

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

NATÁLIA CRISTINA DE MELO SANTOS

**ABORDAGEM RACIONAL DE IMUNOINFORMÁTICA PARA O
DESENVOLVIMENTO DE CANDIDATOS VACINAIS MULTIEPÍTOPOS DO
SARS-COV-2 E MPOX VÍRUS**

ALFENAS/MG

2024

NATÁLIA CRISTINA DE MELO SANTOS

**ABORDAGEM RACIONAL DE IMUNOINFORMÁTICA PARA O
DESENVOLVIMENTO DE CANDIDATOS VACINAIS MULTIEPÍTOPOS DO
SARS-COV-2 E MPOX VÍRUS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Santos, Natália Cristina de Melo .

Abordagem racional de imunoinformática para o desenvolvimento de candidatos vacinais multiepítopos do SARS-CoV-2 e Mpox vírus / Natália Cristina de Melo Santos. - Alfenas, MG, 2024.

61 f. : il. -

Orientador(a): Leonardo Augusto de Almeida.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Monkeypox. 2. Vacinologia Reversa. 3. Multi-epítoto. 4. COVID-19. I. Almeida, Leonardo Augusto de, orient. II. Título.

NATÁLIA CRISTINA DE MELO SANTOS

**ABORDAGEM RACIONAL DE IMUNOINFORMÁTICA PARA O DESENVOLVIMENTO DE
CANDIDATOS VACINAIS MULTIEPÍTOPOS DO SARS-COV-2 E MPOX VÍRUS**

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro.

Aprovada em: 28 de fevereiro de 2024.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Dra. Thaís Cristina Ferreira dos Santos

Instituição: Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM

Prof. Dr. Flávio Protásio Veras

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Augusto de Almeida, Professor do Magistério Superior**, em 28/02/2024, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1196921** e o código CRC **2E103394**.

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo, por me conceder a vida e pelas pessoas que fazem parte dela.

Aos meus pais, Carlos José Ferreira dos Santos e Márcia Regina de Melo Santos, por serem pais tão maravilhosos. Obrigada por sempre estarem comigo, por todo apoio e por serem exatamente como vocês são.

Aos meus avós, irmãos, tios e primos, pelo apoio.

Ao meu orientador Professor Leonardo Augusto de Almeida, por todos esses anos de orientação, com muita paciência e atenção. Obrigada por cada conhecimento passado e por cada puxão de orelha.

Ao meu filho de quatro patas Dudu, por ser meu companheiro de todas as horas.

Ao meu amigo e colega de laboratório Leonardo Pereira de Araújo, por toda paciência e ensinamentos.

A todos meus amigos que sempre estiveram comigo, deixando minha vida mais leve e cheia de alegria.

Ao meu namorado Thalles Maranesi Pereira por ser tão paciente e companheiro. Obrigada por deixar tudo mais fácil.

À Universidade Federal de Alfenas, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

As doenças emergentes e reemergentes simbolizam uma ameaça crescente à saúde global, influenciadas por fatores como globalização, mudanças climáticas e interações humanas com animais. A pandemia de COVID-19 é um exemplo recente que evidencia a ameaça crescente dessas doenças à saúde pública global, enfatizando a necessidade de estratégias eficazes para lidar com doenças zoonóticas, como o recente surto reemergente da varíola dos macacos. A vacinação é uma das abordagens mais eficazes para a proteção contra doenças infecciosas. No entanto, o desenvolvimento de vacinas é um procedimento complexo e demorado, mas que pode ser otimizado empregando a vacinologia reversa, que utiliza técnicas *in silico* para identificação e escolha de antígenos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi desenvolver potenciais candidatos vacinais para a COVID-19 e a varíola dos macacos. O trabalho está estruturado em dois capítulos, com o primeiro abordando a construção de proteínas quiméricas utilizando epítomos do vírus SARS-CoV-2, e o segundo na construção de uma proteína quimérica com epítomos obtidos por meio de abordagem imunoinformática para o vírus Mpox. As proteínas obtidas demonstraram estabilidade, antigenicidade e ausência de potenciais riscos alergênicos. Além disso, por meio de simulações de acoplamento molecular, observou-se que essas proteínas são capazes de interagir com receptores do sistema imunológico, sendo que as simulações imunes indicaram a capacidade de desencadear respostas imunológicas significativas. Embora os resultados sejam promissores, são necessários testes adicionais *in vitro* e *in vivo* para consolidar e validar essas descobertas antes de avançar para ensaios clínicos em humanos. Dessa forma, esse trabalho contribui para a compreensão e potencial combate a doenças infecciosas emergentes e reemergentes, destacando a importância da vacinologia reversa como uma abordagem ágil e promissora no desenvolvimento de vacinas.

Palavras-chave: Monkeypox; Vacinologia Reversa; Multi-epítopo; COVID-19

ABSTRACT

Emerging and re-emerging diseases symbolize a growing threat to global health, influenced by factors such as globalization, climate change and human interactions with animals. The COVID-19 pandemic is a recent example that highlights the growing threat of these diseases to global public health, emphasizing the need for effective strategies to deal with zoonotic diseases, such as the recent re-emerging outbreak of monkeypox. Vaccination is one of the most effective approaches to protecting against infectious diseases. However, vaccine development is a complex and time-consuming procedure, but it can be optimized using reverse vaccinology, which uses *in silico* techniques to identify and choose antigens. Therefore, the objective of this work was to develop potential vaccine candidates for COVID-19 and monkeypox. The work is structured into two chapters, with the first addressing the construction of chimeric proteins using epitopes from the SARS-CoV-2 virus, and the second on the construction of a chimeric protein with epitopes obtained through an immunoinformatics approach for the Mpox virus. The proteins demonstrated safety, antigenicity and absence of potential allergenic risks. Furthermore, through molecular protection simulations, it was proven that these proteins are capable of interacting with immune system receptors, and immunological simulations indicated the ability to trigger significant immune responses. Although the results are promising, additional *in vitro* and *in vivo* testing is needed to consolidate and validate these findings before advancing to human clinical trials. In this way, this work contributes to the understanding and potential combat of emerging and re-emerging infectious diseases, highlighting the importance of reverse vaccinology as an agile and promising approach in vaccine development.

Keywords: Monkeypox; Reverse Vaccinology; Multi-epitope; COVID-19

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Ciclo de vida do coronavírus relacionado à SARS (SARS-CoV e SARS-CoV-2)..... | 14 |
| Figura 2 – Vias citosólicas do Mpox para o ciclo de vida viral..... | 17 |
| Figura 3 – Distribuição geográfica dos casos confirmados de varíola dos macacos durante o surto entre janeiro e setembro de 2022..... | 18 |
| Figura 4 – Sequências de aminoácidos das três proteínas quiméricas criadas, bem como o posicionamento dos epítopos e seus respectivos ligantes..... | 26 |
| Figura 5 – Resultado de similaridade e visualização 3D de modelagem molecular por homologia..... | 29 |
| Figura 6 – Valores de RMSD obtidos durante a dinâmica molecular de 60 ns das três proteínas quiméricas..... | 30 |
| Figura 7 – Valores de RMSF obtidos durante a dinâmica molecular de 60 ns das três proteínas quiméricas..... | 31 |
| Figura 8 – Diagrama 3D da conformação obtida após a dinâmica molecular das proteínas quiméricas..... | 31 |
| Figura 9 – Diagrama 3D dos resultados do acoplamento molecular das proteínas quiméricas com os TLRs..... | 33 |
| Figura 10 – Resultados da simulação imune para as três proteínas quiméricas..... | 35 |
| Figura 11 – Variantes da glicoproteína de superfície SARS-CoV-2..... | 36 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 9 |
| 2 | REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO | 12 |
| 2.1 | Doenças infecciosas emergentes e reemergentes | 12 |
| 2.2 | SARS-CoV-2 e a pandemia da COVID-19..... | 13 |
| 2.3 | Mpox e a varíola dos macacos: uma doença viral reemergente | 16 |
| 2.4 | Vacinologia reversa | 19 |
| 3 | JUSTIFICATIVA | 21 |
| 4 | CAPÍTULO 1 | 22 |
| 5 | OBJETIVOS | 23 |
| 5.1 | OBJETIVO GERAL | 23 |
| 5.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 23 |
| 6 | METODOLOGIA | 24 |
| 6.1 | Construção de proteína quimérica multiepítomos | 24 |
| 6.2 | Avaliação das propriedades antigênicas, alergênicas e físico-químicas | 24 |
| 6.3 | Modelagem molecular | 24 |
| 6.4 | Dinâmica molecular | 25 |
| 6.5 | Docking molecular..... | 25 |
| 6.6 | Simulação imune in silico da vacina..... | 25 |
| 7 | RESULTADOS | 26 |
| 7.1 | As três proteínas quiméricas apresentam alta antigenicidade, baixa alergenicidade e boa estabilidade | 26 |
| 7.2 | A modelagem tridimensional da vacina revelou altas predições para adjuvantes e ligantes, mas baixa eficácia na predição de alguns epítomos..... | 28 |
| 7.3 | Ligantes flexíveis conferiram maior mobilidade à proteína enquanto ligantes rígidos promoveram estabilidade | 29 |
| 7.4 | As três proteínas construídas demonstraram boa afinidade com receptores TLR2, TLR4 e TLR8 | 32 |
| 7.5 | As proteínas quiméricas exibiram aumento significativo de anticorpos IgM e IgG e da resposta imune celular via IFN- γ | 33 |
| 8 | DISCUSSÃO | 36 |
| 9 | CONCLUSÃO | 39 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 10 | CAPÍTULO 2 - ARTIGO: Immunoinformatic approach for rational identification of immunogenic peptides against host entry and/or exit monkeypox proteins and potential multi-epitope vaccine construction | 40 |
| 11 | CONCLUSÃO GERAL | 55 |
| | REFERENCIAS | 56 |

1 INTRODUÇÃO

Uma doença infecciosa emergente é aquela que surge pela primeira vez ou reaparece, aumentando rapidamente em número de casos ou se disseminando para novas áreas geográficas (Galindo-González, 2022). Os surtos de doenças infecciosas possuem um impacto significativo na formação das sociedades e culturas ao longo da história humana, como por exemplo, a gripe aviária, a síndrome respiratória aguda grave (SARS), a febre Ebola, a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) e a COVID-19 (Spernovasilis; Tsiodras; Poulakou, 2022; Wu; Li; Lu, 2022). Muitas dessas doenças emergentes e reemergentes são de origem zoonótica, sendo inicialmente identificadas em animais, se adaptando para o hospedeiro humano (Kalawat; Mohan, 2023).

Hoje em dia, a globalização e o fluxo internacional de viagens e do comércio de animais e de alimentos de origem animal aumentam ainda mais a propagação de doenças infecciosas e a velocidade com que elas são disseminadas pelo mundo (Piret; Boivin, 2022). Em muitos casos, a alteração do hábito alimentar, as mudanças climáticas e as operações humanas hostis ao meio ambiente influenciam o surgimento e o ressurgimento de muitas doenças zoonóticas devido ao aumento do contato entre humanos e animais selvagens (Rahman *et al*, 2020).

A pandemia de COVID-19 evidenciou que eventos de disseminação zoonótica representam uma ameaça cada vez mais significativa para a saúde pública global (Bambra, 2022; Rahman *et al*, 2020). A COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, já soma mais de seis milhões de óbitos no mundo de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2023). Este vírus é um membro do gênero *Coronaviridae*, um grupo de vírus de RNA de sentido positivo, envelopados, pleomórfico que contém peplômeros em forma de coroa e que se replicam no citoplasma (Muralidar *et al*, 2020; Sanyal, 2020). A patogênese da infecção por SARS-CoV-2 em humanos manifesta-se desde sintomas leves até insuficiência respiratória grave (Hu *et al*, 2022). No ano de 2022, durante a pandemia de COVID-19, o mundo se deparou com o desafio adicional de um surto reemergente da varíola dos macacos, causada pelo vírus Mpox (Yu; Shi; Cheng, 2023). Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2023) foram notificados mais de 90 mil casos no mundo. De acordo com Karagoz e colaboradores (2023), diferente do SARS-CoV-2, o vírus Mpox possui genoma de DNA de fita dupla (dsDNA), pertencendo ao gênero *Orthopoxvirus* e família *Poxviridae* (Harapan *et al*, 2022). Os sintomas típicos da varíola dos macacos incluem dores de cabeça e no corpo,

febre, calafrios, dor de garganta, mal-estar, fadiga, aumento dos gânglios linfáticos e erupção cutânea característica que se transforma em pápulas e vesículas que eventualmente formam crostas e cicatrizam (Kmiec; Kirchhoff, 2022). Além disso, o período de incubação da varíola dos macacos geralmente é de 7 a 14 dias, mas pode levar até 21 dias (Kumar *et al*, 2022).

O enfrentamento dessas doenças tem como objetivo a sua erradicação, sendo a vacinação um recurso fundamental para alcançar este propósito (Madhav *et al*, 2020). As vacinas desempenham um papel fundamental na proteção do hospedeiro contra doenças infecciosas e reduziram significativamente a mortalidade (Afrough; Dowall; Hewson, 2019).

O desenvolvimento de vacinas consiste em um procedimento complexo e demorado, envolvendo fases de pesquisa, experimentação e aprovação regulamentar (Viviani; Willems; Pagliusi, 2022). A vacinologia reversa, empregando técnicas *in silico*, proporciona uma redução substancial no tempo e nos custos envolvidos na identificação e escolha da vacina. Além disso, essa abordagem possibilita a detecção de antígenos que podem ser desafiadores de identificar ou cultivar por meio de métodos convencionais (Monterrubio-López; Delgadillo-Gutiérrez, 2021)

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver potenciais candidatos vacinais para a COVID-19 e a varíola dos macacos, por meio da aplicação da abordagem da vacinologia reversa. Dessa forma, este trabalho foi estruturado em dois capítulos. O primeiro capítulo, aborda a construção de três proteína quimérica utilizando epítomos do vírus SARS-CoV-2 previamente descrito pelo nosso grupo. Já o segundo capítulo, concentra-se na construção de uma proteína quimérica em que os epítomos utilizados foram obtidos através de uma abordagem imunoinformática utilizando proteínas responsáveis pela entrada e saída do vírus Mpox no hospedeiro.

Em suma, os resultados expostos em ambos os capítulos evidenciam que as proteínas construídas exibem notável estabilidade, antigenicidade e ausência de potenciais riscos alergênicos. Adicionalmente, por meio de simulações de acoplamento molecular, constatou-se que essas proteínas são aptas a interagir com receptores do sistema imunológico, sendo que as simulações imunes indicaram a capacidade de acarretar respostas imunológicas significativas. Portanto, os candidatos vacinais apresentaram índices satisfatórios em todas as análises realizadas, embora se destaque a necessidade de conduzir testes adicionais, como *in vitro* e *in vivo*, com o objetivo de consolidar e validar essas descobertas promissoras.

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES E REEMERGENTES

Ao longo dos tempos, as doenças infecciosas emergentes e reemergentes têm desempenhado um papel importante nos surtos de enfermidades infecciosas que afetam a humanidade (Spernovasilis *et al*, 2022; Piret; Boivin, 2022). Nos últimos 20 anos, doenças infecciosas emergentes, como a gripe aviária H5N1, gripe aviária H7N9, síndrome respiratória aguda grave (SARS), febre Ebola, síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) e a COVID-19 representaram ameaças à saúde humana e ao desenvolvimento econômico global (Wu; Li; Lu, 2022).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma doença infecciosa emergente é aquela que surge e afeta uma população pela primeira vez ou reaparece de forma intensa, tanto em termos de novos casos, quanto na disseminação para novas áreas. Também estão incluídas nesse grupo as doenças que já foram controladas, mas estão ressurgindo com números crescentes, sendo que as vezes, uma doença considerada como antiga pode retornar com uma forma clínica grave ou fatal, sendo chamada de doença reemergente. A maioria desses patógenos permanecem inativos no ambiente até encontrarem condições favoráveis para emergir ou evoluírem a partir de um organismo progenitor, adaptando-se às condições predominantes, havendo uma complexa interação entre o ambiente, o clima, a vida selvagem e a existência e estilo de vida humanos (Williamson; Westlake, 2019).

Além disso, muitas doenças emergentes e reemergentes são de origem zoonótica, o que significa que a doença emergiu de um animal e atravessou a barreira da espécie para infectar humanos (Usha; Alladi, 2023). De acordo com Rahman e colaboradores (2020), a relação entre mudanças nos hábitos alimentares, alterações climáticas e atividades humanas prejudiciais ao meio ambiente é fundamental no surgimento e ressurgimento de doenças zoonóticas, aumentando o contato entre humanos e animais selvagens, sendo a pandemia de COVID-19 um evidente exemplo do impacto devastador dessas zoonoses na população humana.

Apesar do sucesso da vacinação na erradicação ou controle de alguns patógenos importantes, vários desafios permanecem no desenvolvimento e administração de vacinas (Mao; Chao, 2020). Patógenos emergentes e reemergentes apresentam uma necessidade premente de acelerar o desenvolvimento e a aprovação de vacinas como

uma resposta rápida a epidemias, como no caso da pandemia de COVID-19 causada pelo vírus SARS-CoV-2 (Brisse *et al*, 2020).

2.2 SARS-COV-2 E A PANDEMIA DA COVID-19

Em dezembro de 2019, Wuhan, localizada na província de Hubei, China, emergiu como o epicentro de um surto de pneumonia de etiologia desconhecida, gerando significativa preocupação não apenas dentro da China, mas também em nível internacional (WANG *et al*, 2020). Em 8 de janeiro de 2020, um novo coronavírus foi oficialmente anunciado como a causa do surto e foi nomeado de SARS-CoV-2 (Chams *et al*, 2020).

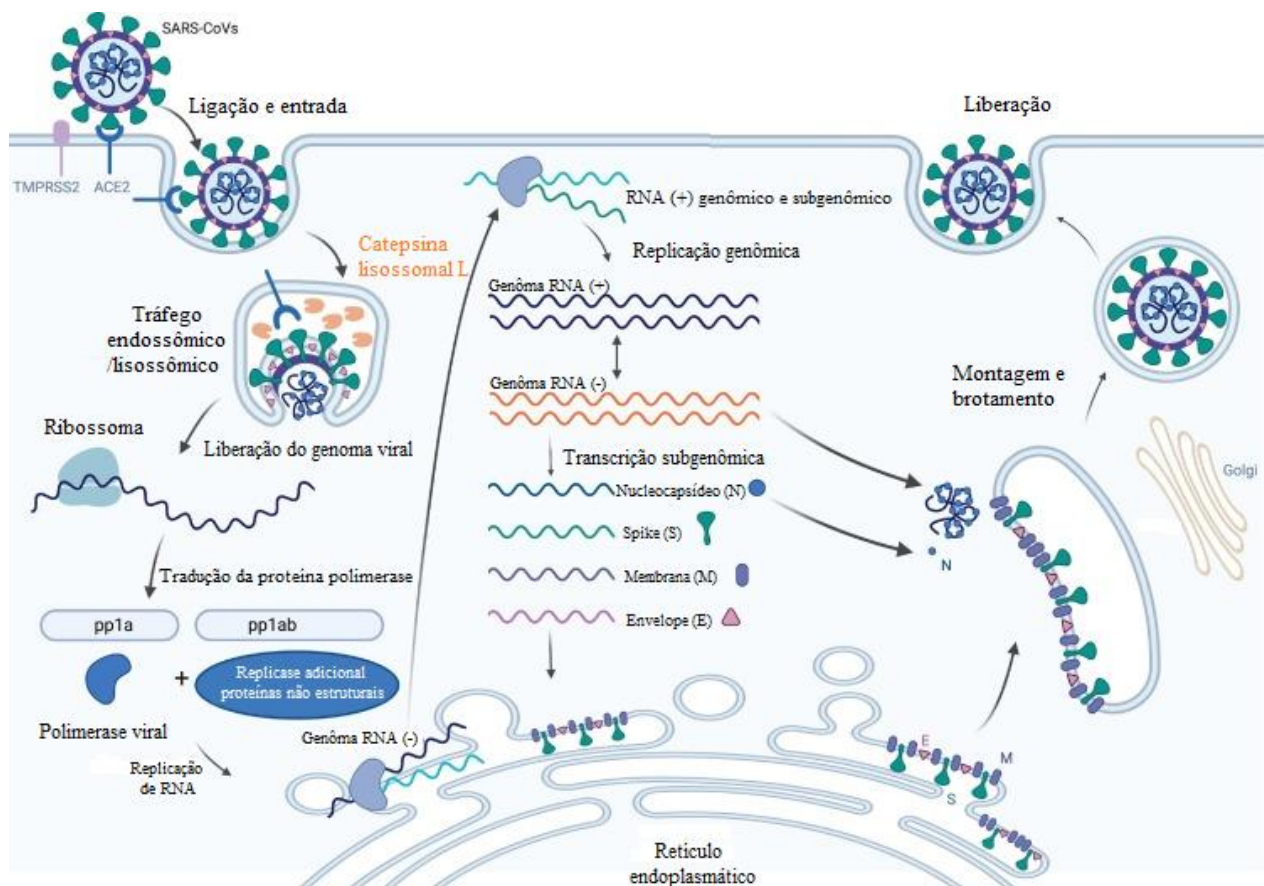
Este vírus pertence à família dos coronavírus (CoVs), uma família altamente diversificada de vírus de RNA de fita simples de sentido positivo e envelopados (V'kovski *et al*, 2021). O SARS-Cov-2 está associado à categoria betacoronavirus, possuindo diâmetro de cerca de 60–140 nm e uma característica estrutural única em suas superfícies que se assemelha a uma coroa solar, devido à presença de proteínas denominadas de *spike* na superfície do virion. (Bhat *et al*, 2021; Yang; Rao, 2021). A organização do seu genoma é compartilhada com outros betacoronavírus (Hu *et al*, 2021). Os dois terços iniciais do genoma coronavírus, na região 5' proximal, contêm o gene da replicase, codificando janelas de leitura abertas (*Open reading frames* - ORFs), como ORF1a e ORF1b, enquanto o terço restante na extremidade 3' é destinado a várias outras ORFs, como por exemplo, quatro ORFs que codificam proteínas estruturais do vírus como espícula ou *spike* (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N) (Hu *et al*, 2021; Wu *et al*, 2022; Zhou *et al*, 2020).

O modo de disseminação do SARS-CoV-2, mais comum, entre os humanos é através da tosse, espirro, inalação de gotículas, contato com mucosas orais, nasais e oculares (Umakanthan *et al*, 2020). O SARS-CoV-2 invade as células hospedeiras interagindo com receptores/co-receptores, como a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), e outros cofatores, por meio de sua proteína *spike* (S), essa interação medeia a fusão entre as membranas virais e celulares (Peng *et al*, 2021). A proteína *spike* é dividida em regiões S1 e S2, com S1 contendo o domínio de ligação ao receptor (RBD) e S2 contendo o domínio de fusão (Zabiegala; Kim; Chang, 2023). A ativação da proteína *spike* envolve a clivagem por várias proteases do hospedeiro, incluindo furina, tripsina, TMPRSS2 e catepsinas (Qiu *et al*, 2023). A presença de TMPRSS2 nas células-

alvo permite a entrada direta do SARS-CoV-2 através da fusão do envelope viral com a membrana celular, enquanto na ausência de TMPRSS2, o vírus entra nas células-alvo através de endossomas onde as catepsinas clivam a proteína *spike* (Ojha *et al*, 2023).

Após a entrada na célula hospedeira, o vírus libera seu genoma de RNA positivo de fita simples. Em seguida, o genoma viral é sintetizado por replicação genômica e as proteínas virais estruturais essenciais são produzidas (Li *et al*, 2020). A proteína N se liga ao RNA genômico, enquanto as proteínas S, M e E são integradas à membrana do retículo endoplasmático (RE); o nucleocapsídeo montado com RNA helicoidal torcido é encapsulado no lúmen RE, onde a progênie viral é transportada em direção à membrana plasmática da célula hospedeira e o vírus gerado é liberado por exocitose (Majumder; Minko, 2021).

Figura 1 – Ciclo de vida do coronavírus relacionado à SARS (SARS-CoV e SARS-



CoV-2)

Fonte: Adaptado de Harrison; Lin e Wang, 2020

A resposta imunológica contra vírus é conduzida principalmente por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como receptores Toll-Like (TLRs) que permitem

a detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) originados do vírus ou de seus intermediários de replicação, promovendo as cascatas iniciais de sinalização antiviral em resposta à infecção, incluindo a produção de citocinas inflamatórias (Molaei *et al*, 2021). A produção de citocinas pró-inflamatórias e a ativação de subconjuntos essenciais de células T, desempenhando um papel crucial no controle da replicação viral, na restrição da propagação do vírus, na modulação da inflamação e na eliminação de células infectadas (Li *et al*, 2020). No entanto, os casos graves de COVID-19 estão relacionados com a inflamação descontrolada, que resulta na liberação exacerbada de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que danificam gravemente os tecidos pulmonares, levando muitas vezes a morte do paciente (McCarthy, 2022; Mehta; Fajgenbaum, 2021). A patogênese da COVID-19 em humanos manifesta-se desde sintomas leves até insuficiência respiratória grave (Hu *et al*, 2021).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2023), atualmente possuem seis medicamentos aprovados para o tratamento da COVID-19. Remdesivir, Paxlovid e Molnupiravir são agentes antivirais, Sotrovimabe e Tocilizumabe são anticorpos monoclonais e Baricitinibe é um imunomodulador (ANVISA, 2023). As vacinas continuam sendo a melhor estratégia para reduzir o fardo da doença e adquirir com segurança proteção imunitária contra o SARS-CoV-2, prevenindo contra sintomas graves subsequentes (Mistry *et al*, 2022). Existem principalmente cinco tipos de vacina COVID-19 que têm sido usados para vacinação global, incluindo o vírus inteiro (inativado) - Sinopharm®/Beijing, CoronaVac®/Sinovac (BBIBP- CorV) e COVAXIN®/Bharat (BBV152), ácido nucleico (DNA e RNA) - COMIRNATY®/Pfizer BioNTech (BNT162b), SPIKEVAX®/Moderna (mRNA-1273), COMIRNATY®Original/Omicron BA.1 e BA.4-5, vetor viral (replicante e não replicante) - VAXZEVRIA®/Oxford–AstraZeneca (ChAdOx1 nCoV-19), COVISHIELD™/Oxford–AstraZeneca (ChAdOx1 nCoV-19), Janssen/Johnson & Johnson (Ad26.COV2.S) e CONVIDECIA/CanSino (Ad5-nCoV-S), subunidade proteica e vírus (vacinas de partículas (VLPs)) - NUVAXOVID™/Novavax (NVX-CoV2373) e COVOVAX™/Novavax (NVX-CoV2373) (Firouzabadi *et al*, 2023).

Além disso, os vírus de RNA apresentam taxas de mutação mais elevadas que os vírus de DNA (Villa *et al*, 2021), essas mutações podem ser vantajosas para um vírus, permitindo-lhe evadir do sistema imune do hospedeiro para se espalhar mais facilmente (Muhar *et al*, 2023). Sendo assim, o surgimento de novas variantes do SARS-CoV-2 é uma grande preocupação, pois seu aparecimento limita ainda mais o sucesso das vacinas

e da imunidade natural, uma vez que contêm alterações genômicas, particularmente nas regiões codificadoras da proteína S, que aumentam a sua aptidão às células do hospedeiro em comparação com estirpes anteriormente circulantes (Mistry *et al*, 2022). Dessa forma, com a redução da eficácia das vacinas comerciais será exigido o desenvolvimento de vacinas modificadas ou a administração de doses de reforço (McLean *et al*, 2022).

2.3 MPOX E A VARÍOLA DOS MACACOS: UMA DOENÇA VIRAL REEMERGENTE

O vírus Mpox ou monkeypox (MPX) é um membro de um subconjunto da família *Poxviridae* chamado *Orthopoxvirus*, agente etiológico da doença varíola dos macacos (Hatmal *et al*, 2022). Os ortopoxvírus são vírus de DNA de fita dupla envelopados com um genoma que codifica cerca de 200 genes e um tamanho de 180 a 220 pares de quilobases (Yu; Shi; Cheng, 2023). O ciclo de vida dos poxvírus é único entre os vírus de DNA, pois a replicação viral é restrita exclusivamente no citoplasma sem interferir no genoma do hospedeiro (Harapan *et al*, 2022).

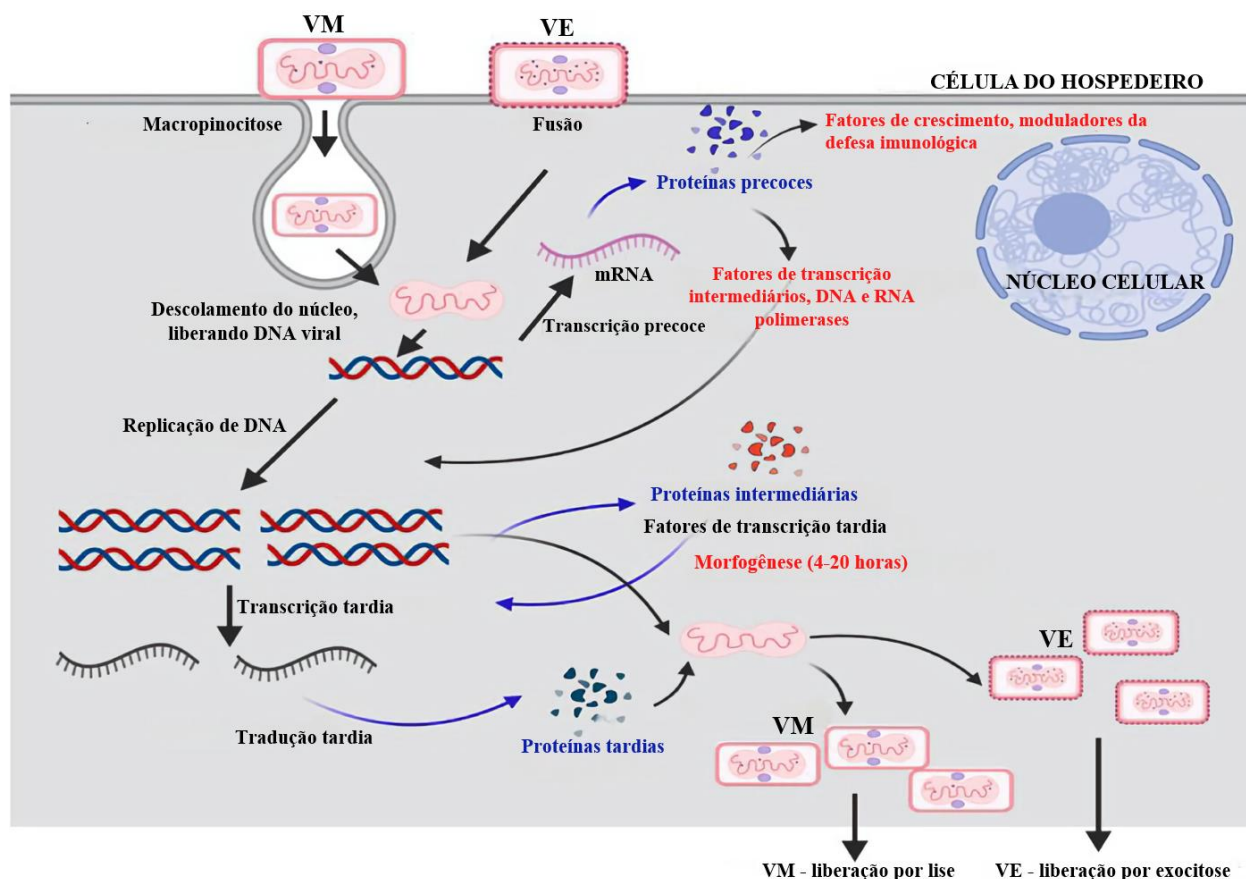
A transmissão do MPX ocorre em vários modos, como de animal para animal, animal para humano ou humano para humano (Karagoz *et al*, 2023). O MPX entra em seu hospedeiro pelas vias orofaríngea, nasofaríngea ou intradérmica, se replica no local da inoculação e depois se espalha para os gânglios linfáticos regionais e após um período de viremia inicial, o vírus se espalha para outros órgãos do corpo (Kumar *et al*, 2022). Os sintomas dessa doença incluem dores de cabeça e no corpo, febre, calafrios, dor de garganta, mal-estar, fadiga, aumento dos gânglios linfáticos e uma erupção cutânea característica que se transforma em pápulas e vesículas que eventualmente formam crostas e cicatrizam (Kmieć; Kirchhoff, 2022). Sendo o período de incubação de 7 a 14 dias, podendo se estender até 21 dias (Kumar *et al*, 2022).

O poxvírus produz duas partículas virais infecciosas durante a replicação: vírus maduro intracelular (VM) e vírus com envelope extracelular (VE) (Gong *et al*, 2022). O MV possui uma única membrana e o EV possui uma membrana externa adicional que é clivada antes da fusão (Rampogu *et al*, 2023). A invasão das células hospedeiras pelo poxvírus é completada principalmente por três etapas: adsorção, fusão da membrana e invasão do núcleo (Gong *et al*, 2022). A replicação do MPX envolve três estágios, incluindo mRNA viral precoce, intermediário e tardio e síntese de proteínas, seguido

pela montagem e morfogênese de vírions infecciosos (Li *et al*, 2023), conforme observado na Figura 2. Segundo Hatmal e colaboradores (2022), as proteínas virais são agrupadas em proteínas de entrada viral, que facilitam a entrada do vírus nas células hospedeiras; proteínas que auxiliam na liberação do vírus nas células; e proteínas importantes para modular a resposta imune e a célula hospedeira.

A evasão da imunidade do hospedeiro tem como exemplo a interferência da cascata de sinalização dos receptores de reconhecimento de patógenos, interrompendo os principais fatores de transcrição para a expressão de genes inflamatórios, como o fator regulador do interferon 3 (IRF3) e o NF- κ B (Lum *et al*, 2022). Além disso, o MPX consegue evitar respostas antivirais das células T CD4+ e CD8+ através da inibição da ativação das células T mediada pelo receptor de células T através da apresentação alternativa de antígeno (Li *et al*, 2023).

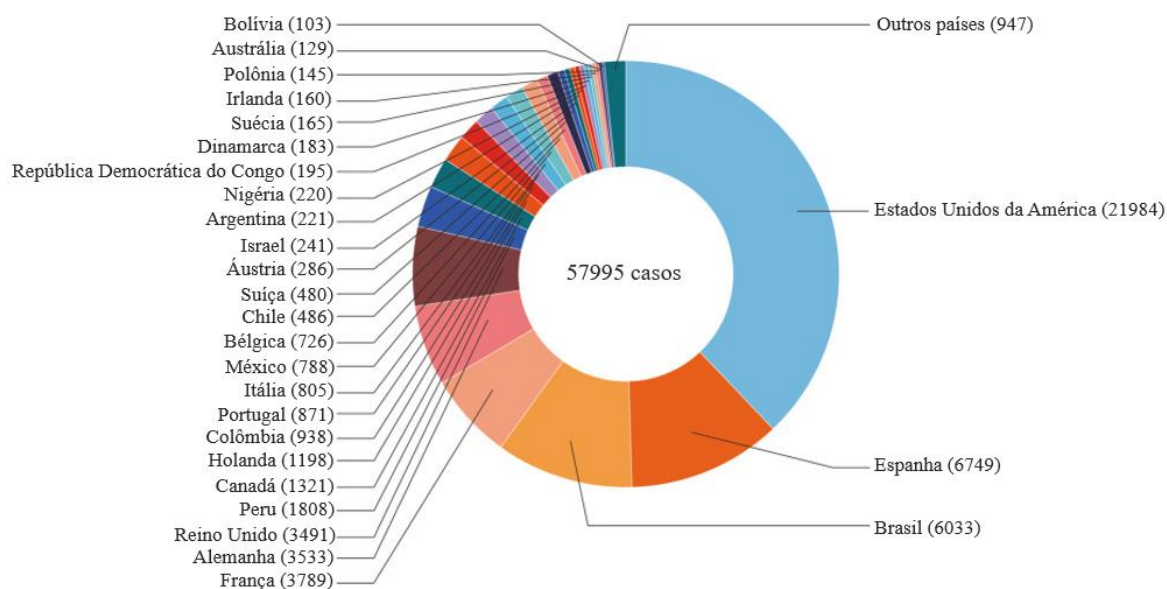
Figura 2 – Vias citosólicas do Mpox para o ciclo de vida viral



Fonte: Adaptado de Kumar *et al*, 2022.

Os países africanos enfrentam a varíola dos macacos há muito tempo, com surtos em regiões da África Ocidental e Central, incluindo Gana, Nigéria, República Centro-Africana (RCA), República Democrática do Congo (RDC), Congo, Benim, Serra Leoa, Sudão do Sul, Costa Marfim, Libéria e Camarões (Diatta *et al*, 2023; Martín-Delgado *et al*, 2022; Yu; Shi; Cheng, 2023). De acordo com Walter e Malani (2022), antes de maio de 2022, as infecções por MPX em pessoas que viviam fora da África estavam relacionadas a viagens para regiões onde este vírus era endêmico ou à exposição a animais infectados com o vírus. Em 13 de maio de 2022, a OMS confirmou um surto de MPX em vários países em África e em países não endêmicos em todo o mundo, principalmente na Europa, como observado na Figura 2 (Hatmal *et al*, 2022). À vista disso, o MPX ganhou as manchetes em todo o mundo e levantou temores de uma nova pandemia global (Yu; Shi; Cheng, 2023).

Figura 3 – Distribuição geográfica dos casos confirmados de varíola dos macacos durante o surto entre janeiro e setembro de 2022.



Fonte: Adaptado de Huang, Mu e Wang, 2022

As infecções emergentes e reemergentes por MPX ameaçam o setor de saúde devido à evolução das características genômicas e à falta de terapia direcionada (Swetha *et al*, 2022). Atualmente, não existem tratamentos específicos clinicamente comprovados para a infecção por MPX, assim, como na maioria das doenças virais, o tratamento é o controle dos sintomas (Moore; Rathish; Zahra, 2023). De acordo com Saadh e colaboradores (2023), os medicamentos utilizados para tratar a varíola dos

macacos são aqueles anteriormente administrados para varíola ou outras infecções decorrentes por *Orthopoxvirus*, incluindo tecovirimat, cidofovir e brincidofovir.

Atualmente, não existe vacina específica contra a infecção pelo MPX, as vacinas utilizadas são aquelas já administradas contra a varíola, conhecidas como ACAM2000, JYNNEOS e LC16m8 (Gong *et al*, 2022; Poland *et al*, 2022; Saadh *et al*, 2023). Essas vacinas não são recomendadas para administração em massa contra a varíola dos macacos, podendo ser utilizadas em duas situações: em pessoas que correm maiores riscos (pré-exposição) e para atenuar a doença (pós-exposição) (Poland *et al*, 2022; Saadh *et al*, 2023; Singhal; Kabra; Lodha, 2022). Portanto, o desenvolvimento de uma nova vacina com um amplo potencial de utilização para o Mpox e suas variantes emergentes poderia apresentar um bom método preventivo para lidar com a evolução da infecção por Mpox (Saadh *et al*, 2023).

2.4 VACINOLOGIA REVERSA

Nos últimos anos, o desenvolvimento do desenho de vacinas foi revolucionado pela vacinologia reversa (VR), que objetiva em identificar inicialmente vacinas candidatas promissoras por meio da análise de bioinformática do genoma do patógeno (Ong *et al*, 2020). Dessa forma, esta abordagem destaca-se por realizar análise de todo o genoma do patógeno, bem como do reconhecimento das proteínas que atuam como antígenos de potenciais alvo para a resposta imunológica, permitindo análises flexíveis que não podem ser realizadas por métodos tradicionais (Sunita *et al*, 2020).

Além disso, a VR oferece duas vantagens principais em comparação com as abordagens tradicionais de desenvolvimento de vacinas: a identificação de antígenos candidatos sem a necessidade de cultivar o patógeno e a identificação de qualquer antígeno independentemente por sua quantidade purificada para ser adequado para teste de vacina (Dalsass *et al.*, 2019). De acordo com Rappuoli e colaboradores (2016), apenas em 2012, uma vacina para meningite B foi a primeira vacina baseada em genoma recebeu aprovação regulamentar.

Rodrigues e colaboradores (2019), por meio de VR e abordagens genômicas subtrativas, observaram sete proteínas com potencial para induzir respostas imunes previstas como alvos da vacina para proteção contra diferentes cepas de *Mycoplasma pneumoniae*, bactéria responsável pela maioria das infecções que levam à pneumonia. Oliveira e colaboradores (2021) demonstraram que através da VR foi possível prever

potenciais antígenos da bactéria *Brucella abortus*, com propriedades imunogênicas. Os resultados apresentados pelos autores demonstraram que o peptídeo vacinal foi capaz de estimular uma resposta imune protetora em organismos infectados com características sugestivas de predominância do perfil Th1.

A importância da bioinformática no desenvolvimento de vacinas ganhou ainda mais destaque nos últimos anos, mostrando-se imprescindível durante a pandemia de COVID-19. Segundo Ma e colaboradores (2021), a bioinformática revolucionou o estudo do novo coronavírus, permitindo a identificação, análise e monitoramento eficazes, sendo possível a rápida obtenção da sequência genômica e da estrutura proteica do SARS-CoV-2, acelerando a busca por medicamentos e o desenvolvimento de vacinas. Um estudo realizado por De Araújo e colaboradores (2022), os autores utilizaram os dados disponíveis das proteínas estruturais do SARS-CoV-2 para obter epítomos imunogênicos, considerando as variantes do vírus e alta possibilidade de provocar respostas de células T e B contra este vírus. De acordo com os autores, os epítomos selecionados representam a sequência mais conservada do novo coronavírus e podem ser usados em diversas estratégias de desenvolvimento de vacinas, pois também estão presentes nas variantes descritas do SARS-CoV-2.

Portanto, as vacinas baseadas em epítomos utilizando a abordagem de VR são uma nova conduta terapêutica para a concepção e desenvolvimento de vacinas adequadas com alta potência, viabilidade logística e segurança aprimorada (Aiman *et al*, 2022). Ademais, a VR demonstra vantagem no desenvolvimento de vacinas contra patógenos altamente infecciosos, incluindo aqueles que não podem ser cultivados em laboratório devido ao alto risco imposto a pesquisadores e profissionais de saúde (Chakraborty; Barman; Deb, 2020).

3 JUSTIFICATIVA

Várias pandemias afligem a humanidade ao longo da história, como por exemplo a peste, cólera, as gripes e as doenças causadas pelos coronavírus. Essas pandemias foram causadas por patógenos considerados emergentes ou reemergentes. Mesmo que essas doenças já tenham sido controladas, estas se configuram como potenciais riscos à saúde humana, pois os patógenos podem se espalhar rapidamente por meio do comércio e viagens globais. A COVID-19 intensificou a preocupação da humanidade em relação ao surgimento de novas pandemias, devido a sua rápida capacidade mutação e surgimento de novas variantes. Em junho de 2022, a OMS declarou a doença causada pelo vírus Mpox como uma emergência de saúde global, sendo documentado 14.500 casos da doença em 60 países pelo Center for Disease Control and Prevention (CDC). A rápida disseminação e os efeitos negativos que esses microrganismos podem trazer para sociedade exigem uma resposta eficiente e segura para amenizar o impacto da doença. Sendo assim, o desenvolvimento de vacinas multiepitopo para SARS-CoV-2 e Mpox representa uma resposta inovadora e adaptável aos desafios apresentados por esses patógenos. Uma vacina multiepitótopo, utiliza vários antígenos do vírus, isso leva a um grande potencial de estímulo para uma resposta imune ampla e específica contra o patógeno de interesse, sustentando uma proteção eficaz. Com o advento da tecnologia, através da vacinologia reversa, que utiliza a bioinformática, é um método utilizado para construção de uma vacina de proteína quimérica contendo múltiplos epítomos. Esse método tem a vantagem de acelerar o processo de desenvolvimento de vacinas, pois identifica e prioriza alvos antigênicos mais pertinentes do patógeno. Além disso, utilizando como base as características genéticas e antigênicas do vírus, é possível criar vacinas sob medida para diferentes linhagens e variantes. Uma outra vantagem a ser destacada é a redução de efeitos colaterais indesejados, isso acontece pois diferente das vacinas tradicionais, a vacinologia reversa descarta componentes não essenciais ou até mesmo aqueles componentes prejudiciais a formulação. Como a vacina passa por diversos testes através da informática, é possível prever até mesmo mecanismos imunológicos envolvidos na proteção vacinal. Em resumo, a construção de uma vacina composta por uma proteína quimérica contra um agente infeccioso que pode causar impactos a saúde pública, tem o intuito de ser uma estratégia viável e promissora para facilitar a produção em larga escala de uma vacina contra uma doença emergente.

4 CAPÍTULO 1

DESENVOLVIMENTO DE UMA PROTEÍNA MULTIEPITOPO DAS PROTEÍNAS
ESTRUTURAIS DO SARS-COV-2

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um candidato vacinal multiepítomos provenientes das proteínas estruturais do SARS-CoV-2;

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver uma nova proteína quimérica multiepítomos a partir de epítomos provenientes de proteínas consenso estruturais do SARS-CoV-2;
2. Analisar e determinar ligantes para a construção proteína multiepítomos;
3. Identificar potenciais sequências adjuvantes para acoplar à proteína multiepítomos;
4. Definir o modelo tridimensional da proteína multiepítomos;
5. Caracterizar as propriedades físico-químicas, de alergenicidade e antigenicidade da proteína multiepítomos;
6. Realizar a ancoragem molecular da proteína multiepítomos com as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II e com receptores semelhantes a Toll (TLRs).
7. Simular a reação imunológica provável da interação da proteína multiepítomos com hospedeiro vertebrado.

6 METODOLOGIA

6.1 CONSTRUÇÃO DE PROTEÍNA QUIMÉRICA MULTIEPÍTOPOS

Os cinco epítomos utilizados nesse trabalho são epítomos de proteínas estruturais do SARS-CoV-2 identificados pelo nosso grupo de pesquisa (ARAÚJO *et al*, 2022), utilizando abordagens *in silico*, sendo estes epítomos imunogênicos racionais e conservados. Antes de adicionar os epítomos foram adicionados dois adjuvantes na composição da proteína, sendo estes β -defensina e a sequência PADRE (epítomo pan DR). Para fazer a ligação entre esses adjuvantes é necessário adicionar uma sequência de aminoácidos como ligantes. Dessa forma, para ligar os adjuvantes utilizou-se um ligante rígido (EAAAK). Após isso, foi adicionado a sequência de cada epítomo seguido por diferentes ligantes, uma construção foi realizada utilizando ligante rígido, outra utilizando ligante clivável (PLGLWA) e outro flexível (GGGGGG). Assim, nesse trabalho realizamos a construção de três proteínas quiméricas, diferindo apenas o tipo de ligante utilizado para ligar os epítomos.

6.2 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIGÊNICAS, ALERGÊNICAS E FÍSICO-QUÍMICAS

Realizou-se os testes para determinação das propriedades físico-químicas de cada proteína a partir do software ProtParam e caso ela não apresentasse um valor de estabilidade inferior a 40, ela era considerada instável e removida da análise, as que passaram pelo teste, foram submetidas ao Vaxijen para análise dos valores de antigenicidade, proteínas que apresentaram valores inferiores a 0,5 também foram eliminadas e submetidas ao servidor AllerCatPro2.0 para análise de alergenicidade.

6.3 MODELAGEM MOLECULAR

Utilizou-se para predição da estrutura 3D a ferramenta AlphaFold Colab (<https://colab.research.google.com/github/deepmind/alphafold/blob/main/notebooks/AlphaFold.ipynb>), as opções padrões foram selecionadas.

6.4 DINÂMICA MOLECULAR

A simulação de dinâmica molecular foi realizada no software GROMACS 2019.3, no qual utilizou-se o campo de força OPLS-AA/L, a proteína foi submetida a uma célula unitária, colocada em um cubo de 1nm, solvatado com água, íons (Na e Cl) foram adicionados conforme a carga presente para neutralizar o sistema. O equilíbrio da água sob condições NVT e NPT foi realizado por 100ps. A temperatura de 300K e a pressão de 1 bar foram definidos. Por fim, realizou-se a execução de 60 ns. Os valores de RMSD foram gerados pelo GROMACS.

6.5 DOCKING MOLECULAR

Para o molecular *docking*, selecionou-se a posição final (60 ns) da dinâmica molecular e a partir do software Pymol, as moléculas de água e os íons foram removidos. Em seguida, a proteína foi submetida para molecular *docking* no servidor ClusPro (<https://cluspro.bu.edu>), em que *docking* com os receptores TLR2 (PDB:2Z7X), TLR4 (PDB:3FXI) e TLR8 (PDB:5AWA) foram realizados.

6.6 SIMULAÇÃO IMUNE *IN SILICO* DA VACINA

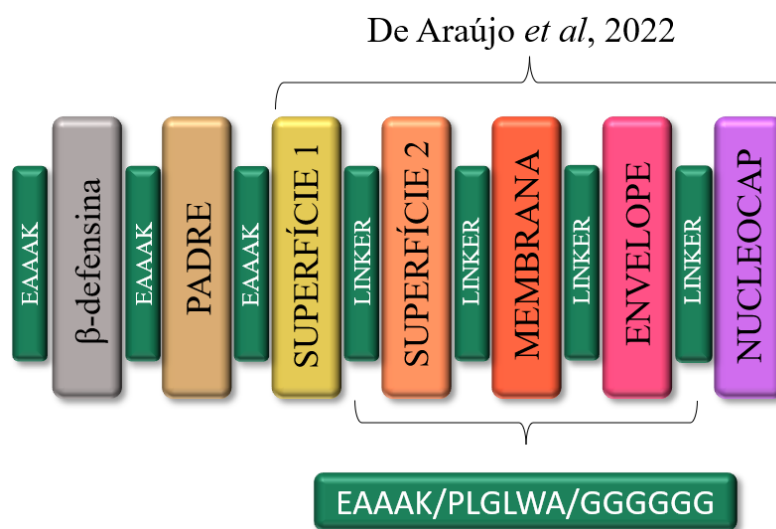
As proteínas quiméricas foram submetidas ao servidor C-ImmSim (<https://kraken.iac.rm.cnr.it/C-IMMSIM/>) para predição de perfil de resposta imune, para isso, os parâmetros: injeção única, random seed = 12345, injeção sem LPS, volume de simulação de 10 e simulação de 300 etapas foram utilizados. As respostas humorais e celular foram analisadas.

7 RESULTADOS

7.1 AS TRÊS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS APRESENTAM ALTA ANTIGENICIDADE, BAIXA ALERGENICIDADE E BOA ESTABILIDADE

Para a construção da proteína multiepítopos foram utilizados cinco epítopos obtidos das proteínas estruturais do SARS-CoV-2, identificados por nosso grupo de pesquisa (De Araújo *et al*, 2022). Sendo um epítopo da proteína do envelope (E), um da glicoproteína de membrana (M), um da fosfoproteína do nucleocapsídeo (N) e dois da glicoproteína de superfície (S). Juntamente com epítopos, foram adicionados dois adjuvantes, β -defensina e PADRE (pan DR epitope). Esses adjuvantes foram unidos utilizando ligante EAAAK, conhecido por ser um ligante rígido, em seguida os epítopos foram ligados em três versões, utilizando ligantes flexíveis (GGGGGG), rígidos (EAAAK) e cliváveis (PLGLWA), resultando em três proteínas quiméricas. Vale ressaltar que os epítopos foram colocados na ordem da estrutura do vírus, de fora para dentro, ou seja, da superfície para o nucleocapsídeo.

Figura 4 – Sequências de aminoácidos das três proteínas quiméricas criadas, bem como o posicionamento dos epítopos e seus respectivos ligantes.



Fonte: do autor, 2023

Posteriormente, as proteínas foram avaliadas quanto à sua antigenicidade usando o servidor VaxiJen. Essa ferramenta destaca-se como uma solução confiável e estável na

previsão de antígenos protetores (Doytchinova; Flower, 2007). Nesse trabalho, as proteínas com valores $>0,50$ foram consideradas antigênicas. Pode-se observar que a proteína quimérica construída com ligantes flexíveis, demonstrou um maior valor (0,6352) quando comparada com as proteínas com ligantes rígidos (0,6091) e cliváveis (0,5928).

Um outro parâmetro analisado foi a alergenicidade, visto que um dos principais problemas na terapêutica baseada em peptídeos é seu risco alergênico potencial (Tirziu; Paunescu, 2022). O servidor utilizado foi o AllerCatPro 2.0, que é capaz de prever a capacidade de alergenicidade proteica usando a similaridade de suas sequências de aminoácidos e estruturas 3D em relação aos conjuntos de dados da OMS/IUIS, COMPARE, FARRP, UniProtKB e Allergome (Nguyen *et al*, 2022). As proteínas analisadas neste trabalho não demonstraram traço de alergenicidade.

Além disso, as propriedades físico-químicas das proteínas são críticas para a sustentabilidade, eficiência e estabilidade em um sistema biológico (Garg *et al*, 2016). Dessa forma, a ferramenta ProtParam foi usada para averiguar tais propriedades. O peso molecular, valor de ponto isoelétrico teórico (pI), a meia-vida e a estabilidade da proteína podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas das proteínas multiepítopos

| Ligante | Peso molecular (Da) | pI | Estabilidade | Meia vida | | |
|-----------------|---------------------|------|--------------|---|--------------------------|--|
| | | | | Reticulócitos de mamíferos, <i>in vitro</i> | Levedura, <i>in vivo</i> | <i>Escherichia coli</i> , <i>in vivo</i> |
| Flexível | 17861.60 | 9.96 | 35,37 | 1 hora | 30 min | >10 horas |
| Rígido | 18374.46 | 9.84 | 28,46 | 1 hora | 30 min | >10 horas |
| Clivável | 19043.47 | 9.96 | 28,31 | 1 hora | 30 min | >10 horas |

Fonte: do autor, 2023.

De acordo com os resultados, as três proteínas são estáveis, pois apresentaram um valor <40 e de acordo com seu ponto isoelétrico, podem ser consideradas de uma natureza básica. Além disso, as três proteínas demonstraram o mesmo tempo estimado de meia vida *in vitro* e *in vivo*.

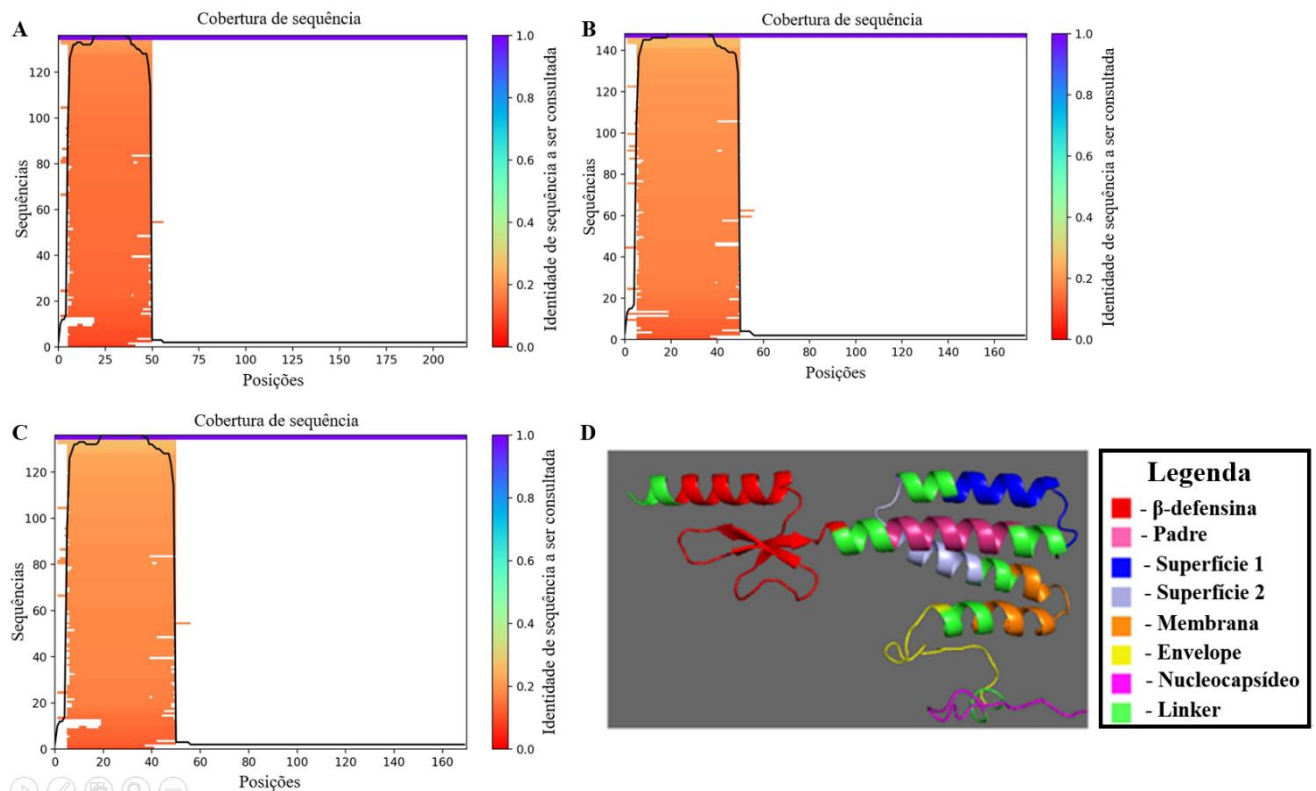
Um outro ponto a ser considerado na avaliação de uma proteína é sua solubilidade, dessa forma, utilizou-se o servidor SoluProt, onde os resultados $>0,5$ indicaram solubilidade proteica. Esse servidor consegue prever a produção de proteínas

solúveis em *Escherichia coli*. Sendo assim, foi possível observar que as três proteínas são solúveis, no qual obteve-se um valor de 0,852, 0,861 e 0,894 para as proteínas com ligantes flexíveis, rígidos e clicáveis, respectivamente.

7.2 A MODELAGEM TRIDIMENSIONAL DA VACINA REVELOU ALTAS PREDIÇÕES PARA ADJUVANTES E LIGANTES, MAS BAIXA EFICÁCIA NA PREDIÇÃO DE ALGUNS EPÍTOPOS

A estrutura 3D da vacina foi modelada pelo software AlphaFold. A rede AlphaFold prevê diretamente as coordenadas 3D de todos os átomos pesados para uma determinada proteína usando a sequência primária de aminoácidos e sequências alinhadas de homólogos como entradas (Jumper *et al*, 2021). Foi possível observar que as estruturas apresentaram altos valores para a predição dos adjuvantes e ligantes, mas um baixo valor para os epítomos, conforme destacado na figura (4A-C). Em um trabalho realizado por De Araújo e colaboradores (2023), observaram que a proteína quimérica também demonstrou altos valores para predição dos adjuvantes e ligantes, mas baixos valores para região dos epítomos. Esse resultado se justifica visto que as proteínas dos adjuvantes podem ser encontradas nas suas formas cristalográficas em bancos de dados como o PDB, e de tal forma, alguns dos epítomos não possuem bons resultados, visto que algumas proteínas do SARS-CoV-2, ainda não possuem suas formas cristalográficas bem definidas.

Figura 5 – Resultado de similaridade e visualização 3D de modelagem molecular por homologia



Fonte: do autor, 2023

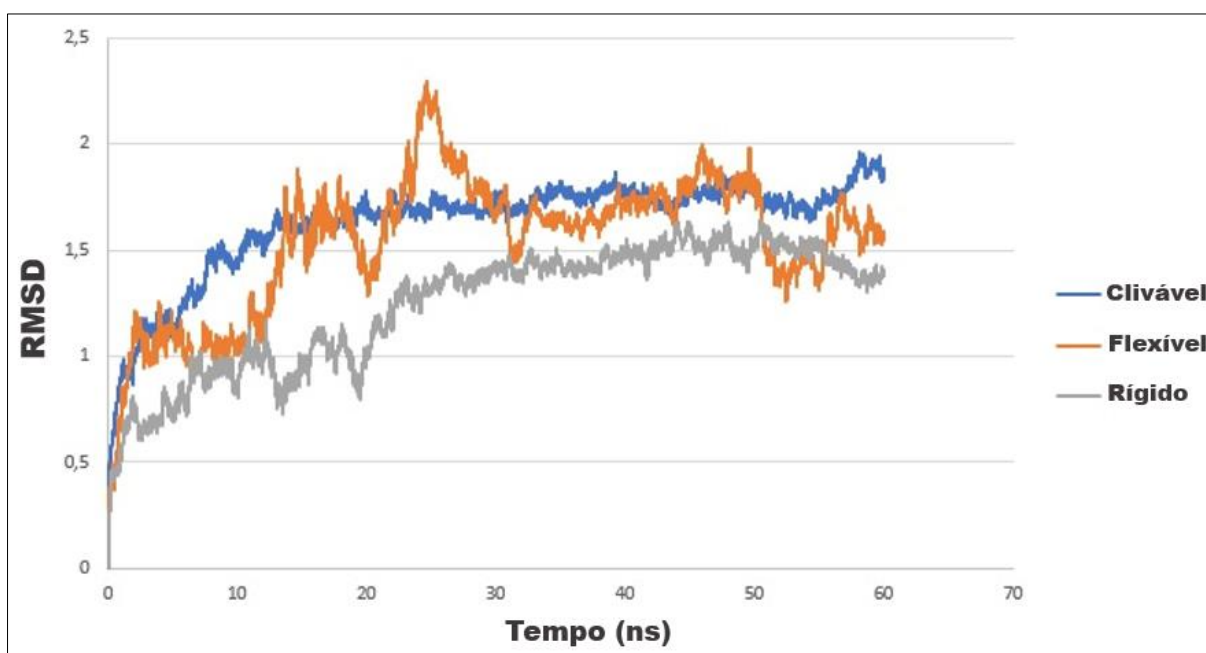
Legenda: a) Valores da predição da proteína com ligante clivável;
 b) Valores da predição da proteína com ligante flexível;
 c) Valores da predição da proteína com ligante rígido;
 d) Estrutura 3D após modelagem molecular.

7.3 LIGANTES FLEXÍVEIS CONFERIRAM MAIOR MOBILIDADE À PROTEÍNA ENQUANTO LIGANTES RÍGIDOS PROMOVERAM ESTABILIDADE

Após a modelagem molecular, as três proteínas foram submetidas ao software GROMACS para simulação da dinâmica molecular, uma vez que, a mesma sofreria alterações conformacionais em sua estrutura presentes na vida real, em que variáveis como pressão, pH e temperatura, poderiam implicar em modificações na sua estabilidade. Sendo assim, as simulações de dinâmica molecular têm sido utilizadas no desenvolvimento de vacinas para avaliar a estabilidade e a correção conformacional de projetos de peptídeos (MOIN *et al*, 2023)

Para avaliação da estabilidade da estrutura em uma escala de tempo gerou-se o gráfico de RMSD (Root Mean Square Deviation) e para avaliação da flutuação residual da proteína gerou-se o gráfico RMSF (Root Mean Square Flutuation). Pode-se observar que os ligantes flexíveis deram à proteína uma característica mais móvel com maiores variações de RMSD (Figura 5), enquanto os ligantes rígidos mantiveram a proteína mais estável.

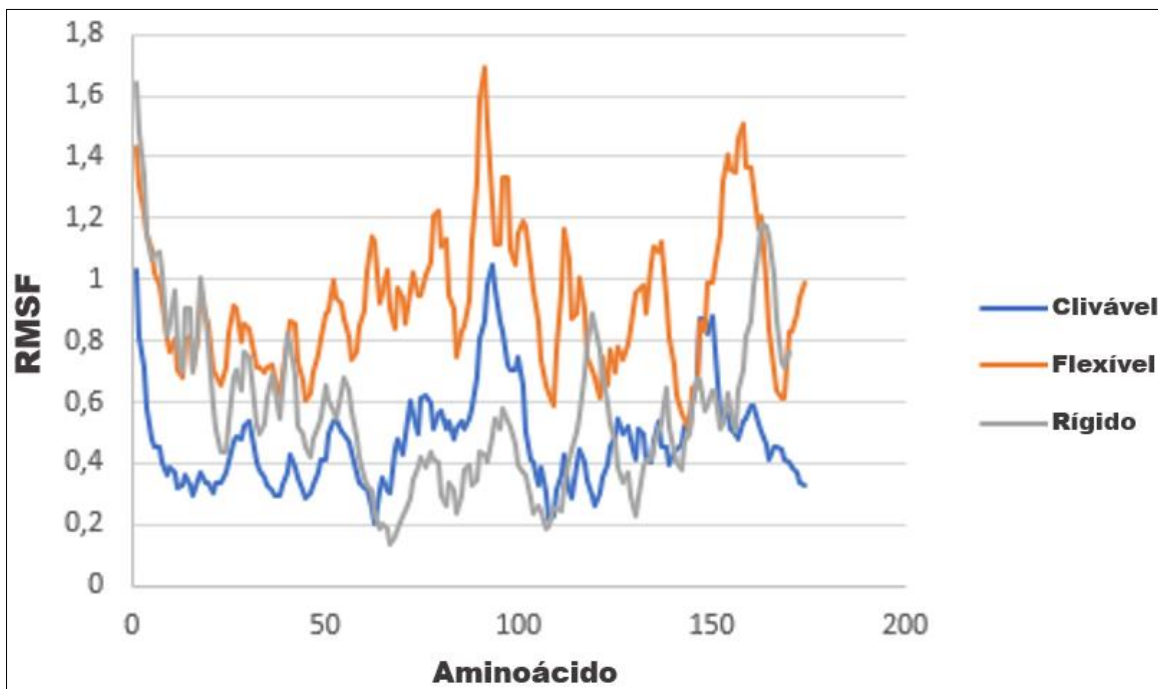
Figura 6 – Valores de RMSD obtidos durante a dinâmica molecular de 60 ns das três proteínas quiméricas



Fonte: do autor, 2023

Já o gráfico de RMSF (Figura 6), avaliou a variação de cada aminoácido separadamente, no qual, os resultados corroboram com o valor de RMSD em que a proteína flexível é a que apresenta a maior movimentação.

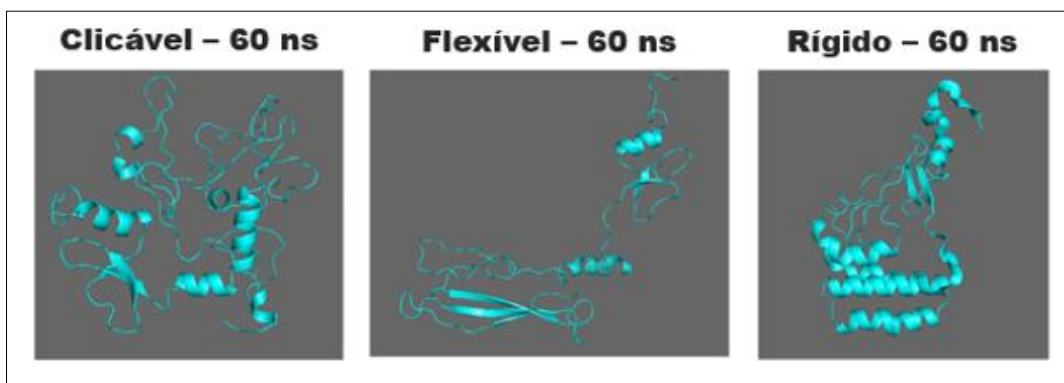
Figura 7 – Valores de RMSF obtidos durante a dinâmica molecular de 60 ns das três proteínas quiméricas



Fonte: do autor, 2023

Além disso, o final dos 60 ns, observa-se que a utilização dos de diferentes ligantes, levou a uma diferença na estrutura final das três proteínas (Figura 7).

Figura 8 – Diagrama 3D da conformação obtida após a dinâmica molecular das proteínas quiméricas

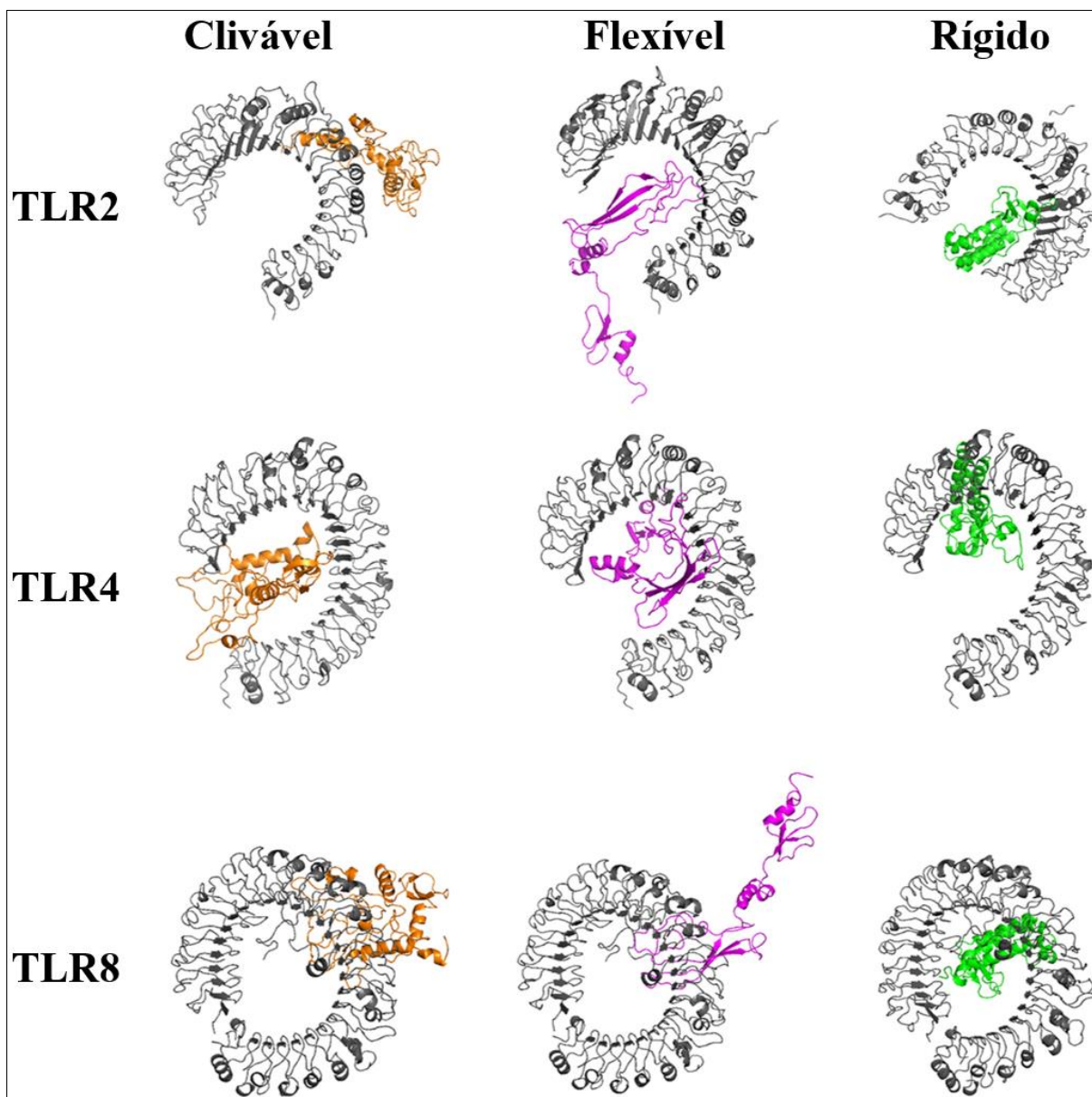


Fonte: do autor, 2023

7.4 AS TRÊS PROTEÍNAS CONSTRUÍDAS DEMONSTRARAM BOA AFINIDADE COM RECEPTORES TLR2, TLR4 E TLR8

Utilizando as posições identificadas durante a dinâmica molecular, o ancoramento molecular das proteínas quiméricas com os receptores TLR2 (PDB: 2Z7X), TLR4 (PDB: 3FXI) e TLR8 (PDB: 5AWA) foi realizado no servidor ClusPro. O ancoramento no qual os resultados indicaram boas interações entre os TLRs e a proteína quimérica, com o TLR2, a potencial vacina multiepítomos obteve uma energia de ligação de -1018,8 kcal/mol, com 80 membros para clivável, -1050,8 kcal/mol e 52 membros para flexível, e por fim, -1018,3 kcal/mol e 89 membros para rígido. Lembrando quanto menor a energia de ligação, mais forte a ligação entre o receptor e ligante, além disso, o servidor cluspro utiliza uma outra variável denominada membro, essa variável é calculada baseada na quantidade de repetições que ocorrem em um processo de 1000 *dockings*, logo uma maior taxa de repetição representa uma maior média e consequente precisão de resultados. Com o TLR4 a proteína obteve uma energia de ligação de -1062,5 kcal/mol, com 41 membros para clivável, -1155,9 kcal/mol e 70 membros para flexível e -1013,0 kcal/mol e 73 membros. Por fim o TLR8 a proteína obteve uma energia de ligação de -1102,6 kcal/mol, com 77 membros para clivável, -1192,5 kcal/mol e 56 membros para flexível e por fim, -1397,4 kcal/mol e 156 membros para rígido. Esses resultados sugerem uma boa afinidade aos receptores, visto que a energia de ligação se mostra similar a outros trabalhos encontrados na literatura, que utilizaram metodologia similar ao deste estudo (Albutti, 2022; Mitra *et al*, 2022; Rafi *et al*, 2022).

Figura 9 – Diagrama 3D dos resultados do acoplamento molecular das proteínas quiméricas com os TLRs



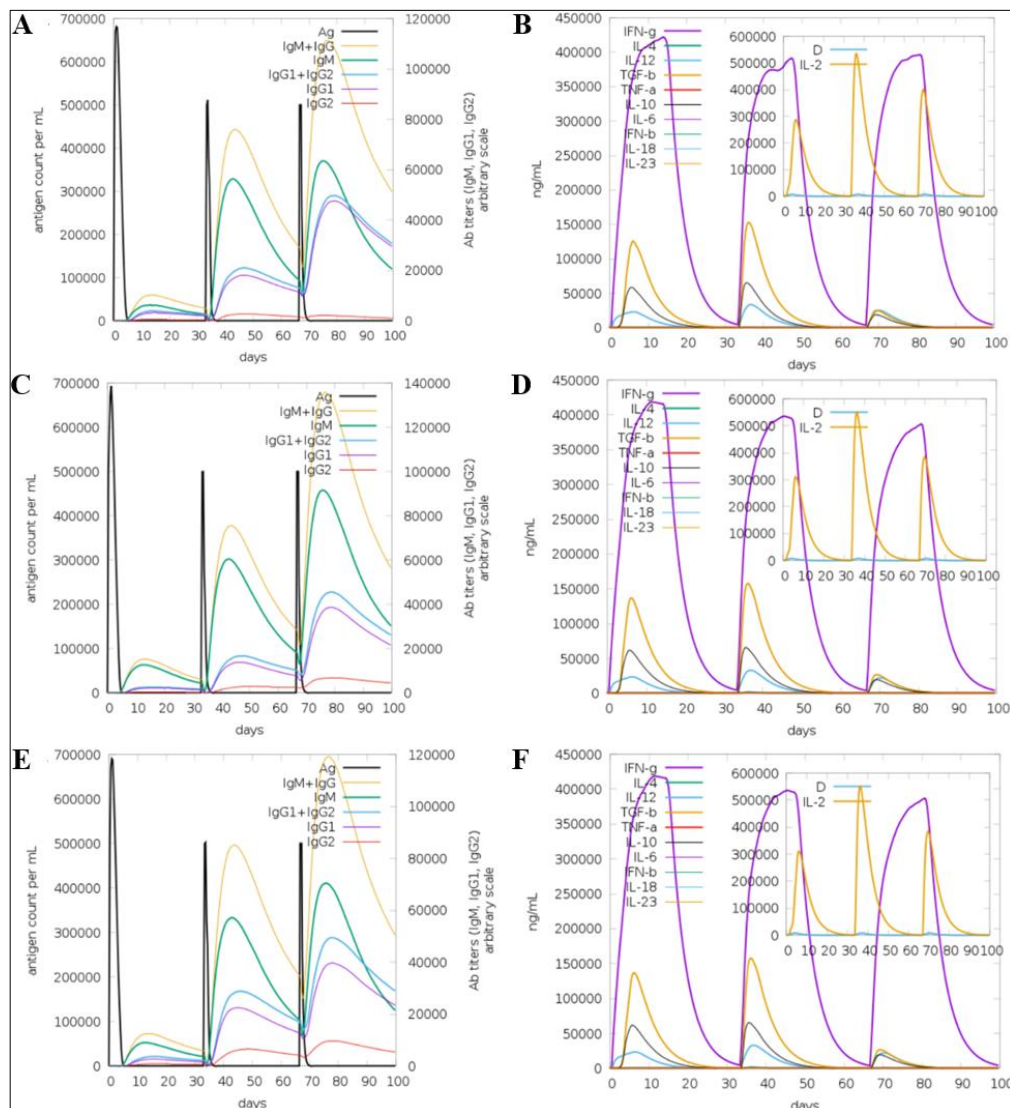
Fonte: do autor, 2023

7.5 AS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS EXIBIRAM AUMENTO SIGNIFICATIVO DE ANTICORPOS IGM E IGG E DA RESPOSTA IMUNE CELULAR VIA IFN- γ

As proteínas quiméricas foram submetidas ao servidor C-ImmSim para predição do perfil de resposta imune. Esse servidor usa técnicas de aprendizado de máquina para prever respostas imunológicas com base em três compartimentos: gânglios linfáticos,

timo e medula óssea (Abdi *et al*, 2022). Como observado na Figura 10, as três candidatas vacinas demonstraram aumento de anticorpos IgM+IgG após as duas doses de reforço, sendo importante ressaltar que a vacina construída com ligantes flexíveis apresentaram títulos próximos a 14 mil enquanto as vacinas construídas com ligantes rígidos e cliváveis ficaram na faixa de 12 mil. Além disso, em relação aos resultados de citocinas, as três construções vacinais apresentaram altas concentrações de IFN- γ após as três doses. No entanto, citocinas anti-inflamatórias como TGF- β e IL-10, apresentaram uma diminuição após a terceira dose. Ademais, observou-se que as três construções vacinais não geram alterações expressivas nos níveis de perigo, descritos pela letra D.

Figura 10 – Resultados da simulação imune para as três proteínas quiméricas.



Fonte: do autor, 2023

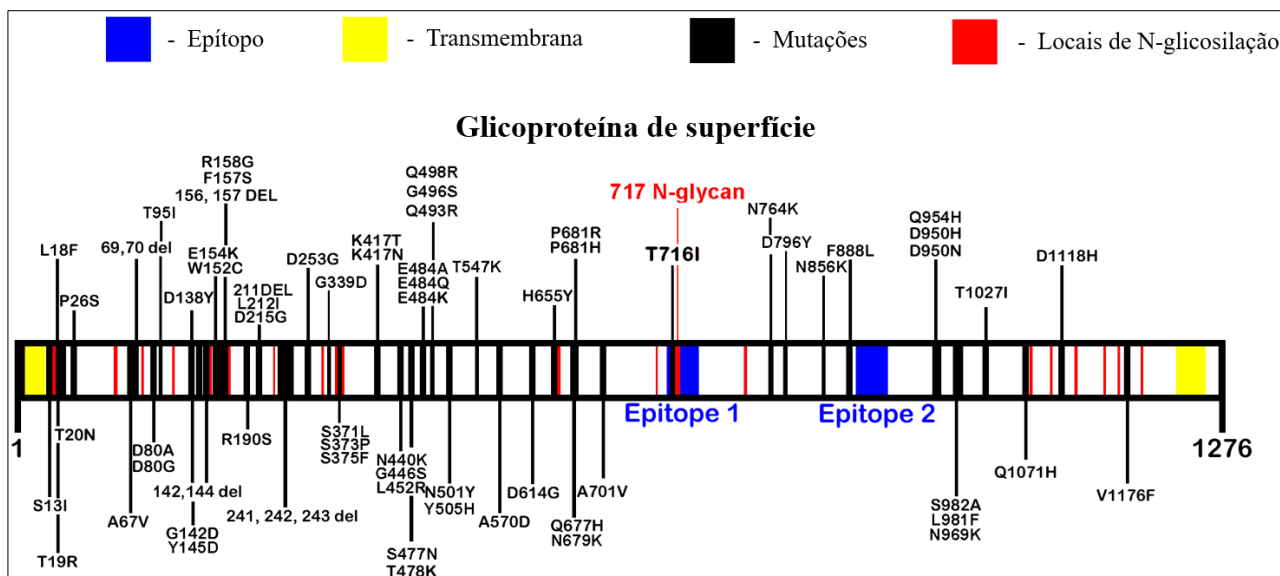
Legenda: a) Concentrações de imunoglobulina em relação à concentração de antígeno da proteína com ligante clivável
 b) Níveis de citocinas e interleucinas para aplicação de três doses da proteína com ligante clivável
 c) Concentrações de imunoglobulina em relação à concentração de antígeno da proteína com ligante flexível
 d) Níveis de citocinas e interleucinas para aplicação de três doses da proteína com ligante flexível
 e) Concentrações de imunoglobulina em relação à concentração de antígeno da proteína com ligante rígido
 f) Níveis de citocinas e interleucinas para aplicação de três doses da proteína com ligante rígido

8 DISCUSSÃO

O surto da pandemia de COVID-19 levantou inquestionavelmente uma grande emergência de saúde pública em todo o mundo. A preocupação é atribuída à transmissibilidade do vírus e à sua capacidade de evoluir rapidamente e sofrer mutações, levando ao surgimento de novas estirpes incomuns (Fernandes *et al*, 2022). Dessa forma, estratégias avançadas precisam ser projetadas para modificar e atualizar as vacinas e calendários de vacinação existentes contra a COVID-19, adicionar doses de reforço, descobrir vacinas mais recentes com maior eficácia e desenvolver vacinas específicas para as variantes em circulação, ou multivalentes (baseadas em múltiplos antígenos) (Dhama *et al*, 2023).

Nesse trabalho foi possível construir 3 proteínas quiméricas multiepítops proveniente das 4 proteínas estruturais do SAR-CoV-2. Os epítops selecionados, identificados pelo nosso grupo de pesquisa (De Araújo *et al*, 2022), possuem uma ampla conservação entre as variantes circulantes até o momento das análises, incluindo a conservação na variante ômicron (Figura 11).

Figura 11 – Variantes da glicoproteína de superfície SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de De Araújo *et al*, 2022.

As vacinas baseadas em epítops podem ajudar a superar desafios como variações genéticas e antigênicas (Akhtar *et al*, 2022). Para a construção dessa proteína quimérica, foram utilizados sequencias proteicas de adjuvantes e ligantes aos peptídeos

de interesse. Os antígenos peptídicos por si só não são suficientemente imunogênicos para gerar uma resposta imune eficiente, sendo necessário o uso de adjuvantes na construção de vacinas peptídicas (Alharbi; Skwarczynski; Toth, 2022; Ariawan *et al*, 2022).

Behmard e colaboradores (2020) e Gustiananda e colaboradores (2021) utilizaram a β -defensina para aumentar a imunogenicidade da vacina multiepítipo, além de servir como ligante para o TLR4 que é necessário para a maturação das células dendríticas e a ativação bem sucedida das células T no linfonodo. Além disso, de acordo com Ghaffari-Nazari e colaboradores (2015), a utilização do adjuvante PADRE é uma estratégia capaz de induzir células T CD4+, podendo ser usado para melhorar a eficácia e a potência das vacinas peptídicas.

Ademais, a utilização de ligantes possuem a finalidade de unir passivamente domínios, separar espacialmente domínios ou libertar domínios funcionais livres *in vivo*, dessa forma, ligantes ideais podem proporcionar muitas vantagens para a produção de proteínas de fusão, incluindo melhorar a estabilidade estrutural, aumentar a bioatividade, aumentar o nível de expressão, alterar os perfis PK e permitir o direcionamento *in vivo* dessas proteínas (Chen; Zaro; Shen, 2013). Já a falta de ligantes adequados em vacinas baseadas em epítomos pode levar à produção de novas regiões estruturais que podem interferir com a imunogenicidade de epítomos exógenos (Lei *et al*, 2019).

A realização da dinâmica molecular se fez necessária, pois essas proteínas quando submetidas ao organismo, podem sofrer alterações conformacionais que podem implicar no seu potencial de ligação com receptores imunológicos. Após a simulação das três proteínas quiméricas, observou-se uma maior variação da proteína que continha ligantes flexíveis, quando comparados a com ligantes cliváveis e rígidos. Em um trabalho realizado por Mitra e colaboradores (2022), os autores utilizaram um ligante rígido, um flexível e um clicável na construção de um candidato vacinal multiepítomos contra SARS-CoV-2, onde demonstraram que apenas durante a fase inicial da simulação, foram observadas alterações conformacionais subsequentes na construção da vacina.

Além disso, a forte interação entre uma vacina e os receptores de células imunes é uma característica importante para produzir uma resposta imune estável (Rafi *et al*, 2022), como por exemplo com a interação com os receptores TLRs. Os TLRs reconhecem diversos patógenos e ligantes associados a danos celulares, desencadeando uma cascata de sinalização que é crucial para a resposta imunológica inata e adaptativa

(Aluri; Cooper; Schuettpelez, 2021). À vista disso, realizou-se a análise de interação entre as proteínas quiméricas desenvolvidas neste estudo e os receptores TLR2, TLR4 e TLR8. Os resultados sugerem uma boa afinidade aos receptores, visto que a energia de ligação se mostra similar a outros trabalhos encontrados na literatura, que utilizaram metodologia similar ao deste estudo (Albutti, 2022; Mitra *et al*, 2022; Rafi *et al*, 2022).

A fim de prever a resposta imunologia das três construções vacinais, foi realizado a análise de simulação imune. Com essa análise é possível obter o monitoramento da resposta do sistema imunológico em termos de produção de anticorpos após a injeção de vacinas construídas (Suleman *et al*, 2022). Nos resultados das simulações, as três proteínas quiméricas apresentam altos valores de anticorpos IgM e IgG e altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, com um baixo nível de perigo.

Devi e colaboradores (2021), observaram resultados parecidos com os deste trabalho, onde a resposta primária a dose do candidato vacinal com epítomos estruturais do SARS-CoV-2 apresentou altos níveis de IgM, seguido por um aumento acentuado nas populações de células B e nos níveis de anticorpos IgG1+IgG2, IgM e IgG+IgM, como parte das respostas secundárias e terciárias. Já Medha e colaboradores (2021), demonstraram que apenas administração de uma dose de reforço da vacina levou a um aumento gradual nas respostas imunológicas. Observando bons níveis de células B secretoras de anticorpos, sendo mais proeminentes as subclasses IgM e IgG e um pico acentuado de IFN- γ , IL-12 e IL-2 foi observado após exposição repetida à vacina.

Diante desse cenário, torna-se evidente que a administração de três doses da vacina demonstrou um notável potencial, considerando os elevados índices de resposta imunológica. Consequentemente, a análise desses dados indica que as três formulações vacinais elaboradas neste estudo têm a capacidade de provocar uma resposta imunológica duradoura, tanto no âmbito celular quanto no humoral.

9 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, foi possível observar que as três proteínas construídas utilizando epítomos conservados do SARS-CoV-2, a incorporação estratégica de adjuvantes e ligantes, bem como a análise de dinâmica molecular e simulação imune, ressaltam a abordagem abrangente e inovadora para o avanço de novas vacinas contra o SARS-CoV-2. Foi observado uma resposta imunológica robusta e duradoura, conforme observado nos altos níveis de anticorpos IgM e IgG, concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias e baixo risco associado. Além sugerir uma boa afinidade aos receptores TLRs analisados. Portanto, as três candidatas vacinais apresentam resultados satisfatórios, mas vale ressaltar necessidade de conduzir testes adicionais, como *in vitro* e *in vivo*, com o objetivo de consolidar e validar esses resultados.

10 CAPÍTULO 2

ARTIGO: Immunoinformatic approach for rational identification of immunogenic peptides against host entry and/or exit monkeypox proteins and potential multi-epitope vaccine construction

MPOX SUPPLEMENT

Immunoinformatic approach for rational identification of immunogenic peptides against host entry and/or exit monkeypox proteins and potential multi-epitope vaccine construction

Leonardo Pereira de Araújo^{1,a}, Natália Cristina de Melo Santos^{1,a}, Patrícia Paiva Corsetti¹, Leonardo Augusto de Almeida¹.

¹Departamento de Microbiologia e Imunologia – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

COVID-19 has intensified humanity's concern about the emergence of new pandemics. Since 2018, epidemic outbreaks of the Monkeypox virus (MPXV) have become worrisome. In June 2022, the World Health Organization (WHO) declared the disease a global health emergency, with 14,500 cases reported by the Center for Disease Control and Prevention (CDC) in 60 countries. Therefore, the development of a vaccine based on the current virus genome is of paramount importance in combating new cases. In view of this, we hypothesized the obtainment of rational immunogenic peptides predicted from proteins responsible for the entry of the MPXV into the host (A17L, A26L/A30L, A33R, H2R, L1R), exit (A27L, A35R, A36R, C19L), and both (B5R). To achieve this, we aligned the genome sequencing data of MPXV isolated from an infected individual in the United States in June 2022 (ON674051.1) with the reference genome dated 2001 (NC_003310.1) for conservation analysis. Immune Epitope Database (IEDB) server was used for the identification and characterization of epitopes of each protein related to MHC-I or MHC-II interaction and recognition by B cell receptors, resulting in 138 epitopes for A17L, 233 for A28L,

^aThe authors contributed equally for this work

Corresponding author: Leonardo Augusto de Almeida. Laboratory of Molecular Biology of Microorganisms, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas, 37130-001, Minas Gerais, Brazil. E-mail: leonardo.almeida@unifal-mg.edu.br

© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com This article is published and distributed under the terms of the Oxford University Press, Standard Journals Publication Model (<https://academic.oup.com/pages/standard-publication-reuse-rights>)

48 for A33R, 77 for H2R, 77 for L1R, 270 for A27L, 72 for A35R, A36R, 148 for C19L, and 276 for B5R. These epitopes were tested *in silico* for antigenicity, physicochemical properties, and allergenicity, resulting in a total of 51, 40, 10, 34, 38, 57, 25, 7, 47, and 53 epitopes, respectively. Additionally, to select an epitope with the highest promiscuity of binding to MHCs and BCR simultaneously, all epitopes of each protein were aligned, and the most repetitive and antigenic regions were identified. By classifying the results, we obtained 23 epitopes from the entry proteins, 16 epitopes from the exit proteins, and 7 epitopes from both. Subsequently, one epitope from each protein was selected and fused to construct a chimeric protein that has potential as a multi-epitope vaccine. The constructed vaccine was then analyzed for its physicochemical, antigenic, and allergenic properties. Protein modeling, molecular dynamics, and molecular docking were also performed on TLR-2, TLR-4, and TLR-8 receptors, followed by *in silico* immune simulation of the vaccine. Finally, the results indicate an effective, stable, and safe vaccine that can be further tested, especially *in vitro* and *in vivo*, to validate the findings demonstrated *in silico*.

1. INTRODUCTION

Zoonotic viral pathogens represent a major concern for global public health, as the transmission of these pathogens can result in severe diseases and even the emergence of pandemics like COVID-19. For instance, during the recent SARS-CoV-2 pandemic, the world faced the additional challenge of a reemerging outbreak of Mpox caused by Monkeypox virus (MPXV).

Prior to May 2022, MPXV infections in individuals living outside of Africa were mainly associated with travel to regions where MPXV was endemic or exposure to animals infected with the virus [1]. This virus belongs to the Orthopoxvirus genus of the Poxviridae family and is a large double-stranded DNA virus, with an average size ranging from 200 to 250 nm. Its entire life cycle occurs within the cytoplasm of infected cells, where a variety of proteins necessary for replication machinery are encoded by open reading frames (ORFs) of the MPXV genome [2,3,4].

The outbreak of the virus in 2022 exhibited a higher number of mutations, indicating an evolution towards greater efficiency in dissemination, with 40 distinct mutations shared by the isolates from this outbreak compared to its closest variant [5]. The best way to prevent the spread of infectious diseases such as Mpox is through vaccination [6]. Therefore, the development of a vaccine based on the current virus genome is of paramount importance in combating new cases. Despite the effectiveness of current vaccines for Mpox that employ the attenuated virus methodology, a subunit vaccine may increase their safety due to the non-use of the whole virus, targeted immunogenicity through the use of adjuvants, ease of production and storage, and, last but not least, their application in vulnerable populations, such as the elderly, children, and immunocompromised individuals [7].

In view of this, the objective of this study was the identification and construction of a chimeric protein in which the epitopes used were obtained through an immunoinformatics approach using

proteins responsible for the entry and exit of MPXV in the host, as well as adjuvants and ligands. The constructed vaccine was analyzed for its physicochemical, antigenic, and allergenic properties. Protein modeling, molecular dynamics, and molecular docking were also performed on TLR-2, TLR-4, and TLR-8 receptors. Finally, an in silico immune simulation of the vaccine was conducted. Overall, the vaccine showed satisfactory indices for all analyses, but further tests, especially in vitro and in vivo, are necessary.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 obtaining monkeypox virus sequences

The reference genome and the genome of an infected individual in Florida, USA, in June 2022, were obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using the identification "taxid:10244" (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/10244/>). The proteins involved in the virus entry and exit mechanisms for each genome were obtained in FASTA format. The conservation of the proteins was evaluated using the IEDB server (<http://tools.iedb.org/conservancy/>). The pipeline followed the chart indicated in figure 1A.

2.2 Prediction of MHC-I or MHC-II or BCR Receptor Epitopes

The algorithms from the Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB; <https://www.iedb.org/>) were used, with only the methods being modified for each prediction. For the identification of potential MHC-I and MHC-II epitopes, the NetMHCpan EL 4.1 prediction method was used (<http://tools.iedb.org/mhci/> and <http://tools.iedb.org/mhcii/>), with the option to obtain epitopes that interact with the 27 reference alleles simulating broader global population coverage, representing 97% to 99%. For MHC-I, a cutoff of 1% of the total quantity of each structure was established [8,9]. For MHC-II, a consensus percentile threshold < 20.0 and interaction with over 50% of the reference alleles were established [10]. For the identification of potential B-cell epitopes, the BepiPred Linear Epitope Prediction 2.0 server was used (<http://tools.iedb.org/bcell/>), with a cutoff limit of 0.5 [11]. All cutoff values were recommended by the IEDB platform.

2.3 Evaluation of Antigenic, Allergenic, and Physicochemical Properties of Epitopes

For antigenicity testing, the VaxiJen 2.0 server was used (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>), with the target organism set as virus, and epitopes with a cutoff threshold < 0.5 and labeled as "likely non-antigen" were removed. The server has 89% accuracy [12]. For allergenicity testing, the AllerCatPro 2.0 server (<https://allercatpro.bii.a-star.edu.sg/>) was used, with a sensitivity of 93.2%, specificity of 98.8%, and accuracy of 96% [13]. The standard method provided by the server was used, and epitopes predicted as allergenic were removed. For physicochemical property testing, the ProtParam tool from the ExPasy server (<https://web.expasy.org/protparam/>) was used, and epitopes with structure stability values > 40 were removed [14].

2.4 Alignment, Consensus Epitope Determination, and Validation of Epitope Regions

The approved epitopes from all previous steps were aligned using the MultiAlign server (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), and manual alignment corrections were performed when necessary for improved accuracy [15]. From the alignment, for each protein, epitope regions with the highest repetition rate and the highest antigenicity value according to the Vaxijen server were selected. Epitope regions present in transmembrane regions were removed using the SOSUI server (<http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosuisubmit.html>) [16]. The epitope regions were subjected to the MHC-I, MHC-II, and BCR steps of the IEDB server again for validation of interaction with their respective receptors.

2.5 Construction of Multi-Epitope Chimeric Protein and Evaluation of Similarity, Antigenic, Allergenic, Solubility and Physicochemical Properties

Next, the epitopes were classified based on their interactions with the receptors. For the construction of the chimeric protein, one epitope from each protein was selected based on the following criteria: 1) interaction with BCR, MHC-I, and MHC-II receptors; 2) highest antigenicity value; and 3) lowest stability value. The selected epitopes were sequentially conjugated with the adjuvants PADRE and beta-defensin, using the EAAAK linker between the adjuvants and the GGGGGG linker between the epitopes. The chimeric protein was subjected to the same servers and parameters as the epitopes, including Vaxijen for antigenicity, AllerCatPro 2.0 for allergenicity, and Protparam for stability. The solubility of the chimeric protein was evaluated using the SOLpro server (<https://scratch.proteomics.ics.uci.edu/index.html>) [17]. Finally, an analysis of the chimeric protein was performed on the BLAST server to assess similarity [18].

2.6 Modeling, Molecular Dynamics, and Molecular Docking

The AlphaFold Colab tool (<https://colab.research.google.com/github/deepmind/alphafold/blob/main/notebooks/AlphaFold.ipynb>) was used for 3D structure prediction, with default options selected [19]. Molecular dynamics simulation was performed using GROMACS 2019.3 software, with the OPLS-AA/L force field. The protein was placed in a 1nm cubic unit cell, solvated with water, and ions (Na and Cl) were added to neutralize the system based on their charges. Water equilibrium under NVT and NPT conditions was performed for 100ps, with a temperature of 300K and a pressure of 1 bar. A 70 ns simulation was then conducted, and RMSD values were generated by GROMACS [20]. For molecular docking, the final position (70 ns) from the molecular dynamic simulation was selected, and water molecules and ions were removed using the Pymol software. The protein was then subjected to molecular docking with the TLR-2 (PDB:2Z7X), TLR-4 (PDB:3FXI), and TLR-8 (PDB:5AWA) receptors using the ClusPro server (<https://cluspro.bu.edu>) [21].

2.7 In Silico Immune Simulation of the Vaccine

The chimeric protein was subjected to the C-ImmSim server (<https://kraken.iac.rm.cnr.it/C-IMMSIM/>) for predicting the immune response profile. Parameters used were single and three

doses, random seed = 12345, injection without LPS, simulation volume of 10, 300 simulation steps and dosing interval of 1, 100 and 200 steps. Humoral and cellular responses were analyzed [22].

3. RESULTS

3.1 Entry and exit proteins of MPXV remain conserved after 20 years

The viral protein sequence used in this study was retrieved as a FASTA file from the NCBI database, using the sequencing data of the MPXV genome isolated from an infected individual in the United States in June 2022 (ON674051.1), with the reference genome dated back to 2001 (NC_003310.1) for conservation analysis. It was observed that the proteins responsible for the entry of MPXV into the host (A17L, A28L, A33R, H2R, L1R), exit (A27L, A35R, A36R, C19L), and both (B5R) showed a high conservation rate among the proteins as demonstrated in Supplementary Table 1, with an average conservation of 98.70%, and therefore, selected for obtaining rational immunogenic peptides. The predicted tridimensional structure from each protein is demonstrated in figure 1B.

3.2 Epitope identification indicates greater interactions with MHC-I and MHC-II receptors and lesser interactions with BCR

The identification and characterization of epitopes for each protein demonstrated that a greater number of them are capable of interacting with MHC-I or MHC-II molecules while fewer interact with B-cell receptor. Subsequently, the epitopes were tested *in silico* for their antigenicity, allergenicity, and physicochemical properties, and those that did not meet the cutoff thresholds were removed. The number of epitopes related to each step is described in Supplementary Table 2.

The selected epitopes were aligned to obtain the region with the highest repetition, and the regions were again tested for antigenicity to obtain the most promiscuous peptide. It should be noted that in some cases, the number of amino acids in the epitopes originally provided by the IEDB was altered to enhance antigenicity, and for this purpose, the analyses were repeated in the IEDB to confirm that the interaction with MHC-I, MHC-II, and B-cell receptors still occurred. The epitopes were selected based on their interaction with MHC-I, MHC-II, and BCR or MHC-I and BCR or MHC-I and MHC-II. The final amino acid sequences of each epitope and their respective antigenicity values are indicated in Supplementary Table 1.

It is important to mention that transmembrane regions were identified by the SOSUI server, and epitopes present in these regions were removed. However, only a few regions were found, with one in the A17L protein (341-363), one in H2R (30-52), three in A27L (92-114, 138-160, and 195-271), and one in A35R (38-60). The remaining proteins were identified as soluble.

3.3 Filtering epitopes for a chimeric protein designed with promiscuous epitopes shows no similarity, high antigenicity, low allergenicity, and good stability

For the construction of a chimeric protein, it was necessary to select one epitope from each protein, requiring a standardized selection process. The first selection prioritized epitopes that interact with B-cell receptors, MHC-I, and MHC-II simultaneously. Since the A27L protein had four epitopes, all four underwent VaxiJen and ProtParam analyses to choose the best among them obtaining only one defined by its antigenicity and stability. However, not all proteins had epitopes that interacted with B-cell receptors, MHC-I, and MHC-II simultaneously, so a second selection was performed. The other proteins that have epitopes that interact only with B-cell receptors and MHC-I or MHC-I and MHC-II also underwent VaxiJen and ProtParam to select the best epitopes for each protein within these interactions.

In addition, for the construction of the chimeric protein, two adjuvants, β -defensin to enhance vaccine immunogenicity, and PADRE to enhance vaccine efficacy by favoring the CD4+ T cells activation [23] were used. These adjuvants were combined with the EAAAK ligand, known for its rigid binding, and then the pre-selected epitopes were linked with the GGGGGG ligand, known for its flexible binding. In total, the chimeric protein had 226 amino acids, and the design of the vaccine construct can be seen in Figure 1C. The BLAST analysis indicated that the chimeric protein exhibits similarity only in the adjuvant portion, whereas the epitope region showed no similarity with any other protein deposited in the databases.

The chimeric protein indicated a good antigenicity value of 0.9442. The molecular weight of the chimeric protein was 22,230.11 KDa, the theoretical isoelectric point was 9.85, suggesting a basic nature. The stability index was 37.56, indicating that the protein is stable, and the aliphatic index was 61.41, indicating broad thermostability. The hydrophobicity (GRAVY) was -0.315, indicating that the molecule is hydrophilic. For the prediction of allergenicity, the AllerCatPro 2.0 server was used, and the chimeric protein showed no evidence of allergenicity. For solubility prediction, the SOLpro server was used, and a value of 0.884415 was obtained, indicating that the protein is soluble.

3.6 Chimeric protein exhibits good stability, low fluctuation, and TLR receptor interaction occurs in adjuvants and epitopes

The 3D structure of the chimeric protein corresponding to rank 1 was used in the molecular dynamics step because it had the best pLDDT prediction result. However, it is important to mention that the structure showed high prediction values for the adjuvants and low values for the epitope regions. This is because the crystallographic forms of the adjuvant proteins can be found in databases such as the PDB, while the entry and exit proteins of the virus do not have well-defined crystallographic forms.

The modeled protein was then subjected to molecular dynamics simulation (Figure 2A). The stability of the structure over time was evaluated by generating the Root Mean Square Deviation

(RMSD) graph showing that the protein achieved stability after 30 ns and remained stable until the end of the simulation (70 ns), with a structure variation ranging from 1.11 nm to 1.53 nm (Figure 2A). The Root Mean Square Fluctuation (RMSF) showed that the protein achieved stability after 30 ns and remained stable until the end of the simulation (70 ns), with a structure variation ranging from 1.11 nm to 1.53 nm (Figure 2A). The RMSF graph indicated higher variation in the beta-defensin adjuvant compared to the rest of the protein.

Molecular docking indicated good interactions between the TLRs and the chimeric protein (Figure 2B). With TLR-2, the chimeric protein achieved a binding energy of -955.5 kcal/mol with 25 members. It formed 4 hydrogen bonds, 2 salt bridges, and 62 hydrophobic interactions. With TLR-4, the protein obtained a binding energy of -1,164.8 kcal/mol with 34 members, 19 hydrogen bonds, and 38 hydrophobic interactions. With TLR-8, the protein obtained a binding energy of -1,456.2 kcal/mol with 71 members, 44 hydrogen bonds, 4 salt bridges, and 60 hydrophobic interactions. It is important to note that the vaccine interacted with amino acids involving epitopes and adjuvants in all TLRs.

3.7 In silico immune response simulation indicates a good humoral and cellular response

In silico immune response simulation was performed showing that although the graph for a single dose shows a high peak, the lateral scale demonstrates that the response is small compared to the response from three doses, both in terms of IgM+IgG, IgG1, and IgM. The IgM+IgG antibodies showed an increase from 45,000 at 30 days to 250,000 at 90 days (Figure 2C).

Regarding cytokines, the in silico results demonstrated that the production of IFN- γ occurs similarly with one or three doses, as the response reaches similar values of mg/mL in the first dose, with a slight decrease in the following two doses. The values of TGF- β , IL-10, and IL-12 decrease from the first dose to the subsequent ones. Finally, it can be observed that the use of one or three doses does not generate alterations in potential danger levels, as described by the letter Fig. 2D.

4. DISCUSSION

Emerging and reemerging MPXV infections have threatened the healthcare sector due to the evolution of genomic characteristics and the lack of specific targeted therapy [24]. The treatments for Mpox consist of medications, like Tecovirimat, Brincidofovir, and Cidofovir, with proven results for the smallpox treatment, but there is still no data regarding their effectiveness for MPXV [25]. For Mpox prevention, there are three vaccines: JYNNEOS™ and ACAM2000®, which are licensed, and Aventis Pasteur Smallpox Vaccine (APSV), used in special cases. JYNNEOS™ and ACAM2000® employ the live attenuated virus. They are not recommended for immunocompromised individuals, making it impractical for use in underdeveloped countries, such as African nations, where both MPXV and HIV viruses are more prevalent. Lastly, the APSV vaccine is used against smallpox and has not been proven effective against Mpox [25].

In this study, it was observed that the proteins responsible for the entry and exit of MPXV in host cells exhibit high conservation values, averaging 98.70%. This can be justified by the fact that MPXV is a double-stranded DNA virus, which has fewer chances of mutation. Therefore, the mutations mentioned by Kumar et al. [5] are likely to occur in regions outside the proteins responsible for viral entry and exit from the host. According to our findings, Shantier et al. [27], which used the MPXV binding protein (E8L), and Sanami et al. [28], which used the A28L protein showed a higher conservation in those proteins. In the present study, these proteins also showed conservation values ranging from 98% to 100%.

According to Hatmal et al. [3], viral proteins are essential for MPXV and can be grouped into viral entry proteins that facilitate virus entry into host cells, proteins involved in virus release from cells, and proteins that modulate the immune response and host cell. Since viral entry and release proteins could be targets for neutralizing antibodies or induce a T-cell-mediated cellular response, epitopes interacting with B-cell receptors, MHC-I, and MHC-II were selected in this study to design a potential vaccine against MPXV. Computational vaccine design offers thermodynamically stable, effective, specific, and cost-effective solutions compared to traditional vaccine development [29]. Epitope-based vaccines can help overcome challenges such as genetic and antigenic variations [30]. Here, using a stringent selection protocol, we obtained rationally 10 antigenic epitopes.

Furthermore, the combination of protein antigens with adjuvants triggers local immune responses and the production of pro-inflammatory cytokines by macrophages [29]. This response is extremely necessary for activated dendritic cells or macrophages, allowing T cells to recognize the MHC/antigen complex through their T-cell receptors, leading to the production of memory T cells and the development of adaptive immunity [29]. To trigger a humoral immune response that activates B cells to produce antibodies, B-cell epitopes are required [26]. Therefore, a multi-epitope vaccine that interacts simultaneously with T-cell and B-cell receptors significantly stimulates both humoral and cellular immune responses [31]. Here, from 10 selected epitopes that interact not only with MHC molecules but also to BCRs, it was designed a new protein linked to adjuvants performing 226 amino acids. Additionally, the chimeric protein exhibits unprecedented potential due to its dissimilarity to existing proteins.

The molecular dynamics of the chimeric protein were performed due to the possibility of conformational changes occurring in the protein's structure in environments with variables such as pressure, pH, and temperature. The results indicated that the new protein obtains a stable conformational structure and could thus be subjected to molecular docking studies.

Based on the molecular docking analyses, high binding energy values can be observed in Toll-like receptors. For example, the binding energy between the vaccine and TLR-2 was -955.5 kcal/mol, for TLR-4 it was -1,164.8 kcal/mol, and for TLR-8 it was -1,456.2 kcal/mol. These results suggest a good affinity to the receptors, as the binding energy is similar to other studies found in the

literature that used a similar methodology to this study [31] and even in methodology involving other microorganisms [32, 33].

Finally, immune simulation analysis was performed, which monitors the immune system response in terms of antibody production after the injection of constructed vaccines [29]. In our analyses, it is possible to note that the use of three doses of the vaccine shows potential, given the high levels of immune response. In the work of Shantier et al. [34] and Aiman et al. [35], levels of IFNs and IL-2 increased after the initial injection and remained at elevated levels after repeated doses of antigen, a situation similar to our study, and according to the authors, this implies a high number of T-helper cells and, as a result, efficient generation of antibodies, which supports a humoral response. Therefore, the observation of all these data points to the potential of the chimeric vaccine developed here to induce long-lasting cellular and humoral immune response.

5. CONCLUSION

It is notorious that the emerging increase in the number of MPXV infection cases has been causing alarm to global public health organizations, mainly due to the lack of effective treatments against the virus's pathogenesis. The vaccine is considered a more efficient preventive method. Thus, this study carried out the development of a stable, antigenic, and non-allergenic chimeric protein with epitopes capable of simultaneous interactions with immune receptors. Furthermore, the protein exhibited strong binding to TLR-2, TLR-4, and TLR-8, and in immune response simulations, it showed an increased cellular adaptive response and the production of IgM and IgG antibodies without demonstrating any danger indicators. Finally, further tests, particularly in vitro and in vivo, are necessary to validate the findings and results demonstrated in silico.

Author contributions: LPA: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology;

Validation; Writing - original draft; NCM: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Validation; Writing - original draft; LAA and PPC: conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Resources; Supervision; Validation; Visualization; Writing – original draft.

Funding: This study was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES) (Finance Code 001)

Conflict of Interest: The authors declare that research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Reference:

1 Walter K, Malani PN. What Is Monkeypox?. JAMA. 2022;328(2):222. doi:10.1001/jama.2022.10259

- 2 Peng Q, Xie Y, Kuai L, et al. Structure of monkeypox virus DNA polymerase holoenzyme. *Science*. 2023;379(6627):100-105. doi:10.1126/science.ade6360
- 3 Hatmal MM, Al-Hatamleh MAI, Olaimat AN, et al. Revisão abrangente da literatura sobre varíola dos macacos. *Emerg Microbes Infect* . 2022;11(1):2600-2631. doi:10.1080/22221751.2022.2132882
- 4 Karagoz A, Tombuloglu H, Alsaed M, et al. Monkeypox (mpox) virus: Classification, origin, transmission, genome organization, antiviral drugs, and molecular diagnosis. *J Infect Public Health*. 2023;16(4):531-541. doi:10.1016/j.jiph.2023.02.003
- 5 Kumar N, Acharya A, Gendelman HE, Byrareddy SN. The 2022 outbreak and the pathobiology of the monkeypox virus. *J Autoimmun*. 2022;131:102855. doi:10.1016/j.jaut.2022.102855
- 6 Hong, J., Pan, B., Jiang, H., Zhang, Q., Xu, X., Jiang, H., . . . Yu, Q. (2023). The willingness of Chinese healthcare workers to receive monkeypox vaccine and its independent predictors: A cross-sectional survey. *Journal of Medical Virology*, 95(1), E28294-N/a. doi: 10.1002/jmv.28294
- 7 Vartak, A., & Sucheck, S. J. (2016). Recent advances in subunit vaccine carriers. *Vaccines*, 4(2), 12. doi:10.3390/vaccines4020012
- 8 Moutaftsi, M., Peters, B., Pasquetto, V., Tschärke, D. C., Sidney, J., Bui, H. H., ... & Sette, A. (2006). A consensus epitope prediction approach identifies the breadth of murine TCD8⁺-cell responses to vaccinia virus. *Nature biotechnology*, 24(7), 817-819. doi: 10.1038/nbt1215
- 9 Kotturi, M. F., Peters, B., Buendia-Laysa Jr, F., Sidney, J., Oseroff, C., Botten, J., ... & Sette, A. (2007). The CD8⁺ T-cell response to lymphocytic choriomeningitis virus involves the L antigen: uncovering new tricks for an old virus. *Journal of virology*, 81(10), 4928-4940. doi:10.1128/jvi.02632-06
- 10 GREENBAUM, Jason et al. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. *Immunogenetics*, v. 63, p. 325-335, 2011. doi: 10.1007/s00251-011-0513-0
- 11 Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., & Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic acids research*, 45(W1), W24-W29. doi:10.1093/nar/gkx346
- 12 Doytchinova, I. A., & Flower, D. R. (2007). VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC bioinformatics*, 8(1), 1-7. doi: 10.1186/1471-2105-8-4
- 13 Nguyen, M. N., Krutz, N. L., Limviphuvadh, V., Lopata, A. L., Gerberick, G. F., & Maurer-Stroh, S. (2022). AllerCatPro 2.0: a web server for predicting protein allergenicity potential. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W36-W43. doi: 10.1093/nar/gkac446
- 14 Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. E., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server (pp. 571-607). Humana press. doi: 10.1385/1-59259-890-0:571
- 15 LaMarche, B. L., Crowell, K. L., Jaitly, N., Petyuk, V. A., Shah, A. R., Polpitiya, A. D., ... & Smith, R. D. (2013). MultiAlign: a multiple LC-MS analysis tool for targeted omics analysis. *BMC bioinformatics*, 14(1), 1-14. doi: 10.1186/1471-2105-14-49
- 16 Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., & Mitaku, S. (1998). SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(4), 378-379. doi: 10.1093/bioinformatics/14.4.378
- 17 Magnan, C. N., Randall, A., & Baldi, P. (2009). SOLpro: accurate sequence-based prediction of protein solubility. *Bioinformatics*, 25(17), 2200-2207. doi: doi.org/10.1093/bioinformatics/btp386

- 18 Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389
- 19 Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., ... & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2
- 20 Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*, 26(16), 1701–1718. doi: <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>
- 21 Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., & Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature protocols*, 12(2), 255–278. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>
- 22 Rapin, N., Lund, O., Bernaschi, M., & Castiglione, F. (2010). Computational immunology meets bioinformatics: the use of prediction tools for molecular binding in the simulation of the immune system. *PloS one*, 5(4), e9862. doi: 10.1371/journal.pone.0009862
- 23 Ghaffari-Nazari H, Tavakkol-Afshari J, Jaafari MR, Tahaghoghi-Hajghorbani S, Masoumi E, Jalali SA. Improving Multi-Epitope Long Peptide Vaccine Potency by Using a Strategy that Enhances CD4+ T Help in BALB/c Mice. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142563. Published 2015 Nov 10. doi:10.1371/journal.pone.0142563
- 24 Swetha RG, Basu S, Ramaiah S, Anbarasu A. Multi-Epitope Vaccine for Monkeypox Using Pan-Genome and Reverse Vaccinology Approaches. *Viruses*. 2022;14(11):2504. Published 2022 Nov 12. doi:10.3390/v14112504
- 25 Rizk, J. G., Lippi, G., Henry, B. M., Forthal, D. N., & Rizk, Y. (2022). Prevention and treatment of monkeypox. *Drugs*, 82(9), 957–963. doi:10.1007/s40265-022-01742-y
- 26 Mazumder L, Hasan MR, Fatema K, Begum S, Azad AK, Islam MA. Identification of B and T Cell Epitopes to Design an Epitope-Based Peptide Vaccine against the Cell Surface Binding Protein of Monkeypox Virus: An Immunoinformatics Study. *J Immunol Res*. 2023;2023:2274415. Published 2023 Feb 22. doi:10.1155/2023/2274415
- 27 Shantier SW, Mustafa MI, Abdelmoneim AH, Fadl HA, Elbager SG, Makhawi AM. Novel multi epitope-based vaccine against monkeypox virus: vaccinomic approach. *Sci Rep*. 2022;12(1):15983. Published 2022 Sep 25. doi:10.1038/s41598-022-20397-z
- 28 Sanami S, Nazarian S, Ahmad S, et al. In silico design and immunoinformatics analysis of a universal multi-epitope vaccine against monkeypox virus. *PLoS One*. 2023;18(5):e0286224. Published 2023 May 23. doi:10.1371/journal.pone.0286224
- 29 Suleman M, Rashid F, Ali S, et al. Immunoinformatic-based design of immune-boosting multiepitope subunit vaccines against monkeypox virus and validation through molecular dynamics and immune simulation. *Front Immunol*. 2022;13:1042997. Published 2022 Oct 13. doi:10.3389/fimmu.2022.1042997
- 30 Akhtar N, Kaushik V, Grewal RK, et al. Immunoinformatics-Aided Design of a Peptide Based Multiepitope Vaccine Targeting Glycoproteins and Membrane Proteins against Monkeypox Virus. *Viruses*. 2022;14(11):2374. Published 2022 Oct 27. doi:10.3390/v14112374
- 31 Ullah A, Shahid FA, Haq MU, et al. An integrative reverse vaccinology, immunoinformatic, docking and simulation approaches towards designing of multi-epitopes based vaccine against monkeypox

- virus [published online ahead of print, 2022 Sep 21]. *J Biomol Struct Dyn*. 2022;1-14. doi:10.1080/07391102.2022.2125441
- 32 Pourseif MM, Yousefpour M, Aminianfar M, Moghaddam G, Nematollahi A. A multi-method and structure-based in silico vaccine designing against *Echinococcus granulosus* through investigating enolase protein. *Bioimpacts*. 2019;9(3):131-144. doi:10.15171/bi.2019.18
- 33 Oladipo EK, Ajayi AF, Onile OS, et al. Designing a conserved peptide-based subunit vaccine against SARS-CoV-2 using immunoinformatics approach. *In Silico Pharmacol*. 2021;9(1):8. Published 2021 Jan 6. doi:10.1007/s40203-020-00062-x
- 34 Shantier SW, Mustafa MI, Abdelmoneim AH, Fadl HA, Elbager SG, Makhawi AM. Novel multi epitope-based vaccine against monkeypox virus: vaccinomic approach. *Sci Rep*. 2022;12(1):15983. Published 2022 Sep 25. doi:10.1038/s41598-022-20397-z
- 35 Aiman S, Alhamhoom Y, Ali F, et al. Multi-epitope chimeric vaccine design against emerging Monkeypox virus via reverse vaccinology techniques- a bioinformatics and immunoinformatics approach. *Front Immunol*. 2022;13:985450. Published 2022 Aug 25. doi:10.3389/fimmu.2022.985450

Figure 1 – Identification of epitopes from entry and/or exit proteins from MPXV into the host. (A) Flowchart of the processes carried out to obtain the epitopes, illustrating at each step the software used and the total quantity of epitopes obtained. (B) 3D diagram of the input and output proteins of the MPXV, in red are the portions of the rationally obtained epitopes. (C) The 3D structure prediction of the chimeric protein shows high values for the prediction of adjuvants and low values for the epitope region.

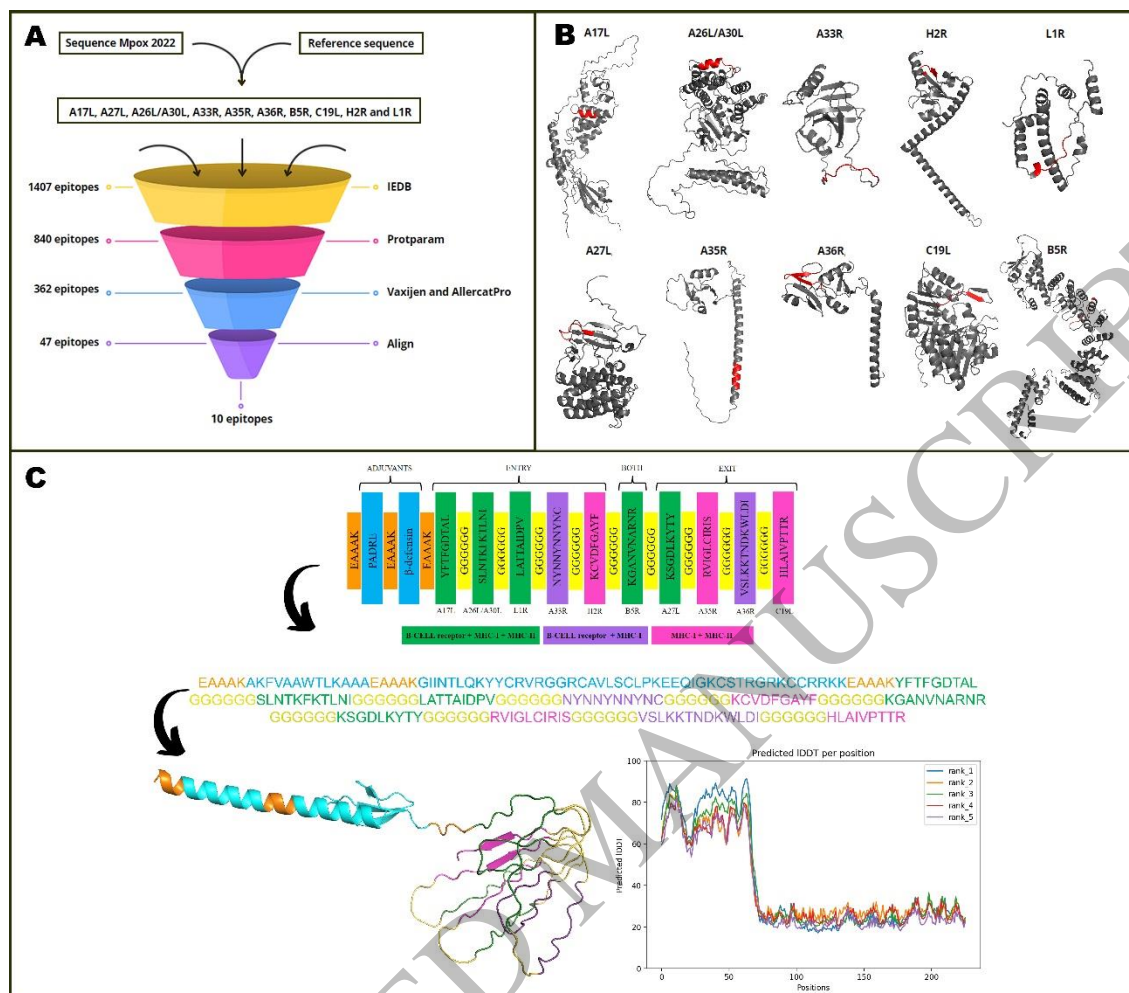
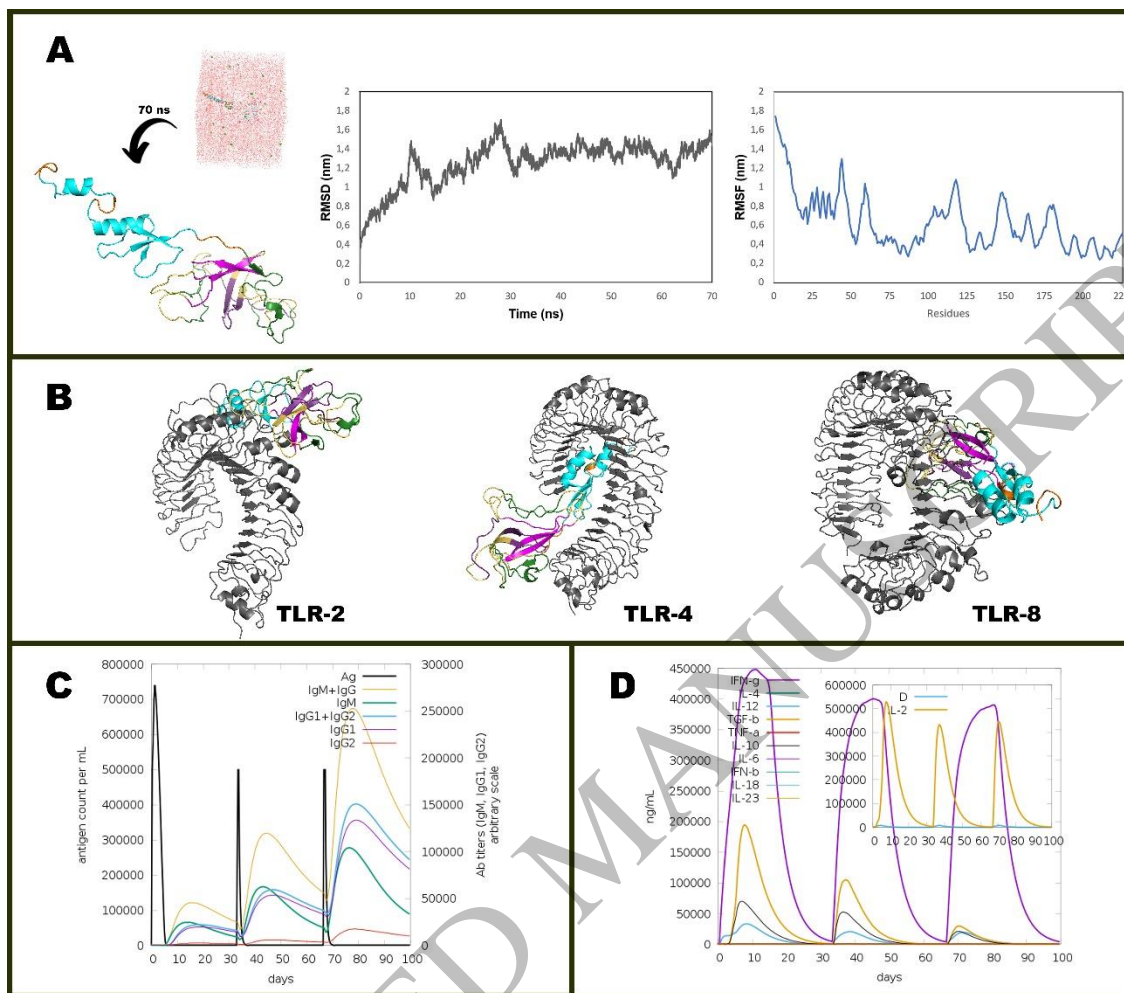


Figure 2 – The constructed chimeric protein demonstrated stability after 30 ns with good interaction with TLRs and promising results for the immune response. (A) Chimeric protein after molecular dynamics and RMSD and RMSF results. (B) Molecular docking of the chimeric protein with TLR-2, TLR-4 or TLR-8. (C) Results *in silico* of Immunoglobulin concentrations relative to antigen concentration. (D) Cytokine and interleukin levels for three-dose application. The "D" in the inserted graph represents a potential danger signal and potential response interleukin-2 as a leukocyte growth factor.



11 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos nos dois capítulos desse trabalho demonstraram a importância da bioinformática no desenvolvimento de vacinas. Ao integrar diferentes abordagens computacionais é possível agilizar o processo do desenvolvimento de vacinas, reduzindo custos e aumentando a probabilidade de sucesso. Dessa forma, desempenhando um papel essencial na otimização da eficácia e segurança das vacinas, acelerando a resposta global a doenças emergentes e reemergentes, como a COVID-19 e a varíola dos macacos.

REFERENCIAS

- ABDI, S. A. H. *et al.* Multi-Epitope-Based Vaccine Candidate for Monkeypox: An In Silico Approach. **Vaccines**, [S.l.], v. 10, n. 9, 1564, Set. 2022. doi:10.3390/vaccines10091564
- Afrough B, Dowall S, Hewson R. Emerging viruses and current strategies for vaccine intervention. **Clin Exp Immunol.**, [S.l.], v. 196, n. 2, p. 157-166, Maio 2019. doi:10.1111/cei.13295
- AIMAN, S. *et al.* Multi-epitope chimeric vaccine design against emerging Monkeypox virus via reverse vaccinology techniques- a bioinformatics and immunoinformatics approach. **Frontiers in immunology**, [S.l.] v. 13, 985450, Ago. 2022. doi:10.3389/fimmu.2022.985450
- AKHTAR, N. *et al.* Design of a multi-epitope vaccine against the pathogenic fungi *Candida tropicalis* using an *in silico* approach. **J Genet Eng Biotechnol.**, [S.l.], v. 20, n. 1, 140, Dez. 2022. doi:10.1186/s43141-022-00415-3
- ALBUTTI, A. Proteome-Wide and Protein-Specific Multi-Epitope Vaccine Constructs Against the Rift Valley Fever Virus Outbreak Using Integrated Omics Approaches. **Front Microbiol.**, [S.l.], v. 13, 921683, Maio 2022. doi:10.3389/fmicb.2022.921683
- ALHARBI, N.; SKWARCZYNSKI, M.; TOTH, I. The influence of component structural arrangement on peptide vaccine immunogenicity. **Biotechnology Advances**, [S.l.], v. 60, 108029, Ago. 2022. doi:10.1016/j.biotechadv.2022.108029
- ALURI, J.; COOPER, M. A.; SCHUETTPELZ, L. G. Toll-Like Receptor Signaling in the Establishment and Function of the Immune System. **Cells.**, [S.l.], v. 10, n. 6, 1374, Jun. 2021. doi:10.3390/cells10061374
- ARIAWAN *et al.* Recent progress in synthetic self-adjuvanting vaccine development. **Biomater. Sci.**, [S.l.], v. 10, p. 4037-4057, Maio 2022. doi:10.1039/D2BM00061J
- BAMBRA C. Pandemic inequalities: emerging infectious diseases and health equity. **Int J Equity Health**, [S.l.], v. 21, n. 1, 6, Jan. 2022. doi:10.1186/s12939-021-01611-2
- BEHMARD, E. *et al.* Immunoinformatic design of a COVID-19 subunit vaccine using entire structural immunogenic epitopes of SARS-CoV-2. **Sci Rep.**, [S.l.], v. 10, 20864, Nov. 2020. doi:10.1038/s41598-020-77547-4
- BHAT, E. A. *et al.* SARS-CoV-2: Insight in genome structure, pathogenesis and viral receptor binding analysis - An updated review. **International immunopharmacology**, [S.l.], v. 95, 107493, Jun. 2021. doi:j.intimp.2021.107493
- BRISSE, M. *et al.* Emerging Concepts and Technologies in Vaccine Development. **Frontiers in immunology**, [S.l.], v. 11, 583077, 2020. doi:10.3389/fimmu.2020.583077
- CHAKRABORTY, S.; BARMAN, A.; DEB, B. Japanese encephalitis virus: A multi-epitope loaded peptide vaccine formulation using reverse vaccinology approach. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, [S.l.], v. 78, 104106, 2020. doi:10.1016/j.meegid.2019.104106
- CHAMS, N. *et al.* (2020). COVID-19: A Multidisciplinary Review. **Frontiers in public health**, [S.l.], v. 8, 383, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00383>

- CHEN, X.; ZARO, J. L.; SHEN, W. C. Fusion protein linkers: Property, design and functionality. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 65, n. 10, p. 1357–1369, 2013. doi:10.1016/j.addr.2012.09.039
- DALSASS, M. *et al.* Comparison of Open-Source Reverse Vaccinology Programs for Bacterial Vaccine Antigen Discovery. **Frontiers in immunology**, [S.l.], v. 10, p. 113, 2019. doi:10.3389/fimmu.2019.00113
- DE ARAÚJO, L. P. *et al.* Epitope identification of SARS-CoV-2 structural proteins using in silico approaches to obtain a conserved rational immunogenic peptide. **Immunoinformatics (Amsterdam, Netherlands)**, v. 7, 100015, 2022. doi: 10.1016/j.immuno.2022.100015
- DEVI, Y. D. *et al.* Immunoinformatics mapping of potential epitopes in SARS-CoV-2 structural proteins. **PloS one**, [S.l.], v. 16, n. 11, e0258645, 2021. doi:10.1371/journal.pone.0258645
- DIATTA, K. L. E. S. *et al.* Useful public health countermeasures to control the current multicountry outbreak of Monkeypox disease. **Front Public Health.**, [S.l.], v. 10, 1060678, Jan 2023. doi:10.3389/fpubh.2022.1060678
- DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC bioinformatics**, [S.l.], v. 8, n. 4, Jan 2007. doi:10.1186/1471-2105-8-4
- FERNANDES, Q. *et al.* (2022). Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. **Annals of medicine**, [S.l.], v. 54, n. 1, p. 524–540, 2022. doi:10.1080/07853890.2022.2031274
- FIROUZABADI, N. *et al.* Update on the effectiveness of COVID-19 vaccines on different variants of SARS-CoV-2. **International immunopharmacology**, [S.l.], v. 117, 109968, 2023. doi:10.1016/j.intimp.2023.109968
- GALINDO-GONZÁLEZ, J. Live animal markets: Identifying the origins of emerging infectious diseases. **Curr Opin Environ Sci Health**, [S.l.], v. 25, 100310, 2022. doi:10.1016/j.coesh.2021.100310
- GARG, V. K. *et al.* MFPPi - Multi FASTA ProtParam Interface. **BIOINFORMATION**, [S.l.], v. 12, n. 2, p. 74–77, 2016. doi:10.6026/97320630012074
- GHAFFARI-NAZARI, H. *et al.* Improving Multi-Epitope Long Peptide Vaccine Potency by Using a Strategy that Enhances CD4+ T Help in BALB/c Mice. **PloS one**, [S.l.], p. 10, n. 11, e0142563, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0142563
- GONG, Q. *et al.* Monkeypox virus: a re-emergent threat to humans. **Virologica Sinica**, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 477–482, 2022. doi:10.1016/j.virs.2022.07.006
- GUSTIANANDA, M. *et al.* Immunoinformatics Analysis of SARS-CoV-2 ORF1ab Polyproteins to Identify Promiscuous and Highly Conserved T-Cell Epitopes to Formulate Vaccine for Indonesia and the World Population. **Vaccines**, [S.l.], v. 9, n. 12, 1459, 2021. doi:10.3390/vaccines9121459
- HARAPAN, H. *et al.* Monkeypox: A Comprehensive Review. **Viruses**, [S.l.], v. 14, p. 10, 2155, 2022. doi:10.3390/v14102155
- HATMAL, M. M. *et al.* Comprehensive literature review of monkeypox. **Emerging microbes & infections**, [S.l.], v. 11, v. 1, p. 2600-2631, 2022. doi:10.1080/22221751.2022.2132882.

- HU, B. *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature reviews. Microbiology**, [S.l.], v. 19, n. 3, p. 141–154, 2021. doi:10.1038/s41579-020-00459-7
- JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, [S.l.], v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021. doi:10.1038/s41586-021-03819-2
- KALAWAT, U.; MOHAN, A. Endemic, emerging and re-emerging zoonotic diseases: The way forward! **Journal of Clinical and Scientific Research**, [S.l.], v. 12, n. 2, p. 79-80, Jun 2023. doi:10.4103/jcsr.jcsr_72_23
- KARAGOZ, A. *et al.* Monkeypox (mpox) virus: Classification, origin, transmission, genome organization, antiviral drugs, and molecular diagnosis. **Journal of infection and public health**, [S.l.], v. 16, n. 4, p. 531-541, 2023. doi:10.1016/j.jiph.2023.02.003
- KARAGOZ, A. *et al.* Monkeypox (mpox) virus: Classification, origin, transmission, genome organization, antiviral drugs, and molecular diagnosis. **Journal of infection and public health**, [S.l.], v. 16, n. 4, p. 531-541, 2023. doi:10.1016/j.jiph.2023.02.003
- KMIEC, D.; KIRCHHOFF, F. Monkeypox: A New Threat?. **International journal of molecular sciences**, [S.l.], v. 23, n.14, 7866, 2022. Doi:10.3390/ijms23147866
- KUMAR, N. *et al.* The 2022 outbreak and the pathobiology of the monkeypox virus. **J Autoimmun**, [S.l.], v. 131, 102855, Jun. 2022. doi: 10.1016/j.jaut.2022.102855
- KUMAR, N. *et al.* The 2022 outbreak and the pathobiology of the monkeypox virus. **Journal of autoimmunity**, [S.l.], v. 131, 102855, 2022. doi:10.1016/j.jaut.2022.102855
- LEI, Y. *et al.* 2019. Application of built-in adjuvants for epitope-based vaccines. **PeerJ**, [S.l.], v. 6, e6185, Jan 2019. doi:10.7717/peerj.6185
- LI, Y. D. *et al.* Coronavirus vaccine development: from SARS and MERS to COVID-19. **J Biomed Sci.**, [S.l.], v. 27, n. 1, p. 104, 2020. doi:10.1186/s12929-020-00695-2
- LUM, F. M. *et al.* Monkeypox: disease epidemiology, host immunity and clinical interventions. **Nature reviews. Immunology**, [S.l.], v. 22, n. 10, p. 597–613, 2022. doi:10.1038/s41577-022-00775-4
- MA, L. *et al.* Comprehensive analyses of bioinformatics applications in the fight against COVID-19 pandemic. **Computational biology and chemistry**, [S.l.], v. 95, 107599, 2021. doi:10.1016/j.compbiolchem.2021.107599
- MADHAV, A. *et al.* Vaccines for neglected, emerging and re-emerging diseases. **Semin Immunol.**, [S.l.], v. 50, 101423, 2020. doi:10.1016/j.smim.2020.101423
- MAJUMDER, J.; MINKO, T. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. **AAPS J**, [S.l.], v. 23, n. 1, p. 14, 2021. doi: 10.1208/s12248-020-00532-2
- MAO, H. H.; CHAO, S. Advances in Vaccines. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, [S.l.], v. 171, p. 155-188, 2020. doi:10.1007/10_2019_107
- MARTÍN-DELGADO, M. C. *et al.* Monkeypox in humans: a new outbreak. **Revista Española de Quimioterapia**, [S.l.], v. 35, n. 6, p. 509–518, Jun 2022. doi:10.37201/req/059.2022
- MCLEAN, G. *et al.* The Impact of Evolving SARS-CoV-2 Mutations and Variants on COVID-19 Vaccines. **mBio**, [S.l.], v. 13, n. 2, e0297921, 2022. doi:10.1128/mbio.02979-21

- MEDHA, B. P.; PRIYANKA, S. M.; SHARMA, S. Prediction and identification of T cell epitopes of COVID-19 with balanced cytokine response for the development of peptide based vaccines. **In silico pharmacology**, [S.l.], v. 9, n. 1, 40, 2021. doi:10.1007/s40203-021-00098-7
- MEHTA, P.; FAJGENBAUM, D, C. Is severe COVID-19 a cytokine storm syndrome: a hyperinflammatory debate. **Curr Opin Rheumatol.**, [S.l.], v. 33, v. 5, p. 419-430, 2021. doi:10.1097/BOR.0000000000000822
- MISTRY, P. *et al.* SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. **Frontiers in immunology**, [S.l.], v. 12, 809244. doi:10.3389/fimmu.2021.809244
- MITRA, D. *et al.* In silico design of multi-epitope-based peptide vaccine against SARS-CoV-2 using its spike protein. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, [S.l.], v. 40, n. 11, p. 5189–5202, 2022. doi:10.1080/07391102.2020.1869092
- MOLAEI, S. *et al.* The immune response and immune evasion characteristics in SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2: Vaccine design strategies. **International immunopharmacology**, [S.l.], v. 92, 107051, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107051>
- MONTERRUBIO-LÓPEZ, G. P.; DELGADILLO-GUTIÉRREZ, K. Vacunología reversa: estrategia contra patógenos emergentes [Reverse vaccinology: strategy against emerging pathogens]. **Rev Med Inst Mex Seguro Soc.**, [S.l.], v. 59, n. 3, p. 233-241, Agosto 2021. PMID: 34370422
- MUHAR, B. K. *et al.* The Race for COVID-19 Vaccines: The Various Types and Their Strengths and Weaknesses. **Journal of pharmacy practice**, [S.l.], v. 36, n. 4, p. 953–966, 2023. doi:10.1177/08971900221097248
- MURALIDAR, S. *et al.* The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. **Biochimie**, [S.l.], v. 179, p. 85-100, 2020. doi: 10.1016/j.biochi.2020.09.018
- NGUYEN, M. N. *et al.* AllerCatPro 2.0: a web server for predicting protein allergenicity potential. **Nucleic acids research**, [S.l.], v. 50, n. 1, p. 36–43, 2022. doi:10.1093/nar/gkac446
- OLIVEIRA, K. C. *et al.* Epitope-Based Vaccine of a Brucella abortus Putative Small RNA Target Induces Protection and Less Tissue Damage in Mice. **Frontiers in immunology**, [S.l.], v. 12, 778475, 2021. doi:10.3389/fimmu.2021.778475
- OMS. Organização Mundial de Saúde. **Painel da OMS COVID-19**. 2023. Disponível em: <<https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths>>. Acesso em: 15 de jan. de 2024.
- ONG, E. *et al.* COVID-19 Coronavirus Vaccine Design Using Reverse Vaccinology and Machine Learning. **Frontiers in immunology**, [S.l.], v. 11, p. 1581, 2020. doi:10.3389/fimmu.2020.01581
- ONG, E; WONG, M. U.; HUDDMAN, A.; HE, Y. COVID-19 Coronavirus Vaccine Design Using Reverse Vaccinology and Machine Learning. **Front Immunol**, [S.l.], v. 11, p. 1581, 2020. doi: 10.3389/fimmu.2020.01581
- PENG, R. *et al.* (2021). Cell entry by SARS-CoV-2. **Trends in Biochemical Sciences**, [S.l.], v. 46, n. 10, p. 848-860, 2021. doi:10.1016/j.tibs.2021.06.001
- PIRET, J.; BOIVIN, G. Pandemics Throughout History. **Frontiers in microbiology**, [S.l.], v. 11, 631736, 2021. doi:10.3389/fmicb.2020.631736

- POLAND, G. A.; KENNEDY, R. B.; TOSH, P. K. Prevention of monkeypox with vaccines: a rapid review. *The Lancet. Infectious diseases*, [S.l.], v. 22, n. 12, e349–e358, 2022. doi:10.1016/S1473-3099(22)00574-6
- QIU, R. *et al.* Supramolecular Nanofibers Block SARS-CoV-2 Entry into Human Host Cells. *ACS Appl Mater Interfaces*, [S.l.], v. 15, n. 22, p. 26340-26348, 2023. doi:10.1021/acsami.3c02447
- RAFI, M. O. *et al.* Design of a multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2: immunoinformatic and computational methods. *RSC advances*, [S.l.], v. 12, n. 7, p. 4288–4310, 2022. doi:10.1039/d1ra06532g
- RAHMAN, M. T. *et al.* Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. *Microorganisms*, [S.l.], v. 8, n. 9, 1405, 2020. doi: 10.3390/microorganisms8091405
- RAMPOGU, S. *et al.* An overview on monkeypox virus: Pathogenesis, transmission, host interaction and therapeutics. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, [S.l.], v. 13, 1076251, 2023. doi:10.3389/fcimb.2023.1076251
- RAPPUOLI, R. *et al.* Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. *The Journal of experimental medicine*, [S.l.], v. 213, n. 4, p. 469–481. doi:10.1084/jem.20151960
- RODRIGUES, T. C. V. *et al.* (2019). Reverse vaccinology and subtractive genomics reveal new therapeutic targets against *Mycoplasma pneumoniae*: a causative agent of pneumonia. *Royal Society open science*, [S.l.], v. 6, n. 7, 190907, 2019. doi:10.1098/rsos.190907
- SAADH, M. J. *et al.* Progress and prospects on vaccine development against monkeypox infection. *Microbial pathogenesis*, [S.l.], v. 180, 106156, 2023. doi:10.1016/j.micpath.2023.106156
- SANYAL, S. How SARS-CoV-2 (COVID-19) spreads within infected hosts - what we know so far. *Emerg Top Life Sci.*, [S.l.], v. 4, n. 4, p. 371-378, 2020. doi: 10.1042/ETLS20200165
- SINGHAL, T.; KABRA, S. K.; LODHA, R. Monkeypox: A Review. *Indian journal of pediatrics*, [S.l.], v. 89, n. 10, p. 955–960, 2022. doi: 10.1007/s12098-022-04348-0
- SPERNOVASILIS, N.; TSIODRAS, S.; POULAKOU G. Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases: Humankind's Companions and Competitors. *Microorganisms*, [S.l.], v. 10, n. 1, 98, 2022. doi:10.3390/microorganisms10010098
- SUNITA, S. A.; SINGH, Y.; SHUKLA, P. Computational tools for modern vaccine development. *Human vaccines & immunotherapeutics*, [S.l.], v. 16, n. 3, p. 723–735, 2020. doi:10.1080/21645515.2019.1670035
- SWETHA, R. G. *et al.* Multi-Epitope Vaccine for Monkeypox Using Pan-Genome and Reverse Vaccinology Approaches. *Viruses*, [S.l.], v. 14, n. 11, 2504, 2022. doi:10.3390/v14112504
- TIRZIU, A.; PAUNESCU, V. Cytotoxic T-Cell-Based Vaccine against SARS-CoV-2: A Hybrid Immunoinformatic Approach. *Vaccines*, [S.l.], v. 10, n. 2, 218, 2022. doi:10.3390/vaccines10020218
- UMAKANTHAN, S, *et al.* (2020). Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgraduate medical journal*, [S.l.], v. 96, n. 1142, p. 753–758, 2020. doi:10.1136/postgradmedj-2020-138234

VILLA, T. G. *et al.* Animal and human RNA viruses: genetic variability and ability to overcome vaccines. **Arch Microbiol.**, [S.l.], v. 203, n. 2, p. 443-464, 2021. doi:10.1007/s00203-020-02040-5

VIVIANI, S.; WILLEMS, P.; PAGLIUSI, S. Strengthening clinical development activities and preparedness for vaccine manufacturers from emerging countries: Results of a survey. **Vaccine: X**, [S.l.], v. 13, 100255, 2022. doi:10.1016/j.jvacx.2022.100255

V'KOVSKI, P. *et al.* Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. Nature reviews. **Microbiology**, [S.l.], v. 19, n. 3, p. 155–170, 2021. doi:10.1038/s41579-020-00468-6

WALTER, K.; MALANI, P. N. What Is Monkeypox? **JAMA.**, [S.l.], v. 328, n. 2, Jul 2022. doi: 10.1001/jama.2022.10259

WILLIAMSON, E. D; WESTLAKE, G. E. Vaccines for emerging pathogens: prospects for licensure. **Clin Exp Immunol.**, [S.l.], v. 198, n. 2, p. 170-183, 2019. doi:10.1111/cei.13284

WU, Q; LI, Q; LU, J. A One Health strategy for emerging infectious diseases based on the COVID-19 outbreak. **J Biosaf Biosecur**, [S.l.], v. 4, n. 1, p. 5-11, 2022. doi:10.1016/j.jobb.2021.09.003

YANG, H.; RAO, Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. **Nature reviews. Microbiology**, [S.l.], v. 19, n. 11, p. 685–700, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00630-8>

YU, X.; SHI, H.; CHENG, G. Mpox Virus: Its Molecular Evolution and Potential Impact on Viral Epidemiology. **Viruses**, [S.l.], v. 15, n. 4, 995, 2023. doi:10.3390/v15040995.

YU, X.; SHI, H.; CHENG, G. Mpox Virus: Its Molecular Evolution and Potential Impact on Viral Epidemiology. **Viruses**, [S.l.], v. 15, n. 4, 995, 2023. doi:10.3390/v15040995.

ZABIEGALA, A.; KIM, Y.; CHANG, K, O. Roles of host proteases in the entry of SARS-CoV-2. **Animal Diseases**, [S.l.], v. 3, n. 12, Abr. 2023. <https://doi.org/10.1186/s44149-023-00075-x>

ZHOU, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, [S.l.], v. 579, n. 7798, p. 270–273, 2020. doi:10.1038/s41586-020-2012-7