA sensibilizadas com proteína spike RBD-SARS-CoV-2 para selecionar a amostra de soro infectado mais promissora. Entre o material de pacientes com COVID-19, o COV 690 apresentou maior produção de anticorpos em cada imunoglobulina, em vez disso, o COV 841 apresentou uma das piores taxas, então eles foram selecionados. Esses dados são a média de dois experimentos diferentes em dias distintos. K55,C136,A0,C174 e DX referem-se a amostras de soro de pacientes saudáveis não infectados pré-pandemia.

8.2 Microarray com amostras selecionadas

As amostras selecionadas para a análise de microarray pertenciam a indivíduos com diferentes desfechos clínicos: um se recuperou e o outro morreu. Essa discrepância é claramente ilustrada na Figura 9a, onde o soro do paciente sobrevivente (COV690) mostrou forte reconhecimento e ligação à proteína spike dos coronavírus, enquanto a amostra do paciente falecido (COV841) exibiu interação mínima com os peptídeos pan-spike. Além disso, na Figura 9b podemos ver as sequências lineares da proteína spike do SARS CoV-2 onde havia mais anticorpos ligados e, corroborando com o mostrado na Figura 2a, o COV690 apresentou uma quantidade maior de anticorpos que reagem à proteína viral do que o COV841 em todas as posições analisadas.



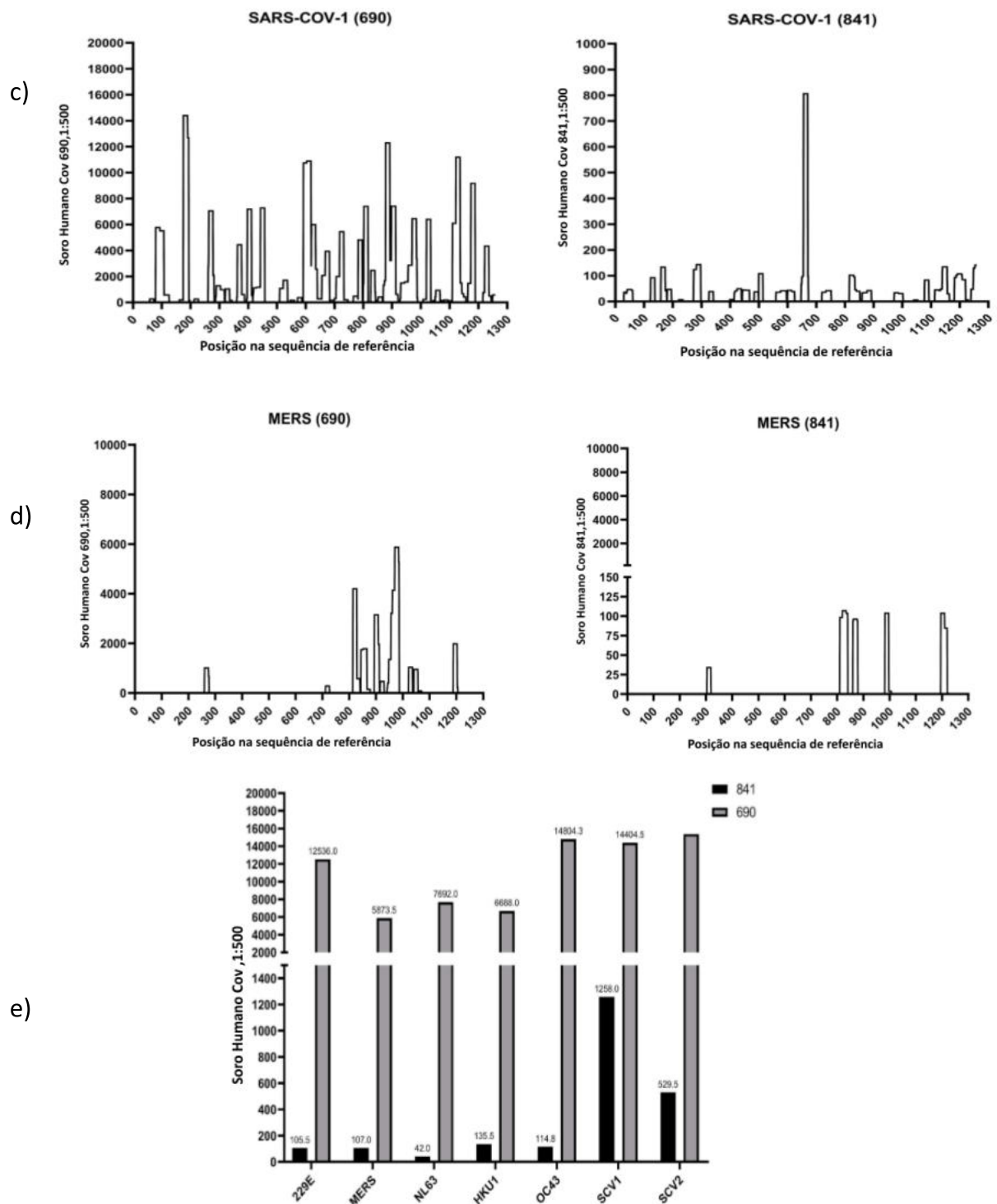


Figura 8. Amostras selecionadas para o Pan-Corona Spike Protein Microarray. Este microarray abrange as proteínas spike do SARS-CoV-2, SARS-CoV MERS-CoV, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-NL63 e HCoV-229E. As amostras foram fornecidas a pacientes, selecionados em uma coorte testada anteriormente. (A) Resultado do microarray demonstrando reconhecimento e correspondência entre a amostra e as proteínas spike dos coronavírus. O paciente que sobreviveu (COV 690) apresentou mais correspondências com as sequências da proteína spike dos coronavírus. (B) As sequências lineares da proteína spike do SARS CoV-2 onde houve mais

anticorpos foram ligados. A amostra sobrevivente (COV690) apresentou uma quantidade maior de anticorpos que reagem à proteína viral do que o paciente falecido (COV841) em todas as posições de sequência de referência analisadas. (C) e (D) O mesmo foi observado quando as amostras foram testadas com SARS-CoV e MERS-CoV, respectivamente, COV690 apresentou mais anticorpos interagindo com sequências da proteína S de ambos os vírus. (E) O nível máximo de proteína spike de interação de cada coronavírus e amostras de pacientes revelou que o soro do paciente 690 atingiu níveis mais altos do que o do COV 841 em todos eles.

Da mesma forma, nos epítomos de Spike do SARS CoV e MERS CoV, responsáveis por surtos no passado, o mesmo padrão é observado em ambos, a amostra da pessoa que recebeu alta exibiu mais imunoglobulinas contra a proteína S do que outras não, Figura 9c e Figura 9d, respectivamente. Quando analisamos o nível máximo de correspondência entre os soros e o peptídeo S de cada coronavírus presente no array, em todos eles o paciente 690 continuou a apresentar mais anticorpos que interagem em oposição ao 841, como visto na Figura 9e. Portanto, o soro daqueles que se recuperaram demonstrou mais epítomos reconhecidos e produziu mais anticorpos contra eles. Diante disso, nos questionamos onde esses epítomos mais reconhecidos estavam localizados na estrutura tridimensional da proteína e se eles eram uma parte da proteína Spike relevante para a infecção.

8.3 Modelagem molecular da proteína Spike de SARS-CoV-2

Foram conduzidas análises de dinâmica proteica para verificar se os epítomos mais interativos da proteína Spike poderiam estar localizados em locais cruciais para a infecção. Após encontrar anticorpos produzidos contra a proteína S do coronavírus, observando em dimensão linear, a observação em visão 3D pode nos dar a resposta sobre se essas imunoglobulinas têm ou não potencial para impedir a entrada do SARS-CoV-2 nas células. Como resultado, o paciente sobrevivente apresentou maior liberação de anticorpos que reconhecem os epítomos da Spike do que o indivíduo falecido. Essa observação pode ser vista em diferentes posições, como podemos ver na vista superior (Figura 10a) e na vista lateral (Figura 10b). Além disso, considerando especificamente o Domínio de Ligação ao Receptor (RBD), o COV690 mais uma vez demonstra maior correspondência entre seus anticorpos e os antígenos proteicos em comparação com o COV841 (Figura 10c). Indo mais a fundo, no local de interação entre RBD-ACE-2, é possível notar que os

anticorpos presentes na amostra da pessoa recuperada eram mais abundantes do que na da pessoa falecida (Figura 10d).

Esses dados corroboram o que foi mostrado na Figura 9, de que pessoas ainda vivas apresentaram maior liberação de anticorpos que reconhecem a proteína Spike, além de que os anticorpos podem interagir com epítomos presentes em regiões relacionadas à entrada do vírus nas células-alvo. Por esse motivo, a resposta imune gerada pelo paciente 690 parece ser protetora e foi responsável por sua recuperação.

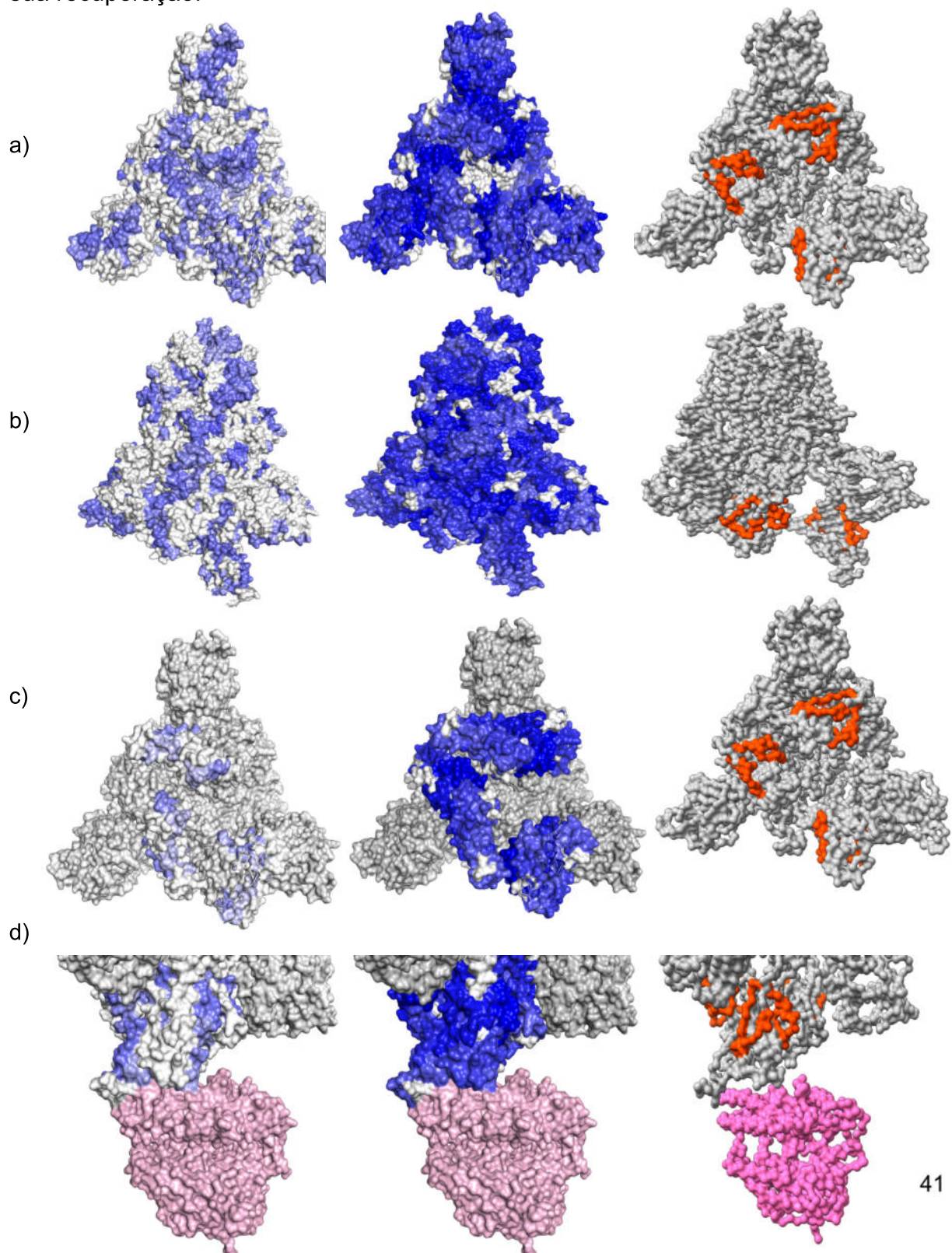


Figura 9. Modelagem Molecular da proteína Spike de SARS-CoV-2. Uma modelagem da proteína Spike foi desenvolvida para mostrar a região onde os epítomos com mais reconhecimento estão localizados. Em azul escuro, os epítomos com mais interação e em azul claro, os menos interativos. Os epítomos selecionados pelo microarray são apresentados em laranja. (A) Uma visão superior da proteína Spike é visualizada e uma visão lateral é mostrada em (B); em ambas, é possível ver maior reconhecimento de epítomos da proteína S pelas imunoglobulinas liberadas pelo paciente sobrevivente do que pelo falecido. (C) A região do domínio de ligação ao receptor é observada e o COV690 demonstra maior interação entre seus anticorpos e epítomos comparado a COV841. (D) O sítio de ligação do RBD-ACE-2 é mostrado e, corroborando as outras visualizações, a amostra 690 têm mais anticorpos que interagem com epítomos virais do que a amostra 841. Em conclusão, o paciente 690 apresentou níveis mais altos de anticorpos que interagem com epítomos Spike em comparação com a amostra COV841.

8.4 Testes com o peptídeo após ampliação da coorte

Após os promissores resultados de microarranjo e de modelagem, conseguimos ampliar a coorte e sintetizar um peptídeo potencialmente imunizante, visto que contém os epítomos para a proteína Spike reconhecidos. O passo seguinte era validar o peptídeo com os soros. Inicialmente, foi utilizado o ensaio de ELISA para testar a possível interação do peptídeo com as amostras de soro, porém após mais de três tentativas constatamos que a técnica não apresentou sensibilidade suficiente para nos trazer respostas. Essa constatação foi realizada devido ao fato de que ao utilizar um pool com as amostras reconhecidamente positivas, um como controle negativo tampão salino e diferentes diluições do peptídeo para sensibilizar a placa, as leituras não apresentaram diferenças entre negativos e positivos nem entre as concentrações peptídicas. Após isso, tentamos utilizar a técnica de imuno spot, porém fazendo testes semelhantes aos feitos no ELISA (diferentes concentrações de peptídeo e controles positivos e negativos), mais uma vez não foi obtido êxito, verificamos que não houveram diferenças entre as variáveis, necessitando de uma nova abordagem para avaliarmos o peptídeo frente às amostras dos pacientes.

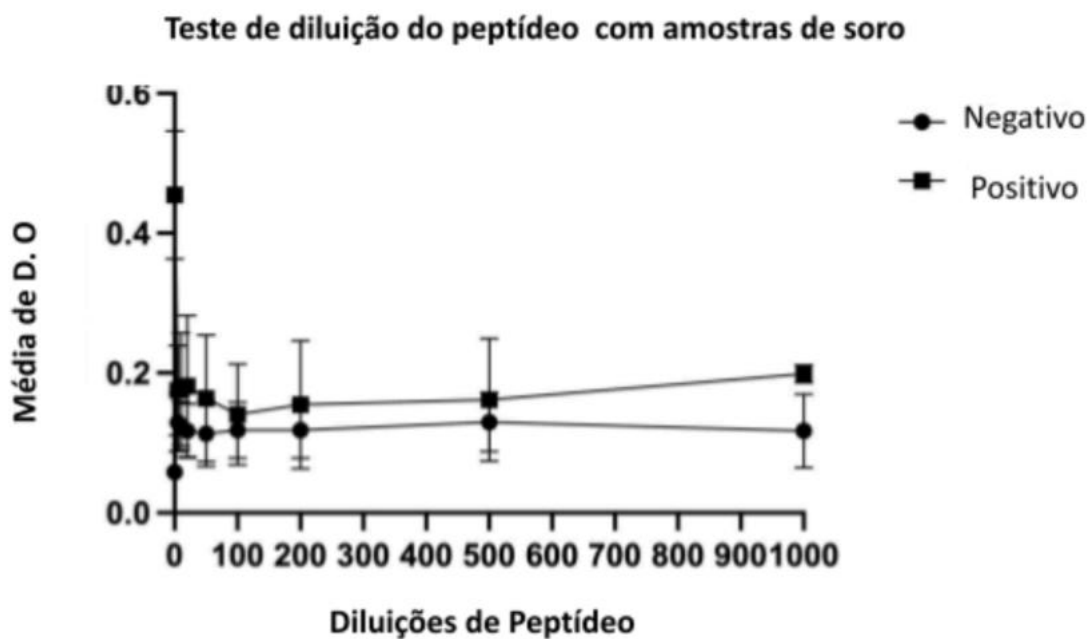


Figura 10. Teste de diluições de peptídeos com pool de amostras de soro. Nosso peptídeo foi diluído em um tampão diluente contido no kit em uma faixa de diluições de 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 e 1:1000. Os controles são identificados como círculo e quadrado localizados no eixo Y como os pontos mais baixos e mais altos, respectivamente. Não há diferença estatística entre amostras negativas e positivas nem entre os controles. Esses dados são a média de dois experimentos diferentes em dias distintos.

9.DISCUSSÃO

A geração de vacinas contra a COVID-19 baseada em uma tecnologia alternativa como os peptídeos é uma inestimável oportunidade, que pode oferecer à humanidade um avanço rumo à superação definitiva da doença.

Nesse sentido, o presente trabalho demonstrou que um sobrevivente da COVID-19 (COV 690) apresentou uma abundância significativamente maior de epítomos da proteína Spike em seu soro em comparação com um não sobrevivente (COV 841) (Fig. 8). Esta observação sugere que uma resposta imune robusta e específica do epítomo pode ser um determinante crítico de melhores resultados clínicos em pacientes com COVID-19.

Com base nessas descobertas, projetamos e sintetizamos um peptídeo que incorpora os epítomos da proteína Spike mais reconhecidos. Este peptídeo sintético representa um candidato promissor para uma vacina de próxima geração — potencialmente mais econômica, mais fácil de fabricar e mais simples de armazenar do que as vacinas atuais de mRNA ou vetor viral. Embora nossos ensaios de validação iniciais (ELISA e immunospot) (Fig. 11) não tenham produzido resultados conclusivos, nossos dados de microarray fornecem evidências convincentes do potencial imunogênico desses epítomos (Fig. 9). Não apenas linearmente, mas quando observamos a estrutura tridimensional da proteína S, foi demonstrado que o paciente que recebeu alta tem uma resposta de produção de anticorpos mais bem-sucedida na ligação aos epítomos da proteína S do que o paciente falecido, especialmente na região de ligação ao receptor (Figura 10). Essa descoberta pode potencialmente significar um ótimo alvo para a prevenção de infecções, pois impede a entrada do SARS-CoV-2 nas células. Além disso, ao expandir nossa coorte com amostras adicionais de soro de pacientes hospitalizados no Hospital Naval Marcílio Dias, poderemos estabelecer uma correlação entre o reconhecimento do epítomo e o resultado do paciente. No geral, essas descobertas contribuem com novos insights sobre o design de vacinas baseadas em peptídeos e ressaltam seu potencial para enfrentar os desafios atuais na acessibilidade às vacinas e no

gerenciamento da COVID prolongada, especialmente em ambientes com recursos limitados.

Com isso, ainda que tenham passado quase cinco anos desde que as primeiras vacinas foram lançadas, e hoje em dia o mundo tenha atingido, globalmente, uma enorme quantidade de pessoas com o esquema vacinal completo, as nações pobres ainda carecem aumentar o número de indivíduos totalmente vacinados. Adicionalmente, muitos relatos de COVID de longa duração (quando as manifestações clínicas duram 3 meses ou mais) foram mostrados na literatura; muitos artigos publicaram que cerca de 30% dos pacientes infectados apresentavam sintomas de longa duração. Os mais comuns são fadiga, distúrbios do sono, ansiedade e outros. Um estudo longitudinal publicado pelo Instituto Oswaldo Cruz em 2022, que realizou durante 14 meses pessoas hospitalizadas infectadas pelo SARS CoV-2 que tiveram alta, mostrou que mais de 50% delas apresentaram COVID longa, além da COVID continuada poder estar presente não só em pessoas que tiveram doença grave, mas em casos moderados e leves também (Bruno et al, 2023;Vannorsdall et al,2021;Gottlieb et al, 2023;Logue et al,2021).

Iniciativas brasileiras de pesquisa e produção de vacinas contra a COVID-19, portanto, são fundamentais. Desde 2020 há projetos de imunizantes sendo desenvolvidos no Brasil com base em diferentes plataformas vacinais e em fases distintas, independentemente do modo de ação, a perspectiva de surgirem imunizantes de produção nacional em grande escala por si só é animador, visto que representaria maior soberania nacional com a enorme dependência de tecnologia e insumos internacional, além de tornar economicamente mais favorável todos os custos que envolvem a administração de uma vacina desde sua produção, armazenamento e transporte até sua aplicação. Tendo isso em vista, é preciso destacar os imunizantes baseados em subunidades proteicas do SARS CoV-2 como é o caso da SpiN-Tec, desenvolvida pela Universidade Federal de Minas Gerais em parceria com o Centro de Tecnologia em Vacinas da Universidade Federal de Minas Gerais em parceria com a FIOCRUZ; da Versamune, feita pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em colaboração com a farmacêutica Farmacore e a empresa americana PDS Biotechnology; e a S-UFRJvac, desenvolvida pelo Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa em Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Além dessas,

há imunizantes sendo sintetizados baseados em biopartículas como é o caso da vacina desenvolvida pela Universidade Federal do Paraná baseado em polímero biodegradável contendo a proteína Spike; e a vacina baseada em peptídeo sintéticos desenvolvida por Bio Manguinhos. Há também propostas vacinais baseadas em vírus atenuado, como é o caso da 2H120 Defense, desenvolvida na Universidade Estadual do Ceará; e a ButanVac, feita pelo Instituto Butantã. Além dos citados, há outros imunizantes sendo propostos, pesquisados e testados em diversos institutos e universidades pelo Brasil, o que mostra a tradição e vocação do país não apenas para imunizar os brasileiros com vacinas compradas da indústria estrangeira, mas para planejar e fabricar as suas próprias (Castro et al, 2022; Vuitika et al, 2024; Junior et al, 2021).

Diante da lógica comercial que há nas farmacêuticas, pode parecer não haver lógica na continuação de um projeto que propõe mais uma alternativa de vacina contra o SARS CoV-2. No entanto, contrariando essa mentalidade, o avanço dessa proposta contida no presente trabalho em conjunto com os projetos brasileiros em curso se mostram bastante necessários e complementares, visando promover uma cobertura vacinal cada vez maior da população, oportunizando a chegada de imunizantes aos braços dos estratos populacionais que menos obtiverem acesso ao esquema vacinal. Diminuindo os impactos do prolongamento dos sintomas da doença, as chances de novos surtos e a circulação e surgimento de variantes mais perigosas do vírus. Não somente pensando no cenário brasileiro, o aparecimento de novas opções disponíveis de imunizantes brasileiros pode representar uma excelente notícia para as nações periféricas que ainda possuem baixas taxas de população vacinada, permitindo a elas uma oferta de vacinas com custos e valores menores.

É urgente, portanto, que as autoridades de saúde, os governos e as organizações internacionais não considerem a COVID-19 um assunto encerrado, um desafio superado, porque há um número muito grande de pessoas que continua em risco. Embora a vacinação não evite a infecção, é o único método de proteção eficaz contra a evolução da doença para fase grave, consequentemente capaz de evitar internações e mortes. Além de que tende a aliviar significativamente os casos de Covid longa, reduzindo o aparecimento de sequelas severas. Resumindo, é preciso que o mundo continue pesquisando, monitorando os casos, vacinando e

tendo em mente que a menos que haja uma maior equidade no número de pessoas imunizadas, não estaremos totalmente seguros.

10. CONCLUSÃO

Foi possível concluir, portanto, que aqueles que possuíam mais epítomos para coronavírus demonstraram resposta imunológica eficiente. Como perspectiva, nosso grupo continua a buscar a validação da capacidade do peptídeo contendo epítomos de Spike do SARS CoV-2 de estimular a produção de anticorpos no soro de pacientes infectados e, para isso, expandimos nossa coorte com a adição de mais soro de pacientes hospitalizados infectados por SARS CoV-2 do mesmo hospital do primeiro grupo de primeiras amostras e estamos buscando técnicas e ensaios alternativos que possibilitem a obtenção dessas respostas. Espera-se que tais abordagens sejam capazes de fornecer um conjunto de epítomos selecionados úteis como candidatos a antígeno para orientar os esforços experimentais para desenvolver uma vacina baseada em peptídeo contra SARS-CoV-2.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *CDC Museum COVID-19 Timeline*. Disponível em:
<https://www.cdc.gov/museum/timeline/covid19.html>. Acesso em: 18 fev. 2025.

2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO COVID-19 dashboard: COVID-19 Cases*. Disponível em:
<https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?m49=001&n=c>. Acesso em: 18 jan. 2025.

3. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Advice for public*. Disponível em:
<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/advice-for-public>. Acesso em: 17 jan. 2024.

4. BROWN, P. et al. "It seems impossible that it's been made so quickly": a qualitative investigation of concerns about the speed of COVID-19 vaccine development and how these may be overcome. *Human Vaccines &*

Immunotherapeutics, v. 18, n. 1, p. 2004808, 2022. DOI: 10.1080/21645515.2021.2004808.

5.ARSENAULT, C., GAGE, A., KIM, M.K. et al. COVID-19 and resilience of healthcare systems in ten countries. *Nat Med* 28, 1314–1324 (2022).<https://doi.org/10.1038/s41591-022-01750-1>

6.SILVA, S. J. R. D.; PENA, L. Collapse of the public health system and the emergence of new variants during the second wave of the COVID-19 pandemic in Brazil. *One Health*, v. 13, p. 100287, 2021. DOI: 10.1016/j.onehlt.2021.100287

7.NOGUEIRA, M. O.; MOREIRA, R. F. C. A Covid deixa sequelas: a destruição do estoque de capital das micro e pequenas empresas como consequência da pandemia de Covid-19. Rio de Janeiro: Ipea, 2023. (Texto para Discussão, 2894). DOI: <http://dx.doi.org/10.38116/td2894-port>. Acesso em: 17 jan. 2024.

8.SOTT, M. K.; BENDER, M. S.; DA SILVA BAUM, K. Covid-19 outbreak in Brazil: health, social, political, and economic implications. *International Journal of Health Services*, v. 52, n. 4, p. 442-454, 2022. DOI: 10.1177/00207314221122658. Acesso em: 17 jan. 2024.

9.DE FOO, C. et al. Health financing policies during the COVID-19 pandemic and implications for universal health care: a case study of 15 countries. *The Lancet Global Health*, v. 11, n. 12, p. e1964-e1977, 2023. DOI: 10.1016/S2214-109X(23)00448-5. Acesso em: 18 fev. 2025.

10.MEDEIROS, M. Impactos distributivos da pandemia da COVID-19 no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 26, n. 9, p. 4211-4218, 2021. DOI: 10.1590/1413-81232021269.09952021. Acesso em: 18 fev. 2025.

11.BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Especial – Doença pelo Coronavírus COVID-19. Brasília,DF. 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/agosto/25/boletim_epidemiologico_covid_88-1.pdf. Acesso em: 18 fev. 2025.

12.KFF. *Economic impact of COVID-19 on PEPFAR countries.* Disponível em:<https://www.kff.org/global-health-policy/issue-brief/economic-impact-of-covid-19-on-pepfar-countries/>. Acesso em: 17 jan. 2024.

13.HATMAL, M. M. et al. Comprehensive Structural and Molecular Comparison of Spike Proteins of SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV, and Their

Interactions with ACE2. *Cells*, v. 9, n. 12, p. 2638, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/12/2638>. Acesso em: 18 fev. 2025.

14.SILVA, G. D. M. da et al. Influência da desigualdade socioeconômica na distribuição das internações e dos óbitos por covid-19 em municípios brasileiros, 2020: um estudo ecológico. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 32, n. 1, p. e2022303, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S2237-96222023000100021>. Acesso em: 10 abr. 2025. Acesso em: 17 jan. 2024.

16.VIRALZONE. SARS-CoV-2, COVID-19 – Coronavirus resource. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/9056>. Acesso em: 18 fev. 2025.

17.RIBEIRO, F.; LEIST, A. Who is going to pay the price of Covid-19? Reflections about an unequal Brazil. *International Journal for Equity in Health*, v. 19, p. 91, 2020. DOI: 10.1186/s12939-020-01207-2. Acesso em: 17 jan. 2024

18.PORMOHAMMAD, A. et al. Comparison of confirmed COVID-19 with SARS and MERS cases: a systematic review and meta-analysis. *Reviews in Medical Virology*, v. 30, n. 4, p. e2112, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmv.2112>. Acesso em: 18 fev. 2025.

19.WILLIAMS, S. et al. The global burden of COVID-19: long-term health effects of the pandemic. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 116, n. 11, p. 1007-1016, 2022. Disponível em: <https://academic.oup.com/trstmh/article/116/11/1007/6581500?login=false>. Acesso em: 18 fev. 2025.

20.CALDAS, B. et al. Promoting equity, diversity, and inclusion in surveys: insights from a patient-engaged study to assess long COVID health-care needs in Brazil. *Journal of Clinical Epidemiology*, v. 173, p. 111423, 2024. DOI: 10.1016/j.jclinepi.2024.111423. Acesso em: 18 fev. 2025.

21.LU, Z. Zhangshi Yitong (the Comprehensive Book of Medicine by Zhang Lu). Shanghai: 1990 repri (1695). 697 p.

22.LOMBARD M, PASTORET PP, MOULIN AM. A brief history of vaccines and vaccination. *Rev Sci Tech.* (2007) 26:29–48. doi: 10.20506/rst.26.1.1724

23.LEUNG AKC. ‘Variolation’ and vaccination in late imperial China, Ca 1570–1911. In: Plotkin SA, editor. *History of Vaccine Development*. New York, NY: Springer (2011). p. 5–12.

- 24.CAVAILLON JM, LEGOUT S. Duclaux, Chamberland, Roux, Grancher, and Metchnikoff: the five musketeers of Louis Pasteur.** *Microbes Infect.* (2019) 21:192–201. doi: 10.1016/j.micinf.2019.06.006
- 25.RUPPRECHT CE, HANLON CA, HEMACHUDHA T. Rabies re-examined.** *Lancet Infect Dis.* (2002) 2:327–43. doi: 10.1016/S1473-3099(02)00287-6
- 26.SMITH KA. Louis Pasteur, the father of immunology?** *Front Immunol.* (2012) 3:1–10. doi: 10.3389/fimmu.2012.00068
- 27.PASTEUR L, CHAMBERLAND C, ROUX E. De l'atenuation des virus et de leur retour a la virulence.** *Compt Rend Acad Sci.* (1881) 92:429–35.
- 28.HATO T, DAGHER PC. How the innate immune system senses trouble and causes trouble.** *Clin J Am Soc Nephrol.* (2015) 10:1459–69. doi: 10.2215/CJN.04680514
- 29.HOFFMAN W, LAKKIS FG, CHALASANI G. B cells, antibodies, and more.** *Clin J Am Soc Nephrol.* (2016) 11:137–54. doi: 10.2215/CJN.09430915
- 30.BENNE N, VAN DUIJN J, KUIPER J, JISKOOT W, SLÜTTER B. Orchestrating immune responses: how size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines.** *J Control Release.* (2016) 234:124–34. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.05.033
- 31.RADBRUCH A, MUEHLINGHAUS G, LUGER EO, INAMINE A, SMITH KGC, DÖRNER T, et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell.** *Nat Rev Immunol.* (2006) 6:741–50. doi: 10.1038/nri1886
- 32.AHMED R, GRAY D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation.** *Science.* (1996) 272:54–60. doi: 10.1126/science.272.5258.54
- 33.SARKANDER J, HOJYO S, TOKOYODA K. Vaccination to gain humoral immune memory.** *Clin Transl Immunol.* (2016) 5:1–6. doi: 10.1038/cti.2016.81
- 34.POLLARD AJ, BIJKER EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments.** *Nat Rev Immunol.* (2021) 21:83–100. doi: 10.1038/s41577-020-00479-7
- 35.OXFAM BRASIL. *Desigualdade no acesso a vacinas.*** Disponível em: <https://www.oxfam.org.br/justica-social-e-economica/desigualdade-no-acesso-a-vacinas/>. Acesso em: 18 fev. 2025.

- 36.HE, J. et al. The Role of Exosomes in the Immune Response and Inflammation in Rheumatic Diseases. *Cells*, v. 9, n. 12, p. 2638, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/12/2638>. Acesso em: 18 fev. 2025.**
- 37.ASUNDI, A.; O'LEARY, C.; BHADELIA, N. Global COVID-19 vaccine inequity: the scope, the impact, and the challenges. *Cell Host & Microbe*, v. 29, n. 7, p. 1036-1039, 2021. DOI: 10.1016/j.chom.2021.06.007.**
- 38.MAGAZINE N, ZHANG T, BUNGWON AD, et al. Immune Epitopes of SARS-CoV-2 Spike Protein and Considerations for Universal Vaccine Development. *Immunohorizons*. 2024;8(3):214-226. doi:10.4049/immunohorizons.2400003**
- 39.WANG, X., ZHANG, J., LIU, M. et al. Nonconserved epitopes dominate reverse preexisting T cell immunity in COVID-19 convalescents. *Sig Transduct Target Ther* 9, 160 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01876-3>**
- 40.SKWARCZYNSKI M, TOTH I. Peptide-based synthetic vaccines. *Chem Sci*. 2016;7(2):842-854. doi:10.1039/c5sc03892h**
- 41.KATHWATE GH. In silico Design and Characterization of Multi-epitopes Vaccine for SARS-CoV2 from Its Spike Protein. *Int J Pept Res Ther*. 2022;28(1):37. doi: 10.1007/s10989-021-10348-z. Epub 2022 Jan 3. PMID: 35002585; PMCID: PMC8722413.**
- 42.HUAN Y, KONG Q, MOU H, YI H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol*. 2020 Oct 16;11:582779. doi: 10.3389/fmicb.2020.582779. PMID: 33178164; PMCID: PMC7596191.**
- 43.HE M, ZHANG H, LI Y, WANG G, TANG B, ZHAO J, HUANG Y, ZHENG J. Cathelicidin-Derived Antimicrobial Peptides Inhibit Zika Virus Through Direct Inactivation and Interferon Pathway. *Front Immunol*. 2018 Apr 12;9:722. doi: 10.3389/fimmu.2018.00722. PMID: 29706959; PMCID: PMC5906549.**
- 44.ALAGARASU K, PATIL PS, SHIL P, SEERVI M, KAKADE MB, TILLU H, SALUNKE A. In-vitro effect of human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 on dengue virus type 2. *Peptides*. 2017 Jun;92:23-30. doi: 10.1016/j.peptides.2017.04.002. Epub 2017 Apr 9. PMID: 28400226.**
- 45.MATSUMURA T, SUGIYAMA N, MURAYAMA A, YAMADA N, SHIINA M, ASABE S, WAKITA T, IMAWARI M, KATO T. Antimicrobial peptide LL-37 attenuates infection of hepatitis C virus. *Hepatol Res*. 2016 Aug;46(9):924-32. doi: 10.1111/hepr.12627. Epub 2016 Feb 4. PMID: 26606891.**

46.GAMES PD, DOS SANTOS IS, MELLO EO, DIZ MS, CARVALHO AO, DE SOUZA-FILHO GA, DA CUNHA M, VASCONCELOS IM, FERREIRA Bdos S, GOMEs VM. Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from Phaseolus vulgaris L. seeds. Peptides. 2008 Dec;29(12):2090-100. doi: 10.1016/j.peptides.2008.08.008. Epub 2008 Aug 22. PMID: 18786582

47.PELEGRINI PB, MURADA AM, SILVA LP, SILVA LP, SANTOS RCP, COSTa FT, TAGLIARI PD, BLOCH JR C, NORONHA EF, MILLER RNG, FRANCO OL. Identification of a novel storage glycine-rich peptidefrom guava (Psidiumguajava) seeds with activity against Gram-negative bacteria. Peptides.29, 1271-1279, 2008.

48.HEITMANN, J.S., BILICH, T., TANDLER, C. et al. A COVID-19 peptide vaccine for the induction of SARS-CoV-2 T cell immunity. Nature 601, 617–622 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04232-5>

49.SHATTOCK AJ, JOHNSON HC, SIM SY, CARTER A, LAMBACH P, HUTUBESSY RCW, THOMPSON KM, BADIZADEGAN K, LAMBERT B, FERRARI MJ, JIT M, FU H, SILAL SP, HOUNSELL RA, WHITE RG, MOSSER JF, GAYTHORPE KAM, TROTTER CL, LINDSTRAND A, O'BRIEN KL, BAR-ZEEV N. Contribution of vaccination to improved survival and health: modelling 50 years of the Expanded Programme on Immunization. Lancet. 2024 May 25;403(10441):2307-2316. doi: 10.1016/S0140-6736(24)00850-X. Epub 2024 May 2. PMID: 38705159; PMCID: PMC11140691.

50.DHANDA SK, VITA R, HA B, GRIFONi A, PETERS B, SETTE A. ImmunomeBrowser: a tool to aggregate and visualize complex and heterogeneous epitopes in reference proteins. Bioinformatics. 2018 Nov 15;34(22):3931-3933. doi: 10.1093/bioinformatics/bty463. PMID: 29878047; PMCID: PMC6223373.

51.MENG EC, GODDARD TD, PETERSEN EF, COUCH GS, PEARSON ZJ, MORRIS JH, FERRIN TE. UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis. Protein Sci. 2023 Nov;32(11):e4792. doi: 10.1002/pro.4792. PMID: 37774136; PMCID: PMC10588335.

52.BRUNO, E. et al. Long-term effects of COVID-19 on health. *American Journal of Biomedical Sciences*, v. 120, n. 11, p. e20230750, 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10763636/pdf/0066-782X-abc-120-11-e20230750.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2025.

53.VANNORS DALL, T. D. et al. Cognitive Dysfunction, Psychiatric Distress, and Functional Decline After COVID-19. *Journal of the Academy of Consultation-Liaison Psychiatry*, v. 63, n. 2, p. 133-143, 2022. DOI: 10.1016/j.jaclp.2021.10.006.

54.GOTTLIEB, M. et al. Severe Fatigue and Persistent Symptoms at 3 Months Following SARS-CoV-2 Infections During the Pre-Delta, Delta, and Omicron Periods: A Multicenter Prospective Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases*, v. 76, n. 11, p. 1930-1941, 2023. DOI: 10.1093/cid/ciad045

55.LOGUE, J. K. et al. Sequelae in Adults at 6 Months After COVID-19 Infection. *JAMA Network Open*, v. 4, n. 2, p. e210830, 2021. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.0830.

56.CASTRO, J. T. et al. Promotion of neutralizing antibody-independent immunity to wild-type and SARS-CoV-2 variants of concern using an RBD-Nucleocapsid fusion protein. *Nature Communications*, v. 13, p. 4831, 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-32547-y.

57.VUITIKA, L. et al. A self-adjuvanted VLPs-based Covid-19 vaccine proven versatile, safe, and highly protective. *Scientific Reports*, v. 14, p. 24228, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-76163-w.

58.JUNIOR, M. R. S. C.; SILVA, B. R.; TREVISAN, M. Importância das vacinas da produção à vacinação como garantia no cuidado à saúde. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 4, n. 6, p. 24952–24968, 2021. DOI: 10.34119/bjhrv4n6-107. Acesso em: 18 fev. 2025.