



Variabilidade genética do sars-cov-2: uma análise de mutações em epítomos de mhc-i e ii e impactos frente à vacinação por AZD1222 na população brasileira

Genetic variability of sars-cov-2: an analysis of mutations in mhc-i and ii epitopes and impacts on vaccination by AZD1222 in the brazilian population

**Ana Maria Barbosa Neves¹, Waléska Faustino Rodrigues², Kamilly Flávia Carvalho dos Santos³,
Maria Angélica Ramos da Silva^{4*}**

¹Mestranda em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa (PB), Brasil; ²Discente de engenharia elétrica, Instituto Federal da Paraíba, João Pessoa (PB), Brasil; ³Discente de engenharia elétrica, Instituto Federal da Paraíba, João Pessoa (PB), Brasil; ⁴Docente do Instituto Federal da Paraíba, João Pessoa (PB), Brasil.

*Autor correspondente: Maria Angélica – Email: maria.ramos@ifpb.edu.br

RESUMO

O estudo se propôs a analisar mutações em epítomos de MHC-I e II frente à vacinação com AZD1222 no Brasil. Foram identificadas mutações em seis epítomos, algumas diminuindo sua imunogenicidade, como o NYNYRYRLF de MHC-I, de 783 para 171. Isso sugere uma possível redução na eficácia da vacina contra variantes mutantes do vírus. A pesquisa destaca a importância de adaptar estratégias de imunização para lidar com as mutações emergentes do SARS-CoV-2. Além disso, ressalta a necessidade de monitorar a variabilidade genética do vírus e desenvolver vacinas atualizadas para combater a pandemia. Esses resultados também enfatizam a importância de entender as mutações do vírus para correlacionar com sua evolução e virulência, fornecendo insights valiosos para o controle da COVID-19.

Palavras-chave: Epítomos. SARS-CoV-2. Vacinação. Variabilidade.

ABSTRACT

The study aimed to analyze mutations in MHC-I and II epitopes in the face of vaccination with AZD1222 in Brazil. Mutations were identified in six epitopes, some of which decreased their immunogenicity, such as NYNYRYRLF of MHC-I, from 783 to 171. This suggests a possible reduction in the vaccine's efficacy against mutant variants of the virus. The research highlights the importance of adapting immunization strategies to deal with emerging SARS-CoV-2 mutations. It also highlights the need to monitor the genetic variability of the virus and develop updated vaccines to combat the pandemic. These results also emphasize the importance of understanding the mutations of the virus to correlate with its evolution and virulence, providing valuable insights for the control of COVID-19.

Keywords: Epitopes. SARS-CoV-2. Vaccination. Variability.

INTRODUÇÃO

SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita simples que já infectou mais de meio bilhão de pessoas no mundo, e só no Brasil levou mais de 660 mil pessoas a óbito até o final de julho de 2022[1] [2]. Em 2021 foram disponibilizadas no Brasil as primeiras vacinas no Sistema Único de Saúde - SUS, e, atualmente, a vacina AZD1222 (Covishield), da Oxford–AstraZeneca, é uma das disponibilizadas, tratando-se de uma vacina de vetor viral, baseada na proteína de pico, com eficácia estimada em torno de 81% [3].

É fato que a disponibilização é o importante passo para o recuo no número de mortes e casos graves da doença COVID-19, além do controle da pandemia de forma geral. No entanto, por ser um vírus de RNA e por consequência da sua taxa de transmissão, o SARS-CoV-2 apresenta alto grau de mutação, existindo até então uma diversidade de variantes que não cessam em surgir [4]. É reconhecido que essas variantes podem acarretar neutralização reduzida por anticorpos gerados por infecção ou vacinação anterior, interferência generalizada com alvos de teste de diagnóstico, potencial impacto no diagnóstico clínico, aumento na transmissão e gravidade da doença, entre outros [3]. Diante dessas mutações, existe uma preocupação em relação à continuidade da eficácia da vacinação, já que as variações podem causar neutralização reduzida por anticorpos gerados por infecção ou vacinação anterior.

Nesse contexto, compreender o impacto da variabilidade genética do SARS-CoV-2 frente à vacinação na população brasileira é um esforço de utilidade tanto para compreensão geral da evolução do SARS-CoV-2 frente ao sistema imune humano, quanto, por consequência, para o desenvolvimento de vacinas, levando em consideração a importância de regiões epítópicas de MHC-I e II. Além disso, a presente pesquisa teve como foco a seleção de sequências brasileiras, enfoque que não foi encontrado até o momento em nenhuma pesquisa

Dessa forma, tendo em vista que a vacinação atualmente disponível para SARS-CoV-2 não induz apenas anticorpos neutralizantes, mas também respostas de células T CD4+ e CD8+ específicas para SARS-CoV-2 [5], o presente

trabalho teve como objetivo analisar a variabilidade genética do SARS-CoV-2 e seus possíveis impactos frente à vacinação na população brasileira através da investigação de mutações em epítópos de reconhecimento de MHC I e II localizados na região do gene em que a vacina AZD1222 foi projetada.

MÉTODOS

SELEÇÃO DE EPÍTOPOS

Os epítópos de MHC-I e II alvos da análise, foram selecionados através de revisão da literatura e através de coleta no banco de dados de epítópos Immune Epitope Database [6], que é um banco disponível gratuitamente que cataloga dados experimentais sobre anticorpos e epítópos estudados em humanos, primatas não humanos e outras espécies animais no contexto de doenças infecciosas, alergia, autoimunidade e transplante. A seleção no banco de dados [6] foi baseada nos epítópos localizados dentro do Gene S que tenham sido abordados com mais frequência em estudos com experimentos obtendo resultados positivos. A escolha por epítópos localizados no Gene S se dá pelo fato de que a vacina AZD1222 é baseada no mesmo.

SELEÇÃO E COLETA DE SEQUÊNCIAS

Foram coletadas sequências genômicas de amostras do SARS-CoV-2 sequenciadas no Brasil para avaliação. As referidas sequências foram selecionadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponível no seguinte site: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, que é uma página inicial que inclui diversos recursos e dados, e será levado como critério de seleção a preferência por sequências que não possuam bases não identificadas. Já as coletadas das sequências foram realizadas no Genbank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> e GISAID <https://gisaid.org/>, duas plataformas que funcionam como banco de dados em que todas as sequências mundiais são depositadas a fim de compartilhar o conhecimento sobre a genética dos organismos.

ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS

Após a seleção das sequências, foram realizados os alinhamentos múltiplos para nucleotídeos e proteínas utilizando o programa MEGA versão 10 (<https://www.megasoftware.net/>) e comparadas com a sequência referência utilizada no desenvolvimento da vacina AZD1222, de identidade NC_045512.2, coletada no Genbank, a fim de identificar possíveis mutações em regiões de epítomos selecionados.

ANÁLISE DE EPÍTOMOS PARA MHC

A análise dos epítomos para a determinação de possíveis impactos das alterações de aminoácidos de epítomos para o MHC I e II foi realizada no Immune Epitope Database [6]. Além de ser um banco de dados, o IEDB oferta recursos úteis para a análise dos

epítomos, dentre eles, o aqui utilizado para análise de imunogenicidade.

RESULTADOS

Na primeira etapa deste trabalho, foram selecionados mais de 20 epítomos de MHC I e II. Para isso, foram considerados os epítomos mais bem posicionados levando em consideração o maior número de ensaios positivos. Após essa seleção, os epítomos foram localizados dentro da sequência proteica da Vacina AZD1222. Os epítomos não encontrados, ou seja, que faziam parte de outra região, foram excluídos. A tabela 1 expõe os epítomos selecionados e suas características.

Tabela 1. Epítomos selecionados

MHC-I	MHC-II
YLQPRTFLL	NLLQYGSFCTQLNR
QYIKWPWYI	SFIEDLLENKVTIAD
LTDEMIQY	CTFEYVSQPFLMDLE
NYNYLYRLF	TDEMIQYTSALLAG
KCYGVSPK	YAWNRRKRISNCVADY
KIADYNYKL	LKPFERDISTEIQYA
TNFTISVTT	HWFVTQRNFYEPQII
VVLSFELL	LQPELDSFKEELDKY
TLDSKTQSL	RFASVYAWNRRKRISN
	SASFSTFKCYGVSPK

Fonte: Elaboração própria (2024)

Em seguida se deu a etapa de seleção e alinhamento das sequências que possibilitaram a análise do Gene S, e em seguida a conversão para aminoácidos e análise da proteína S. Ao total foram alinhadas 500 sequências. A seleção das sequências seguiu os critérios definidos na metodologia, como, por exemplo, preferência

por sequências que não possuíam bases não identificadas. Além disso, diante da disponibilidade de informações das variantes mais frequentes por período no GISAID [8], foram selecionadas sequências das 5 variantes mais predominantes por mês, dentro do período de fevereiro a junho de 2023, sendo elas:

Tabela 2. Variantes mais predominantes de acordo com cada mês

Fevereiro	Março	Abril	Mai	Junho
XBB.2.3	XBB.1.5	XBB.1.5	XBB.1.5	XBB.1.5
XBB.1.5.102	XBB.1.9.1	XBB.1.9.1	XBB.1.9.1	XBB.1.9.1
XBB.1.18.1	BQ.1.1	XBB.1.16	XBB.1.16	XBB.1.16
XBB.1.5	BA.5	XBB.1	XBB.2.3	XBB.2.3
XBB.1.5.86	CH.1.1	XBB.2.3	XBB.1.16.1	XBB.1.16.1

Fonte: Elaboração própria a partir de dados do GISAID (2023)

A análise resultou na identificação de mutações em 6 dos epítomos selecionados. O epítomo que apresentou mais variações de

mutação foi o SASFSTFKCYGVSPT, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Mutações em epítomos selecionados

Nota: I= Isoleucina, T= Treonina, A = Alanina, K = Lisina, M = Metionina, V= Valina, N = Asparagina, D = Aspartato, L = Leucina Y= Tirosina, Q= Glutamina, F= Fenilalanina, R= Arginina, P= Prolina, E= Ácido Glutâmico.

Epítomos		Mutações	
MHC -I	YLQPRTFL		YLQPRTFL-
MHC -I	QYIKWPWYI		Q-IKWPWYI
MHC -I	NYNYLYRLF		NYNYRYRLF
MHC -I	KIADYNYKL		NIADYNYKL
MHC-II	RFASVYAWNRKRISN	KFASVYAWNRKRISN	TFASVYAWNRKRISN
MHC-II	SASFSTFKCYGVSPT	FAPFFAFKCYGVSPT	LAPFFTFKCYGVSPT

Fonte: Elaboração própria (2024)

Seguindo para a próxima etapa, após análise conforme descrita na metodologia, alguns dos epítomos selecionados apresentaram diferença de imunogenicidade quando mutados.

Portanto, foi elaborada uma tabela com os epítomos que apresentaram diferença de imunogenicidade.

Tabela 4. Imunogenicidade dos epítomos mutados

Epítomos originais		Imunogenicidade
Original	NYNYRYRLF	783
Mutado	NYNYLYRLF	171
Original	FAPFFAFKCYGVSPT	3.996
Mutado	LAPFFTFKCYGVSPT	3.966

Fonte: Elaboração própria (2024)

A partir desse resultado, surgiu a hipótese de que os epítomos que permaneceram com os mesmos valores de imunogenicidade, seriam epítomos que tiveram seus aminoácidos trocados por aminoácidos do mesmo grupo

funcional. No entanto, foi observado que alguns epítomos, mesmo quando tiveram aminoácidos trocados por outro de outro grupo funcional, permaneceram com os mesmos valores de imunogenicidade. Por exemplo, o epítomo

KIADYNYKL que teve uma Lisina de característica polar básica trocada por uma Asparagina de característica polar ácida.

Em todos os casos, os epítomos se tornaram menos imunogênicos, ou permaneceram iguais, não havendo epítomos que se tornaram mais imunogênicos.

DISCUSSÃO

Os CoVs pertencem à subfamília *coronavirinae* da família *coronaviridae*, e são subdivididos em quatro gêneros: alfa, beta, gama e delta - CoVs [9]. São vírus envelopados que possuem capacidade de infectar os sistemas respiratório, gastrointestinal, hepático e nervoso central de humanos [10]. Além disso, é muito investigado a variação dos quadros de acordo com o perfil genético e clínico dos indivíduos [11].

Aqui analisamos epítomos de MHC-I e MHC-II localizados dentro do gene S do SARS-CoV-2 que sintetiza a proteína Spike [12]. Podemos caracterizar os epítomos como como trechos específicos dos antígenos que são reconhecidos pelos anticorpos, pois a partir da complementaridade estrutural e afinidade entre resíduos do epítomo do antígeno e do anticorpo acontece o reconhecimento que desencadeiam na resposta imune [13].

A escolha por epítomos localizados dentro da proteína Spike se deu, pois, a vacina selecionada para análise dos epítomos na presente pesquisa é uma vacina que tem como tecnologia aplicada um vetor viral, o adenovírus, que infecta chimpanzés, sendo manipulada geneticamente e inserido justamente o gene da proteína “Spike” (proteína “S”). A vacina em questão, a AZD1222, foi umas das quatro primeiras a serem autorizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para a imunização da população brasileira e foi desenvolvida pela AstraZeneca em parceria com a universidade de Oxford, e no Brasil é produzida pela Fundação Oswaldo Cruz [14].

Nosso estudo encontrou uma diminuição da imunogenicidade de alguns epítomos após mutação. A imunogenicidade está relacionada à capacidade respondedora para a proteína recombinante, reatividade de anticorpos

específicos contra o peptídeo. Portanto, vacinas baseadas nos epítomos dessas novas cepas não seriam mais imunogênicas que as baseadas nas primeiras. Isso demonstra que o vírus perdeu capacidade imunogênica, acredita-se que isso poderá facilitar o escape do reconhecimento pelas respostas imunológicas humanas conforme descrito por Tarke *et al.*, (2021) em estudo semelhante ao aqui realizado [15].

Os vírus constituídos de RNA são suscetíveis a apresentar altas taxas de mutações durante a replicação do genoma [16]. Além disso, a rápida disseminação de SARS-COV-2 em escala mundial levantou questões, como se sua evolução é impulsionada por mutações [17]. No geral, sabe-se que as mutações ajudam o vírus a evoluir para uma versão melhor de si, podendo fazer com que se encaixe melhor em seu ambiente, escapando, por exemplo, da vigilância imunológica das células hospedeiras.

Saha *et al.*, (2020) também aponta que obter informações sobre locais de mutações nas sequências e frequência de tais, ajuda a correlacionar o significado dessas mutações com a evolução e virulência do vírus. Nossos resultados contribuem para a compreensão geral da evolução do SARS-CoV-2 frente ao sistema imune humano [4]. A capacidade do vírus de se tornar menos imunogênicos reforça que uma primeira infecção não é suficiente para imunizar indivíduos ao longo do tempo e que essas mudanças podem diminuir o reconhecimento desses epítomos.

Além disso, ao longo desses anos, surgiu no Brasil uma hesitação vacinal advinda da ideia de que a própria infecção pelo vírus seria suficiente para tornar o indivíduo imunizado [18]. Nossos resultados vão em contrapartida, e reforçam a necessidade da continuação de esforços no sentido de conscientização sobre a vacinação, quanto o incentivo para pesquisa e construção de novas vacinas com novas tecnologias, permitindo a elaboração de novas e melhores construções vacinais.

Em nosso trabalho nos atemos a selecionar apenas sequências coletadas no Brasil levando em consideração esse contexto mundial de escassez desses dados, e apesar de não termos encontrado associação entre a diversidade de grupos funcionais dos aminoácidos e a variação de imunogenicidade dos epítomos, encontramos

um estudo de *Tarke et al.*, (2021) que identificou através de análise bioinformática que 93% dos epítomos permanecem conservados em função mesmo diante das mutações. Apesar do seu estudo não ter sido com foco em sequências brasileiras, seus resultados se assemelham aos nossos, já que apenas 4% dos epítomos que analisamos sofreram alguma alteração na sua imunogenicidade [15].

Ressalta-se ainda que o relevante estudo de *Tarke et al.*, (2021) utilizou também, além de outros, o mesmo recurso para a realização da análise de imunogenicidade, o IEDB [15]. Além disso, Ramesh (2021) ao fazer um apanhado geral sobre as variantes e as implicações na resposta imune humana, aponta que, à medida que a infecção se espalhou pelo mundo, houve um aumento no número de múltiplas variantes do SARS-CoV-2, e que até o decorrente ano de sua pesquisa, quatro variantes continuavam sendo uma grande preocupação: Alfa, Beta, Gama e Delta. Pois aumentaram a taxa de infecção, modificaram a potência dos anticorpos neutralizantes e, assim, comprometem a eficácia da vacina. Reforçando ainda que uma vacina eficaz contra o COVID-19 exige anticorpos neutralizantes e um componente celular acionado por Th1 [3].

CONCLUSÃO

Aqui neste trabalho que se propôs analisar a variabilidade genética do SARS-CoV-2 e seus possíveis impactos frente à vacinação na população brasileira através da investigação de mutações em epítomos de reconhecimento de MHC I e II localizados na região do gene em que a vacina AZD1222 foi projetada, e identificação de possíveis alterações nas ligações de reconhecimento de epítomos, foram encontradas mutações em dois epítomos que impactaram na imunogenicidade deles. O epítopo NYNYRYRLF de MHC – I teve sua imunogenicidade reduzida de 783 para 171, enquanto o epítopo FAPFFAFKCYGVSP de MHC – II teve sua imunogenicidade reduzida de 3.996 para 3.966. Esses resultados mostram a importância de esforços no sentido de produção de novas vacinas com novas tecnologias, em especial aquelas

voltadas para infecções causadas por vírus de alta mutação, como é o caso do SARS-CoV-2, assim como a conscientização da população sobre a importância da continuação da imunização com novas doses da vacina.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. WHO. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. 2022 [Citado em 12 fev 2024] Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331329/WHO-COVID-19-laboratory>
2. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020. [Citado em 12 fev 2024] 579 (7798): 270-273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
3. Ramesh S, Govindarajulu M, Parise RS, Neel L, Shankar T, Patel S, et al. Emerging SARS-CoV-2 variants: a review of its mutations, its implications and vaccine efficacy. *Vaccines*. 2021. [Citado em 12 fev 2024] 9(10): 1195. <https://doi.org/10.3390/vaccines9101195>
4. Saha P, Banerjee AK, Tripathi PP, Srivastava AK, Ray U. A virus that has gone viral: amino acid mutation in S protein of Indian isolate of Coronavirus COVID-19 might impact receptor binding, and thus, infectivity. *Bioscience Reports*, 2020. [Citado em 12 fev 2024] 40(05) 1-18. <https://doi.org/10.1042/BSR20201312>
5. Noh, JY; Jeong, HW; Shin, E. SARS-CoV-2 mutations, vaccines, and immunity: implication of variants of concern. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021. [Citado em 12 fev 2024] 6(1):1-2. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00623-2>
6. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. [Internet] [Citado em 12 fev 2024] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

7. GENBANK. [Internet] [Cited 2024 Feb 12] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
8. GISAID. <https://www.gisaid.org/>. [Internet] [Citado em 12 fev 2024]
9. Cui J, Li, F, Shi LZ. Origin and evolution of pathogenic coronavirus. *Nature Reviews Microbiology*. 2019 [Citado em 12 fev 2024] 17(1): 181-192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
10. Weiss, SR, Leibowitz JL. Coronavirus Pathogenesis. *Advances in Virus Research*. 2011.[Citado em 12 fev 2024] 81(1):85-164, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2>
11. Bierhals ND, Knod EB, Weber AF, Moura VAR, Possuelo LG, Renner JDP. Caracterização genética, clínica e epidemiológica de pacientes com Covid-19 em uma região do Sul do Brasil. *Saúde e Pesquisa*, 2022. [Citado em 12 fev 2024] 15(4): 1-11. <https://doi.org/10.17765/2176-9206.2022v15n4.e10740>
12. Malik YA. Properties of coronavirus and SARS-CoV-2. *The Malaysian journal of pathology*. 2020. [Citado em 12 fev 2024] 42(1): 3-11. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32342926/>
13. Velloso JPL. Análise de aspectos estruturais em imunoinformática utilizando candidatos vacinais contra Leishmaniose que foram selecionados usando vacinologia reversa (Doctoral dissertation). (2018). [Citado em 12 fev 2024] Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/34553>
14. Brasil. Instituto Butantan. Quais são as diferenças entre as vacinas contra Covid-19 que estão sendo aplicadas no Brasil? 2022.[Citado em 12 fev 2024] Disponível em: <https://butantan.gov.br/covid/butantan-tira-duvida/tira-duvida-noticias/quais-sao-as-diferencas-entre-as-vacinas-contra-covid-19-que-estao-sendo-aplicadas-no-brasil>
15. Tarke A, Sidney J, Methot N, Zhang Y, Dan JM., Goodwin B, et al. Negligible impact of SARS-CoV-2 variants on CD4+ and CD8+ T cell reactivity in COVID-19 exposed donors and vaccinees. *BioRxiv*, 2021.[Citado em 12 fev 2024](1):02-27 <https://doi.org/10.1101/2021.02.27.433180>
16. Sanjuán R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R. Viral mutation rates. *Journal of virology*. 2010.[Citado em 12 fev 2024] 84(19):9733-9748. <https://doi.org/10.1128/jvi.00694-10>
17. Phan T. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2. *Infection, genetics and evolution (2020)*. [Citado em 12 fev 2024] 81: 104260 <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104260>
18. Galhardi CP, Freire NP, Fagundes MCM, Minayo MCDS, Cunha ICKO. Fake news e hesitação vacinal no contexto da pandemia da COVID-19 no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2022. [Citado em 12 fev 2024], 27:1849-1858. <https://doi.org/10.1590/1413-81232022275.24092021>

Recebido: 04 Mar. 2024

Aceito: 15 Mai. 2024