



Roteiro de aula prática – Módulo II – 03/05/2024

RCB0300 – Tópicos em Biotecnologia III

Nome: _____ N° USP: _____

Objetivo gerais: Montar uma sequência de nucleotídeos para o desenvolvimento de uma potencial vacina de mRNA contra a Covid-19 (COronaVirus Disease 2019).

Introdução: O sucesso do desenvolvimento de uma vacina antiviral depende do conhecimento de conceitos básicos sobre a imunidade viral, conforme descrito abaixo:

Imunidade aos vírus: (retirado de Abbas, Lichtamn e Pilai, 2019 – Imunologia Celular e Molecular - 9ª Edição.

Os vírus são microorganismos intracelulares obrigatórios que usam componentes do ácido nucleico e a maquinaria de síntese proteica do hospedeiro para se replicar. Os vírus tipicamente infectam vários tipos celulares, por endocitose mediada por receptor, após a ligação a molécula de superfícies normais. Os vírus podem causar lesão tecidual e doença por diversos mecanismos.

A replicação viral interfere na síntese proteica e na função celular normal, leva à lesão e, por fim, à morte da célula infectada. Esse resultado é um tipo de efeito citopático dos vírus, e a infecção é dita lítica porque a célula infectada é lisada.

Os vírus podem estimular respostas inflamatórias que causam danos nos tecidos. Os vírus podem também causar infecções latentes. As respostas imunes inata e adaptativa aos vírus são destinadas a bloquear a infecção e a eliminar células infectadas (Figura 1).

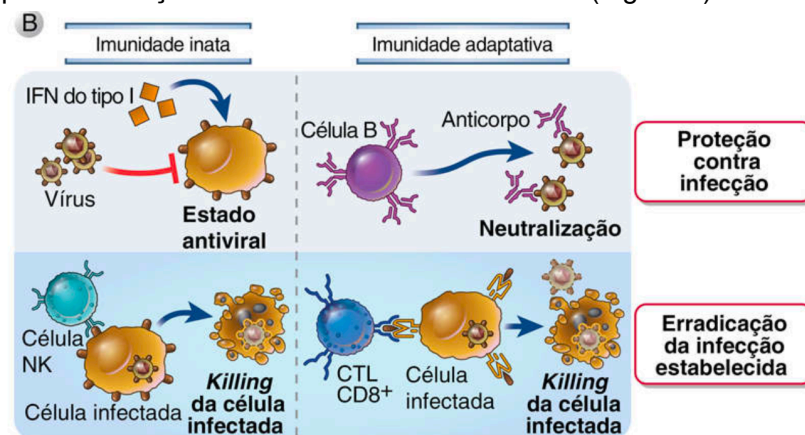


Figura 1.B. Mecanismos pelos quais a imunidade inata e adaptativa previnem e erradicam as infecções virais. A imunidade inata é mediada por IFN do tipo I, que previne a infecção, e células NK, que eliminam células infectadas. A imunidade adaptativa é mediada por anticorpos e CTLs, que bloqueiam a infecção e matam as células infectadas, respectivamente.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



Imunidade inata aos vírus:

Os principais mecanismos da **imunidade inata contra vírus** são: 1) a *inibição da infecção por interferons do tipo I* e 2) o *killing* das células infectadas mediado por células NK. A infecção por muitos vírus está associada à produção de interferons (IFNs) do tipo I pelas células infectadas, bem como por células dendríticas, especialmente do tipo plasmacitoide, em resposta aos produtos virais.

Diversas vias bioquímicas disparam a produção de IFN. Entre essas vias, estão o *reconhecimento de RNA e DNA viral por TLRs endossômicos* e a *ativação de receptores tipo RIG citoplasmáticos, bem como da via STING, pelo RNA e DNA viral, respectivamente*. Essas vias convergem na ativação de proteínas quinases que, por sua vez, ativam fatores de transcrição IRF, que estimulam a transcrição do gene de IFN. Os IFNs do tipo I atuam inibindo a replicação viral tanto em células infectadas como em células não infectadas.

As células NK matam células infectadas por vírus e constituem um importante mecanismo de imunidade contra vírus no início do curso da infecção, antes de as respostas imunes adaptativas terem se desenvolvido. A expressão de *MHC de classe I frequentemente é “desligada” nas células infectadas por vírus*, como um mecanismo para escapar dos CTLs. Isso permite que as células NK matem as células infectadas, uma vez que a ausência de classe I libera as células NK de um estado normal de inibição.

Imunidade adaptativa aos vírus:

A *imunidade adaptativa contra infecções virais é mediada por anticorpos*, os quais bloqueiam a ligação e a entrada do vírus nas células hospedeiras, e por **CTLs**, que eliminam a infecção destruindo as células infectadas (Fig. 1). Os anticorpos mais efetivos são anticorpos de alta afinidade produzidos nas reações de centros germinativos T-dependentes (Capítulo 12, *Abbas et al 2019*). Os anticorpos são efetivos contra os vírus somente durante o estágio extracelular das vidas desses microrganismos. Os vírus podem ser extracelulares antes de infectarem as células hospedeiras, ou quando são liberados das células infectadas por brotamento viral ou com a morte das células infectadas.

Os anticorpos antivirais se ligam ao envelope viral ou aos antígenos do capsídeo e atuam principalmente como anticorpos neutralizadores, para prevenir a fixação e entrada dos vírus nas células hospedeiras. Assim, os *anticorpos previnem tanto a infecção inicial como a disseminação célula à célula*. Os anticorpos secretados, especialmente do **isotipo IgA**, são importantes para *neutralizar os vírus juntos aos tratos respiratório e intestinal. A imunização oral contra o poliovírus funciona induzindo a imunidade de mucosa*. Além da neutralização, os anticorpos podem opsonizar partículas virais e promover sua eliminação pelos fagócitos. A ativação do complemento também pode participar na imunidade viral mediada por anticorpo, principalmente via promoção de fagocitose e, possivelmente, pela lise direta dos vírus contendo envelopes lipídicos.

A importância da imunidade humoral na defesa contra infecções virais é sustentada pela observação de que a resistência a um vírus particular, induzida por infecção ou vacinação, costuma ser específica para o tipo sorológico (anticorpo-definido) do vírus. Um exemplo é o vírus influenza, em que a exposição a um tipo sorológico não confere resistência aos outros sorotipos do vírus. Os anticorpos neutralizantes bloqueiam a infecção viral das células e a disseminação viral célula à célula, entretanto, depois que os vírus entram e passam a se replicar no meio intracelular, tornam-se



inacessíveis aos anticorpos. Portanto, **a imunidade humoral induzida por infecção prévia ou vacinação é capaz de conferir proteção aos indivíduos a partir da infecção viral, mas por si só não consegue erradicar uma infecção estabelecida.**

A eliminação de vírus residentes nas células é mediada por CTLs que matam as células infectadas. Conforme mencionamos nos capítulos anteriores, a principal função fisiológica dos CTLs é a vigilância contra a infecção viral. A maioria dos CTLs vírus-específicos são células T CD8+ que reconhecem peptídeos virais citosólicos, em geral sintetizados endogenamente, apresentados por moléculas de MHC classe I. Se a célula infectada for uma célula tecidual e não uma célula apresentadora de antígeno (APC, do inglês, antigen-presenting cell), como uma célula dendrítica, a célula infectada pode ser fagocitada pela célula dendrítica que processa os antígenos virais e os apresenta às células T CD8+ naive. A diferenciação integral dos CTLs CD8+ muitas vezes requer citocinas produzidas por células auxiliares CD4+ ou coestimuladores expressos em células infectadas. As células T CD8 sofrem uma intensa proliferação durante a infecção viral, e a maioria das células que proliferaram são específicas para alguns peptídeos virais. Algumas células T ativadas se diferenciam em CTLs efetores capazes de destruir qualquer célula nucleada infectada. Os efeitos antivirais dos CTLs são devidos principalmente ao killing das células infectadas, porém outros mecanismos são a ativação de nucleases nas células infectadas, as quais degradam os genomas virais, e também à secreção de citocinas, como o IFN- γ , que ativa fagócitos e pode ter alguma atividade antiviral.

Muitas linhas de evidência experimentais e clínicas sustentam a importância dos CTLs na defesa contra a infecção viral. A suscetibilidade a essas infecções é aumentada em pacientes e animais deficientes de linfócitos T. Experimentalmente, camundongos podem ser protegidos contra algumas infecções virais por meio da transferência adotiva de CTLs vírus-específicos restritos à classe I. Os vírus desenvolveram numerosas estratégias para escapar ao ataque dos CTLs CD8+. Entre estas, estão o bloqueio do processamento e apresentação de antígenos pela via do MHC de classe I e o desligamento das respostas de célula T CD8+ pela indução do fenômeno de exaustão. Esses mecanismos de evasão são discutidos adiante, neste capítulo.

Esses conceitos formam a base da vacinação e dados da literatura mostraram que a proteína spike de SARS-CoV-2 é capaz de ativar tanto a resposta humoral como a resposta CTL e T-auxiliar.

Mediante essa revisão, temos agora os objetivos da presente aula prática

Nessa primeira aula prática os objetivos são:

- 1- Criar uma conta no GISAID - gisaid.org e conhecer a riqueza desse banco de dados de genomas virais;
- 2 – Ter conhecimento dos códigos dos genomas virais do SARS-CoV-2 original (Wuhan – depositado no Gisaid sob número: EPI_ISL_402124) e a linhagem/ cepa atual mais prevalente JN.1.1 (depositado no Gisaid sob número: EPI_ISL_18492450);
3. Por meio do documento *Gisaid_Linhagem Original* obter informações oficiais do vírus SARS-CoV-2 original e seu tamanho original;



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



4. Por meio do documento *Gisaid Linhagem Atual* obter informações oficiais da cepa viral atual. Conhecer o número de mutações missense e indel e o tamanho de seu genoma;ds
5. Criar um documento do word contendo a sequência do genoma completo do vírus original. E conhecer dois pontos importantes: formatar o documento com *margens estreitas* e utilizar a **fonte courier new e tamanho 10**. Lembre-se, sempre que trabalhamos com sequências de DNA ou RNA a fonte utilizada é a courier new.
6. Criar um documento do word contendo a sequência do genoma completo da linhagem viral atual;
7. Acessar o documento que contém a proteína spike do vírus original e por meio de **editar e localizar, no documento contendo o genoma viral original completo** identificar onde começa e onde termina o gene da proteína spike. **Anotar em azul**.
8. Acessar o documento que contém a proteína spike do vírus original e por meio de **editar e localizar, no documento contendo o genoma viral atual completo** identificar onde começa e onde termina o gene da proteína spike. **Anotar em azul**.
9. Criar um documento do word contendo a sequência de cDNA do gene que codifica a proteína spike do vírus original;
10. Criar um documento do word contendo a sequência de cDNA do gene que codifica a proteína spike do linhagem viral atual;
11. Utilizar o site **Primer show** (https://www.bioinformatics.org/sms/primer_show.html) e realizar a tradução da proteína spike do vírus SARS-CoV-2 original e localizar as posições em que foram realizadas as duas mutações missense das vacinas de mRNA da Pfizer e da Moderna;
12. Utilizar o site **Primer show** (https://www.bioinformatics.org/sms/primer_show.html) e realizar a tradução da proteína spike da linhagem viral atual e localizar as posições em que foram realizadas as duas mutações missense das vacinas de mRNA da Pfizer e da Moderna;
13. Ter o documento do word com o cDNA da proteína spike do vírus original e contendo as duas mutações missense nas posições **K986P e V987P**
14. Ter o documento do word com o cDNA da proteína spike da linhagem viral atual e contendo as duas mutações missense nas posições **K9862P e V983P**.