



# Concurso Público Fiocruz 2023

## Pesquisador em Saúde Pública

### Prova Discursiva

#### PE39

## Biotecnologia aplicada a Inovações Terapêuticas e Imunobiológicos

### Espelho de Resposta

**Pontuação de cada Questão Discursiva conforme Anexo II do Edital nº 3, de acordo com a Unidade detentora da vaga.**

Espera-se que o candidato, no desenvolvimento do tema, tenha feito considerações técnicas adequadas sobre os seguintes pontos:

#### Questão 01

a) – Solução biotecnológica 1: o encapsulamento do mRNA em nanopartículas lipídicas (NPLs) constituiu uma solução disruptiva para que estes ácidos nucleicos pudessem ser entregues de maneira integral ao citoplasma das células do indivíduo vacinado, onde os mRNAs são traduzidos em proteínas antigênicas que são, por sua vez, apresentadas ao sistema imunológico. Soluções lipossomais anteriores ou o inóculo de mRNAs “nus” culminavam com elevado grau de degradação dos ácidos nucleicos, tornando os inóculos ineficazes para a geração de imunidade protetora. Adicionalmente, moléculas de mRNA não encapsuladas têm carga negativa e são relativamente grandes, o que dificulta sua translocação ao citoplasma da célula através da membrana citoplasmática. As NPLs são constituídas por lipídeos ionizados que se complexam ao mRNA em pH ácido, mas que apresentam polaridade neutra em pH fisiológico. Isto diferencia as NPLs dos lipossomos, por exemplo, que apresentam cargas positivas em pH fisiológico, podendo induzir efeitos tóxicos. Por fim, as NPLs apresentam lipídios adicionais, tais como colesterol e outros lipídeos, que permitem sua ligação à membrana citoplasmática, endocitose, e liberação da carga de mRNA no citoplasma celular.

Solução Biotecnológica 2: RNAs inoculados em condições nativas no organismo tendem a formar estruturas secundárias e são reconhecidos por sensores citoplasmáticos de ácidos nucleicos, gerando potente resposta inflamatória e citotoxicidade exacerbada. Adicionalmente, estes mRNAs são rapidamente degradados por RNases, diminuindo sua taxa de tradução. Assim, para evitar estes problemas as vacinas de mRNA modernas apresentam a substituição da base uridina por uma base modificada, denominada N1-metil-pseudouridina. A molécula de mRNA modificada apresenta menor reconhecimento pelo sistema imune inato, induzindo menor taxa de inflamação deletéria, e mais resistência à degradação, o que culmina em maiores taxas de tradução e produção do antígeno alvo. De fato, durante os testes clínicos e pré-clínicos de vacinas baseadas em mRNAs encapsulados por NPLs contra COVID-19, candidatos vacinais baseados em moléculas de RNA não modificadas apresentaram taxas de eficácia protetora contra COVID-19 inferiores a 50%, enquanto mRNAs modificados mostraram taxas de eficácia da ordem de 90 a 95%.

b.1) – Não. A primeira vacina composta por um vetor viral recombinante foi a Ervebo, uma vacina contra o vírus Ebola, linhagem Zaire, constituída por um vírus da estomatite vesicular (EEV) atenuado, capaz de expressar a glicoproteína de superfície do vírus Ebola. Esta vacina foi licenciada para uso humano pela primeira vez em maio de 2019, pela Agência regulatória Europeia e pré-qualificada pela Organização Mundial de Saúde. O FDA Americano também licenciou a vacina em dezembro daquele mesmo ano, e em seguida diversos países Africanos também autorizaram o uso humano da vacina. Em maio de 2020, uma segunda vacina para Ebola, constituída por doses heterólogas de Adenovírus e Vaccinia vírus (MVA) recombinantes expressando a proteína de envelope do vírus Ebola, recebeu autorização especial para uso populacional experimental em indivíduos com mais de um ano de idade.

b.2) – Os vetores virais recombinantes são constituídos por linhagens de vírus atenuados, capazes de expressar genes heterólogos clonados em seus respectivos genomas. Como resultado, estes vírus vivos atenuados são capazes de infectar células do indivíduo vacinado e produzir em seu citoplasma as proteínas recombinantes, além das proteínas do próprio vetor viral. Como resultado, as proteínas recombinantes são processadas dentro da célula hospedeira e apresentadas ao sistema imunológico de diversas maneiras. Desta feita, estas vacinas induzem uma ampla gama de respostas imunológicas, tanto humorais como celulares, o que as difere das vacinas inativadas (como a vacina para gripe ofertada pelo SUS), cuja natureza inerte faz com que as respostas imunológicas à vacina dependam sobremaneira da internalização dos antígenos por células apresentadoras de antígeno e posterior apresentação ao sistema imune, com um viés fortemente TH2.

Há dois tipos gerais de vetores virais recombinantes, vetores virais replicativos e vetores virais não-replicativos. A diferença entre os dois é que os vetores não-replicativos possuem salvaguardas genéticas que impedem que se repliquem eficientemente no indivíduo vacinado. Assim, eles infectam a célula hospedeira, produzem as proteínas recombinantes, mas não geram progênie viral viável. Este aspecto aumenta a segurança do vetor vacinal, podendo ser utilizado, inclusive, em populações imunocomprometidas. Por esta razão, apenas vetores virais não-replicativos foram licenciados para uso amplo em seres humanos. Esse aspecto também diferencia os vetores virais não-replicativos das vacinas de vírus atenuados replicativos convencionais, tais como as vacinas atualmente ofertadas pelo SUS contra febre-amarela e a tríplice viral, por exemplo, que são constituídas por vírus vivos atenuados replicativos.

c) - As vacinas vetoriais possuem genes recombinantes clonados em seu genoma, e após infecção das células do hospedeiro estes genes são transcritos e traduzidos de maneira intracelular. Não obstante, as proteínas recombinantes geradas não fazem parte da partícula viral viável do vetor recombinante, e a infecção celular é condição essencial para geração da proteína heteróloga vacinal. Já a vacina quimérica não apenas possui os genes heterólogos clonados em seu genoma, mas as proteínas heterólogas são efetivamente incorporadas à partícula viral vacinal. Desta feita, a vacina quimérica já possui a proteína vacinal alvo incorporada ao imunógeno no momento da inoculação no indivíduo vacinado.

## Questão 02

a) - O desenvolvimento e produção tradicional de anticorpos monoclonais em animais pode ser dividido em três etapas globais. A primeira etapa é inoculação do animal “naive” para geração de células B produtoras de anticorpos contra o antígeno escolhido. Um ponto crítico desta etapa inclui a preparação do antígeno, que deve ser obtido em estado mais puro possível e livre de elementos tóxicos. Esta etapa envolve, ainda, a escolha da espécie animal a ser utilizada. O modelo de escolha normalmente é o camundongo, mas outros animais também podem ser usados em condições específicas (por exemplo, se o antígeno for murino, o que faria com a que a produção de anticorpos fosse mínima ou não ocorresse). A escolha do adjuvante apropriado, assim como a rota de inoculação também são críticos. Uma vez inoculado em um ou mais doses, sangrias não letais são realizadas para detecção da geração do anticorpo de interesse. Por fim, o animal é eutanasiado e exanguinado para obtenção de células B. A segunda etapa consiste da fusão, *in vitro*, das células B obtidas com células tumorais mieloides, através do uso de reagentes químicos específicos sobre as células em cultura. As células fundidas, denominadas de hibridomas, são então quimicamente selecionadas através de processos diversos, tais como diluição limitante em placas de cultura

celular ou “cell-sorting” em citômetro de fluxo. Os hibridomas são, finalmente, expandidos e avaliados pela sua capacidade de produzir o anticorpo desejado. A terceira e última etapa é a inoculação do hibridoma na cavidade abdominal (inoculação intraperitoneal) de animais experimentais. O hibridoma se desenvolve gerando um tumor sólido que produz enormes quantidades de anticorpos, os quais são coletados da ascite resultante. Por fim, estes anticorpos são purificados em colunas de resina de afinidade ou outros processos semelhantes.

- b) - A forma mais direta para a produção de um anticorpo monoclonal recombinante é a obtenção da sequência gênica codificadora das cadeias leve e pesada do anticorpo de interesse. Muitas sequências nucleotídicas codificadoras de anticorpos específicos para antígenos conhecidos já estão disponíveis em bancos de dados públicos. Nesse caso, procede-se a síntese dos genes codificadores das cadeias do anticorpo em plasmídeos a serem transfectados na célula produtora, sendo um plasmídeo codificando a cadeia pesada e um plasmídeo codificando a cadeia leve. Nesta etapa, é frequente o uso de cDNAs e não dos genes codificadores. As células produtoras dos anticorpos devem ser células eucariotas, para permitir a produção de proteínas com conformação e processamento pós traducional corretos, tais como células CHO ou HEK293. As células transformantes são selecionadas quimicamente e obtidas por diluição limitante ou “cell-sorting” em citômetro de fluxo, entre outros processos semelhantes, e testadas para a secreção do anticorpo pretendido. Neste tipo de processo, não há garantia da incorporação definitiva ou controlada dos genes codificadores no genoma da célula produtora, mas a consistência genética dos plasmídeos codificantes garante a clonalidade do anticorpo produzido.

No caso em que as sequências nucleotídicas ou de aminoácidos de um anticorpo contra determinado antígeno não são conhecidas, pode-se realizar o sequenciamento dos aminoácidos das cadeias leve e pesada do anticorpo através de espectrometria de massa, por exemplo, e uma vez conhecidas as sequências de aminoácidos da proteína pode-se inferir a sequência nucleotídica e sintetizá-la comercialmente. A produção do anticorpo passa, então, a ser feita como descrito anteriormente. Alternativamente, processos de identificação *in vitro* de anticorpos específicos incluem a técnica de “phage-display”, a qual tem sido crescentemente usada para identificação e produção de anticorpos monoclonais. Nesse caso, a partir de extratos gênicos de células “naives” (“universal cDNA libraries”) é possível clonar diferentes fragmentos gênicos codificadores de cadeias de anticorpos em plasmídeos específicos para geração de fagos (os chamados “phagemids”). Esses plasmídeos são usados, então, para a recomposição de fagos íntegros em culturas de bactérias. Os fagos são eluidos e selecionados em placas de Elisa sensibilizados com o antígeno de interesse. Após lavagens, apenas os fagos expressando em sua superfície as cadeias de anticorpo específicas para o antígeno são retidas nas placas sensibilizadas, para serem mais tarde eluidos. Após esse processo, os fagos selecionados são usados para reinfecção de bactérias e identificação dos clones específicos.