

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIENCIAS MÉDICAS
CURSO DE MEDICINA

BRENDA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOQUÍTINAS E ENSAIO DE
CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO E6 DO
MULTIEPÍTOPO RECOMBINANTE 1 (MERECL) DO SARS-
COV-2**

João Pessoa - PB

2023

BRENDA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOQUINAS E ENSAIO DE
CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO E6 DO
MULTIEPÍTOPO RECOMBINANTE 1 (MERECL1) DO SARS-
COV-2**

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado à
Universidade Federal da
Paraíba, como requisito parcial
para a obtenção do título de
graduado em Medicina

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Joelma
Rodrigues de Souza

João Pessoa - PB

2023

**Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

F363a Fernandes, Brenda.

Avaliação do perfil de citocinas e ensaio de citotoxicidade em células VERO E6 do multiepítopo recombinante 1 (MERECL) do SARS-COV-2 / Brenda Fernandes. - João Pessoa, 2023.

33 f. : il.

Orientação: Joelma Rodrigues de Souza de Souza.
TCC (Graduação) - UFPB/CCM.

1. SARS-CoV2. 2. COVID-19. I. de Souza, Joelma Rodrigues de Souza. II. Título.

UFPB/CCM

CDU 616.9(043.2)

BRENDA FERNANDES

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS E ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO E6 DO MULTIEPÍTOPO RECOMBINANTE 1 (MERECL1) DO SARS-COV-2

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade
Federal da Paraíba, como
requisito parcial para a obtenção
do título de graduado em
Medicina

Aprovado em 01/12/23

BANCA EXAMINADORA



Drª Joelma Rodrigues de Souza



Dr Renato Antônio dos Santos Oliveira



Drª Maria Alenita de Oliveira

Dedico esse trabalho a Deus, à minha mãe Elisângela Fernandes Cerqueira, ao meu pai Jurandir Fernandes Pereira e ao meu irmão Braian Fernandes e a minha tia Maria do Carmo Albuquerque.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus não apenas pelo dom da vida, mas por ter me moldado nesses 24 anos em uma pessoa pronta para fazer o certo e o justo, segundo os mandamentos Dele. Agradeço também à minha família, nas pessoas da minha mãe Elisângela Fernandes Cerqueira, meu pai Jurandir Fernandes Pereira e meu irmão Braian Fernandes, que não apenas permitiram minha vinda para João Pessoa, mas também fizeram de tudo para apoiar esse sonho. Em especial, agradeço a minha mãe por ser exemplo de determinação, ao meu pai por exemplo de sabedoria e ao meu irmão por exemplo de humanidade, sem os quais eu não seria a médica que me tornei. Agradeço à Maria do Carmo Albuquerque, Fabiana Albuquerque, Juliana Albuquerque e Renata Albuquerque que me acolheram em João Pessoa e foram minha família nesses seis anos de curso. Agradeço a minha orientadora, Joelma Rodrigues de Souza, exemplo de professora e pesquisadora, por ter estado comigo em toda a minha jornada e ter me dado a honra de ser sua orientanda. Agradeço, por fim, à própria cidade de João Pessoa, que me fez amadurecer, crescer e aprender a viver nos últimos seis anos, sem a qual eu não seria quem sou hoje.

“Não necessitam de médico os que estão sãos, mas, sim, os que estão enfermos”

(Lucas 5:31)

RESUMO

O vírus SARS-CoV-2, responsável pela COVID-19, é objeto de estudo mundial devido sua rápida replicação, que desencadeia uma resposta imune exacerbada, devido a uma tempestade de citocinas, a síndrome respiratória aguda grave, principal causa de morte em pacientes com essa afecção. Esta síndrome deve-se à apresentação de hiperinflamação sistêmica, com presença de níveis elevados das citocinas e quimiocinas. Isso posto, centros de pesquisa de todo o mundo estiveram à frente para produzir vacinas capazes de imunizar a população, mas devido ao possível escape imune de novas variantes do SARS-CoV-2, estratégias vacinais atualizadas visando o aumento de sua eficácia são necessárias. Diante disso, nosso grupo de pesquisa mapeou e identificou *in silico* regiões imunodominantes das proteínas do SARS-CoV-2, caracterizando peptídeos como um possível protótipo vacinal a ser utilizado contra o vírus. Assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o perfil da resposta imune celular através das dosagens de citocinas e os ensaios de citotoxicidade *in vitro* induzidos pelos peptídeos desenvolvidos, conferindo ensaios pré-clínicos deste protótipo vacinal. Ensaios de citotoxicidade em células Vero E6 e em células mononucleares do sangue periférico – PBMCs – e dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura foram realizados. Nossos resultados revelaram que os peptídeos selecionados estimularam uma boa resposta celular baseada em IFN- γ , contudo, sem a exacerbão danosa da produção de citocinas inflamatórias. Em acréscimo, nas condições testadas, as sequências peptídicas não apresentaram citotoxicidade. Esses achados, embora preliminares, encorajam nosso grupo na realização das etapas subsequentes de um projeto maior, avaliando novas condições de cultura, aumento do n amostral e realização dos ensaios *in vivo*, visando, desta forma, a validação dessas sequências antigênicas como imunizante para COVID-19.

Palavras chave: SARS-CoV2; COVID-19; Epítopos; Vacina; Resposta Imune.

ABSTRACT

The SARS-CoV-2 virus, responsible for COVID-19, is the object of worldwide study due to its rapid replication, which triggers an exacerbated immune response, due to a cytokine storm, the severe acute respiratory syndrome, the main cause of death in patients. with this condition. This syndrome is due to the presentation of systemic hyperinflammation, with the presence of high levels of cytokines and chemokines. That said, research centers around the world have been at the forefront to produce vaccines capable of immunizing the population, but due to the possible immune escape of new SARS-CoV-2 variants, updated vaccine strategies aimed at increasing their effectiveness are necessary. Therefore, our research group mapped and identified in silico immunodominant regions of SARS-CoV-2 proteins, characterizing peptides as a possible vaccine prototype to be used against the virus. Thus, the present work aims to evaluate the profile of the cellular immune response through cytokine dosages and in vitro cytotoxicity assays induced by the developed peptides, checking pre-clinical assays of this vaccine prototype. Cytotoxicity assays in Vero E6 cells and in peripheral blood mononuclear cells – PBMCs – and cytokine dosage in culture supernatant were performed. Our results revealed that the selected peptides stimulated a good IFN- γ -based cellular response, however, without the harmful exacerbation of inflammatory cytokine production. In addition, under the conditions tested, the peptide sequences did not show cytotoxicity. These findings, although preliminary, encourage our group to carry out the subsequent stages of a larger project, evaluating new culture conditions, increasing the sample n and carrying out in vivo assays, thus aiming at validating these antigenic sequences as an immunizer for COVID -19.

Keywords : SARS-CoV2; COVID-19; Immune Response; Epitopes; Vaccine. Immune Response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema MRC1.....	15
Figura 2 - Perfil de citocinas em sobrenadante de cultura de PBMC de voluntários após estimulação.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Status vacinal dos voluntários doadores de amostras sanguíneas para avaliação da imunogenicidade e citotoxicidade das sequências peptídicas do SARS-CoV-2.....17

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Porcentagem de Viabilidade das Células Vero E6 após 24 horas de estimulação.....	21
Gráfico 2 - Porcentagem de Viabilidade das Células Vero E6 após 48 horas de estimulação.....	21
Gráfico 3 - Viabilidade celular de PBMCs.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAEE	Centro de Atendimento Educacional Especializado
CBA	Cytometric Bead Array
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
COVID-19	Doença do Coronavírus de 2019
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
IFN-γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-17A	Interleucina 17A
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
MErec	Multiepítopo recombinante
MS	Ministério da Saúde
MTT	2H-Tetrazolium, 2-(4,5-dimetil-2-thiazolil)-3,5-difenil,bromide
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Células Mononucleares do Sangue periférico
PBS	Tampão Fosfato Salino
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SARS-CoV -2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2
SFB	Soro Fetal Bovino
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VOC	Variante de preocupação
VOI	Variante de interesse
VUM	Variante sob monitoramento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
3. METODOLOGIA.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5. CONCLUSÃO.....	27
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	26
7. ANEXO A	29

1. INTRODUÇÃO

O coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV -2) foi identificado em dezembro de 2019 como a causa de uma epidemia de pneumonia que afetou a cidade de Wuhan, na China. Outros vírus, da mesma família, *Coronaviridae*, foram responsáveis por epidemias entre 2002 e 2003, além de 2012 e 2013 (DU et al., 2009; ZAKI et al., 2012), mas em menor proporção do que foi a COVID-19, doença de coronavírus 2019, como denominou a Organização Mundial da Saúde. Assim, foi decretado a pandemia de COVID-19, em março de 2020, devido à alta taxa de contágio do vírus (WHO, 2020).

Em vista desse contexto, com as pesquisas de todo o mundo, foi possível desenvolver diversas plataformas vacinais contra a COVID-19, em um curto período, devido ao acúmulo de conhecimentos prévios de plataformas utilizadas em outras patologias, alto investimento e mobilização mundial em vários centros de pesquisas e indústrias farmacêuticas, para tentar controlar a disseminação do vírus e impedir novas mortes. Essas, causadas pelo quadro clínico grave da infecção por COVID-19, denominada síndrome respiratória aguda grave (SARS) (HU et al., 2021), devido à hiperinflamação sistêmica do paciente por níveis elevados de vários citocinas e quimiocinas (DHOLARIA; BACHMEIER; LOCKE, 2019; HUANG et al., 2020), que levam ao quadro de sepse, choque séptico e ao óbito, sobretudo em pacientes com comorbidades e idade avançada (CHEN et al., 2020a). No entanto, convém mencionar, que a maior parte dos infectados vão desenvolver uma afecção assintomática, leve ou moderada, dentro da sintomatologia de febre, tosse, dor de garganta, dor de cabeça, fadiga, mialgia e falta de ar (WHO, 2020).

Ademais, urge ressaltar que a elevada transmissibilidade do vírus culminou em mutações genéticas capazes de diferenciá-lo em novas variantes em relação à cepa original, devido à rápida replicação. Assim, é importante ressaltar que mutações adaptativas no genoma podem alterar o potencial patogênico e dificultar o desenvolvimento de medicamentos e vacinas (FERNANDES et al., 2022; MALIK et al., 2022). Tais cepas podem ser classificadas como VUM, VOI ou VOC, que correspondem respectivamente à tradução de “variante sob monitoramento”, “variante de interesse” e “variante de preocupação” (WHO, 2023). A OMS classificou como VOCs até março de 2023 as variantes Alfa, Beta, Gama, Delta e Ômicron.

Sabendo que é possível obter princípios vacinais com menor custo de produção, mantendo a imunogenicidade e com menor chance de desenvolvimento de efeitos colaterais pela ausência do componente vivo da vacina (ALI et al., 2017), estratégias de imunoinformática *in silico* foram implementadas, gerando sequências proteicas antigênicas imunodominantes do SARS-CoV-2, visando a construção de um princípio vacinal capaz de estimular as células T e B, por meio de um multiepítopo recombinante, MErec. Essas sequências foram primariamente idealizadas para serem obtidas por síntese biotecnológica, contudo, por questões operacionais, optou-se por sua síntese química. Assim, o presente plano teve por objetivo avaliar o perfil de citocinas e os ensaios de citotoxicidade dessas sequências proteicas P1, P2 e P3, configurando ensaios pré-clínicos deste protótipo vacinal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

2.1.1 Avaliar o perfil de citocinas e ensaio de citotoxicidade das sequências proteicas imunodominantes do SARS-CoV-2.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Realizar ensaio de citotoxicidade em células Vero E6 para as sequências proteicas do SARS-CoV2;

2.2.2 Realizar ensaio de citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico para as sequências proteicas do SARS-CoV2;

2.2.3 Estimular Células Mononucleares do Sangue periférico – PBMC de voluntários infectados/imunizados com o SARS-CoV2 com diferentes concentrações peptídicas;

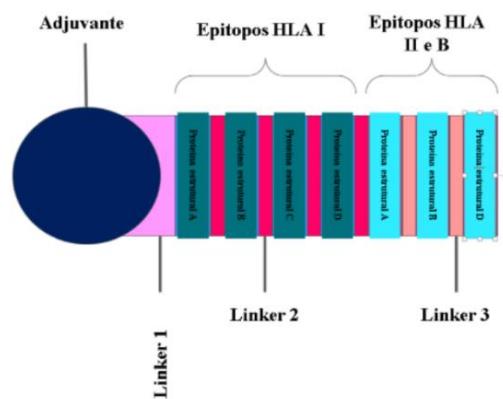
2.2.4 Avaliar o perfil de citocinas Th1, Th2, Th17 induzidas pelas sequências peptídicas imunodominantes em sobrenadante de cultura de PBMC de voluntários infectados com SARS-CoV2.

3. METODOLOGIA

3.1 Seleção dos epítópos de proteínas do SARS-CoV-2 para construção do multiepítópo recombinante a partir do genoma viral sequenciado e caracterizado no território brasileiro disponível no GenBankTM (Código: MT126808.1)

Realizado o mapeamento de epítópos de células T e B para as proteínas do SARS-CoV-2, com a identificação *in silico* de possíveis alvos de diferentes proteínas virais, mediante a construção de um mosaico proteico, bem caracterizado por análises físico-químicas e por parâmetros imunológicos como alergenicidade, imunogenicidade e interação com receptores imunes inatos perfazendo os estudos *in silico* de um projeto maior (DOYTCHINOVA; FLOWER, 2007; DHANDA; RAGHAVA, 2013). Desta forma, foram obtidas sequências peptídicas P1, P2 e P3 obtidas por síntese química (FastBio™) e utilizadas nos ensaios *in vitro* a seguir, buscando sua caracterização pré-clínica, destas sequências imunodominantes.

Figura 1: Esquema MRC1



Fonte: Autoria própria, 2023

3.2 Cultivo Celular de Células Vero E6 (ATCC – CRL1586)

Células Vero E6 foram cultivadas em meio DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium - suplementado com 10% de SFB (Gibco®), L-Glutamina 2mM (Gibco®), além de penicilina/estreptomicina/anfotericina B 100U/mL (Gibco®), para fins de utilização nos ensaios de citotoxicidade e avaliação da resposta imune celular. Vale ressaltar que essa linhagem foi escolhida devido à alta quantidade de receptores de angiotensina 2 nessa célula (responsável pela ligação do SARS-CoV-2 nas células);

3.3 Ensaio de citotoxicidade em células Vero E6

Placas de 96 poços com a concentração celular de 5×10^4 células/poço foram incubação por 24 h em atmosfera com 5% CO₂ - 37°C. Após, o meio de cultura DMEM foi aspirado e reposto em um volume de 100µL/poço juntamente com os tratamentos de diferentes concentrações das sequências proteicas P1, P2 e P3. Tendo sido utilizadas como controle negativo, células sem estímulo em meio de cultura, e células em DMSO (10%) como controle positivo. As placas foram então incubadas na presença dos estímulos por 24h e 48h a 37°C e 5% CO₂. Após 24h e 48h, o meio de cultura foi aspirado e os poços foram lavados com PBS 1x. Foi adicionado 100µL de MTT (2H-Tetrazolium, 2-(4,5-dimetil-2-thiazolil)-3,5-difenil,bromide) por poço na concentração de 2mg/mL previamente diluído em MEM 5% não suplementado. Quatro horas depois, retirou-se o conteúdo total da placa e 100µL de DMSO foram adicionados em cada poço, com homogeneização vigorosa, para dissolver os cristais de Formazan. Em seguida, a absorbância foi mensurada no comprimento de onda de 570 nm no espectrofotômetro. Para a interpretação dos resultados e cálculos de viabilidade realizou-se a média da absorbância (Abs) das triplicatas de cada uma das amostras avaliadas, aplicando-se a fórmula:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{100 \times (\text{absorbância amostra})}{(\text{absorbância do controle negativo})}$$

3.4 Seleção dos voluntários

Os voluntários participantes deste estudo foram selecionados e recrutados (n=4) a partir de seu estado vacinal e/ou confirmação diagnóstica para COVID-19. Os participantes eram vacinados contra COVID-19 com três doses, sem comorbidades registradas ou sem uso de imunossupressores, dois deles com confirmação diagnóstica de COVID-19 e dois deles sem confirmação e suspeita de quadros de COVID-19. Estes tiveram suas amostras sanguíneas obtidas conforme descrito no item 7.5. As informações referentes à vacinação e à infecção por SARS-CoV2 desses voluntários se encontram descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Status vacinal dos voluntários doadores de amostras sanguíneas para avaliação da imunogenicidade e citotoxicidade das sequências peptídicas do SARS-CoV-2

Voluntários	1 ^a dose vacina COVID-19	2 ^a dose vacina COVID-19	Doses de reforço	Infecção por COVID-19
01	08/08/2021 (BNT162b2)	06/11/2021 (BNT162b2)	1 ^a 09/03/2022 (ChAdOx1)	1 – julho de 2020
02	05/05/2021 (VAXZEVRIA)	08/08/2021 (VAXZEVRIA)	1 ^a 15/12/2021 (BNT162b2)	1 – janeiro de 2022
03	31/05/2021 (BNT162b2)	02/09/2021 (BNT162b2)	1 ^a 07/01/2022 (BNT162b2)	Sem infecção confirmada
04	03/06/2021 (ChAdOx1)	31/08/2021 (ChAdOx1)	1 ^a 04/01/2022 (BNT162b2)	Sem infecção confirmada

Fonte: Autoria própria, 2023

3.5 Obtenção de Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC)

Foi coletado 10 mL de sangue dos voluntários, dividido em dois tubos, utilizando-se heparina como anticoagulante para obtenção das células

mononucleares do sangue periférico (PBMC). O sangue foi diluído em PBS pH 7,2 na proporção 2:1 e transferido para tubos cônicos contendo Ficoll-Hypaque (GE Healthcare), também na proporção 2:1. Após centrifugação, a 400x g por 30 minutos a 20°C, a camada de PBMC obtida entre a mistura de Ficoll-Hypaque e o plasma foi removida, depositada em novos tubos cônicos e lavado com 20 ml de PBS. Depois de nova centrifugação a 300 x g por 15 minutos a 20°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 10 ml de PBS (pH 7,2) e novamente centrifugado a 300x g, durante o mesmo tempo e mesma temperatura. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento composto de PBMC foi ressuspensionado em meio de cultura RPMI 1640 (Cutilab) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cutilab). Uma alíquota da suspensão celular foi então removida, diluída 1:20 em azul de Trypan (Sigma) e quantificada na câmara de Neubauer.

3.6 Ensaio de citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico - PBMC

Para avaliação da citotoxicidade celular dos peptídeos testes em PBMCs foi utilizado o kit Alamar Blue®, onde a metodologia consiste em a resazurina, de cor azul, ser reduzida a resorufina, de cor rosa e fluorescente na presença de células viáveis. As PBMCs foram plaqueadas usando placas de 96 poços (5×10^4 células/poço) em meio RPMI suplementado com 10% de SFB com mix de peptídeo na concentração de C2 e incubados em estufa de atmosfera úmida a 37 °C com 5% de CO₂, nos intervalos de tempo de 24, 48, 72 e 96 horas. Foi utilizado como controle negativo as células sem estímulo em meio de cultura e o DMSO (10%) como controle positivo. Nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h, foi adicionado 10µL de Alamar Blue® na concentração de 1,5mM para leitura da fluorescência. Após 5 horas de incubação a 37°C e 5% CO₂ cada placa foi levada para leitura no comprimento de onda de 570nm em leitora de placas. Os dados foram expressos em Unidades Relativas de Fluorescência (FRU) e os resultados de viabilidade celular em percentual foram calculados seguindo a fórmula a seguir:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{100 \times (\text{fluorescência amostra} - \text{fluorescência branco})}{(\text{fluorescência controle negativo} - \text{fluorescência branco})}$$

3.7 Estimulação das Células Mononucleares do Sangue Periférico – PBMC – com as sequências peptídicas do multiepítopo recombinante sintetizados quimicamente

As PBMC isoladas dos voluntários foram cultivadas em placas de 96 poços (5×10^4 células/poço) com meio RPMI 1640 (Gibco®), suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal (Lonza®), 10 mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco®) e 200 U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco®). As células foram estimuladas com as sequências peptídicas na concentração C2, pré-estabelecida nos ensaios de células Vero E6, e incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C, por 96 horas. Após esse intervalo, o sobrenadante de cultura foi retirado para avaliação da indução de resposta imune celular por esses peptídeos.

3.8 Avaliação da resposta imune celular – Perfil de Citocinas

Para avaliar a resposta imune celular induzida pelas sequências proteicas P1, P2 e P3, o sobrenadante de cultura de PBMCs estimulados por esses peptídeos foram utilizados para dosagem de citocinas através da técnica de Citometria de Fluxo CBA (*Cytometric Bead Array*) seguindo os protocolos preconizados pelo fabricante. O kit Th1/Th2/Th17 CBA (Becton Dickinson Biosciences que quantifica as citocinas dos IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17A foi utilizado. O BD™ *Cytometric Bead Array* (CBA) utiliza uma série de partículas (microesferas ou beads) com intensidade de fluorescência distinta para detectar simultaneamente através de uma superfície de captura as várias citocinas solúveis. Cada *bead* de captura está conjugada com um anticorpo específico para cada citocina. A detecção das citocinas presentes na amostra foi realizada através do fluorocromo ficoeritrina (PE) conjugadas a anticorpos que fornece um sinal fluorescente em proporção à

quantidade de citocina da amostra ligada a *bead*. Os complexos formados de *bead* de captura + citocina da amostra + reagente de detecção foram mensurados através de citometria de fluxo. A intensidade da fluorescência PE de cada complexo revela a concentração em pg/mL de cada citocina. Foi utilizado o citômetro de fluxo Accuri C6 Becton Dickinson (BD)R. Para o cálculo das concentrações e intensidade média de fluorescência de cada citocina será utilizado o software FCAP 1.0.1.

3.9 Análise Estatística

A avaliação das dosagens das citocinas e ensaios de citotoxicidade foram compilados e a estatística descritiva realizada. Teste de Kruskal-Wallis para avaliar as diferenças entre os grupos avaliados na dosagem das citocinas foi realizado utilizando-se o software GraphPad Prism 8.0. Para as análises dos ensaios de citotoxicidade, foi utilizado o software Microsoft Excel® para Windows 10 (© Microsoft Corporation).

3.10 Aspectos éticos

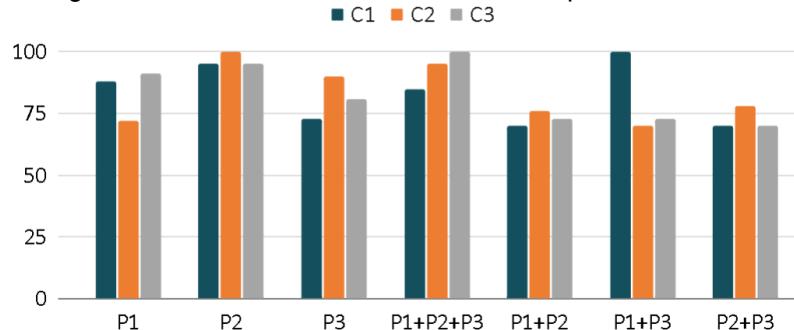
O presente projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, de acordo com a resolução MS/CNS 466/2012, no que se refere às questões de ética em pesquisa com seres humanos, obtendo o parecer de aprovação no 4.563.921 CCS/UFPB, CAEE nº 37475820.7.0000.5188. (anexo A)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio de citotoxicidade em células Vero E6

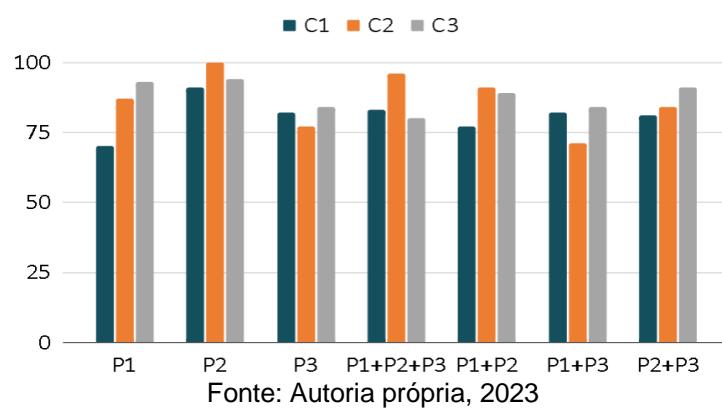
A análise de citotoxicidade das sequências proteicas P1, P2 e P3 em células Vero E6 foi realizada por 24h e 48 horas, onde foram coletados dados no período de 24 horas de duração (Gráfico 1) e 48 horas de duração (Gráfico 2). Foram empregadas três concentrações diferentes dos peptídeos (C1, C2 e C3 em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em 7 grupos distintos (3 para os peptídeos isoladamente, 3 para os peptídeos em dupla e 1 para peptídeos em trio). Foi observada a formação de cristais de Formazan através de síntese mitocondrial e, então, quantificados por absorbância em comprimento de onda a 560 nm, evidenciando, portanto, viabilidade celular.

Gráfico 1: Porcentagem de Viabilidade das Células Vero E6 após 24 horas de estimulação



Fonte: Autoria própria, 2023

Gráfico 2: Porcentagem de Viabilidade das Células Vero E6 após 48 horas de estimulação



Assim, tem-se que em 24h, a concentração C2 apresentou maior viabilidade para

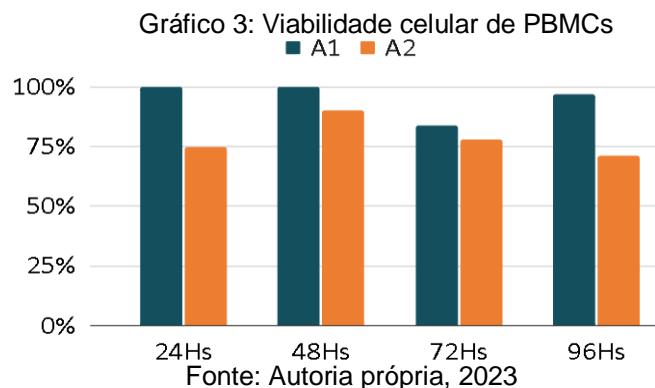
os grupos P2(100%), P3(90%), P1+P2(76%) e P2+P3(78%), seguido pela concentração C3 para P1(91%) e P1+P2+P3(100%) e por C1 apenas para P1+P3(100%). Para a placa de 48h, a concentração C3 maior viabilidade em 4 amostras, P1(93%), P3(84%), P1+P3(84%) e P2+P3(91%), seguido pela concentração C2, que apresentou maior viabilidade em nas três amostras restantes: P2(100%), P1+P2+P3(86%), P1+P2(91%).

Isso posto, constatou-se que após as 48 horas houve viabilidade celular nos sete grupos de peptídeos nas três concentrações propostas, sem que houvesse alguma concentração tóxica (verificado por não haver redução na viabilidade celular acima de 30%). Para as próximas etapas, decidiu-se que seria utilizado nos experimentos o trio de peptídeos para que houvesse uso racional dos recursos, bem como agilidade na pesquisa, para isso foi escolhida a concentração C2, tendo em vista que há a descrição na literatura de concentrações semelhantes de peptídeos sem apresentar efeitos citotóxicos em Vero E6 (FERNANDES et al., 2013).

4.2 Estímulo de Células Mononucleares do Sangue periférico (PBMCs)

4.2.1 Viabilidade celular de PBMCs

Os dados dessa análise se encontram no Gráfico 3. Nessa etapa, com o teste pelas células de dois voluntários, devido à limitação de reagentes, foi verificado que os peptídeos não eram tóxicos para PBMC, devido à manutenção da viabilidade celular obtida no controle positivo em todas as etapas (24, 48, 72 e 96 horas).

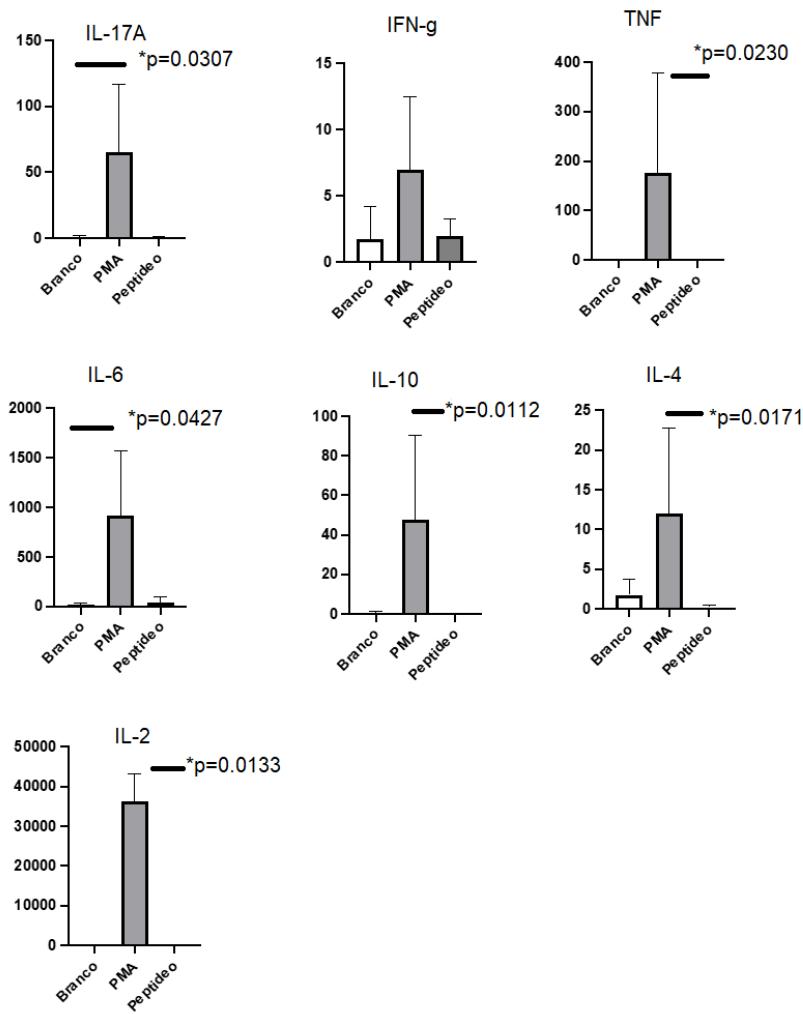


4.2.2 Avaliação da resposta imune celular – Perfil de Citocinas

A avaliação da resposta imune celular foi realizada em sobrenadante de cultura

de PBMCs de voluntários vacinados para COVID-19 e estimulados com nossa sequência proteica na concentração C2. Adicionalmente, uma combinação de PMA e Ionomicina (PMA+IONO) foi utilizada como estímulo ativador para induzir a expressão de citocinas conforme relatado na literatura, uma vez que pode potencialmente ativar todas as células T independentemente de seus receptores específicos do antígeno (GODOY-RAMIREZ et al., 2004). Os resultados obtidos dessas dosagens foram compilados e apresentados na figura 2.

Figura 2: Perfil de citocinas em sobrenadante de cultura de PBMC de voluntários após estimulação



Teste de Kruskal Wallis, post-hoc de Dunn.
Fonte: autoria própria, 2023

Nossos resultados revelaram que houve baixa estimulação da produção de citocinas nos sobrenadantes de culturas avaliados nas condições do experimento. Esses achados sugerem que nossas sequências peptídicas não desenvolveram uma

reação de produção de citocinas de forma exagerada que possa denotar síndrome tóxica ou tempestade de citocinas semelhante àquela observada durante a evolução grave da COVID-19 (CHEN et al., 2020b). Adicionalmente, percebe-se produção da citocina IFN- γ induzida pelo pool peptídico. Esses resultados preliminares apontam para uma resposta imune celular contra patógenos intracelulares como ocorre nas infecções virais, favorecendo um perfil de caráter Th1. Embora, incipientes, são resultados que corroboram com achados similares visualizados no desenvolvimento de outros imunizantes contra o SARS-CoV2, como a BNT162b2, que indica um perfil Th1 favorável (SAHIN et al., 2020) e a ChAdOx 1 nCoV-19 (Oxford-AstraZenecaTM), que induz uma resposta tendenciosa para Th1 caracterizada por secreção da citocina IFN- γ (EWER et al., 2020).

Além disso, houve baixa produção da citocina IL-6 e praticamente nenhuma produção da IL-10 pelo estímulo específico, dados que corroboram com àqueles descritos para a vacina BNT162b2 (PfizerTM), que induziu uma menor produção de IL-10 e IL-6 quando comparada à infecção natural por SARS-CoV-2 (PONCIANO-GÓMEZ et al., 2022). Este fato é uma das grandes preocupações no desenvolvimento dos imunizantes, visto que a citocina IL-6 é descrita como uma forte influenciadora da síndrome de ativação macrofágica presente nos casos graves da COVID-19 (PACES et al., 2020; MCGONAGLE; SHARIF; OREGAN; BRIDGEWOOD, 2020). Por outro lado, a citocina IL-10 é conhecida como moduladora imunológica (PONCIANO-GÓMEZ et al., 2022). Rodda et al. (2022) verificaram expressão de IFN- γ e IL-10 em indivíduos previamente infectados pelo vírus e posteriormente imunizados para SARS-CoV2, considerados indivíduos de imunidade híbrida pois vacinação. Nesse estudo, embora o IFN- γ estivesse estimulado, não observamos produção da citocina IL-10.

Desta forma, embora incipientes, e ainda com o projeto maior em desenvolvimento, esses achados vêm sinalizando positivamente para validação dessas sequências antigênicas. O aumento do nosso n-amostral e outras condições experimentais de associação peptídica com moléculas adjuvantes e realização de ensaios *in vivo* podem ratificar os achados preliminares deste estudo.

5. CONCLUSÃO

Ensaios de biocompatibilidade em células Vero E6 e em células mononucleares do sangue periférico – PBMC revelaram que as sequências peptídicas do SARS-CoV2 avaliadas neste trabalho, não apresentaram citotoxicidade em todas as três concentrações testadas, reproduzindo uma boa avaliação de segurança do ensaio.

Adicionalmente, a avaliação do perfil de citocinas dosadas em sobrenadante de cultura de PBMC de voluntários imunizados e/ou infectados para o SARS-CoV2, sob estimulação antigênica em uma concentração atribuída com C2, revelou baixa produção de citocinas. Contudo, o estímulo específico revelou indução da citocina IFN- γ , sinalizada entre todos os ensaios vacinais desenvolvidos contra COVID-19, como a mediadora da resposta imune celular direcionada e requerida para uma boa imunização em infecções virais.

Assim, embora preliminares, esses achados vêm encorajando nosso grupo de pesquisa na ampliação da testagem dessas sequências antigênicas, ampliando o n amostral dos ensaios *in vitro* e realizando etapas de imunização *in vivo* visando a validação desses peptídeos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 8a Ed, São Paulo: Elsevier, 2015.
- BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE (Brasil). **Descritores em Ciências da saúde**. 2023. Disponível em: <https://decs.bvsalud.org/ths/resource/?id=19375#Concepts>. Acesso em: 11 ago. 2023.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE; SAÚDE, S. DE V. EM. **Plano Nacional de Operacionalização da Vacinação contra a COVID-19**, Brasília/DF, 2022a.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. . **Novos lotes: mais 2,8 milhões de vacinas Covid-19 bivalentes chegaram ao Brasil**. 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/dezembro/novos-lotes-mais-2-8-milhoes-de-vacinas-covid-19-bivalentes-chegaram-ao-brasil>. Acesso em: 11 ago. 2023.
- CHEN, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **Lancet**, v 395, p 507–513, 2020a.
- CHEN, Guang; WU, Di; GUO, Wei; CAO, Yong; HUANG, Da; WANG, Hongwu; WANG, Tao; ZHANG, Xiaoyun; CHEN, Huilong; YU, Haijing. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 130, n. 5, p. 2620-2629, 13 abr. 2020b. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci137244>.
- DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: A server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 1–7, 2007.
- DHANDA, S. K.; VIR, P.; RAGHAVA, G. P. S. Designing of interferon-gamma inducing MHC class-II binders. **Biology Direct**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2013.
- DHOLARIA, B. R.; BACHMEIER, C.; LOCKE, F. Mechanisms and management of chimeric antigen receptor T-cell therapy related toxicities. **BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther**, v 33, p 45–60, 2019.
- DU, L. et al. The spike protein of SARS-CoV - A target for vaccine and therapeutic development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 226–236, 2009.
- Ewer, KJ, Barrett, JR, Belij-Rammerstorfer, S. et al. Respostas de células T e anticorpos induzidas por uma dose única da vacina ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) em um ensaio clínico de fase 1/2. **Nature Med** 27 , 270–278 ,2021. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01194-5>
- FERNANDES, M. H. V. Evaluation of the cytotoxicity of the antimicrobial p34 peptide. **Sci. Anim. Health.**, v1, n1, pp 01-09, 2013.
- GU, H. et al. Probable Transmission of SARS-CoV-2 Omicron Variant in Quarantine Hotel, Hong Kong, China, November 2021. **Emerg Infect Dis.**, v 28, n 2, p 460-462, 2022.
- HU, B. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 1, 1 mar. 2021.
- HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet Lond Engl**, v 395, p 497–506, 2020.
- Li, et al. "Down-Regulation of Colonic ACE2 Expression in Patients With Inflammatory Bowel Disease Responding to Anti-TNF Therapy: Implications for COVID-19." **Frontiers in medicine** vol. 7 613475.

12 Jan. 2021, doi:10.3389/fmed.2020.613475

Maes, et al. "Treatment of severely ill COVID-19 patients with anti-interleukin drugs (COV-AID): A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial." **Trials** vol. 21, 1 468. 3 2020, doi:10.1186/s13063-020-04453-5

PACES, J. et al. COVID-19 e o sistema imunológico. **Physiol. Res.**, Praga, n. 69, p. 379-388, 29 maio 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32469225/>. Acesso em: 30 ago. 2023.

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, 1 fev. 2022.

MCGONAGLE, Dennis; SHARIF, Kassem; O'REGAN, Anthony; BRIDGEWOOD, Charlie. The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation PAES, Â. T.. Itens essenciais em bioestatística. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 71, n. 4, p. 575–580, out. 1998.

Syndrome-Like Disease. **Autoimmunity Reviews**, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 102537, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102537>.

MOHAMMED, I. et al. The efficacy and effectiveness of the COVID-19 vaccines in reducing infection, severity, hospitalization, and mortality: a systematic review. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 18, n. 1, 2022.

Ponciano-Gómez, Alberto et al. "High baseline expression of IL-6 and IL-10 decreased CCR7 B cells in individuals with previous SARS-CoV-2 infection during BNT162b2 vaccination." **Frontiers in immunology** vol. 13 946770. 16 2022, doi:10.3389/fimmu.2022.946770

RODDA, Lauren B.; MORAWSKI, Peter A.; PRUNER, Kurt B.; FAHNING, Mitchell L.; HOWARD, Christian A.; FRANKO, Nicholas; LOGUE, Jennifer; EGGENBERGER, Julie; STOKES, Caleb; GOLEZ, Inah. Imprinted SARS-CoV-2-specific memory lymphocytes define hybrid immunity. **Cell**, [S.L.], v. 185, n. 9, p. 1588-1601, abr. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2022.03.018>.

Sahin, U., Muik, A., Derhovanessian, E. et al. A vacina COVID-19 BNT162b1 provoca respostas de anticorpos humanos e células T _H1. **Nature** 586, 594–599, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2814-7>

WANG, Y. et al. Resistance of SARS-CoV-2 Omicron variant to convalescent and CoronaVac vaccine plasma. **Emerging Microbes & Infections**, v. 11, n. 1, p. 424–427, 2022.

WHO. **Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus [nCoV] infection is suspected**. Disponível em: <[https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-\[ncov\]-infection-is-suspected](https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-[ncov]-infection-is-suspected)>. Acesso em: 06 de abril de 2020.

WHO. **Updated working definitions and primary actions for SARS-CoV-2 variants**, 15 March 2023. 15 de março de 2023. (Disponível em <https://www.who.int/publications/m/item/updated-working-definitions-and-primary-actions-for--sars-cov-2-variants>).

Wu, W., Dietze, KK, Gibbert, K., Lang, KS, Trilling, M., Yan, H., et al. (2015). A IL-6 induzida pelo ligante de TLR contra-regula a resposta antiviral das células T CD8 (+) durante uma infecção aguda por retrovírus. **Ciência. Rep.** 5:10501. doi: 10.1038/srep10501

ZAKI, A. M. et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 19, p. 1814–1820, 2012.

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação in silico de epítópos constituintes das proteínas estruturais e não estruturais que compõem o SARS-CoV-2 capazes de estimular as células T e B e avaliação da resposta imune in vitro e in vivo dos epítópos candidatos a vacina multiepítópos

Pesquisador: Joelma Rodrigues de Souza

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 37475820.7.0000.5188

Instituição Proponente: Centro de Ciência da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.563.921

Apresentação do Projeto:

Estudo que tenta estabelecer conhecimentos inéditos sobre o desenvolvimento de uma vacina baseado em epítópos múltiplos, seu uso na produção de imunogênicos para o desenvolvimento de kits de diagnóstico de baixo custo e alta eficiência, aumentando o conhecimento quanto às sequências patogênicas de maior virulência e adaptação da biologia viral, contribuindo com o desenvolvimento de agentes anti virais específicos contra o SARS-CoV-2 e de uma vacina baseada em multiepítópos. Tem a parte experimental com camundongos e com humanos voluntários sadios e recuperados da COVID-19.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Identificar in silico epítópos a partir das proteínas estruturais e não estruturais que compõem o SARS-CoV-2 capazes de estimular as células T e B e avaliar a resposta imune in vitro e in vivo dos epítópos candidatos para uma vacina multiepítópos. Objetivo Secundário: - Mapear in silico epítópos imunodominantes derivados das proteínas estruturais e não estruturais do SARS-CoV-2; - Construir sequência de múltiplos-epítópos da estrutura molecular vacinal; - Clonar in silico a estrutura proposta; - Realizar a expressão do multiepítópo recombinante; - Avaliar in vitro a resposta imune e a citotoxicidade do multiepítópo recombinante; - Analisar quantitativamente e qualitativamente os anticorpos presentes no plasma convalescente de

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 4.563.921

pacientes

recuperados da COVID-19;- Avaliar as respostas imunes humorais e celulares induzidas com o multiepítopo em camundongos BALB/c;- Avaliar alterações macro e microscópicas de órgãos de camundongos BALB/c imunizados com o multiepítopo recombinante; - Realizar ensaio de funcionalidade de anticorpos gerados em camundongos BALB/c imunizados com o multiepítopo recombinante.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Realizada

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Viável

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados conforme a resolução 466/12

Recomendações:

Vide conclusões

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa pode ser iniciada

Considerações Finais a critério do CEP:

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou a execução do referido projeto de pesquisa. Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à submissão do Relatório Final na Plataforma Brasil, via Notificação, para fins de apreciação e aprovação por este egrégio Comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJECTO_1626336.pdf	23/12/2020 15:09:58		Aceito
Outros	Carta_anuencia_ANA_Lourdes_CEP_COVID.pdf	23/12/2020 15:08:35	Joelma Rodrigues de Souza	Aceito

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA -
CCS/UFPB**



Continuação do Parecer: 4.563.921

Recurso Anexado pelo Pesquisador	Resposta_PARECER_CEP_PPSUS_2020_versao2.pdf	23/12/2020 15:07:43	Joelma Rodrigues de Souza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_vacina_CEP_UFPB_corrigido_submetido23_12_2020.pdf	23/12/2020 15:02:41	Joelma Rodrigues de Souza	Aceito
Outros	ficha_clinica_COVID_CEP.pdf	06/11/2020 21:33:00	Joelma Rodrigues de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CEP_VAcina.pdf	06/11/2020 21:30:41	Joelma Rodrigues de Souza	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_CEP_VACINAS.pdf	07/09/2020 22:40:07	Joelma Rodrigues de Souza	Aceito
Outros	Certidao_DFP_VACINA.pdf	07/09/2020 21:05:45	Joelma Rodrigues de Souza	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 27 de Fevereiro de 2021

Assinado por:
Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador(a))

Endereço: UNIVERSITARIO S/N

Bairro: CASTELO BRANCO

CEP: 58.051-900

UF: PB

Município: JOAO PESSOA

Telefone: (83)3216-7791

Fax: (83)3216-7791

E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br