

JAMILLE RAMOS DE OLIVEIRA

**Identificação de peptídeos-alvo de anticorpos contra a proteína RBD
do vírus SARS-CoV-2 em indivíduos convalescentes e vacinados**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título Doutor em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Profa. Dra. Keity Souza Santos

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de
13 de outubro de 2011. A versão original está
disponível na Biblioteca FMUSP.

SÃO PAULO

2023

JAMILLE RAMOS DE OLIVEIRA

**Identificação de peptídeos-alvo de anticorpos contra a proteína RBD
do vírus SARS-CoV-2 em indivíduos convalescentes e vacinados**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título Doutor em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia
Orientadora: Profa. Dra. Keity Souza Santos

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de
13 de outubro de 2011. A versão original está
disponível na Biblioteca FMUSP.

SÃO PAULO

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Jamille Ramos de
Identificação de peptídeos-alvo de anticorpos
contra a proteína RBD do vírus SARS-CoV-2 em
indivíduos convalescentes e vacinados / Jamille
Ramos de Oliveira. -- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Alergia e Imunopatologia.
Orientadora: Keity Souza Santos.

Descritores: 1.Epitopos lineares 2.Pressão
imunológica 3.Betacoronavírus 1 4.COVID-19
5.Anticorpos neutralizantes

USP/FM/DBD-171/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esta tese ao meu companheiro de vida, João e aos meus pais Clarice e Jair. Não estaria aqui sem o carinho e a presença deles.

AGRADECIMENTOS

Esses últimos anos foram difíceis. Não sei se conheço alguém que não tenha sofrido com a perda, alguém que não tenha sentido medo. Como cientista, sofri muito com o descaso pela ciência, pelo progresso, e com a onda de notícias falsas que deslegitimaram o meu trabalho e o dos meus pares. Como pessoa, tive muito medo pela minha família e por todas as pessoas ao meu redor. Foram meses difíceis, incertos, sombrios. Mas em momento algum estive sozinha. Tenho muito a agradecer pelo carinho, presença e apoio do meu companheiro de aventuras e de vida, João. Você é a luz, o grande farol da minha vida. Obrigada por tudo. Agradeço imensamente aos meus pais Jair e Clarice, e minhas irmãs Jéssica e Jenifer pelo amor e apoio incondicional nessa longa jornada em busca do meu sonho de ser cientista. Ninguém entendeu bem de onde saiu essa ideia, mas todos apoiaram (risos), e por isso sou muito grata. Ainda sobre agradecimentos, agradeço à minha orientadora Keity por, bem... tudo! Por me aceitar e por aguentar os meus surtos (que foram muitos). Por topar todas as minhas ideias e por compartilhar comigo essa paixão completamente doida pela ciência. Agradeço à minha querida amiga Jhosie, que virou minha parceira de ~~erimes~~ quarentena no laboratório: nos ELISAs infinitos e nas fugas para comer docinhos e tomar café. Às minhas queridas amigas de lab Dani, Amandinha, Safi, Anne e Ariane por todos os cafezinhos e risadas: minha jornada foi muito mais leve com a presença de vocês. Ao César, que me ensinou muito e colaborou muito comigo nessa busca incansável pelo P44. À querida Gabi, pela amizade sincera e pelos muitos (e muito bem-vindos) conselhos. Ao pessoal do lab: Déia, Ana, Samar, Janinha, Wash... obrigada pela companhia e desculpem pela bagunça. Agradeço a todos os colegas do Incor, do HC e da FMUSP pela colaboração e pela FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

*For all the air that's in your lungs
For all the joy that is to come
For all the things that you're alive to feel
Just let the pain remind your heart can heal.*

Hate To See Your Heart Break – Paramore
(Paramore – 2013)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS.....	
RESUMO.....	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Dados epidemiológicos da COVID-19, vacinação e suas variantes no Brasil....	1
1.2 O vírus SARS-CoV-2 e sua estrutura	2
1.3 Mecanismos da infecção viral por SARS-CoV-2	4
1.4 Imunidade antiviral	6
1.4.1 Princípios gerais de imunidade antiviral	6
1.4.2 Imunidade ao SARS-CoV-2.....	8
1.5 Vacinas e variantes.....	10
1.6 Perfil de reconhecimento de epítomos	13
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. PLANO DE TRABALHO	16
4. OBJETIVOS	17
4.1 Objetivo geral.....	17
4.2 Objetivos específicos	17
5. MÉTODOS	18

5.1	Casuística	18
5.2	Obtenção de soro.....	18
5.3	ELISA para avaliação da produção de anticorpos	19
5.4	Ensaio de neutralização viral (VNT, do inglês, <i>virus neutralization titer</i>).....	20
5.5	Varredura de peptídeos-alvo de anticorpos IgG e IgA	20
5.6	Quantificação da intensidade de fluorescência dos spots de <i>microarray</i>	21
5.7	Predição <i>in silico</i> de epítomos de células B.....	22
5.8	Análise comparativa da sequência de aminoácidos	22
5.9	Análises estruturais	22
5.10	Análises estatísticas.....	22
6.	RESULTADOS	24
6.1	Caracterização clínico-demográfica, sorologia e neutralização das coortes.....	24
6.2	Perfil de reconhecimento de epítomos em indivíduos convalescentes	30
6.3	Perfil de reconhecimento de peptídeos em vacinados	43
7.	DISCUSSÃO	49
8.	CONCLUSÃO	55
9.	REFERÊNCIAS	56
10.	ANEXOS.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcento
+ssRNA	RNA de fita simples
<	menor que
>	maior que
≥	maior ou igual
°C	grau Celsius
3D	terceira Dimensão
Å	Angstrom (1nm)
aa	aminoácidos
Ab	anticorpos
ACE-2	do inglês, <i>angiotensin converter enzyme 2</i> (ECA-2, enzima convertora de angiotensina)
ADCC	do inglês, <i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> (citotoxicidade dependente de anticorpo)
APC	do inglês, <i>antigen presenting cells</i> (células apresentadoras de antígenos)
Asn	Asparagina (N)
Asp	Aspartato (D)
ATP	adenosina trifosfato
BALB/c	Bagg albino
BSA	albumina de soro bovino
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CO₂	dióxido de carbono
COVID-19	do inglês, <i>coronavirus disease 19</i>
CPE-VNT	do inglês, <i>cytopathic effect based virus neutralization test</i> (ensaio de neutralização viral baseado no efeito citopático)
CTD	do inglês, <i>carboxyl-terminal domain</i>
DAMP	do inglês, <i>damage-associated molecular patterns</i> (padrões moleculares associados a danos)
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidade ótica

ELISA	do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Glu	glutamato (K)
Gly	Glicina (G)
H1N1	Influenza A
H₂SO₄	ácido sulfúrico
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCl	ácido clorídrico
HCOV	coronavírus humano
HR1	região rica em hélice 1
HR2	região rica em hélice 2
HRP	do inglês, <i>horseradish peroxidase</i>
IC50	concentração média de inibição
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IFN	interferon
IgA	imunoglobulina tipo A
IgG	imunoglobulina tipo G
IgM	imunoglobulina tipo M
IKKϵ	inibidor da subunidade- ϵ do fator nuclear kappa B cinase
IRF3	fator regulador interferon 3
IL	interleucinas
K_D	constante de dissociação
Kd	quilodalton
Lys	lisina (K)
M	molar
m/v	molaridade/volume
mAb	anticorpo terapêutico
MERS	do inglês, <i>Middle East Respiratory Syndrome</i> (Síndrome respiratória do Oriente Médio)
MFI	média de intensidade de fluorescência
mg	miligrama
mg/mL	miligrama por mililitro
MHC	do inglês, <i>major histocompatibility complex</i> (complexo principal de histocompatibilidade)

min	minutos
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	micro RNA
nAb	anticorpos neutralizantes
nm	nanômetro
NTD	do inglês, <i>amino-terminal domain</i> (domínio amino-terminal)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	do inglês, <i>o-Phenylenediamine dihydrochloride</i>
ORF	do inglês, <i>Open Reading Frame</i>
PAMP	do inglês, <i>pathogen-associated molecular patterns</i> (padrões moleculares associados a patógenos)
PBS	tampão fosfato salino
pH	potencial de hidrogênio
PNA	do inglês, <i>peptide-peptide nucleic acid</i>
PRR	receptores de reconhecimento de padrões
RBD	do inglês, <i>Receptor Binding Domain</i>
RBM	do inglês, <i>Receptor Binding Motif</i>
RNA	ácido ribonucleico
RPM	rotações por minuto
RT-qPCR	PCR em tempo real com transcrição reversa
s	segundos
S1	subunidade S1
S2	subunidade S2
SARS	do inglês, <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> (síndrome respiratória aguda grave)
SARS-CoV-2	do inglês, <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> (síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2)
SDS	dodecilsulfato sódico
sIgA	IgA secretora
STAT1	fator de transcrição ativador de sinal transdutor e ativador de transcrição 1
TBK1	do inglês, <i>TANK-binding kinase 1</i>

T_{FH}	células T foliculares
Th	do inglês, <i>T helper</i>
Th1	células <i>T helper</i> do tipo 1
TMPRSS2	Serina protease transmembrana tipo II
TRIS	do inglês, <i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>
Tyr	tirosina (Y)
v/v	volume/volume
VH	do inglês, <i>Human immunoglobulin heavy-chain-variable</i>
VOC	do inglês, <i>variant of concern</i>
VOI	do inglês, <i>variant of interest</i>
VUM	do inglês, <i>variant under monitoring</i>
VLP	do inglês, <i>virus-like particles</i>
WHO	do inglês, <i>World Health Organization</i>
µg	micrograma
µL	microlitro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura da proteína S do SARS-CoV-2.** No topo, diagrama esquemático da organização da proteína. NTD, domínio amino-terminal; RBD, domínio de ligação ao receptor; SD1, subdomínio 1; SD2, subdomínio 2; FP, peptídeo de fusão; HR1, heptapeptídeo 1; HR2, heptapeptídeo 2; TM, domínio de transmembrana. Na esquerda, o trímero Spike (cinza) no estado fechado (*closed state*) com três RBDs (azul ciano) “down”. À direita, o trímero Spike no estado aberto (*open state*), com uma RBD “up” e duas RBDs “down”. Adaptado de Qi et al (15).
.....3
- Figura 2.** Organograma das etapas de organização deste trabalho.....16
- Figura 3. Intensidade de reconhecimento de anticorpos para RBD.** A. IgG e IgA para RBD no ELISA. B. correlação entre os níveis de IgG e IgA (N=209).25
- Figura 4. Títulos de Neutralização Viral (N=209).** A maioria das amostras obteve título de 1:160 (18%) e 11% não apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes.....26
- Figura 5. Correlação Spearman entre os títulos de neutralização e anticorpos anti-RBD (N=209).** Observamos correlação positiva para IgG (p=0.0001) e IgA (p=0.0001).
.....27
- Figura 6. Análise do perfil sorológico da coorte de vacinados e dos títulos de neutralização.** A. Razão de IgA e IgG para RBD. B. Títulos de neutralização (VNT) entre vacinas. (N=18). *p<0.05; **p<0.001; ***p<0.000129
- Figura 7. Análise da detecção de proteínas por microarray.** Dois sub-arrays mostrando duas amostras de indivíduos pós Coronavac (A) e pós booster (B).....30
- Figura 8. Exemplificação do mapa e sistema de análise.** A PEPerPRINT disponibilizou um mapa em formato de grid para sobrepor a imagem adquirida pelo equipamento. O grid sobrepõe cada subarray do microchip individualmente para análise.....31
- Figura 9. Perfil Imunológico e das amostras de indivíduos convalescentes (N=71).** A. Porcentagem de indivíduos nos grupos *Low* e *High*. B. Número de peptídeos IgG e IgA reconhecidos por amostra.32
- Figura 10. Mapa de calor representando a magnitude de reconhecimento dos peptídeos da região RBD do SARS-CoV-2 testados para reatividade IgG e IgA.** Nas colunas, encontram-se os peptídeos ordenados em sequência da estrutura primária. Nas linhas, encontram-se as amostras de convalescentes, agrupadas por isotipo e títulos de anticorpos neutralizantes. O peptídeo destacado e sua sequência é o P44 (S415-429)...33

Figura 11. Perfil de frequência de reconhecimento da coorte de convalescentes (N=71). A. Número de peptídeos reconhecidos por IgG e IgA por amostra. Observa-se que existe maior reconhecimento de peptídeos para os grupos que possuem baixos títulos de neutralização (<i>Low</i>) tanto para IgG ($p=0.0020$), quanto para IgA ($p=0.0002$). B. Frequência de reconhecimento (%) IgG e IgA por peptídeo.....	34
Figura 12. Diferencial de intensidade aos peptídeos RBD selecionados, comparando convalescentes dos grupos <i>High</i> e <i>Low</i>. A. Perfil IgG. B. Perfil IgA.....	36
Figura 13. Avaliação da conservação dos peptídeos imunodominantes. A. Análise de conservação dos peptídeos imunodominantes entre as proteínas RBD dos betacoronavírus SARS-CoV-2, SARS-CoV, SARS-SZ3, Rs3367-bat, CoV-pangolin, e RaTG13-bat. O tamanho das letras no gráfico reflete a frequência do aminoácido em questão no alinhamento de múltiplas sequências. B. Entropia dos resíduos de aminoácidos alinhados na figura anterior. O valor da entropia é inversamente proporcional à frequência de variação das regiões alinhadas. Os peptídeos imunodominantes estão destacados.....	38
Figura 14. Avaliação estrutural dos peptídeos imunodominantes. Ligação da porção RBD com o nAb B38 (A) e com o receptor ECA2 (B) e suas interações com o P44. Os resíduos de contato estão em vermelho. O SARS-CoV-2 está em cinza, e as regiões dos peptídeos imunodominantes em laranja (<i>P50</i>), verde oliva (<i>P12</i> , <i>P14</i> , <i>P18</i>), azul ciano (<i>P30</i>) e verde fluorescente (<i>P66</i>).....	38
Figura 15. Perfil de reconhecimento do P44. A. Predição in silico pelo software BepiPred. A região destacada corresponde a região do <i>P44</i> , mostrando um alto valor de predição. B. Correlação positiva entre a média de intensidade de fluorescência (MFI) de IgG ($p<0.0001$) e IgA ($p=0.0084$) específica para <i>P44</i> e os títulos de neutralização.	39
Figura 16. Perfil de reconhecimento do P44. A. Correlação positiva entre a média de intensidade de fluorescência (MFI) do <i>P44</i> e os níveis de IgG RBD no ELISA ($p=0.04$). B. Comparação da média de intensidade de fluorescência (MFI) do <i>P44</i> entre indivíduos hospitalizados e não hospitalizados, mostrando maior reatividade de IgA ($p=0.0092$) do que IgG ($P=0.051$) entre os indivíduos hospitalizados.....	40
Figura 17. Representação estrutural da ligação da RBD ancestral (Wuhan) e as variantes Gamma, Beta, Delta e Omicron, ao mAb REGN10933 (pdb: 6XDG). A. As ligações estruturais mostrando as RBD ancestral apresentam várias pontes de ligação próximas ao resíduo E484, enquanto as variantes não apresentam. B. Análise de área de superfície acessível a um solvente evidenciando as regiões carregadas. Em azul as cargas	

positivas, e em vermelho as negativas. A região destacada é a região de contato entre o mAb e a RBD.41

Figura 18. Localização estrutural dos peptídeos mais reconhecidos e as faces de ligação da RBD. **A.** Estrutura da superfície de diferentes ângulos que mostra as faces não neutralizantes em cinza e as faces de ligação de nAbs em rosa. **B.** Os peptídeos imunodominantes estão coloridos em azul escuro (*P6*), laranja (*P12/14*), vermelho (*P44*), amarelo (*P18*), verde escuro (*P50*), azul ciano (*P30*) e verde fluorescente (*P66*). As faces não neutralizantes estão destacadas em cinza.....43

Figura 19. Perfil de reconhecimento da coorte de vacinados. **A.** Mapa de calor representando a magnitude de reconhecimento dos peptídeos da região RBD do SARS-CoV-2 testados para reatividade IgG pós Coronavac e pós booster com mRNA-273 Pfizer. Nas colunas, encontram-se os peptídeos ordenados em sequência da estrutura primária. Nas linhas, encontram-se as amostras de vacinados, agrupadas por esquema vacinal. **B.** Frequência de reconhecimento IgG pelos peptídeos imunodominantes selecionados.....44

Figura 20. Avaliação da conservação dos peptídeos imunodominantes. **A.** Análise de conservação dos peptídeos imunodominantes entre as proteínas RBD de diferentes variantes (alfa, beta, gamma, delta e omicron BA.1). O tamanho das letras no gráfico reflete a frequência do aminoácido em questão no alinhamento de múltiplas sequências. **B.** Entropia dos resíduos de aminoácidos alinhados na figura anterior. O valor da entropia é inversamente proporcional à frequência de variação das regiões alinhadas. Os peptídeos imunodominantes estão destacados.....46

Figura 21. Avaliação estrutural dos peptídeos imunodominantes. Ligação da RBD ao nAb COVA1-16 (**A**) e a ECA2 (**B**) mostrando a interação com o *P14/18* e seus resíduos de contato (em preto). A RBD está em cinza, e os peptídeos imunodominantes em amarelo (*P14/18*), verde (*P56*), laranja (*P41/44*) e azul ciano (*P1/3/5/6*).47

Figura 22. Sequência linear da RBD mostrando os sítios de mutação beta, gamma, delta e Omicron BA.1. As regiões destacadas em amarelo são as mais reconhecidas entre os vacinados. Os treze peptídeos IgG reconhecidos por vacinados (em laranja) e os sete reconhecidos por covalentes (azuis) são mostrados de acordo com os resíduos RBD. Os números em vermelho ou azul representam os aminoácidos mutados nas variantes Omicron ou Beta/Gamma/Delta, respectivamente.48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil demográfico da coorte de convalescentes.....	24
Tabela 2. Perfil demográfico da coorte de convalescentes selecionados para o microarray.	24
Tabela 3. Perfil demográfico da coorte de vacinados.....	25
Tabela 4. Caracterização imunológica das amostras selecionadas para o <i>array</i>	27
Tabela 5. Frequência de nAbs em contato com aminoácidos da RBD.....	42
Tabela 6. Lista dos peptídeos imunodominantes entre convalescentes e/ou vacinados.	45

RESUMO

Oliveira, JR. Identificação de peptídeos-alvo de anticorpos contra a proteína RBD do vírus SARS-CoV-2 em indivíduos convalescentes e vacinados [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

O vírus SARS-CoV-2 surgiu na China em 2019, com altos níveis de propagação, e três anos após o início da pandemia é responsável por 670 milhões de casos reportados. Apesar da baixa letalidade já provocou 6,8 milhões de mortes. A entrada do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras é mediada pela ligação da enzima conversora de angiotensina-2 (ECA2) com a região Receptor Binding Domain (RBD) localizada na Subunidade S1 da glicoproteína Spike, região alvo de anticorpos neutralizantes. Com essas informações em mente, mapeamos os anticorpos para a proteína RBD presentes no soro de 71 pacientes convalescentes da primeira onda de COVID-19 e de 18 indivíduos vacinados seguindo o regime vacinal de duas doses de Coronavac seguidas de um booster com a vacina miRNA-273. Visamos definir o perfil imunológico destes indivíduos e identificar possíveis peptídeos imunodominantes e a correlação com os títulos de anticorpos neutralizantes. Para isso, utilizamos os seguintes métodos: ELISA para detecção de anticorpos IgG anti RBD, ensaio de neutralização viral (VNT) para detecção de anticorpos neutralizantes e ensaio de microarray para identificar peptídeos específicos da proteína. Parte de nossos resultados mostraram consonância com a literatura: correlação positiva entre títulos de RBD e neutralização. De forma inédita, detectamos um grupo de epítomos imunodominantes reconhecidos por mais de 30% dos indivíduos, que diferem entre as coortes e estão dentro de regiões conservadas entre os betacoronavírus. Destes, apenas um peptídeo, P44 (S415-429), foi reconhecido por 68% dos convalescentes e apresentou reatividade IgG e IgA correlacionada com os títulos de anticorpos neutralizantes, sugerindo que essa é uma região importante na RBD e potencial alvo de atividade neutralizante. Esse peptídeo faz contato com a ECA2 e abriga o sítio de mutação K417 presente nas variantes Beta, Gamma e Ômicron. O perfil de epítomos dos indivíduos vacinados se difere dos convalescentes, sendo mais diverso. Ainda, as regiões imunodominantes reconhecidas pelos vacinados coincidem com os sítios de mutação encontrados na variante Ômicron BA.1, que emergiu após a vacinação. Nossos dados mostram que a pressão imunológica exercida pelos anticorpos imunodominantes podem favorecer a seleção de mutações e a posterior seleção de variantes capazes de evadir a resposta imune.

Palavras-chave: Epítomos Imunodominantes; Mutação; Pressão Imunológica; Betacoronavírus; COVID-19; Anticorpos neutralizantes.

ABSTRACT

Oliveira, JR. Identification of antibody-targeted peptide epitopes against the RBD protein of the SARS-CoV-2 virus in convalescent and vaccinated individuals [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

The SARS-CoV-2 virus emerged in China in 2019, with high levels of transmission, and three years after the start of the pandemic, it has been responsible for 670 million reported cases. Despite its low lethality, it has already caused 6.8 million deaths. The entry of SARS-CoV-2 into host cells is mediated by the binding of the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) to the Receptor Binding Domain (RBD) region located in the S1 Subunit of the Spike glycoprotein, a target region of neutralizing antibodies. With this information in mind, we mapped the antibodies against the RBD protein present in the serum of 71 COVID-19 convalescent patients and 18 vaccinated following the two-dose vaccine regimen of two Coronavac doses followed by a booster with miRNA-273 vaccine to define the immunological profile of these individuals and identify possible immunodominant peptides that could indicate a biomarker. To do this, we used the following methods: ELISA assay for the detection of anti-RBD IgG antibodies, viral neutralization assay (VNT) for the detection of neutralizing antibodies and a microarray assay to identify specific peptides of the protein. Our results were consistent with the literature: a positive correlation between RBD titers and neutralization. We detected a group of immunodominant epitopes recognized by more than 30% of individuals, which differ between cohorts and are within conserved regions among betacoronaviruses. Of these, only one peptide, P44 (S415-429), was recognized by 68% of convalescents and showed IgG and IgA reactivity correlated with neutralizing antibody titers, suggesting that this is an important region in the RBD and a potential target for neutralizing activity. This peptide is localized within a contact region with the ACE2 receptor and harbors the K417 mutation site present in the Beta, Gamma, and Omicron variants. The epitope profile of vaccinated individuals is different from convalescents, with a more diverse repertoire. Furthermore, the immunodominant regions recognized by vaccinees coincide with the mutation sites found in the Omicron BA.1 variant, which emerged after mass vaccination. Our data show that immune pressure induced by immunodominant antibodies may favor mutation in hotspots and subsequent selection of variants capable of evading the immune response.

Keywords: Angiotensin-Converting Enzyme 2; Neutralizing Antibodies; Betacoronavirus; Epitopes; Immunodominant Epitopes.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dados epidemiológicos da COVID-19, vacinação e suas variantes no Brasil

No final de 2019, um novo coronavírus denominado SARS-CoV-2 (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) emergiu na cidade de Wuhan, China, e causou um surto de pneumonia viral altamente transmissível. Foi denominada pela OMS (Organização Mundial da Saúde) como a doença do coronavírus (COVID-19, do inglês, *Coronavirus Disease 2019*). A síndrome respiratória espalhou-se rapidamente e deu origem a uma pandemia global ultrapassando rapidamente SARS-CoV (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome*) e MERS-CoV (do inglês, *Middle East Respiratory Syndrome*) em termos de número de infectados e alcance territorial das áreas epidêmicas (1,2).

Segundo o Ministério da Saúde, o Brasil registrou o primeiro caso no dia 26 de fevereiro de 2020. À data da escrita desta tese, o número de casos documentados ultrapassa os 670 milhões e mais de 6,8 milhões de casualidades. No Brasil, o país sofreu com mais de 36,5 milhões de casos e 690 mil mortes (3).

Apesar da existência consolidada do Plano Nacional de Vacinação, o Brasil foi considerado atrasado no cenário de produção de vacinas em consequência do contexto político existente em torno da pandemia. Quatro vacinas foram aprovadas para uso no Brasil à data da coleta de amostras: AstraZeneca e Janssen, vacinas de vetores virais; Pfizer (miRNA-273), vacina de mRNA (ácido ribonucleico mensageiro); e Coronavac, vacina de vírus inativado. As vacinas usadas neste estudo, Pfizer e Coronavac, são administradas via intramuscular por meio de duas doses e possuem eficácia de 95% e 50%, respectivamente. O esquema vacinal adotado foi de duas doses de Coronavac (com intervalo de 4 semanas entre as doses) seguidas de um *booster* com a miRNA-273 após o intervalo de 4 meses (4). O cronograma vacinal e de aparecimento de variantes encontra-se ilustrado no anexo. Atualmente, a cobertura vacinal no Brasil é de 85% de vacinados com a primeira dose, 80% com a segunda dose ou vacinas de dose única, e apenas 50,5% vacinados com as doses de reforço (5).

A OMS acompanha a evolução do SARS-CoV-2 e avalia fatores como transmissibilidade, alterações fenotípicas, virulência e propagação. As linhagens virais que podem requerer intervenções em saúde pública foram classificadas como VOC (do inglês, *variant of concern*), VOI (do inglês, *variant of interest*) ou VUM (do inglês, *variant under monitoring*)(6).

No Brasil, a epidemia foi caracterizada por ondas alimentadas pela emergência de VOCs como a Gamma/P.1 (janeiro 2021) e Delta (junho 2021), seguidas de uma queda nos casos reportados, provável resultado da vacinação (>50% de cobertura nacional) e imunidade adquirida pela infecção pelas variantes anteriores (7). A variante Omicron (B.1.1.529) emergiu na África do Sul em novembro de 2021 e rapidamente substituiu a variante Delta em âmbito nacional e internacional, alertando o mundo em função de seu número exorbitante de mutações: a maioria localizada na proteína Spike e associadas com escape imunológico(8–10).

1.2 O vírus SARS-CoV-2 e sua estrutura

Os Coronavírus são um grupo de vírus diversos que infectam diversos animais e podem causar infecção respiratória leve a grave em humanos. Em 2001 e 2012, respectivamente, dois coronavírus altamente patogênicos de origem zoonótica, o SARS-CoV e o MERS-CoV emergiram em humanos causando doença respiratória fatal e tornando os coronavírus emergentes um problema de saúde pública no século 21 (11).

O SARS-CoV-2 é um betacoronavírus RNA de fita simples (+ssRNA), e compartilha 79% de semelhança com o SARS-CoV e 50% com o MERS-CoV, assim como a mesma organização estrutural. Sua estrutura é composta por seis domínios funcionais ORF (do inglês, *open reading frame*), que estão arranjados em ordem 5'3': replicase ORF1a/b, Spike, envelope, membrana e nucleocapsídeo (12).

A proteína Spike é altamente conservada entre os coronavírus humanos (HCoVs) e está envolvida no reconhecimento do receptor, ligação viral e entrada nas células hospedeiras (13,14). Cada virion contém em média 26 ± 15 trímeros de Spike, cobertos extensivamente por glicanos distribuídos aleatoriamente pela superfície da proteína. Para cada glicoproteína

Spike monomérica, existem duas subunidades funcionais: S1, para ligação com o receptor ECA2, e S2 para mediar a fusão das membranas celulares e virais (Figura 1) (15).

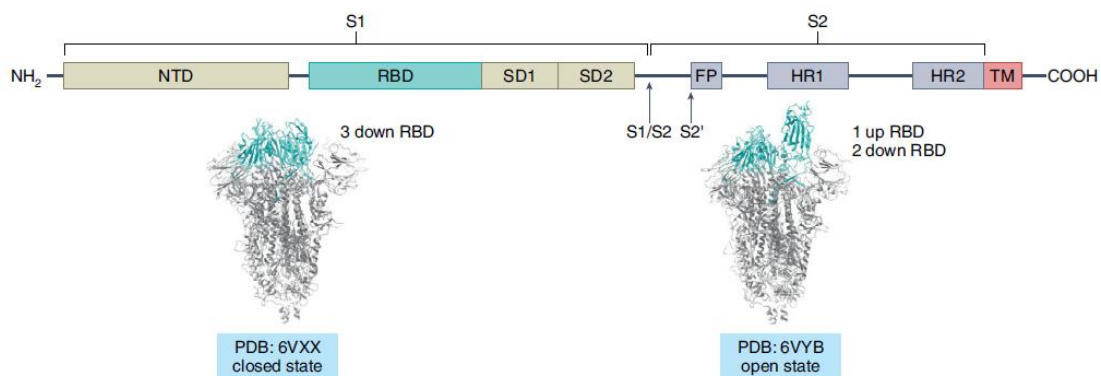


Figura 1. Estrutura da proteína S do SARS-CoV-2. No topo, diagrama esquemático da organização da proteína. NTD, domínio amino-terminal; RBD, domínio de ligação ao receptor; SD1, subdomínio 1; SD2, subdomínio 2; FP, peptídeo de fusão; HR1, heptapeptídeo 1; HR2, heptapeptídeo 2; TM, domínio de transmembrana. Na esquerda, o trímero Spike (cinza) no estado fechado (*closed state*) com três RBDs (azul ciano) “down”. À direita, o trímero Spike no estado aberto (*open state*), com uma RBD “up” e duas RBDs “down”. Adaptado de Qi *et al* (15).

A subunidade S1 se dobra em quatro domínios estruturais, o NTD, RBD, e dois domínios CTD (domínio carboxi-terminal), que envolvem e protegem a subunidade S2. Em seu estado nativo, a proteína Spike existe como um precursor inativo. Durante a infecção viral, proteases da célula do hospedeiro ativam a proteína S clivando-a em S1 e S2, necessário para ativar o domínio de fusão de membrana, de maneira similar a outros coronavírus (16,17). Análises cristalográficas e de crio-microscopia eletrônica revelaram que a RBD passa por flutuações estruturais espontâneas entre os estados “up” e “down”, onde apenas o estado conformacional “up” permite a exposição da porção RBM (do inglês, receptor binding motif) da RBD, que dessa forma se torna acessível e se liga ao receptor ECA2 (enzima conversora de angiotensina) (18).

1.3 Mecanismos da infecção viral por SARS-CoV-2

A infecção viral se inicia com a ligação das partículas virais a receptores da célula hospedeira, tornando o reconhecimento de receptores um fator determinante no tropismo celular e tecidual do vírus. A proteína Spike é uma peça importante na infecção viral: é uma proteína de transmembrana trimérica de classe I, e está presente em vários tipos de HCoV, assim como em outros vírus, como o vírus Influenza, HIV (vírus da imunodeficiência humana) e Ebola (19). De maneira similar a outros coronavírus, a proteína Spike medeia o reconhecimento de receptor, ligação na célula e fusão durante a infecção viral (18,20).

A proteína Spike se liga à célula hospedeira através do reconhecimento do receptor da ECA2, que está distribuída principalmente nos pulmões, intestino, coração e rins, e a célula que mais expressa esse receptor é pneumócito do tipo 2. A subunidade S1 contém a porção RBD, que é responsável pela ligação do vírus ao receptor, enquanto a subunidade S2 está relacionada à fusão viral (21,22). Modelos computacionais e medições biofísicas indicam que a região RBD do SARS-CoV-2 se liga ao ECA2 com afinidade 10-20 vezes maior ($K_D \approx 15$ nM) do que o SARS-CoV, e a proteína Spike constantemente muda entre os estados “aberto” e “fechado” para liberar a região de ligação e evasão do sistema imune, respectivamente. Estudos com a estrutura cristalográfica da RBD ligada ao ECA2 revelaram diferenças sutis, porém funcionalmente importantes entre o SARS-CoV e o SARS-CoV-2. Essas diferenças conferem a RBD do SARS-CoV-2 uma afinidade maior com o seu receptor do que o SARS-CoV, o que pode explicar a alta infectividade do SARS-CoV-2 (23,24).

Para que aconteça a fusão de membranas por endocitose, a proteína Spike precisa ser clivada de maneira proteolítica para que a subunidade S1 se dissocie e a subunidade S2 passe por mudanças estruturais. Entre as proteases envolvidas nesse processo, estão a protease de superfície TMPRSS2 e as catepsinas L (proteases lisossomais) (16,23,25). Por fim, a ligação RBD-ECA2 começa um processo de endocitose formando um endossoma. Dentro do endossoma, a subunidade S1 é clivada, expondo o peptídeo de fusão, que é inserido dentro da membrana do hospedeiro. Então, a região S2 se dobra entre as regiões HR1 e HR2, levando à fusão da membrana e liberação do conteúdo viral dentro do citoplasma do hospedeiro (26).

A infecção pelo SARS-CoV-2 e a destruição dos pneumócitos causam uma resposta imune local, recrutando monócitos e macrófagos que respondem à infecção liberando citocinas e iniciando as respostas imunes adaptativas B e T. Na maioria dos casos, essas respostas são suficientes e capazes de acabar com a infecção. Entretanto, em alguns casos acontece uma resposta imune disfuncional que pode desencadear danos aos pulmões ou patologias sistêmicas (26).

Vírus citopáticos como o SARS-CoV-2 induzem à morte e dano das células e tecidos como parte do ciclo de replicação viral (27). A infecção no epitélio das vias aéreas superiores pode causar um tipo de apoptose relacionada ao vírus chamada piroptose, uma forma de morte celular programada altamente inflamatória associada com vazamento vascular, como foi observado em pacientes infectados com SARS-CoV (28,29). Usando uma variedade de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), as células epiteliais alveolares e os macrófagos alveolares detectam os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) como RNA viral e os padrões moleculares associados a danos (DAMPs), como oligômeros de ATP (adenosina trifosfato) e DNA (ácido desoxirribonucleico), começando uma inflamação local envolvendo grande liberação de citocinas e quimiocinas pró inflamatórias indicadoras de uma resposta celular polarizada de linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) (30), também observado em infecções por SARS-CoV e MERS-CoV (31). Essa grande liberação de fatores pró inflamatórios recruta células imunes do sangue para o tecido, como linfócitos T e monócitos. Normalmente, essas células recrutadas acabam com a infecção, a resposta imune finaliza e os indivíduos acometidos se recuperam. Entretanto, alguns indivíduos apresentam resposta imune disfuncional, que engatilha uma “tempestade” de citocinas que medeia uma inflamação pulmonar disseminada (26).

Os mecanismos pelos quais o SARS-CoV-2 subverte a resposta inata antiviral ainda não foram completamente elucidados, porém, pesquisas anteriores com o vírus SARS-CoV mostram que várias proteínas estruturais e não-estruturais estão envolvidas antagonizando múltiplas etapas das vias de sinalização de interferons: impedindo o reconhecimento de PRRs como RNA viral (32), inibindo a sinalização de PRRs por TBK1/inibidor da subunidade-ε do NFκB (fator nuclear kappa B) e IRF3 (fator regulador de interferon 3) (33) e prevenindo a diminuição da sinalização de STAT1 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 1) (34),

por exemplo. O antagonismo das respostas de interferon beneficia a replicação viral e induz maior dano tecidual, que por sua vez engatilha uma resposta imunológica mais intensa. A inflamação segue de forma escalonada: as células inflamatórias infiltram os pulmões e produzem altas quantidades de citocinas pró inflamatórias. Essas respostas desbalanceadas causadas em parte pelo antagonismo dos IFN (interferon) são a causa determinante mais provável de gravidade na doença aguda (35,36).

Os resultados da infecção por SARS-CoV-2 variam muito, e a maior parte dos indivíduos jovens experienciam a infecção leve (37). Outros fatores importantes são sexo, homens representam uma parcela maior entre indivíduos com doença grave (38); idade, maiores de 65 anos apresentam maior risco (39); comorbidades como obesidade, hipertensão, doença pulmonar obstrutiva e doenças cardiovasculares estão associadas à infecção grave (40). Outro fator de risco associado é o hábito de fumar: a fumaça do cigarro induz o aumento da expressão do receptor ECA2 e, dessa forma, pode influenciar a invasão do vírus (41).

1.4 Imunidade antiviral

1.4.1 Princípios gerais de imunidade antiviral

O sistema imunológico é um sistema complexo que evoluiu para trabalhar em uníssono para nos proteger de doenças infecciosas. A resposta imune inata inicia-se a partir da entrada do vírus na célula e engatilha os mecanismos que ativam a resposta imune adaptativa. Em um cenário de resposta imune eficiente, a infecção viral ativa os mecanismos de reconhecimento via DAMPs e PAMPs que desencadeiam a ação do sistema imune inato, cujos principais mecanismos envolvidos são a inibição da infecção pela ação dos IFN do tipo I e a ação das células NK. Conforme a resposta progride, citocinas e quimiocinas recrutam células da resposta adaptativa. A magnitude das respostas adaptativas é determinada por fatores como a patogenicidade viral, a extensão do processo inflamatório, cinéticas de replicação viral e as frequências de células vírus-específicas. A resposta adaptativa é mediada pela produção de anticorpos com atividade neutralizante e pelas células T citotóxicas, que destroem as células infectadas. As células T CD4⁺ também possuem papel importante na imunidade antiviral, sendo responsáveis pela polarização da resposta Th1 e pela diferenciação em células T foliculares, cruciais para o desenvolvimento dos plasmócitos nos

tecidos linfoides e para o desenvolvimento de células B de memória. Como resultado da interação coordenada das respostas inatas e adaptativas, a carga viral e a inflamação diminuem. Quando as respostas imunes adaptativas à infecção são sub ótimas ou o vírus desenvolveu meios para escapar das respostas imunes (incluindo a indução da supressão imunológica do hospedeiro), pode ocorrer infecção crônica ou doença generalizada e morte, especialmente em indivíduos de risco (42–44).

A imunidade humoral, em particular os anticorpos neutralizantes, é de importância central para proteger o corpo contra vírus citopáticos. Os anticorpos (ou imunoglobulinas) são proteínas circulantes produzidas em resposta à exposição a antígenos. São sintetizados pelos linfócitos B e podem estar ligados à membrana, exercendo função de receptores que medeiam a ativação das células B; ou podem ser secretados e exercendo função de mediadores da imunidade humoral específica, acoplando diversos mecanismos efetores para eliminar antígenos (45).

Os anticorpos são formados por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, ligadas por uma ponte dissulfeto. A molécula se divide em duas regiões: Fab (do inglês, *Fragment Antigen Binding*), responsável pela ligação ao antígeno; e Fc (Fragmento cristalizável), responsável por determinar a função do anticorpo. Além disso, os anticorpos apresentam regiões variáveis, responsáveis por determinar a especificidade aos antígenos; e regiões constantes, altamente conservadas e que determinam as diferentes classes de anticorpos. Os anticorpos são classificados em diferentes isotipos, com base nas diferenças estruturais da região Fc. Os isotipos de anticorpos são chamados de IgM, IgD, IgG, IgE e IgA. Mudanças nos segmentos genéticos das regiões conservadas sem alterações nas regiões variáveis são as bases das trocas de isotipo, que levam mudanças nas funções efectoras, mas sem alterações na especificidade (46).

As principais funções dos anticorpos são neutralizar e eliminar patógenos e toxinas via diversos processos, como neutralização, opsonização, fagocitose, lise, inflamação, citotoxicidade e ativação do sistema complemento. A maioria dessas funções são mediadas pelas regiões conservadas das cadeias pesadas e ativadas pela ligação dos antígenos na região Fab (47).

Várias mudanças na estrutura dos anticorpos podem ocorrer durante uma resposta imune. As células B inicialmente produzem somente anticorpos ligados à membrana, mas conforme as células B são ativadas e diferenciam-se em plasmócitos, as imunoglobulinas com a mesma especificidade de ligação ao antígeno em questão são secretadas. A maturação da afinidade ocorre quando acontecem mutações pontuais nas regiões variáveis de um anticorpo específico e aumentam a afinidade para aquele antígeno (48).

1.4.2 Imunidade ao SARS-CoV-2

A evolução do anticorpo ocorre por mutação somática e seleção em centros germinativos, nos quais o antígeno pode ser retido na forma de complexos imunes na superfície das células dendríticas foliculares por períodos prolongados (49). A infecção por SARS-CoV-2 induz uma robusta resposta humoral na maior parte dos indivíduos (50–52), que é caracterizada pela magnitude e heterogeneidade do perfil da resposta de anticorpos, cujos títulos normalmente caem rapidamente ao curso de 4 meses após a infecção (53,54). De maneira controversa, a resposta de células B específicas para SARS-CoV-2 aumenta ao curso desse mesmo período antes de estabilizar (55) e são mantidas na medula óssea por até 11 meses após a infecção (56).

A infecção grave por SARS-CoV-2 está associada a uma resposta aumentada de anticorpos e células B de memória, comparada a infecções leves (57). Isso pode ser explicado por achados que mostram que estes indivíduos geram uma resposta de células B extra foliculares que se correlaciona a um aumento no nível de citocinas pró-inflamatórias e no título de anticorpos neutralizantes (58). Porém, a resposta do centro germinal de células B é prejudicada. Estes indivíduos podem falhar em formar centros germinativos funcionais, evidenciado pela acentuada diminuição no número de células T foliculares (T_{FH}) presentes no baço e gânglios linfáticos (59). Os baixos níveis de hipermutação somática nas células B provenientes da infecção grave são consistentes com a resposta prejudicada dos centros germinativos e podem levar à produção de anticorpos ineficientes na resolução da doença. Entretanto, a resposta do centro germinativo não é deficiente em todos os casos: alguns indivíduos com doença grave apresentam uma resposta T_{FH} circulante robusta (60)

A infecção leve também induz uma resposta extra folicular na qual ambas as células *naïve* e específicas se diferenciam em células B ativadas e plasmócitos de vida curta. No entanto, as células B de memória específicas para SARS-CoV-2 acumulam mutações somáticas nos genes de região variável (V_H), sugerindo que elas são provenientes de uma resposta contínua do centro germinal. Outros achados suportam esse modelo: a presença de ácidos nucleicos virais no intestino de convalescentes com infecção leve por pelo menos três meses após a infecção, que pode alimentar a resposta do centro germinativo e a consequente presença de plasmócitos de alta afinidade na medula óssea de infectados (51).

Os anticorpos expressos pelas células B de memória específicas para SARS-CoV-2 com mutação somática exibem características especiais em relação a células B presentes em momentos anteriores da infecção como: ligação ao antígeno, amplitude e potência de neutralização aprimoradas (61–63).

De maneira similar a outras infecções respiratórias, a infecção por SARS-CoV-2 estimula rapidamente a produção de imunoglobulinas do tipo M, G e A (IgM, IgG e IgA), que podem ser quantificados no soro logo após o início dos sintomas (57,64). A capacidade neutralizante também aparece rapidamente, apesar de ser altamente variável entre os indivíduos convalescentes (53,65). Estudos longitudinais e transversais indicam que os títulos de anticorpos e de atividade neutralizante contra o SARS-CoV-2 atingem o pico em 3 a 4 semanas após o início dos sintomas (36,66), e embora os títulos de anticorpos diminuam com o tempo (67–70), eles permanecem relativamente estáveis por meses, com o IgG sendo mais estável do que IgM e IgA (54,65,66).

Enquanto a gravidade do COVID-19 varia na população, níveis de anticorpos circulantes e capacidade neutralizante são encontrados em indivíduos com infecção grave em maior proporção do que naqueles com infecção leve (54,71) ou assintomáticos (72). Estudos mostraram que a infecção grave tem maior probabilidade de começar com uma carga viral alta (73), e os títulos elevados de anticorpos em casos graves provavelmente resultam de uma resposta extra folicular impulsionada por um antígeno muito mais potente (74).

Os anticorpos circulantes encontrados no soro ou em tecidos ajudam a controlar a propagação viral dentro do corpo. Na mucosa, em particular a IgA secretora (sIgA) encontrada no trato respiratório pode desempenhar um papel importante na transmissão do

vírus pelas vias aéreas (75). Essa proteção é baseada na distribuição estratégica no tecido e na atividade neutralizante mais potente da sIgA dimérica em relação à IgA monomérica encontrada no soro e outros anticorpos de outros isotipos (76). Foi detectada a presença de IgA específica para SARS-CoV-2 na saliva de indivíduos infectados (65), e de anticorpos IgA neutralizantes em fluidos nasais de profissionais da saúde soronegativos, este último sugerindo uma resposta estritamente local no tecido linfoide nasofaríngeo (77). Níveis significantes de IgA permanecem nos fluidos nasais por meses após o início dos sintomas, e parecem contribuir para a resistência a reinfecção (78,79).

Uma das maiores esperanças do passado recente era que a imunidade de rebanho pausasse ou diminuísse os ciclos de infecção e doença aguda. Modelos matemáticos de outras doenças sugerem que mais de 60% - e talvez até 80% - da população precisa apresentar imunidade para que a replicação viral caia e possibilite algum nível modesto de controle da doença. É historicamente documentado que a imunidade de rebanho não erradica doenças. Um exemplo recente é a pandemia de Influenza H1N1 que ocorreu em 1918, onde apenas dois anos, 500 milhões de infecções e 50 milhões de mortes depois a sociedade atingiu níveis suficientes de imunidade de rebanho e começou a se recuperar (80).

1.5 Vacinas e variantes

Vacinas são um produto biológico que pode ser usado para induzir com segurança uma resposta imune que confere proteção contra um patógeno e/ou doença em uma exposição subsequente (81). Para isso, uma vacina deve conter antígenos derivados de patógenos ou produzidos sinteticamente para representar os componentes do organismo em questão. As vacinas para o COVID-19 são baseadas em sete plataformas que podem ser classificadas em três modelos de acordo com a categoria do antígeno (81). O primeiro modelo é baseado na produção da proteína *in vitro*, incluindo vacinas inativadas (SARS-CoV-2 inativado), vacinas VLP (partículas virais sem ácido nucleico) e vacinas de subunidade (proteína Spike ou RBD expressadas *in vitro*). O segundo modelo é baseado no gene do antígeno expressado *in vivo*, como vacinas de vetor viral (usam o vírus geneticamente modificado para que apresente defeitos na replicação, e que carregam o mRNA da proteína Spike ou RBD), vacinas de DNA (carregam as sequências de DNA da proteína Spike ou RBD) e vacinas de mRNA (carregam

as sequências de RNA da proteína Spike ou RBD). O terceiro modelo é a vacina de vírus atenuado (82). Algumas vacinas de mRNA e de vetores podem induzir resposta Th1 (83) e respostas persistentes no centro germinativo (84,85), além da indução de células de memória (86–88). A maioria das vacinas tem como alvo a cepa identificada no começo da pandemia – Wuhan, selvagem ou ancestral (89–93), e a imunização se mostrou altamente eficaz na prevenção da infecção seja leve ou grave (94).

A proteção conferida pela vacinação é associada à imunidade humoral (anticorpos neutralizantes) e adaptativa (células T). Respostas duradouras de anticorpos são mediadas através de células B de memória e plasmócitos de vida longa. Esses subtipos de células produzem continuamente anticorpos neutralizantes e não neutralizantes que mobilizarão funções efetoras das células da imunidade inata, tal como citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC) ou a fagocitose pelos neutrófilos, também dependente de anticorpos (95). Em uma resposta vacinal canônica, a resposta imune inicial é mediada por células apresentadoras de antígenos (APCs) no sítio de imunização. Essas APCs encontram os antígenos e migram para os linfonodos e apresentam os antígenos para as células T e B. O resultado imunológico dessa interação entre APCs, células B e T é parcialmente moldado pelo imunizante (vetor, imunógeno e adjuvante), o microambiente do hospedeiro nas cascatas de sinalização da resposta imune inata, que desencadeiam redes transcricionais distintas nas APCs, principalmente nas células dendríticas e macrófagos (96). As APCs também expressam ligantes para receptores presentes nas células B e T, além de produzirem citocinas que modulam as respostas das células T, a troca de classe de anticorpos das células B e estabelecem as respostas de células T e B de memória e dos plasmócitos de vida longa (97,98). A qualidade da resposta inata afeta as interações entre as APCs e as células T/B e molda, assim, o grau em que a resposta adaptativa será protetora e durável.

Embora em média as vacinas induzam produção de anticorpos em níveis suficientes para proteção contra a doença, a resposta a cada vacina tem natureza heterogênea, e produz títulos de anticorpos que variam na faixa de duas ou três ordens de magnitude em adultos imunizados com a mesma vacina, similaridade também observada após o reforço (*boost* ou *booster*) com a mesma vacina, ou uma vacina diferente (96).

Uma preocupação inicial em relação ao SARS-CoV-2 foi o possível surgimento de variantes antigenicamente distintas, com capacidade de escapar da imunidade adquirida por vacina ou por infecções. No início da pandemia, quando a fração de hospedeiros *naive* era maior, havia pouco benefício evolutivo na novidade antigênica em relação à variante selvagem. À medida que a imunidade na população aumentava, a novidade antigênica passou a desempenhar um papel cada vez mais importante em seu processo reprodutivo em relação às mudanças biológicas intrínsecas (99). A seleção natural favoreceu as variantes capazes de maximizar o sucesso reprodutivo por meio da adaptação das características biológicas intrínsecas – como a alteração conformacional na proteína Spike conferida pela mutação Asp614Gly, ou o fenótipo de clivagem de furina aprimorado, associado ao aumento da ligação ao receptor ECA2, exibido pela variante Alpha (100–102), mais transmissível e detectada pela primeira vez em 2020, causou mais casos graves do que a variante ancestral (103,104). As variantes Beta e Gamma foram reportadas como capazes de escapar da imunidade adquirida naturalmente ou induzida por vacina (105–107). A variante Delta emergiu na Índia no final de 2020 e causou aumento nos casos confirmados (108). A proteína Spike da variante Delta evoluiu para otimizar a entrada na célula acelerando a fusão da membrana, causando, ainda, evasão do sistema imune (109). A variante Omicron superou a variante Delta e se tornou dominante em escala mundial logo após sua descoberta devido à sua maior transmissibilidade (110,111). De acordo com os relatórios semanais da OMS, as sub variantes descendentes da Omicron são as cepas dominantes circulantes.

Modificações estruturais sutis na proteína Spike podem facilitar o escape imunológico, o que dificulta o desenvolvimento de vacinas universais baseadas na proteína Spike (112,113). Alguns *hotspots* de mutação como a Lys417, que é crucial para interação com um resíduo de carga negativa encontrado em anticorpos neutralizantes, quando mutados como na K417N (troca do aminoácido lisina por uma asparagina), perturba uma ponte salina que se forma durante a ligação com o anticorpo e leva ao escape imunológico (114). Altas taxas de mutação fornecem ao vírus maiores chances de sobreviver por escape imunológico e a intensidade dessas novas mutações apresentam um grande desafio aos atuais estudos de vacinas e produções de anticorpos terapêuticos.

1.6 Perfil de reconhecimento de epítomos

Epítomos, também conhecidos como determinantes antigênicos, são parte de um antígeno reconhecido pelo sistema imune, especificamente por células B ou T. Os epítomos de antígenos proteicos podem ser conformacionais ou lineares. Um epítomo conformacional é formado pela conformação 3D adotada pela interação de resíduos aminoácidos descontínuos. Em contraste, o epítomo linear é formado pela conformação 3D adotada pela interação de resíduos de aminoácidos contínuos (115). A identificação de epítomos é fundamental para entender como a ligação com o anticorpo pode ser traduzida em imunidade protetora estabelecida seja por infecção ou por vacinas, além de ser importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e vacinais (116).

O cenário de epítomos neutralizantes na região RBD foi mapeado e organizado em quatro classes, RBD de classe 1 a 4. A classe RBD 1 compreende os anticorpos neutralizantes codificados pelo gene VH3-53, que bloqueiam a ECA2 e se ligam apenas à RBD em conformação *up*. A classe RBD 2 compreende os anticorpos neutralizantes que bloqueiam a ECA2 em sua conformação *up* ou *down* e podem fazer contato com RBDs adjacentes. A classe RBD 3 compreende anticorpos que se ligam fora do sítio de ligação ECA2 e reconhecem a RBD em conformação *up* ou *down*. A classe RBD 4 compreende os anticorpos que não bloqueiam a ECA2 e se ligam à RBD apenas em conformação *up*. Os anticorpos que têm como alvo a RBM estão entre os anticorpos com maior potência de neutralização (Classe 1, 2 e 3) (15).

Epítomos IgG e IgM foram identificados no soro de 10 indivíduos por *whole-proteome array*, além de encontrar um potencial anticorpo neutralizante na região RBD (117), em outro estudo epítomos IgG e IgM foram encontrados no nucleocapsídeo e na proteína Spike de 29 indivíduos convalescentes, sendo a proteína Spike com maior especificidade (118), e três epítomos lineares identificados em soro de pacientes convalescentes, utilizados para enriquecimento de anticorpos neutralizantes contra a proteína Spike (119) e pelo método que utiliza um conjugado de peptídeos com ácidos nucleicos foram encontrados epítomos lineares na região glicoproteica da proteína Spike (120). Três epítomos lineares de células B reconhecidos por anticorpos neutralizantes foram

caracterizados como imunodominantes por um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (121), e outros foram detectados por ferramentas de bioinformática (122).

Uma técnica convencional para estudar o perfil sorológico dos indivíduos inclui o ELISA e suas variações. Entretanto, essas técnicas normalmente podem testar apenas uma proteína ou um anticorpo em uma única reação. Em contraste, o *microarray* de proteínas permite uma caracterização do proteoma alvo de respostas de anticorpos em formato *high-throughput*, resultando em uma ampla descrição das respostas desejadas. Existe uma vasta variedade de *microarrays* de proteínas descritas na literatura, como para o vírus SARS-CoV (123), o vírus da Dengue (124) e o vírus Influenza (125).

Descrevemos nesta tese a caracterização do perfil de resposta IgG e IgA a peptídeos da RBD do vírus SARS-CoV-2, de indivíduos convalescentes de COVID-19 e indivíduos vacinados sem infecção anterior. Descreveremos uma visão dinâmica dessas respostas, revelando o perfil único de cada paciente e buscando perfis de reconhecimento nos diferentes grupos clínicos, que podem auxiliar em direção a possíveis estratégias terapêuticas contra o SARS-CoV-2.

2. JUSTIFICATIVA

Ao ativar a resposta humoral do hospedeiro, as infecções virais desencadeiam a produção de anticorpos direcionados contra epítomos proteicos virais. O conhecimento destes epítomos é fundamental para a compreensão da patogênese das infecções virais, para o desenvolvimento de biomarcadores bem como para vacinas eficazes. A seleção de bibliotecas de anticorpos no soro de pacientes convalescentes pode levar ao isolamento de epítomos baseados em peptídeos imunorreativos.

Diante do exposto, no presente estudo, pretendemos de forma sistemática mapear a resposta imune humoral especialmente à RBD do SARS-CoV-2 ancestral e seus peptídeos, correlacionando com a capacidade neutralizante dos anticorpos. Dessa maneira, esperamos contribuir para o conhecimento dos correlatos de proteção da infecção pelo SARS-CoV-2 e buscar marcadores ou alvos terapêuticos contra esse patógeno emergente.

3. PLANO DE TRABALHO

As etapas de execução do projeto encontram-se resumidas na figura abaixo:

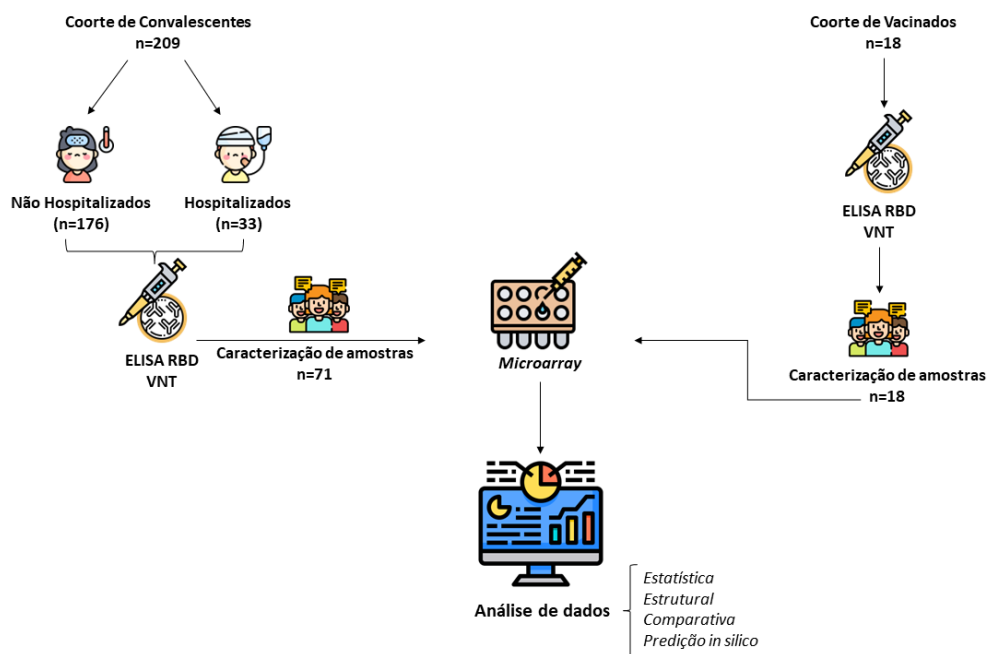


Figura 2. Organograma das etapas de organização deste trabalho.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil de epítomos de anticorpos da RBD da proteína Spike e identificar os imunodominantes, selecionados a partir de testes de reatividade contra soro de indivíduos infectados com o SARS-CoV-2.

4.2 Objetivos específicos

- Correlacionar o perfil de reconhecimento de anticorpos com o título de neutralização e com grupos específicos relacionados à gravidade da doença.
- Correlacionar os peptídeos imunodominantes com títulos de neutralização.
- Avaliar o perfil de reconhecimento de epítomos em indivíduos vacinados e comparar com perfil de convalescentes.
- Avaliar o perfil de reconhecimento de epítomos em relação às mutações das diferentes variantes do vírus.

5. MÉTODOS

5.1 Casuística

Foram recrutados 209 indivíduos convalescentes entre 18-90 anos no Ambulatório de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) com confirmação diagnóstica por RT-PCR entre março e abril de 2020. As amostras foram coletadas 30-50 dias após o início dos sintomas. O estudo foi aprovado pela CAPPesq (Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP) e Conep (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) (CAAE: 30155220.3.0000.0068). Destes, 71 indivíduos (52% mulheres, 48% homens, com idade mediana de 42 anos) foram selecionados para o mapeamento de epítomos. Estes indivíduos foram separados em dois grupos em relação ao título de neutralização, sendo caracterizados como *High* ($\geq 1:160$) ou *Low* ($< 1:160$), de acordo com a recomendação para doação de plasma da União Europeia (126). Dentre eles, 21 (30%) indivíduos foram hospitalizados, dos quais 9 estiveram em UTI sem ventilação mecânica. Os 50 (70%) participantes restantes apresentaram sintomas leves e não precisaram de hospitalização.

18 indivíduos vacinados e sem infecção prévia por COVID-19 (77,8% mulheres, 22,2% homens, com idade mediana de 52 anos) foram selecionados de uma segunda coorte do mesmo estudo, nas quais duas amostras foram coletadas em tempos diferentes: 15 dias após a segunda dose da vacina Coronavac, e 90 dias após um booster com a vacina miRNA-273 Pfizer.

5.2 Obtenção de soro

As amostras de soro coletadas no ambulatório foram obtidas a partir do sangue centrifugado a 1800 RPM por 8 minutos, aliquotadas e criopreservadas em freezer -80°C até o momento do uso. Para controle foram utilizados soros coletados antes de 2020. Todas as amostras foram inativadas a 56°C por 30 minutos antes do início dos experimentos.

5.3 ELISA para avaliação da produção de anticorpos

A produção de anticorpos IgG e IgA anti-RBD foi avaliada por meio de ensaios de ELISA. Para tal, microplacas *half-area* de 96 poços de poliestireno *high-binding* (Corning, Sigma-Aldrich, Alemanha) foram revestidas com 25 μL de antígeno purificado (GenScript Biotech, Estados Unidos) na concentração de 50 ng/mL diluído em tampão carbonato 50mM pH 9,6 (Sigma-Aldrich, Alemanha) e incubadas por aproximadamente 16 horas a 4°C. Após a incubação, a solução de RBD foi descartada e as microplacas foram bloqueadas com 80 μL de tampão de bloqueio PBS-Tween 20 a 0.02% (*Phosphate-buffered saline*) acrescido de BSA (*Bovine serum albumine*) a 1% e 5% de leite desnatado por 2h a temperatura ambiente, para minimizar ligações inespecíficas. As amostras de soro foram diluídas em PBS-Tween 20 a 0.02% acrescido de 0.25% de leite desnatado na proporção de 1:100. Foram adicionados 50 μL de soro diluído a 1:100 em cada poço e as microplacas foram incubadas por 45 minutos em estufa a 37°C. Após a incubação, 50 μL de anticorpo secundário (IgG e IgA anti-goat HRP, Sigma-Aldrich, Alemanha) foram adicionados às microplacas, previamente diluídos em PBS-Tween 20 0.02% acrescido de 0.25% de leite desnatado na proporção de 1:10000 e incubados por 30 minutos em estufa a 37°C. Entre todas as etapas, as microplacas foram lavadas 5 vezes por 3 minutos com 100 μL de PBS-Tween 20 a 0.05%. Tabletes de *o-Phenylenediamine dihydrochloride* (OPD) (Sigma-Aldrich, Alemanha) foram diluídos em solução Fosfato-Citrato 0.05 M pH 5.0 (Sigma-Aldrich, Alemanha) para a concentração de 0.4 mg/mL. Imediatamente antes do uso, 5 μL de peróxido de hidrogênio a 30% foram adicionados à solução. Para finalizar a reação, foram adicionados 50 μL por poço da solução final e as microplacas foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos, ao abrigo de luz. Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 50 μL de uma solução de H_2SO_4 (ácido sulfúrico) em concentração de 2N em cada poço. Por fim, as placas foram lidas em espectrofotômetro de microplacas (Epoch, Biotek, Estados Unidos) no comprimento de onda de 492 nm. Todas as amostras foram corridas em triplicatas.

Para a determinação do *cut-off* de cada anticorpo foi calculada a média das leituras de densidade ótica de pelo menos 12 soros negativos. O *cut-off* foi determinado como a média obtida mais 3 vezes o desvio padrão. Esse valor foi utilizado para calcular a razão, já que não se tem uma curva de referência para determinação quantitativa. O valor da leitura obtida nas

amostras analisadas foi dividido pelo *cut-off* estabelecido. Valores resultantes < 1 foram considerados negativos, valores >1 e $<1,2$ foram considerados indeterminados e foram repetidos e valores $>1,2$ foram considerados positivos.

5.4 Ensaio de neutralização viral (VNT, do inglês, *virus neutralization titer*)

Os ensaios para avaliar a capacidade de neutralização do vírus SARS-CoV-2 *in vitro* foram realizados no laboratório do professor Dr. Edison Durigon no Instituto de Ciências Biomédicas em *facility* NB-3 que permite o manuseio do vírus vivo.

O ensaio de neutralização viral baseado no efeito citopático (CPE-VNT, do inglês, *cytopathic effect based virus neutralization test*) do vírus SARS-CoV-2 (GenBank: MT350282) foi realizado em placas de 96 poços contendo 5×10^4 células/mL de células Vero (ATCC CCL-81). Foram usadas oito diluições de soro inativado (1:20 até 1:10240). Subsequentemente, o soro foi misturado vol/vol com o vírus (100 doses de cultura de tecido infectado, 50% do volume total do poço) e pré-incubado a 37°C por 1 hora para neutralização. A mistura de soro e vírus foi transferida para uma camada confluyente de células e incubada por 3 dias na estufa a 37 °C e 5% CO₂ (dióxido de carbono). Após 72h as placas foram observadas por microscopia de inversão. O efeito citopático foi observado nas células Vero, distinguindo a presença ou ausência do CPE-VNT. O título de neutralização é descrito como a maior diluição capaz de neutralizar o crescimento viral. Para confirmar os resultados, as placas foram fixadas e coradas com uma solução de amido *black* (0.1% de amido *black* v/v com 5.4% de ácido acético e 0.7% de acetato de sódio) por 30 minutos. Em cada experimento foi utilizado um controle positivo interno (soro RT-qPCR positivo com neutralização $>1:640$) (127).

5.5 Varredura de peptídeos-alvo de anticorpos IgG e IgA

O mapeamento de peptídeos-alvo específicos para IgG e IgA foi realizado pela tecnologia *PEPperMAP*[®] *Linear Epitope Mapping* pela empresa PEPperPRINT (Heidelberg, Alemanha). A sequência pertencente à proteína RBD da porção Spike do vírus SARS-CoV-2 (S₃₃₅-S₅₁₆) foi sintetizada como peptídeos de 15 resíduos de aminoácidos com sobreposição de 13 resíduos, totalizando uma sequência com o total de 113 aminoácidos (Anexo A). Os

peptídeos foram impressos em duplicata em lâminas de vidro. Todos os *arrays* incluem controles positivos internos que incluem sequências de peptídeos derivadas do vírus da Poliomielite (KEVPALTAVETGAT) e da proteína HA (hemaglutinina) (YPYDVPDYAG) do vírus Influenza humano.

Os *arrays* de peptídeos foram marcados conforme os protocolos disponibilizados pela PEPperPRINT. Primeiro, as lâminas foram incubadas com 200 μ L de *Standard Buffer* (0.05% Tween-20 in PBS, pH 7.4) por 10 minutos em agitador orbital (350 RCF), e então bloqueadas com 150 μ L de *Blocking Buffer* (Rockland Blocking Buffer, Rockland Immunochemicals Inc.) para cada *array* por 30 minutos em temperatura ambiente em agitador orbital. Para garantir que os anticorpos secundários não interagissem com os peptídeos impressos nos *arrays*, uma cópia do *array* foi pré-incubada com o anticorpo IgG de cabra anti-IgG humano (H+L) DyLight680 (Invitrogen) e o anticorpo IgG de cabra anti-IgA humano (cadeia alfa) DyLight800 (Rockland Immunochemicals Inc.) diluídos na concentração de 1:2000 em *Staining Buffer* (*Standard Buffer* adicionado com 10% de *Blocking Buffer*) por 45 minutos em temperatura ambiente, em agitador orbital. Não foi observada fluorescência proveniente de ligações inespecíficas do anticorpo secundário. Em seguida, os *arrays* foram incubados por 15 horas em agitador orbital a 4 °C com soro ou plasma dos indivíduos convalescentes e vacinados diluídos na concentração de 1:10 em *Staining buffer*. Após três lavagens de 1 minuto cada com 200 μ L de *Standard Buffer*, os *arrays* foram então incubados com os anticorpos secundários (anti-IgG e IgA) em diluição de 1:2000 por 45 minutos em temperatura ambiente. Seguidas da incubação com anticorpos secundários, três lavagens foram realizadas e as lâminas foram mergulhadas em *Dipping Buffer* (TRIS 1mM) e centrifugadas a 800 RCF para secagem.

5.6 Quantificação da intensidade de fluorescência dos spots de *microarray*

Os sinais de fluorescência em todas as lâminas foram detectados por um Scanner Odyssey (LI-COR Biosciences, EUA) e a quantificação das intensidades de fluorescências dos spots e identificação dos peptídeos foram adquiridas no software GenePix Pro 4.0 (Molecular Devices, EUA). O software analisa as intensidades de fluorescências quebrando-as em sinais *Raw*, *Foreground* e *Background*, calculando as médias de fluorescências

subtraindo as intensidades de background. A média de intensidade de fluorescência (MFI, do inglês, *median fluorescence intensity*) de cada peptídeo foi medida entre as duplicatas, e as razões de sinal-ruído foram adicionalmente calculadas para cada *spot* de peptídeo.

5.7 Predição *in silico* de epítomos de células B

Os epítomos de células B para a RBD foram preditos usando a ferramenta BepiPred-2.0 web server (128). O BepiPred-2.0 prediz epítomos de células B a partir de uma sequência de proteínas usando um algoritmo de *machine learning* chamado *Random Forest* treinado em epítomos e aminoácidos não epítomos determinados a partir de estruturas cristalinas. Nesse estudo, usamos um *threshold* de 0,55.

5.8 Análise comparativa da sequência de aminoácidos

As sequências de RBD da proteína Spike do SARS-CoV (319-540, Genbank: QIG55955) e outros sarbecovírus como o SARS-CoV (306-526, Genbank: AAR86775), Civet-SARS SZ3 (306-526, Genbank: AAU04646), Pangolin-CoV (319-540, Genbank: QIQ54048), Bat-CoV Rs3367 (307-527, Genbank: AGZ48818) e Bat-CoV RaTG13 (319-540, Genbank: QHR63300) foram alinhadas usando o software MUSCLE (129), e os resultados foram exportados para o website Weblogo (130) para gerar uma representação gráfica dos alinhamentos.

5.9 Análises estruturais

As representações estruturais da RBD interagindo com o receptor ECA2 (pdb: 6M0J) e com os anticorpos neutralizantes B38 (pdb: 7BZ5) e COVA1-16 (pdb: 7JMW) foram geradas usando o software UCSF Chimera (131).

5.10 Análises estatísticas

O software GraphPad Prism 9.0.1 foi utilizado para análises estatísticas de reatividade peptídica individual comparando soros de indivíduos com alta e baixa capacidade de neutralização (Mann-Whitney, Wilcoxon), Spearman para análise de correlação, e valores

de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O teste de Mann-Whitney unilateral foi realizado para investigar as diferenças entre os valores médios de MFI dos grupos de alta e baixa neutralização para cada peptídeo, usando o pacote rstatix R (v0.6.0). Para visualizar os resultados, $-\log_2$ (valores de p) foram plotados em um mapa de calor usando o pacote ggpubr (0.4.0). Foi calculado o poder estatístico ($1-\beta$) de 50 (VNT $\geq 1:160$) versus 21 (VNT $< 1:160$) indivíduos para *P44*.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização clínico-demográfica, sorologia e neutralização das coortes

O total de 209 indivíduos convalescentes foram recrutados e tiveram amostra coletada cerca de 40 dias após o início da infecção (Tabela 1), e destes, 71 foram selecionados para este estudo (Tabela 2). 18 indivíduos vacinados sem infecção prévia por COVID-19 foram selecionados de uma segunda coorte (Tabela 3) para a coleta de mais duas amostras: 15 dias após a segunda dose da vacina Coronavac, e 90 dias após *booster* com a vacina miRNA-273 Pfizer.

Tabela 1. Perfil demográfico da coorte de convalescentes.

Perfil Demográfico - Convalescentes (N=209)				
<i>Informações</i>	Idade			<i>Total</i>
	18-39	40-59	60+	
Homens	37	31	7	75 (36%)
Mulheres	71	54	9	134 (64%)
Hospitalização	10	19	5	34 (16%)

Idade mediana: 39 anos

Tabela 2. Perfil demográfico da coorte de convalescentes selecionados para o *microarray*.

Perfil Demográfico - Convalescentes (N=71)				
<i>Informações</i>	Idade			<i>Total</i>
	18-39	40-59	60+	
Homens	11	19	4	34 (48%)
Mulheres	17	15	5	37 (52%)
Hospitalização	5	11	5	21 (29,5%)

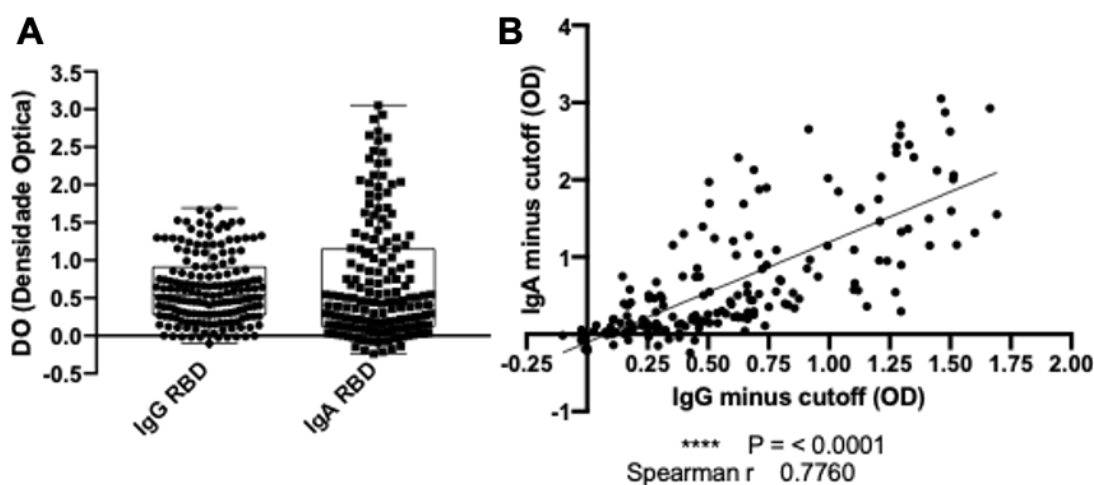
Idade mediana: 42 anos

Tabela 3. Perfil demográfico da coorte de vacinados.

Perfil Demográfico - Vacinados (N=18)				
Informações	Idade			Total
	18-39	40-59	60+	
Homens	1	2	1	4 (77,8%)
Mulheres	4	4	6	14 (22,22%)
N Total	5	6	7	18 (100%)

Idade mediana: 52,5 anos

Todas as amostras foram testadas pelo método de ELISA para RBD e ensaios de neutralização por VNT. Na coorte de convalescentes (N=209), a positividade no ELISA foi de 178/209 (85,2%) para IgG e 161/209 (77%) para IgA. Não houve diferença estatística entre a intensidade de reconhecimento para IgA comparada a IgG ($p=0.1964$; **Figura 3a**). Existe correlação entre os níveis de IgA e IgG (Spearman 0,776; $p<0,0001$; (**Figura 3b**). Essa correlação foi mantida mesmo quando observamos os grupos clínicos separadamente.

**Figura 3.** Intensidade de reconhecimento de anticorpos para RBD. A. IgG e IgA para RBD no ELISA. B. correlação entre os níveis de IgG e IgA (N=209).

Os títulos de neutralização variaram de 0 a 5120 entre os convalescentes (N=209). Entre todas as amostras testadas, cerca de 18% obtiveram título de 1:160, e pouco mais de 11% não tiveram título neutralizante e apenas um indivíduo apresentou título neutralizante 1:5120 (Figura 4).

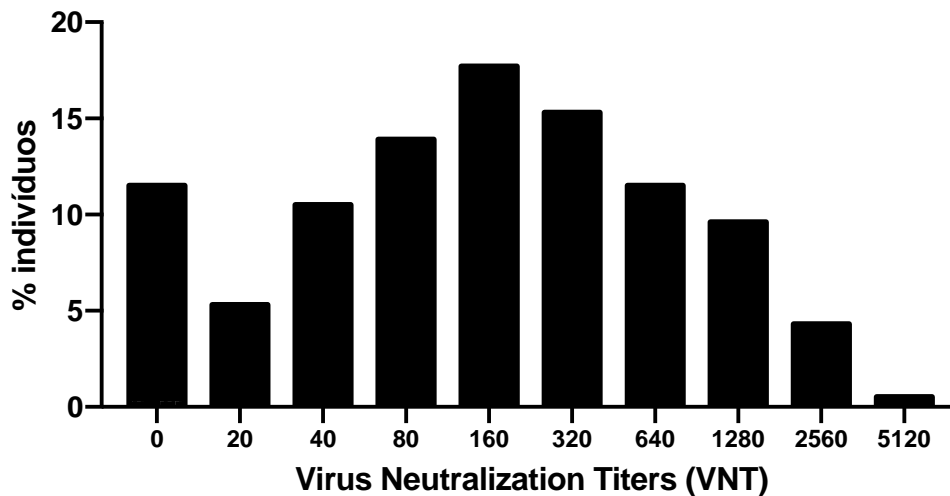


Figura 4. Títulos de Neutralização Viral (N=209). A maioria das amostras obteve título de 1:160 (18%) e 11% não apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes.

Observamos correlação entre a razão (DO/Cut-off) dos títulos de IgG (Spearman $r=0.784$, $p=0.0001$) e IgA (Spearman $r=0.6916$, $p=0.0001$), e os títulos de neutralização (Figura 5).

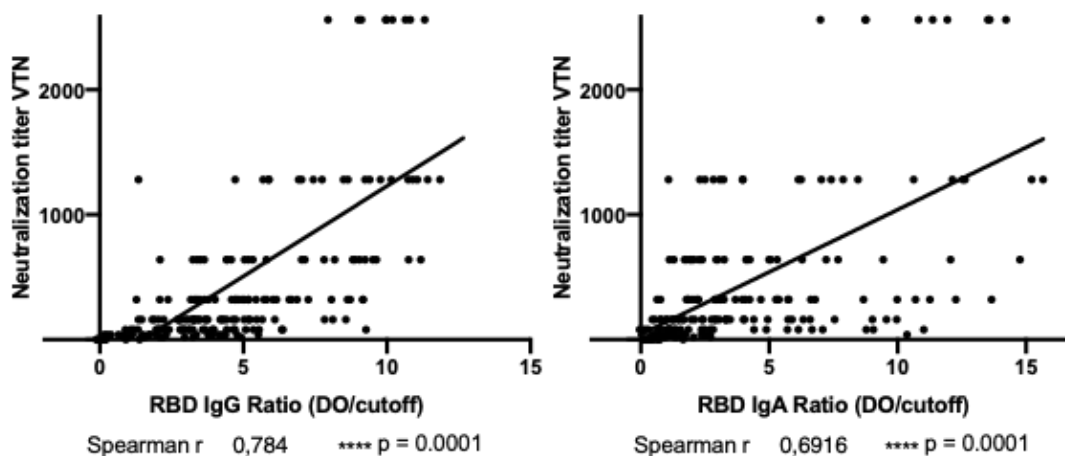


Figura 5. Correlação Spearman entre os títulos de neutralização e anticorpos anti-RBD (N=209). Observamos correlação positiva para IgG ($p=0.0001$) e IgA ($p=0.0001$).

Para seleção das amostras a serem testadas no *array*, foram considerados os valores da densidade ótica (DO) de RBD (caracterizados em RBD1 para valores de DO menores do que 0,5, RBD2 para valores de DO entre 0,5 e 1 e RBD3 para valores de DO maiores do que 1) e os títulos de neutralização (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização imunológica das amostras selecionadas para o *array*.

Perfil Imunológico			
N=71			
ID Amostra	RBD	VNT	IgG DO
4	RBD2	40	0,566
5	RBD2	20	0,299
6	RBD3	1280	1,461
9	RBD3	2560	1,823
10	RBD1	20	0,425
11	RBD3	640	1,37
13	RBD3	1280	1,335
14	RBD3	2560	1,408
15	RBD3	1280	1,63
17	RBD2	40	1,593
19	RBD2	40	0,795
23	RBD3	80	0,688

25	RBD3	640	1,61
29	RBD3	160	2,23
30	RBD1	320	0,485
31	RBD2	1280	0,848
34	RBD1	1280	0,195
35	RBD1	320	0,185
37	RBD2	320	0,869
38	RBD1	320	0,474
40	RBD1	320	0,342
45	RBD2	1280	1,013
46	RBD1	640	0,488
47	RBD1	640	0,466
50	RBD2	1280	0,68
58	RBD3	2560	1,467
62	RBD1	20	0,467
66	RBD3	2560	1,434
69	RBD1	40	0,484
70	RBD3	2560	1,534
72	RBD3	2560	1,437
73	RBD1	160	0,499
74	RBD3	320	1,319
83	RBD2	40	0,546
86	RBD2	80	0,918
87	RBD2	40	0,617
88	RBD1	80	0,423
91	RBD2	320	0,837
94	RBD3	1280	1,706
95	RBD3	320	1,32
96	RBD1	20	0,018
98	RBD3	1280	1,546
99	RBD3	1280	1,569
101	RBD2	320	0,661
102	RBD3	1280	1,644
104	RBD3	640	1,549
105	RBD3	2560	1,556
107	RBD3	640	1,278
108	RBD3	640	1,302
111	RBD2	40	0,545
112	RBD3	2560	1,297
113	RBD3	1280	1,354
115	RBD2	40	0,596
119	RBD2	1280	1,072
124	RBD2	1280	0,998
127	RBD3	1280	1,331

140	RBD3	1280	1,223
141	RBD2	1280	0,846
142	RBD3	640	1,387
153	RBD1	320	0,456
160	RBD2	1280	1,115
166	RBD1	0	0,2
167	RBD3	1280	1,244
178	RBD2	40	0,631
183	RBD3	640	1,331
185	RBD2	20	0,708
188	RBD1	40	0,332
197	RBD1	640	0,303
200	RBD3	2560	1,145
201	RBD2	1280	0,819
208	RBD3	2560	1,312

Na coorte de indivíduos vacinados, todos apresentam anticorpos IgG anti-RBD após a vacinação com Coronavac, e aumentaram os títulos de IgG (Wilcoxon, $p < 0,0001$) (Figura 6a) e de VNT (Wilcoxon, $p = 0,0002$) (Figura 6b) após a vacinação com miRNA-273 Pfizer. Já os títulos de IgA caíram e não aumentaram após o *booster* vacinal (Figura 6a).

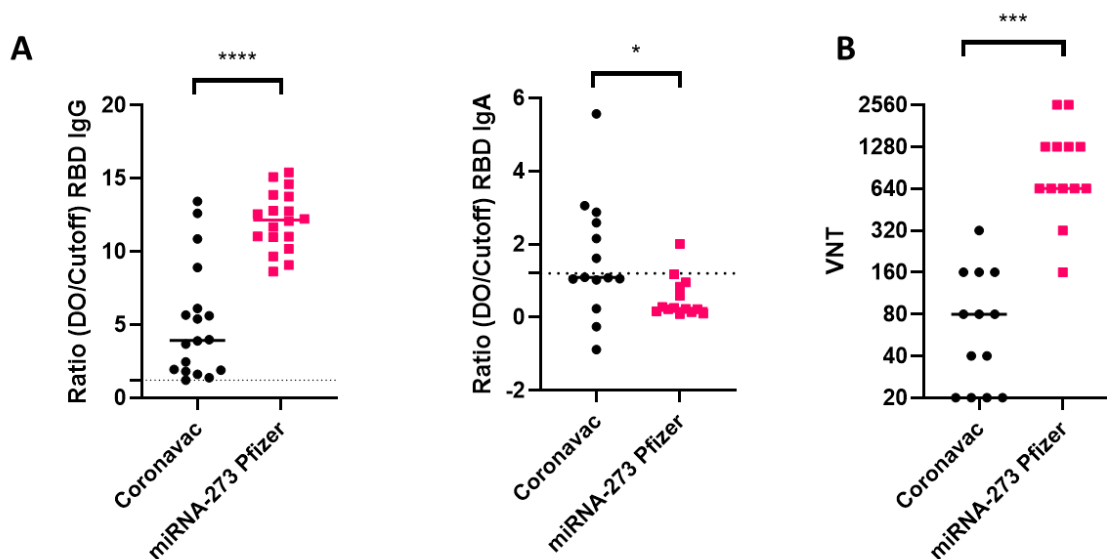


Figura 6. Análise do perfil sorológico da coorte de vacinados e dos títulos de neutralização. A. Razão de IgA e IgG para RBD. **B.** Títulos de neutralização (VNT) entre vacinas. (N=18). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$

6.2 Perfil de reconhecimento de epítomos em indivíduos convalescentes

Para determinar se a resposta de anticorpos foi direcionada a múltiplas ou a algumas regiões antigênicas dominantes, analisamos a reatividade de IgG e IgA a um conjunto de 91 peptídeos de sequências de proteínas do SARS-CoV-2.

O ensaio de *microarray* para varredura dos peptídeos IgG e IgA foi desenhado para maximizar a sensibilidade e especificidade dos anticorpos. Para assegurar que as amostras não apresentariam reação cruzada ou ligações inespecíficas provenientes do anticorpo secundário, 8 amostras de controle pré pandêmicos foram mapeados e não foram encontradas ligações inespecíficas.

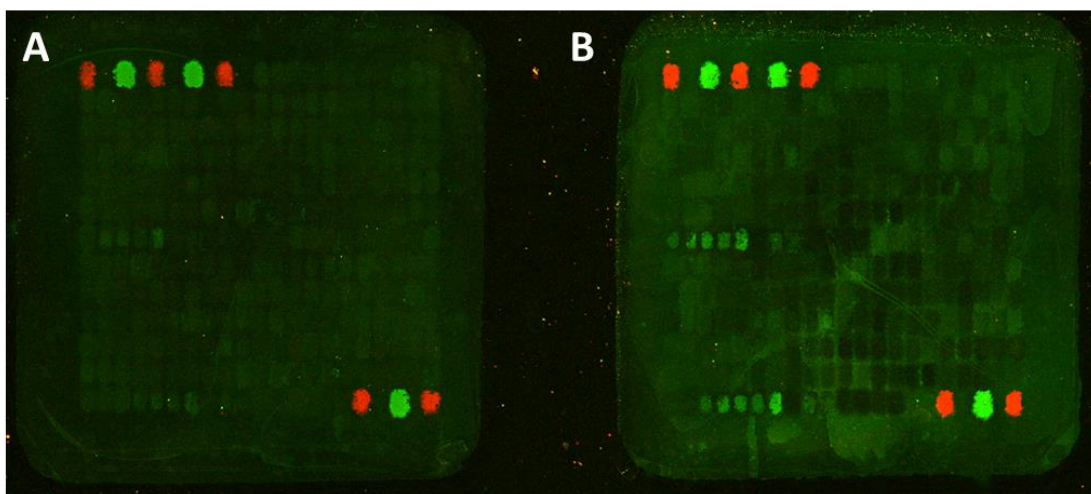


Figura 7. Análise da detecção de proteínas por microarray. Dois sub-arrays mostrando duas amostras de indivíduos pós Coronavac (A) e pós booster (B).

A intensidade de reconhecimento foi obtida após análise no software GenePix Pro 7.1 (Figura 7). Um mapa da posição dos peptídeos foi disponibilizado pela PEPperPRINT para correta sinalização dos spots fluorescentes e aplicado ao software de análise. Uma vez posicionado, todos os *subarrays* foram lidos simultaneamente e geraram resultados

individuais, onde cada *subarray* tem uma medição própria de background e razão sinal-ruído (Figura 8). As análises de imagem geraram uma tabela de dados brutos, e os dados finais foram tratados e analisados.

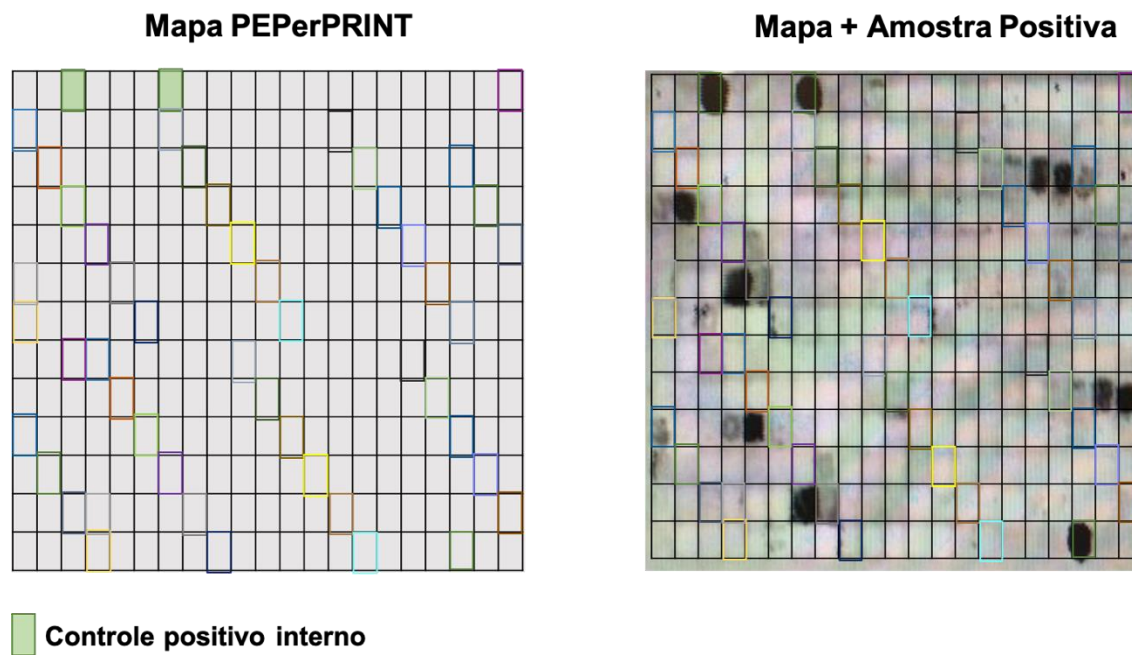


Figura 8. Exemplificação do mapa e sistema de análise. A PEPePRINT disponibilizou um mapa em formato de grid para sobrepor a imagem adquirida pelo equipamento. O grid sobrepõe cada subarray do microchip individualmente para análise.

Os indivíduos foram divididos em dois grupos: (i) 52 com altos títulos de neutralização, nomeados “*High*” ($\geq 1:160$) e (ii) 19 com títulos baixos de neutralização, nomeados “*Low*” ($< 1:160$). Entre os indivíduos *Low*, a maioria apresentou títulos de 1:40, enquanto entre os indivíduos *High*, a maioria apresentou títulos de 1:1280 e estão distribuídos entre 1:320, 1:640 e 1:2560 (Figura 9a).

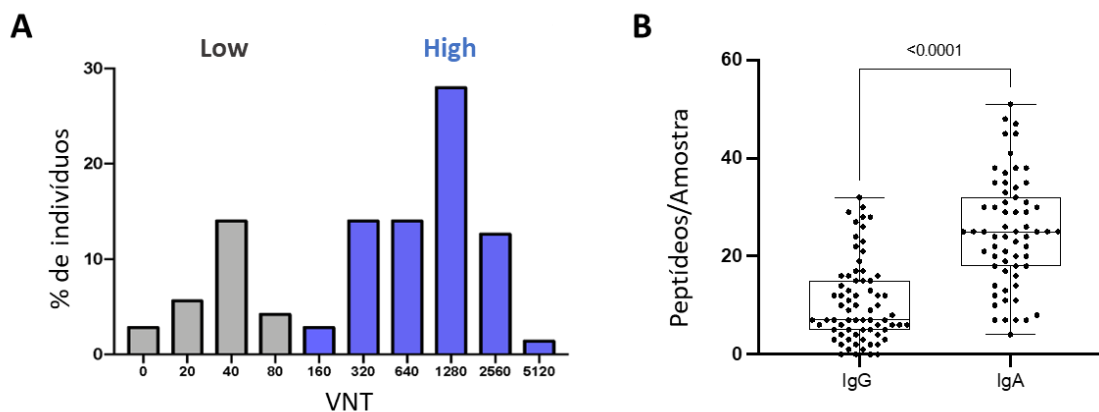


Figura 9. Perfil Imunológico e das amostras de indivíduos convalescentes (N=71). **A.** Porcentagem de indivíduos nos grupos *Low* e *High*. **B.** Número de peptídeos IgG e IgA reconhecidos por amostra.

Identificamos regiões antigênicas lineares anti-RBD para IgG e IgA (Figura 10). O reconhecimento IgA foi mais amplo, com 4 a 51 peptídeos reconhecidos por amostra (mediana de 25 peptídeos) em comparação ao IgG, com até 32 peptídeos reconhecidos por amostra (Wilcoxon, $p < 0,0001$) (Figura 9b).

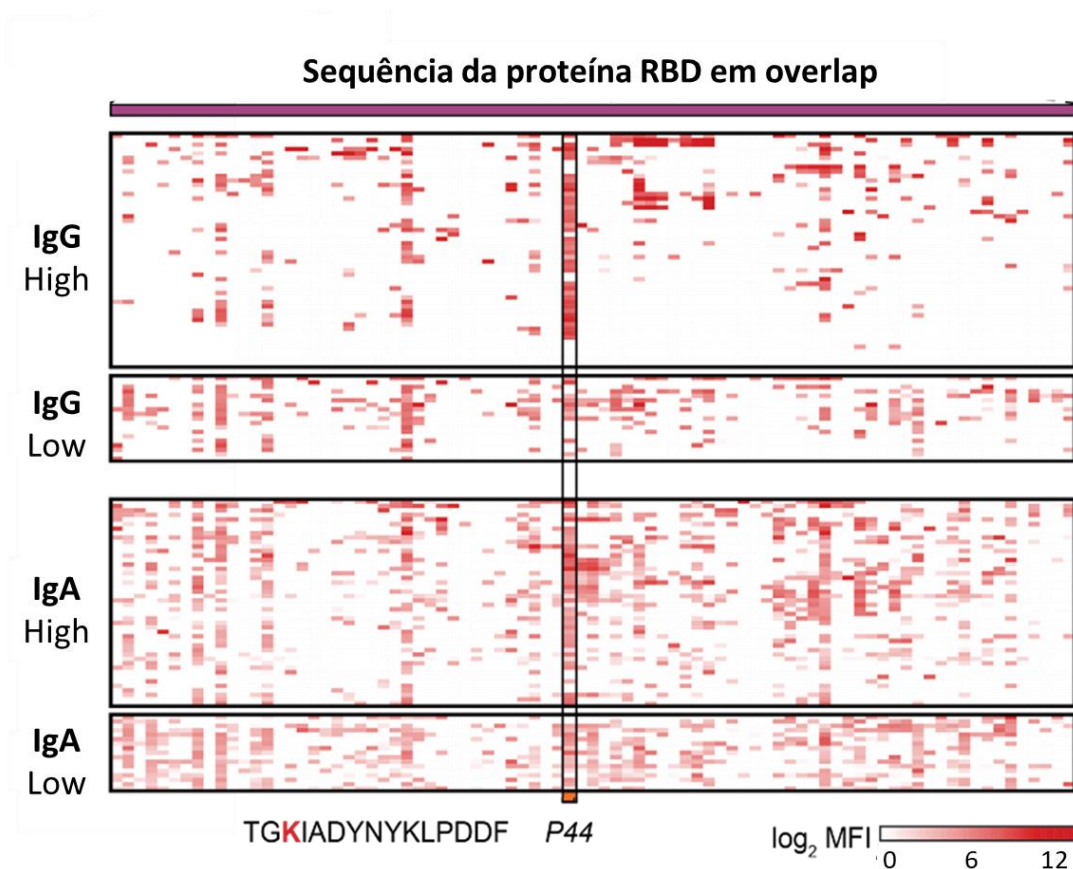


Figura 10. Mapa de calor representando a magnitude de reconhecimento dos peptídeos da região RBD do SARS-CoV-2 testados para reatividade IgG e IgA. Nas colunas, encontram-se os peptídeos ordenados em sequência da estrutura primária. Nas linhas, encontram-se as amostras de convalescentes, agrupadas por isotipo e títulos de anticorpos neutralizantes. O peptídeo destacado e sua sequência é o P44 (S415-429).

Considerando os títulos de neutralização, observamos que os indivíduos do grupo Low reconhecem mais peptídeos tanto para IgG ($p=0,0002$) quanto para IgA ($p=0,0002$) (Figura 11a). Por outro lado, os indivíduos do grupo High reconheceram menos peptídeos, indicando que altos títulos de neutralização estão associados com uma resposta de peptídeos menos diversa.

Para definir os peptídeos mais intensamente reconhecidos, estabelecemos um *cut-off* onde consideramos os peptídeos mais reconhecidos por pelo menos 30% da coorte. Após a filtragem dos dados pela quantidade final de reconhecimento de cada peptídeo, encontramos 8 peptídeos dominantes reconhecidos por pelo menos 30% da coorte: P6 (S₃₅₃₋₃₆₇), P12 (S₃₆₅₋₃₇₉), P14 (S₃₇₀₋₃₈₄), P18 (S₃₇₈₋₃₉₂), P30 (S₃₉₇₋₄₀₁), P44 (S₄₁₅₋₄₂₉), P50 (S₄₂₇₋₄₄₁)

e *P66* (S₄₅₉₋₄₇₃) (Figura 11b). Em contraste com IgG, para os anticorpos IgA o *P50* não foi imuno dominante, mas sim o *P6*. Os indivíduos que exibiram reatividade IgG ao *P44* apresentam maiores títulos de neutralização comparado aos que reconhecem outros peptídeos, enquanto para IgA a distribuição é mais homogênea.

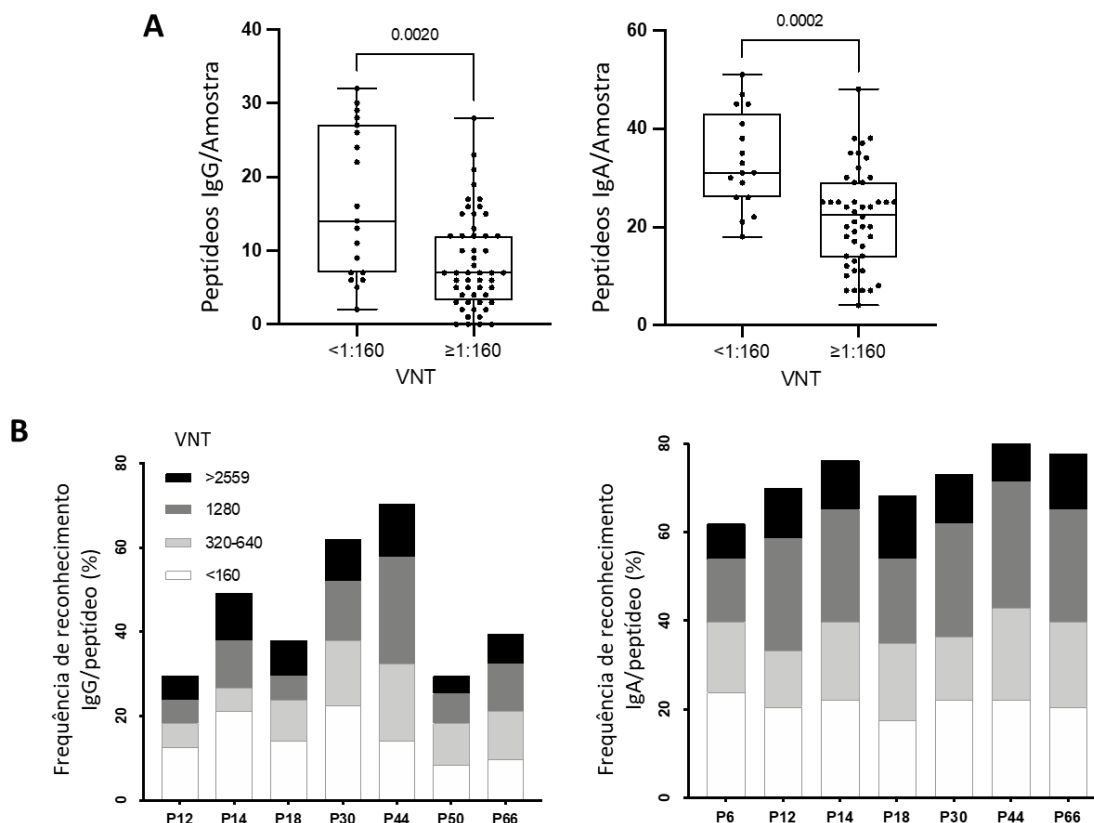


Figura 11. Perfil de frequência de reconhecimento da coorte de convalescentes (N=71). **A.** Número de peptídeos reconhecidos por IgG e IgA por amostra. Observa-se que existe maior reconhecimento de peptídeos para os grupos que possuem baixos títulos de neutralização (*Low*) tanto para IgG ($p=0.0020$), quanto para IgA ($p=0.0002$). **B.** Frequência de reconhecimento (%) IgG e IgA por peptídeo.

Os oito peptídeos mais reconhecidos foram analisados considerando sua relação com a alta ou baixa capacidade de neutralização do soro contra o SARS-CoV-2 de Wuhan. O *P44* foi o único peptídeo significativamente mais reconhecido pelo grupo High para IgG

($p=0,0015$) (Figura 12a) e IgA ($p=0,0176$) (Figura 12b). Em contraste, os peptídeos *P12*, *P14*, *P18* e *P30* mostraram maiores intensidades de ligação para o grupo Low, assim como o *P6* para IgA.

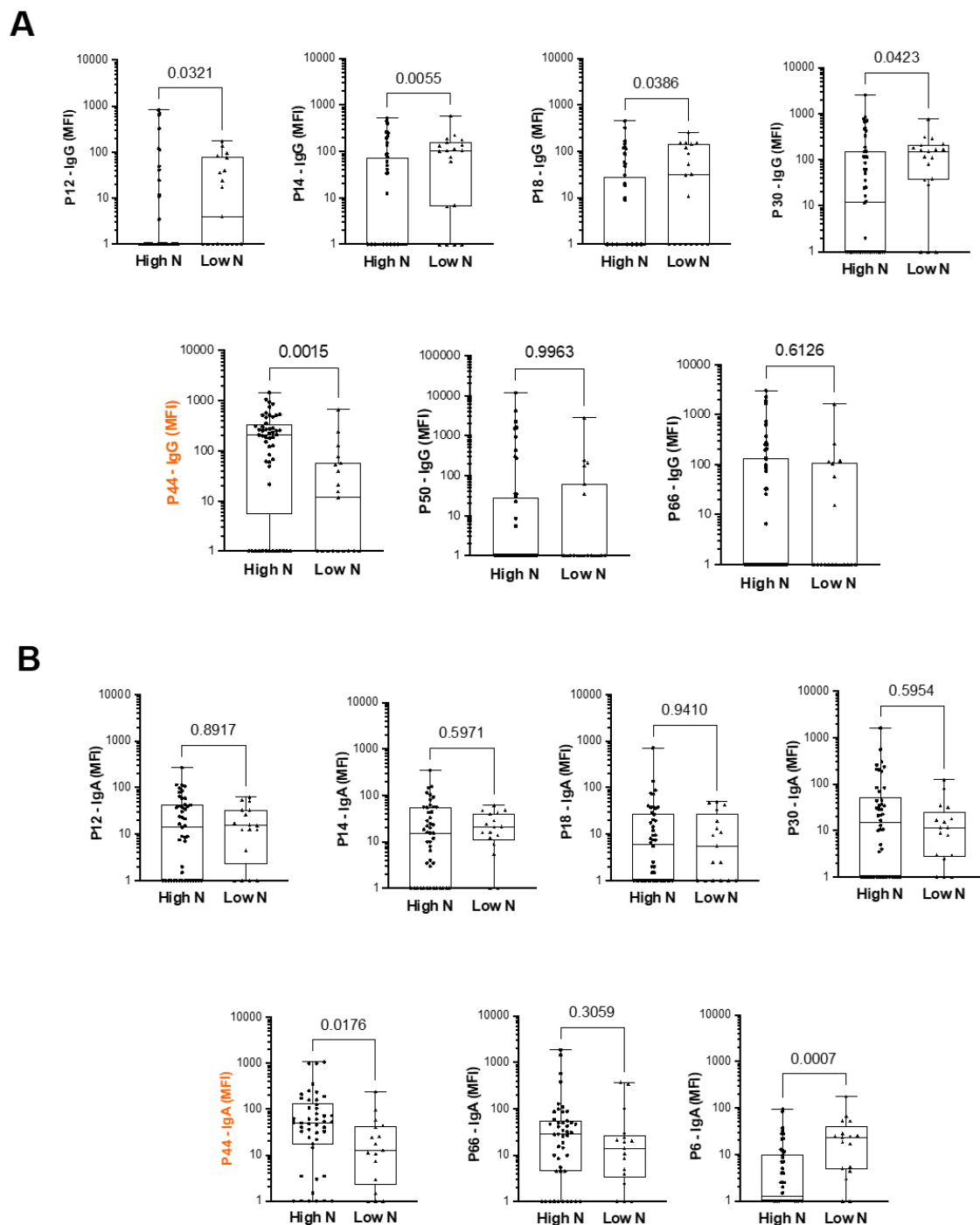


Figura 12. Diferencial de intensidade aos peptídeos RBD selecionados, comparando convalescentes dos grupos *High* e *Low*. A. Perfil IgG. B. Perfil IgA.

Os oito peptídeos mais reconhecidos foram considerados como imunodominantes e passaram por análises profundas sobre sua conservação e estrutura. A análise de conservação das proteínas RBD de outras linhagens de beta coronavírus (SARS-CoV-2, SARS-CoV, SARS-SZ3, Rs3367-bat, CoV-pangolin, e RaTG13-bat) mostrou que os peptídeos imunodominantes estão localizados em regiões altamente conservadas (Figura 13a) e com altos níveis de entropia (Figura 13b). Exceção feita a *P50* e *P66*, que se encontram em regiões menos conservadas, embora as cargas positivas dos aminoácidos lisina e arginina, pareçam estar preservadas nesses peptídeos.

Para observar como os peptídeos imunodominantes se comportam estruturalmente em relação aos sítios de ligação, fizemos uma análise estrutural e escolhemos a ECA2 e o B38, sendo esse segundo um anticorpo neutralizante (nAb) terapêutico que possui sítios de ligação próximos a região correspondente ao *P44*. Observamos que o *P44* é o único peptídeo presente nas regiões de contato com a ECA2 e com o nAb B38. Em contraste, os peptídeos *P12*, *P14*, *P18* e *P30* estão localizados fora da região de ligação com o nAb (Figura 14).

Figura 13. Avaliação da conservação dos peptídeos imunodominantes. **A.** Análise de conservação dos peptídeos imunodominantes entre as proteínas RBD dos betacoronavírus SARS-CoV-2, SARS-CoV, SARS-SZ3, Rs3367-bat, CoV-pangolin, e RaTG13-bat. O tamanho das letras no gráfico reflete a frequência do aminoácido em questão no alinhamento de múltiplas sequências. **B.** Entropia dos resíduos de aminoácidos alinhados na figura anterior. O valor da entropia é inversamente proporcional à frequência de variação das regiões alinhadas. Os peptídeos imunodominantes estão destacados.

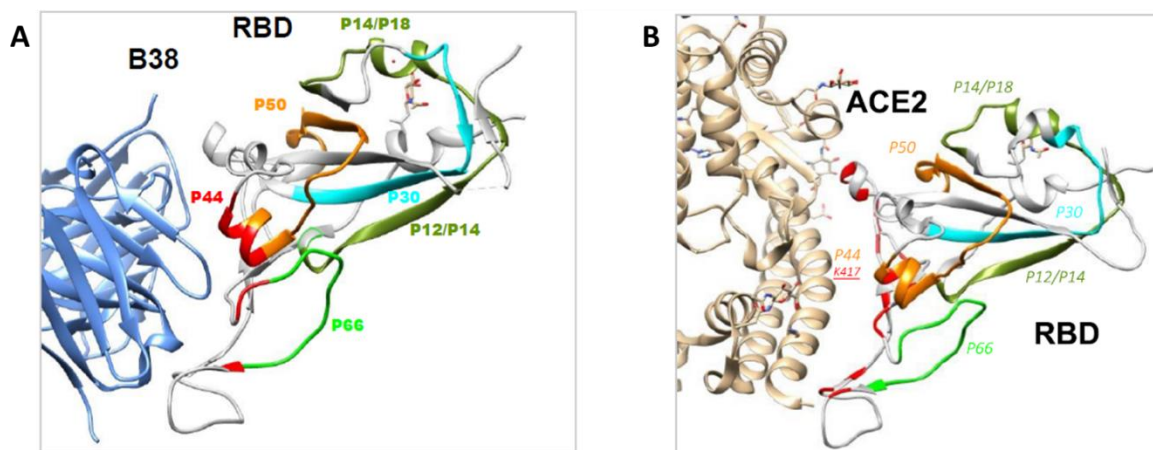


Figura 14. Avaliação estrutural dos peptídeos imunodominantes. Ligação da porção RBD com o nAb B38 (A) e com o receptor ECA2 (B) e suas interações com o P44. Os resíduos de contato estão em vermelho. O SARS-CoV-2 está em cinza, e as regiões dos peptídeos imunodominantes em laranja (P50), verde oliva (P12, P14, P18), azul ciano (P30) e verde fluorescente (P66).

O peptídeo mais reconhecido foi o P44, (S₄₁₅₋₄₂₉, de sequência TGKIADYNYKLPDDF), que apresentou 68% de reatividade para IgG e 82% para IgA. Predições de epítopos de células B *in silico* mostraram que o P44 está dentro de uma região com alta probabilidade de epítopos (Figura 15a). Análises de correlação mostraram que a reatividade IgG do P44 está positivamente correlacionada com títulos de neutralização (Spearman $r=0.4846$, $p<0.0001$, 95% com intervalo de confiança de 0.2769 - 0.6491) (Figura 15a), e a reatividade IgA também está correlacionada positivamente, porém mais fraca (Spearman $r=0.3103$, $p=0.0084$, 95% com intervalo de confiança de 0.07602 - 0.5121) (Figura 15b).

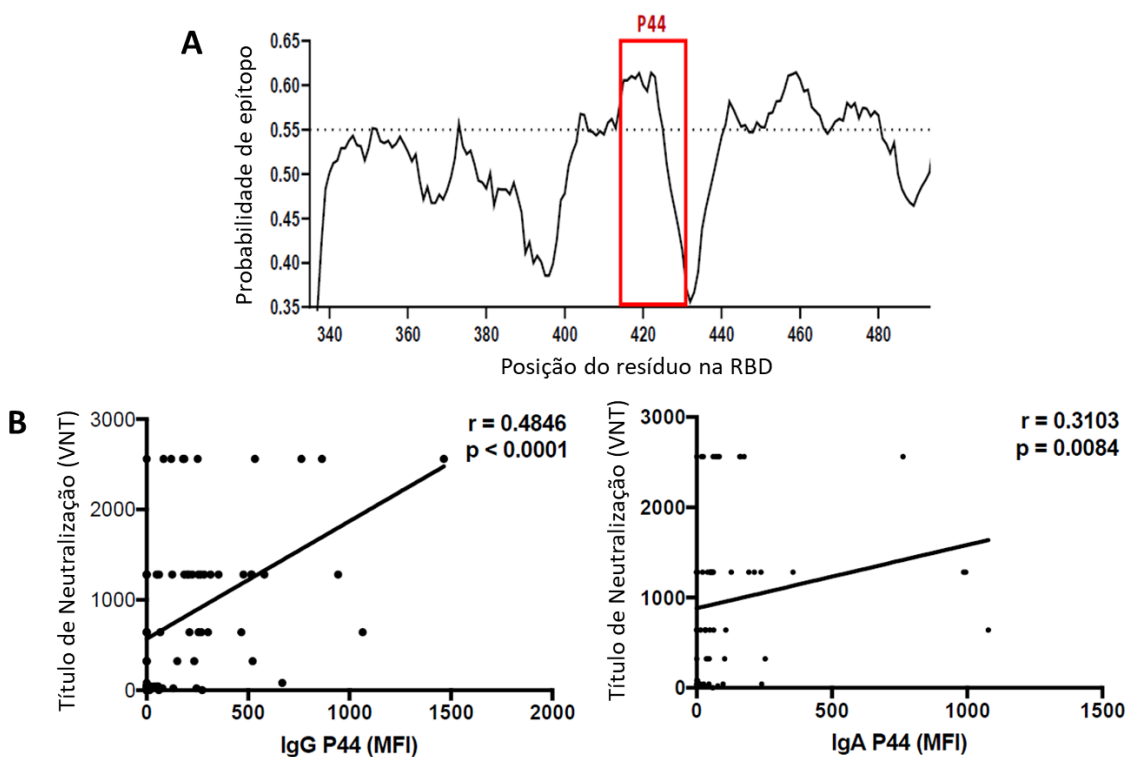


Figura 15. Perfil de reconhecimento do P44. A. Predição *in silico* pelo software BepiPred. A região destacada corresponde a região do P44, mostrando um alto valor de predição. B. Correlação positiva entre a média de intensidade de fluorescência (MFI) de IgG ($p < 0.0001$) e IgA ($p = 0.0084$) específica para P44 e os títulos de neutralização.

As MFI de IgG do P44 também se correlacionam positivamente com os níveis de IgG mensurados pelo método de ELISA (Spearman, $r = 0.2443$; $p = 0.04$) (Figura 16a). Quando consideramos os indivíduos hospitalizados, encontramos maior reatividade para IgA (Mann Whitney, $p = 0,0092$), mas não observamos o mesmo para IgG (Mann Whitney, $p = 0,051$) (Figura 16b). Levando em consideração que o P44 contém o *hotspot* que compreende a região de mutação K417, investigamos a relevância das mutações nas regiões de ligação de anticorpo usando simulações de dinâmicas moleculares *in silico* usando as variantes Beta (que contém as mutações RBD E484K, K417N e N501Y) e Gamma/Delta/Omicron (que contém as mutações E484K, K417T and N501Y) interagindo com o anticorpo monoclonal (mAb) terapêutico REGN10933, que mostrou perda de atividade neutralizante em ensaio de pseudovírus com a presença da mutação K417N (132).

Os resultados dessa análise indicam que a RBD ancestral possui várias pontes de ligação próximas ao resíduo E484, ao contrário das variantes, que não possuem (Figura 17).

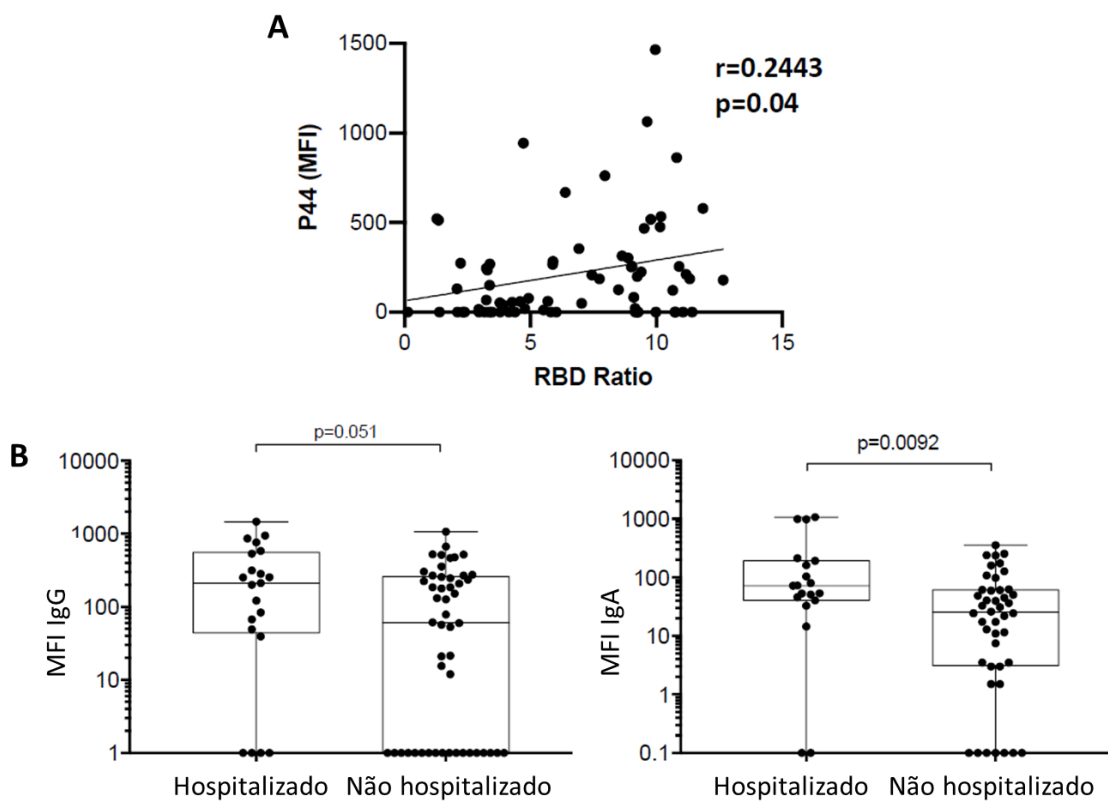


Figura 16. Perfil de reconhecimento do P44. **A.** Correlação positiva entre a média de intensidade de fluorescência (MFI) do P44 e os níveis de IgG RBD no ELISA ($p=0.04$). **B.** Comparação da média de intensidade de fluorescência (MFI) do P44 entre indivíduos hospitalizados e não hospitalizados, mostrando maior reatividade IgA ($p=0.0092$) do que IgG ($P=0.051$) entre os indivíduos hospitalizados.

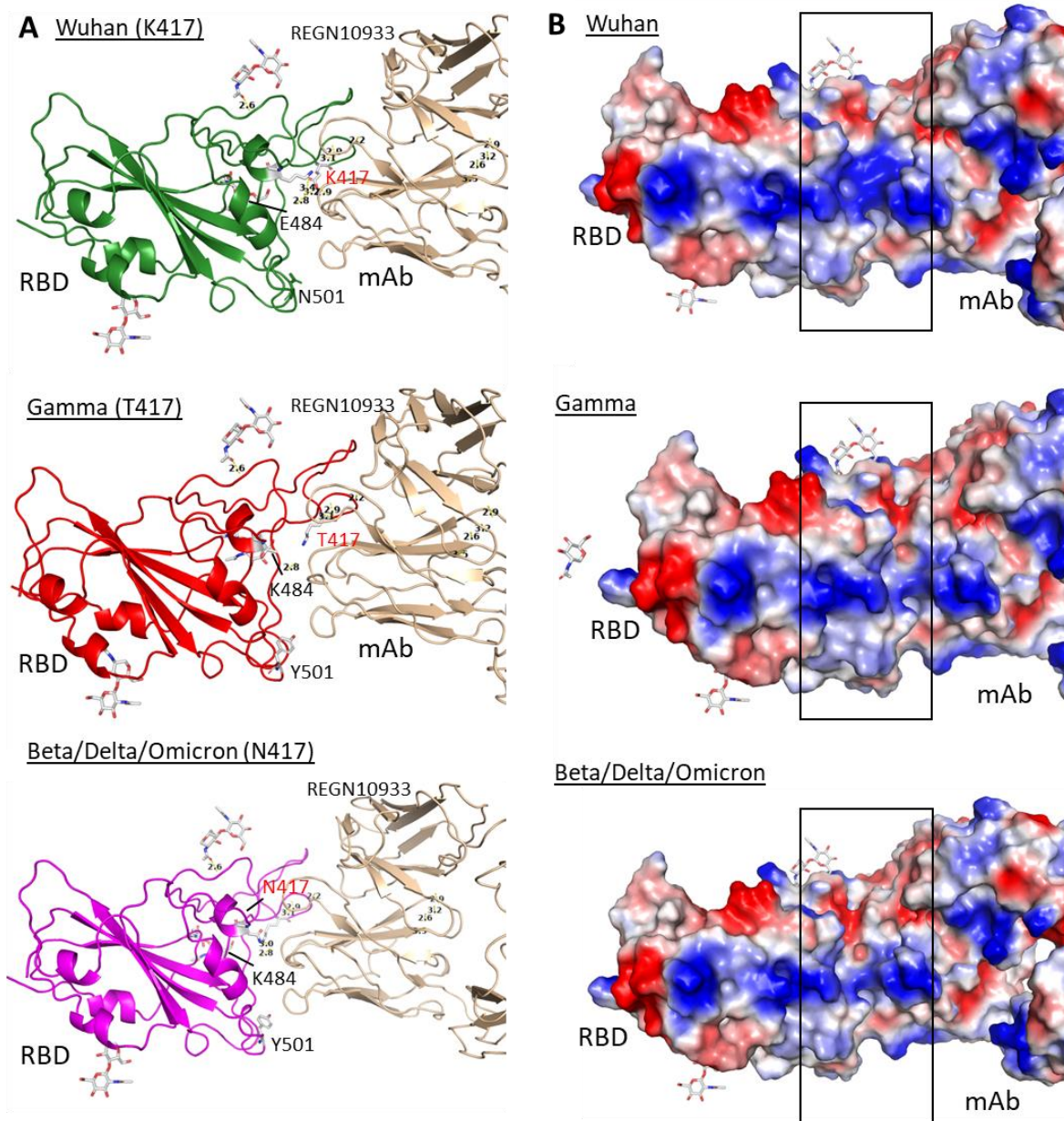


Figura 17. Representação estrutural da ligação da RBD ancestral (Wuhan) e as variantes Gamma, Beta, Delta e Omicron, ao mAb REGN10933 (pdb: 6XDG). A. As ligações estruturais mostrando as RBD ancestral apresentam várias pontes de ligação próximas ao resíduo E484, enquanto as variantes não apresentam. **B.** Análise de área de superfície acessível a um solvente evidenciando as regiões carregadas. Em azul as cargas positivas, e em vermelho as negativas. A região destacada é a região de contato entre o mAb e a RBD.

Seguindo as análises estruturais, investigamos mais profundamente se os peptídeos imunodominantes estão localizados nas regiões que são conhecidas como regiões de contato

com nAbs. Com exceção do resíduo K417, todos os resíduos da RBD que fazem contato com nAbs estão localizados na RBM (Anexo B). O *P44* possui a maior frequência de contato com nAbs (n=56), seguido do *P66* (n=45) (Tabela 5), embora o *P66* não apresente reconhecimento estatisticamente significativo entre indivíduos do grupo *High* (Figura 12) ou correlação com VNT. Ainda, as análises mostram que a região RBD possui uma grande superfície de contato com os nAbs e três faces não neutralizantes que não fazem contato com nAbs (132) (Figura 18a). Transpondo as sequências dos peptídeos imunodominantes localizados dentro das áreas de ligação de nAbs para a superfície da RBD, observamos que o *P44* está quase inteiramente localizado dentro das áreas de ligação com os nAbs, enquanto os outros peptídeos se encontram fora dessas regiões (Figura 18b).

Tabela 5. Frequência de nAbs em contato com aminoácidos da RBD.

Peptídeo	Frequência de contato com nAbs
P6	9
P12	3
P14	11
P18	25
P30	6
P44	56
P50	12
P66	45

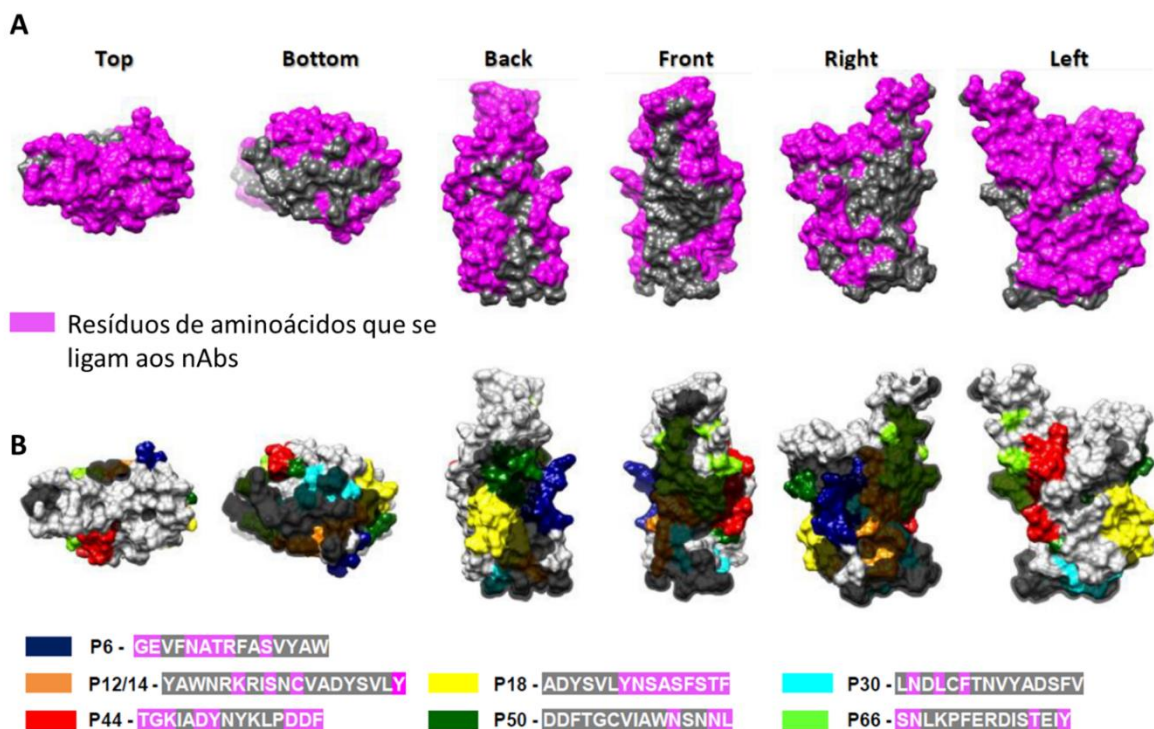


Figura 18. Localização estrutural dos peptídeos mais reconhecidos e as faces de ligação da RBD. A. Estrutura da superfície de diferentes ângulos que mostra as faces não neutralizantes em cinza e as faces de ligação de nAbs em rosa. **B.** Os peptídeos imunodominantes estão coloridos em azul escuro (*P6*), laranja (*P12/14*), vermelho (*P44*), amarelo (*P18*), verde escuro (*P50*), azul ciano (*P30*) e verde fluorescente (*P66*). As faces não neutralizantes estão destacadas em cinza.

6.3 Perfil de reconhecimento de peptídeos em vacinados

Considerando o grande impacto da vacinação como forma de proteção contra a infecção por SARS-CoV-2 e seu papel na seleção de novas variantes, foi examinado o perfil de reconhecimento de anticorpos em 18 indivíduos depois de duas doses de Coronavac e um booster de miRNA-273 (Pfizer).

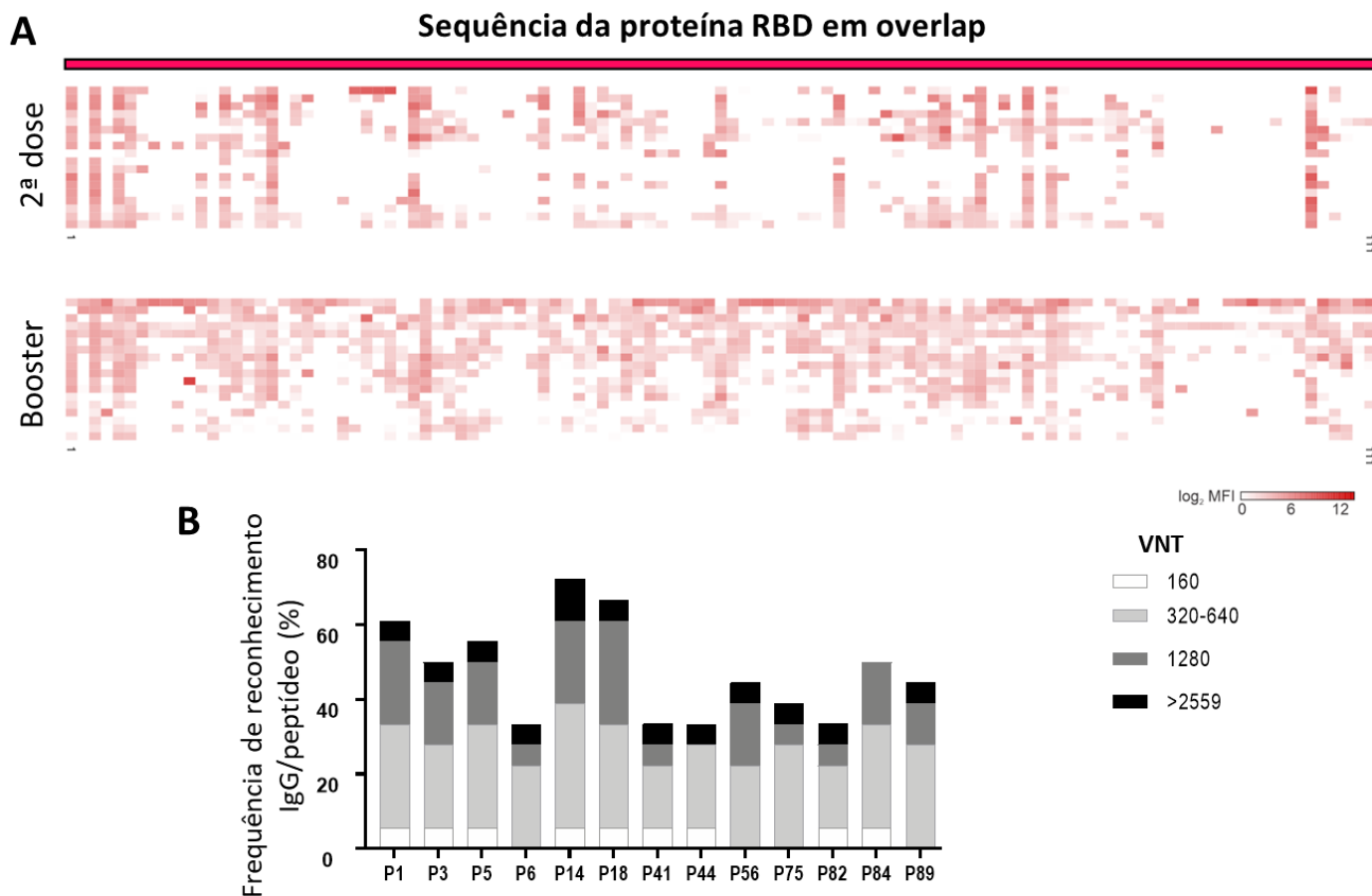


Figura 19. Perfil de reconhecimento da coorte de vacinados. **A.** Mapa de calor representando a magnitude de reconhecimento dos peptídeos da região RBD do SARS-CoV-2 testados para reatividade IgG pós Coronavac e pós booster com mRNA-273 Pfizer. Nas colunas, encontram-se os peptídeos ordenados em sequência da estrutura primária. Nas linhas, encontram-se as amostras de vacinados, agrupadas por esquema vacinal. **B.** Frequência de reconhecimento IgG pelos peptídeos imunodominantes selecionados.

Foram encontrados 13 peptídeos reconhecidos por 30% da coorte, com repertório mais diversificado do que o dos convalescentes (Figura 19). Destes, apenas o *P14*, *P18* e o *P44* coincidem com o perfil de peptídeos imunodominantes dos convalescentes (Tabela 6). Após a análise de conservação, desta vez comparando as variantes alfa, beta, gamma, delta e omicron BA.1 com a Wuhan ancestral, observamos que estes peptídeos estão em regiões menos conservadas ou que apresentam maiores níveis de entropia (Figura 20).

Tabela 6. Lista dos peptídeos imunodominantes entre convalescentes e/ou vacinados.

Peptídeo	Resíduo	Sequência	% reconhecimento (N)
1	329-343	FPNITNLCPFGEVFN	61,1 (11/18)
			N/A
3	333-347	TNLCPFGEVFNATRF	50 (9/18)
			N/A
5	337-347	PFGGEVFNATRFASVY	55,56 (10/18)
			N/A
6	339-353	GEVFNATRFASVYAW	33,33 (6/18)
			22,53 (16/71)
12	351-365	YAWNRKRISNVCVADY	11,11 (2/18)
			30,99 (22/71)
14	355-369	RKRISNVCVADYSVLY	72,22 (13/18)
			49,30 (35/71)
18	363-377	ADYSVLVNSASFSTF	66,67 (12/18)
			39,44 (28/71)
30	387-401	LNDLCFTNVYADSFV	16,67 (3/18)
			61,97 (44/71)
41	409-423	QIAPGQTGKIADYNY	33,33 (6/18)
			29,57 (21/71)
44	415-429	TGKIADYNYKLPDDF	33,33 (6/18)
			69,01 (49/71)
50	427-441	DDFTGCVIAWNSNNL	5,56 (1/18)
			30,99 (22/71)
56	439-453	NNLDSKVGGNVNYLY	44,44 (8/18)
			25,35 (18/71)
66	459-473	SNLKPFERDISTEY	27,78 (5/71)
			39,44 (28/71)
75	477-491	STPCNGVEGFNCYFP	38,89 (7/18)
			2,82 (2/71)
82	491-505	PLQSYGFQPTNGVGY	33,33 (6/18)
			21,13 (15/71)
84	495-509	YGFQPTNGVGYQPYPYR	50 (9/18)
			4,23 (3/71)
89	505-517	YQPYPYRVVLSFELLH	44,44 (8/18)
			9,86 (7/71)
*Laranja = vacinados			>30%
Azul = convalescentes			>30%

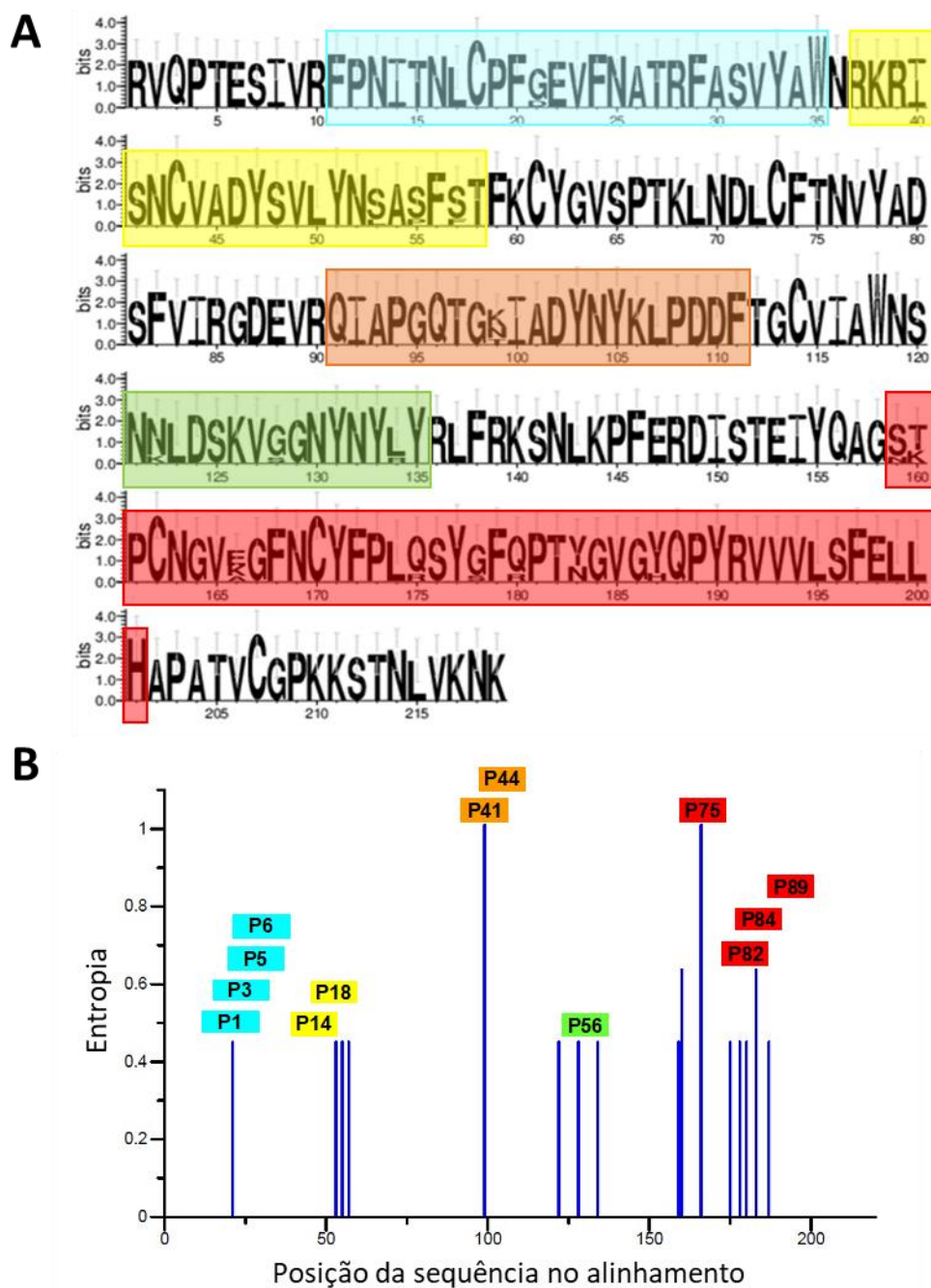


Figura 20. Avaliação da conservação dos peptídeos imunodominantes. A. Análise de conservação dos peptídeos imunodominantes entre as proteínas RBD de diferentes variantes (alfa, beta, gamma, delta e omicron BA.1). O tamanho das letras no gráfico reflete a frequência do aminoácido em questão no alinhamento de

múltiplas sequências. **B.** Entropia dos resíduos de aminoácidos alinhados na figura anterior. O valor da entropia é inversamente proporcional à frequência de variação das regiões alinhadas. Os peptídeos imunodominantes estão destacados.

Verificamos também onde esses peptídeos estavam estruturalmente localizados em relação aos sítios de ligação viral utilizando o COVA1-16, um nAb terapêutico com sítios de ligação correspondentes às regiões dos peptídeos *P14* e *P18*, os mais reconhecidos entre os vacinados e o receptor ECA2. Observamos que os resíduos de contato com a COVA1-16 *S*₃₇₁ e *S*₃₇₅ estão mutados na Omicron BA.1 (*S*₃₇₁ Leu e *S*₃₇₅ Phe) (Figura 21a). Além do *P44*, os peptídeos *P75*, *P82*, *P84* e *P89* também estão localizados na região de contato da RBD com o receptor ECA2 (Figura 21b).

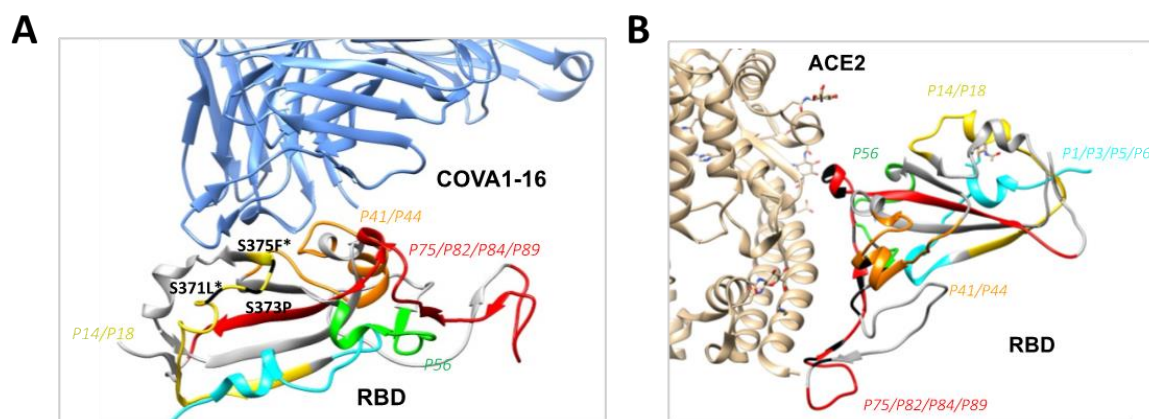


Figura 21. Avaliação estrutural dos peptídeos imunodominantes. Ligação da RBD ao nAb COVA1-16 (A) e a ECA2 (B) mostrando a interação com o *P14/18* e seus resíduos de contato (em preto). A RBD está em cinza, e os peptídeos imunodominantes em amarelo (*P14/18*), verde (*P56*), laranja (*P41/44*) e azul ciano (*P1/3/5/6*).

Uma vez que o perfil de peptídeos imunodominantes é distinto entre convalescentes e vacinados, levantamos a hipótese de uma pressão imunológica que aconteceu entre os períodos de vacinação em comparação ao surgimento das variantes no Brasil (Anexo C). Essas regiões predominantemente reconhecidas por vacinados estão localizadas em regiões de mutação na variante Omicron BA.1, uma variante de grande importância que emergiu após a vacinação em escala (Figura 22).

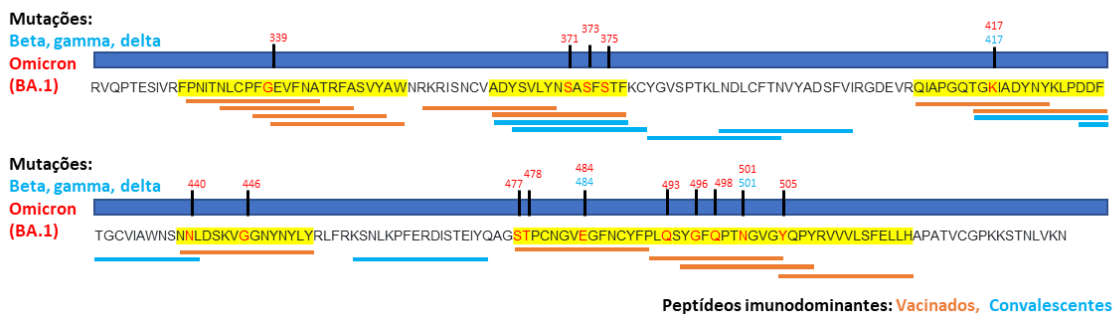


Figura 22. Sequência linear da RBD mostrando os sítios de mutação beta, gamma, delta e Omicron BA.1. As regiões destacadas em amarelo são as mais reconhecidas entre os vacinados. Os treze peptídeos IgG reconhecidos por vacinados (em laranja) e os sete reconhecidos por convalescentes (azuis) são mostrados de acordo com os resíduos RBD. Os números em vermelho ou azul representam os aminoácidos mutados nas variantes Omicron ou Beta/Gamma/Delta, respectivamente.

7. DISCUSSÃO

A região RBD é considerada pela literatura como imunodominante devido ao número total de anticorpos dirigidos e por ser alvo de 90% da atividade neutralizante presente no soro ou plasma da maioria dos indivíduos mapeados (133). Em consonância com nossos resultados, diversos estudos citaram a correlação entre altos títulos de neutralização e altos títulos de reconhecimento da proteína RBD (134,135), a correlação entre a gravidade da doença e altos títulos de neutralização, e a alta potência dos anticorpos anti-RBD e sua correlação com o aumento da sobrevivência.

A identificação de epítomos de células B que induzem à produção de anticorpos neutralizantes é essencial para compreender a dinâmica de evolução viral, além de promover informações relevantes em relação a estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra o SARS-CoV-2 e suas variantes emergentes. Nossa abordagem pelo *microarray* de peptídeos forneceu um perfil abrangente da reatividade IgA e IgG aos peptídeos derivados do vírus ancestral em convalescentes da primeira onda da pandemia e em indivíduos vacinados sem infecção prévia, o que permitiu observar e identificar conjuntos de peptídeos imunodominantes distintos.

Em resumo, o perfil de reconhecimento IgA em convalescentes foi mais diverso do que o perfil de IgG, diferente do que foi observado em uma coorte de convalescentes que mostrou que os anticorpos IgG e IgA reconhecem as mesmas regiões proteicas com frequências similares (136). Além disso, o perfil de IgG foi ainda mais restrito em convalescentes com altos títulos de neutralização. Se, por um lado, uma resposta mais restrita de anticorpos possa refletir uma resposta imune mais robusta, por outro, também pode favorecer o escape imunológico – a seleção de novas variantes. Alinhado com essa interpretação, um estudo recente (137) mostrou que devido ao “*imprinting*” humoral, as infecções por Omicron causaram reduções significantes na diversidade de epítomos de nAbs e aumentaram a proporção de mAbs não neutralizantes, o que por sua vez teria concentrado a pressão imune e promovido a evolução convergente das variantes.

Os peptídeos reconhecidos por mais de 30% da coorte foram considerados imunodominantes (133,138). Como primeira abordagem, determinamos o perfil de

reatividade dos convalescentes e identificamos apenas um peptídeo (*P44*, S₄₁₅₋₄₂₉ TGKIADYNYKLPDDF) que mostrou correlação positiva com a atividade neutralizante, sugerindo que as respostas aos outros peptídeos também caracterizados como imunodominantes possam não ter gerado anticorpos neutralizantes.

Algumas informações importantes foram observadas. Encontramos a presença de peptídeos com característica imunogênica já descrita na literatura: candidatos relevantes para peptídeos vacinais ou para imunovigilância após a administração de terapias com anticorpos preditos por diversos métodos integrando antigenicidade, toxicidade, alergenicidade, estabilidade e propriedades físico-químicas (Anexo D).

Parte do peptídeo *P44* e o peptídeo *P50* foram descritos como peptídeos imunodominantes em camundongos BALB/c em um estudo com um candidato de vacina de DNA, com indução de respostas de células T 7 dias após a inoculação (139). Parte do peptídeo *P50* também foi descrito em um design de vacina *in silico*, onde os autores reportam o *docking* dos peptídeos imunogênicos com os receptores tipo Toll (TLR, do inglês, *Toll-Like Receptors*) e com o ECA2, e a predição da estrutura secundária de mRNA *in silico*, demonstrando a expressão eficiente dos peptídeos em *Escherichia coli* (140).

O peptídeo *P18* foi reportado em um estudo anterior também *in silico* como peptídeo de células T que interagem com MHC de classe II (HLA-DR*01:01), porém com baixa afinidade (141). Por fim, o *P66* faz parte da região RBM (do inglês, *Receptor Binding Motif*), a região central da proteína RBD que se liga ao ECA2. Esse peptídeo localizado em um *hotspot* foi descrito como uma região IgG reativa, analisada em uma coorte de 12 indivíduos COVID-19 positivos ($p=0.0249$), porém perdeu a habilidade de discriminar os indivíduos positivos quando analisado em uma coorte maior, dessa vez com 23 indivíduos ($p=0.2640$) (142).

Parte do peptídeo *P66* também foi predito como epítipo linear e conformacional de células B (143). Esse mesmo estudo mostrou os peptídeos *P12* e *P14* em um epítipo viral de 33 resíduos de aminoácidos (GEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLVNS) como o 3º colocado em uma lista de 1546 genes que incluem as proteínas Spike, de membrana e envelope para epítipos de células T e B, com apresentação de MHC de classe I em 98,3% da população. Zhang e colaboradores (144) identificaram 4 peptídeos derivados da região RBD

por mapeamento de epítomos que sobrepõem parcialmente os peptídeos *P12*, *P14* e *P66* e que reagem com o antisoro de camundongos imunizados contra uma vacina baseada na porção Fc da proteína RBD, porém com uma baixa atividade neutralizante (145).

O *P44* compreende o resíduo de mutação K417 presente nas variantes Gamma (K417T), Beta e Omicron (K417N), variantes que são menos reconhecidas por nAbs de convalescentes da primeira onda (138) e por vacinados (146). O resíduo K417 é um resíduo de contato com a ECA2, e é provavelmente o resultado da evolução adaptativa do SARS-CoV-2, e exibe forte ligação ao receptor (147). A forte resposta humoral direcionada à região que compreende esse resíduo pode ter causado pressão seletiva e por consequência, favorecido o escape imunológico desta região observado nas variantes.

Outros estudos mostraram que nAbs que reconhecem epítomos RBD conservados entre as variantes do SARS-CoV-2 e outros sarbecovírus fora da RBM são capazes de neutralizar a Omicron (148). Diversos mAbs reagem de forma cruzada e neutralizam outros sarbecovírus além do SARS-CoV-2, indicando que os nAbs direcionados a regiões conservadas dos sarbecovírus permanecem efetivos (148).

Dados sobre epítomos conformacionais indicam que as mutações que ocorrem em resíduos com altos escores de acessibilidade de anticorpos baseados em suas estruturas, como o resíduo K417 quando a RBD está aberta, são mais susceptíveis a abranger epítomos (149). Nossos dados mostram que as substituições de aminoácidos nessas regiões podem impactar a resposta de anticorpos policlonais.

Estudos mostraram que a sequência do *P44* é alvo de anticorpos IgG de convalescentes e de vacinados com vacinas Spike-mRNA (150). Embora o estudo possua um número pequeno de voluntários e não tenha avaliado o potencial neutralizante, esses resultados corroboram a teoria de imunodominância do *P44*, também observada para IgA. Outros dois estudos com *microarray* que usaram peptídeos menores (12-mer) sobrepondo a sequência do *P44*, não mostrou reatividade direcionada ao peptídeo T₄₁₅GKIADYNYKLP₄₂₆ (119,151). Acreditamos que isso pode ser devido ao comprimento do peptídeo usado no estudo em questão, e que isso também sugere que conseguimos detectar o epítomo de maneira precisa pela nossa abordagem: não encontramos reatividade de anticorpo dominante direcionada aos peptídeos que flanqueiam o *P44* (*P43* e *P45*). Outros estudos reforçam

nossos achados ao demonstrar que o soro de indivíduos convalescentes reage com peptídeos mais longos contendo a sequência do *P44* (G₄₁₃QTGIADYNYKLPDDFTGC₄₃₂ (152) e V₄₀₇RQIAPGQTGIADYNYKLPDDFTGCVIAW₄₃₆ (153)).

Mencionamos anteriormente que o *P44* está localizado próximo a vários sítios de ligação de anticorpos terapêuticos, e frequentemente se sobrepõe com os sítios de ligação ao receptor ECA2 (154), como os nAbs REGN10933 (155) e o B38 (156), que reconhecem a região principal de ligação com a RBD e que contém a sequência do *P44*. Nossos achados mostram que o *P44* tem 56% de frequência de contato com nAbs. Outros estudos mostraram que todos os sítios que sofrem escape imunológico estão em contato direto (<4 Å) ou proximal (4–8 Å) com anticorpos em estruturas de alta resolução (156). Consequentemente, a troca do K417 carregado positivamente por uma Asparagina neutra (variante Beta) ou Treonina (variante Gamma) causa uma mudança na estrutura de hélice, como mostrado por Chen e colaboradores (157), aumentando ainda mais a distância da interação molecular e possivelmente, prejudicando a interação com o anticorpo. O IC₅₀ (concentração média de inibição) do REGN10933 caiu cerca de 13 e 8 vezes contra as variantes Beta e Gamma, respectivamente, principalmente por causa das mutações K417T/N e E484K (158). Consequentemente, os anticorpos que reconhecem o peptídeo sequencial que abrange o *P44* possivelmente não neutralizariam as variantes com a mutação K417N, conforme relatado em outros estudos (157–159). Já o resíduo E484K está localizado em um loop estabilizado por duas pontes dissulfeto (149), e provavelmente forma um epítopo conformacional, e por esse motivo não foi detectado no nosso *array*.

Por conseguinte, nós levantamos a hipótese de que os epítomos dominantes podem favorecer a pressão imunológica e a seleção de variantes portadoras de mutações em regiões críticas, capazes de evadir a resposta imune. Para isso, nós também analisamos o perfil de indivíduos vacinados e que não foram previamente infectados, e observamos que o perfil de peptídeos imunodominantes dos vacinados foi maior do que o dos convalescentes, que possuem uma resposta mais focada e associada a altos títulos de neutralização. Isso nos leva a acreditar que a pressão imunológica associada à vacinação contribui para a disseminação de epítomos e o surgimento da Omicron.

Estudos recentes mostraram o potencial da pressão imunológica exercida pelos tratamentos com plasma de indivíduos convalescentes e com mAbs na evolução do SARS-CoV-2 em imunocomprometidos (160,161). Essas circunstâncias podem ter contribuído para o surgimento de variantes com mais mutações (como a Omicron em relação às demais variantes (157)). Visto que tanto as vacinas quanto as terapias baseadas em anticorpos têm como alvo principal a proteína Spike, as pressões de seleção que favorecem o surgimento de variantes portadoras de mutações de escape imunológico geradas em infecções crônicas (162) serão semelhantes às que selecionam mutações que permitem reinfecções na população geral (163,164). A teoria do “*Original Antigenic Sin*” (do inglês, “pecado antigênico original”), que descreve que o desenvolvimento da imunidade contra patógenos/antígenos é moldado a partir da primeira exposição aos mesmos (165), também pode apresentar um obstáculo para o desenvolvimento de vacinas com potencial neutralizante.

É importante ressaltar que a vacinação com vacinas de mRNA geram anticorpos estruturalmente diferentes, com funções efetoras que diferem dos anticorpos produzidos em resposta à infecção natural, representando a eficácia da vacinação mesmo em cenários de redução da capacidade neutralizante (166). Estudos mostram que a vacinação induz mais anticorpos sialilados, fucosilados e galactosilados, especialmente IgG1, do que a infecção natural: essas modificações estruturais aumentam a capacidade dos anticorpos de se envolverem nas vias FcγR, que podem servir como outro mecanismo para reduzir a infecção (167,168). Outro estudo mostrou que a depleção de anticorpos específicos para RBD de pacientes vacinados teve pouco ou nenhum impacto nas funções efetoras dependentes de Fc contra as variantes Alpha, Beta, Gamma e Delta. Além disso, o plasma de indivíduos vacinados apresentou altos níveis de ligação dos componentes do complemento C1q e C3d a anticorpos específicos para Spike ou RBD, ao contrário do plasma convalescente (169). Mesmo que as mutações da proteína Spike encontradas nas VOCs diminuam a eficácia da vacina ao reduzir a atividade neutralizante, as funções efetoras dependentes de Fc também contribuem para menor incidência de doença grave após a vacinação (166).

É esperado que o vírus continue a se adaptar e continue a se divergir cada vez mais das sequências iniciais do vírus ancestral (Wuhan). Consequentemente, as vacinas que possuem como alvo a Spike ancestral podem, na verdade, aumentar as respostas contra

epítomos conservados ao invés de induzir respostas às novas variantes. É incerto se a imunidade conferida por uma vacina bivalente contendo as variantes Omicron e Wuhan será a melhor escolha: Wang e colaboradores (170) publicaram recentemente um pequeno estudo sobre a resposta de anticorpos à Omicron e o booster bivalente contendo as Spikes das variantes Omicron BA.4, BA.5 e da variante ancestral. Os autores concluem que o booster com a vacina bivalente não provoca um pico de neutralização superior em comparação ao reforço com as vacinas monovalentes originais e levantam a hipótese de impressão imunológica. Ainda, um outro estudo chegou a conclusões similares ao observar a evasão de anticorpos das sub-variantes Omicron em vacinados com a vacina contra o vírus ancestral, e embora a infecção com a sub-variante induza certa capacidade de neutralização cruzada, o fenômeno “*Original Antigenic Sin*” limita muito a remodelação da resposta variante-específica: as infecções subsequentes por variantes não parecem promover proteção suficiente (171). Provavelmente os próximos passos envolverão desenvolver vacinas específicas baseadas em novas variantes dominantes e/ou subdominantes, conforme demonstrado em resultados pré-clínicos promissores (172).

8. CONCLUSÃO

Identificamos um grupo de peptídeos lineares imunodominantes contidos na região RBD do vírus SARS-CoV-2 ancestral que difere entre convalescentes da primeira onda de infecção e vacinados que seguiram o regime vacinal de duas doses de Coronovac seguidas de um *booster* com a miRNA-273 Pfizer. Entre os indivíduos convalescentes, apenas o peptídeo *P44* se correlacionou positivamente com títulos de neutralização, o que sugere que ele possui epítomos reconhecidos por anticorpos neutralizantes devido à sua localização na RBD. Esse peptídeo imunodominante possui um *hotspot* de mutação em três variantes do SARS-CoV-2: Beta, Gamma e Omicron. Também observamos que o perfil de peptídeos imunodominantes caracterizados na coorte de indivíduos vacinados é mais diverso e foi detectado em regiões que coincidem com as mutações encontradas na variante Omicron BA.1, uma variante de grande importância clínica, e que emergiu após a vacinação em escala global. Os resultados contidos neste estudo evidenciam que os epítomos imunodominantes reconhecidos por convalescentes e vacinados podem favorecer a pressão seletiva, gerando variantes que possuem mutações nesses sítios e favorecendo o escape imunológico.

9. REFERÊNCIAS

1. Han Q, Lin Q, Jin S, You L. Coronavirus 2019-nCoV: A brief perspective from the front line. *Journal of Infection*. 2020;80:373–377. doi: 10.1016/j.jinf.2020.02.010.
2. Hui DS, I Azhar E, Madani TA, Ntoumi F, Kock R, Dar O, Ippolito G, Mchugh TD, Memish ZA, Drosten C, et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health — The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020;91:264–266. doi: 10.1016/j.ijid.2020.01.009.
3. COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University [Internet]. 2023. [Acesso em 11 de Abril de 2023]. Disponível em: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>.
4. Brito LLO, Lima TO, Pinto RR. A eficácia das vacinas anticovid-19 disponíveis no Brasil – Uma revisão integrativa / The effectiveness of anticovid-19 vaccines available in Brazil - An integrative review. *Brazilian Journal of Development*. 2021;7:113754–113767. doi: 10.34117/bjdv7n12-250.
5. Mapa da vacinação contra Covid-19 no Brasil. 2023. [Acesso em 11 de abril de 2023]. Disponível em: <https://especiais.g1.globo.com/bemestar/vacina/2021/mapa-brasil-vacina-covid/>
6. World Health Organization [Internet]. 2023. [Acesso em 11 de abril de 2023]. Disponível em: <https://covid19.who.int>.
7. Alcantara LCJ, Nogueira E, Shuab G, Tosta S, Fristch H, Pimentel V, Souza-Neto JA, Coutinho LL, Fukumasu H, Sampaio SC, et al. SARS-CoV-2 epidemic in Brazil: how the displacement of variants has driven distinct epidemic waves. *Virus Res*. 2022;315:198785. doi: 10.1016/j.virusres.2022.198785.
8. Wang L, Cheng G. Sequence analysis of the emerging SARS-CoV-2 variant Omicron in South Africa. *J Med Virol*. 2022;94:1728–1733. doi: 10.1002/jmv.27516.
9. Greaney AJ, Starr TN, Gilchuk P, Zost SJ, Binshtein E, Loes AN, Hilton SK, Huddleston J, Eguia R, Crawford KHD, et al. Complete Mapping of Mutations to the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain that Escape Antibody Recognition. *Cell Host Microbe*. 2021;29:44-57.e9. doi: 10.1016/j.chom.2020.11.007.
10. Torjesen I. Covid-19: Omicron may be more transmissible than other variants and partly resistant to existing vaccines, scientists fear. *BMJ*. 2021;n2943. doi: 10.1136/bmj.n2943.

11. Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17:181–192. doi: 10.1038/s41579-018-0118-9.
12. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, Wang W, Song H, Huang B, Zhu N, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet.* 2020;395:565–574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8.
13. Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science (1979).* 2020;369:330–333. doi: 10.1126/science.abb9983.
14. Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CAM, Rottier PJM. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *J Virol.* 2003;77:8801–8811. doi: 10.1128/JVI.77.16.8801-8811.2003.
15. Qi H, Liu B, Wang X, Zhang L. The humoral response and antibodies against SARS-CoV-2 infection. *Nat Immunol.* 2022;23:1008–1020. doi: 10.1038/s41590-022-01248-5.
16. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu N-H, Nitsche A, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020;181:271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
17. Du L, Kao RY, Zhou Y, He Y, Zhao G, Wong C, Jiang S, Yuen K-Y, Jin D-Y, Zheng B-J. Cleavage of spike protein of SARS coronavirus by protease factor Xa is associated with viral infectivity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;359:174–179. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.05.092.
18. Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veerler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 2020;181:281-292.e6. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
19. Weissenhorn, W., Dessen, A., Calder, L. J., Harrison, S. C., Skehel, J. J., Wiley DC. Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Mol Membr Biol.* 1999;16:3–9. doi: 10.1080/096876899294706.
20. Wang Q, Zhang Y, Wu L, Niu S, Song C, Zhang Z, Lu G, Qiao C, Hu Y, Yuen K-Y, et al. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell.* 2020;181:894-904.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.03.045.

21. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* (1979). 2020;367:1444–1448. doi: 10.1126/science.abb2762.
22. Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med*. 2020;46:586–590. doi: 10.1007/s00134-020-05985-9.
23. Shang J, Wan Y, Luo C, Ye G, Geng Q, Auerbach A, Li F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117:11727–11734. doi: 10.1073/pnas.2003138117.
24. Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, Geng Q, Auerbach A, Li F. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*. 2020;581:221–224. doi: 10.1038/s41586-020-2179-y.
25. Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein. *Viruses*. 2012;4:1011–1033. doi: 10.3390/v4061011.
26. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. 2020;20:363–374. doi: 10.1038/s41577-020-0311-8.
27. Zhang H, Zhou P, Wei Y, Yue H, Wang Y, Hu M, Zhang S, Cao T, Yang C, Li M, et al. Histopathologic Changes and SARS-CoV-2 Immunostaining in the Lung of a Patient With COVID-19. *Ann Intern Med*. 2020;172:629–632. doi: 10.7326/M20-0533.
28. Chen I-Y, Moriyama M, Chang M-F, Ichinohe T. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Viroporin 3a Activates the NLRP3 Inflammasome. *Front Microbiol*. 2019;10. doi: 10.3389/fmicb.2019.00050.
29. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infect Immun*. 2005;73:1907–1916. doi: 10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005.
30. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 2020;395:497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
31. Huang K-J, Su I-J, Theron M, Wu Y-C, Lai S-K, Liu C-C, Lei H-Y. An interferon- γ -related cytokine storm in SARS patients. *J Med Virol*. 2005;75:185–194. doi: 10.1002/jmv.20255.

32. Versteeg GA, Bredenbeek PJ, van den Worm SHE, Spaan WJM. Group 2 coronaviruses prevent immediate early interferon induction by protection of viral RNA from host cell recognition. *Virology*. 2007;361:18–26. doi: 10.1016/j.virol.2007.01.020.
33. Frieman M, Ratia K, Johnston RE, Mesecar AD, Baric RS. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Papain-Like Protease Ubiquitin-Like Domain and Catalytic Domain Regulate Antagonism of IRF3 and NF- κ B Signaling. *J Virol*. 2009;83:6689–6705. doi: 10.1128/JVI.02220-08.
34. Frieman M, Yount B, Heise M, Kopecky-Bromberg SA, Palese P, Baric RS. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ORF6 Antagonizes STAT1 Function by Sequestering Nuclear Import Factors on the Rough Endoplasmic Reticulum/Golgi Membrane. *J Virol*. 2007;81:9812–9824. doi: 10.1128/JVI.01012-07.
35. Arunachalam PS, Wimmers F, Mok CKP, Perera RAPM, Scott M, Hagan T, Sigal N, Feng Y, Bristow L, Tak-Yin Tsang O, et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. *Science* (1979). 2020;369:1210–1220. doi: 10.1126/science.abc6261.
36. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, Ellingson MK, Mao T, Oh JE, Israelow B, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020;584:463–469. doi: 10.1038/s41586-020-2588-y.
37. Brodin P. Why is COVID-19 so mild in children? *Acta Paediatr*. 2020;109:1082–1083. doi: 10.1111/apa.15271.
38. Shattuck-Heidorn H, Danielsen AC, Gompers A, Bruch JD, Zhao H, Boulicault M, Marsella J, Richardson SS. A finding of sex similarities rather than differences in COVID-19 outcomes. *Nature*. 2021;597:E7–E9. doi: 10.1038/s41586-021-03644-7.
39. Brodin P. Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. *Nat Med*. 2021;27:28–33. doi: 10.1038/s41591-020-01202-8.
40. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 2020;395:497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
41. Smith JC, Sausville EL, Girish V, Yuan M Lou, Vasudevan A, John KM, Sheltzer JM. Cigarette Smoke Exposure and Inflammatory Signaling Increase the Expression of the SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in the Respiratory Tract. *Dev Cell*. 2020;53:514–529.e3. doi: 10.1016/j.devcel.2020.05.012.
42. Hope JL, Bradley LM. Lessons in antiviral immunity. *Science* (1979). 2021;371:464–465. doi: 10.1126/science.abf6446.

43. Yan N, Chen ZJ. Intrinsic antiviral immunity. *Nat Immunol.* 2012;13:214–222. doi: 10.1038/ni.2229.
44. Rouse BT, Sehrawat S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nat Rev Immunol.* 2010;10:514–526. doi: 10.1038/nri2802.
45. Law M, Hangartner L. Antibodies against viruses: passive and active immunization. *Curr Opin Immunol.* 2008;20:486–492. doi: 10.1016/j.coi.2008.06.005.
46. Corti D, Lanzavecchia A. Broadly Neutralizing Antiviral Antibodies. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:705–742. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095916.
47. Forthal DN. Functions of Antibodies. *Microbiol Spectr.* 2014;2. doi: 10.1128/microbiolspec.AID-0019-2014.
48. Cyster JG, Allen CDC. B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions. *Cell.* 2019;177:524–540. doi: 10.1016/j.cell.2019.03.016.
49. Clem A. Fundamentals of vaccine immunology. *J Glob Infect Dis.* 2011;3:73. doi: 10.4103/0974-777X.77299.
50. Sakharkar M, Rappazzo CG, Wieland-Alter WF, Hsieh C-L, Wrapp D, Esterman ES, Kaku CI, Wec AZ, Geoghegan JC, McLellan JS, et al. Prolonged evolution of the human B cell response to SARS-CoV-2 infection. *Sci Immunol.* 2021;6. doi: 10.1126/sciimmunol.abg6916.
51. Gaebler C, Wang Z, Lorenzi JCC, Muecksch F, Finkin S, Tokuyama M, Cho A, Jankovic M, Schaefer-Babajew D, Oliveira TY, et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2. *Nature.* 2021;591:639–644. doi: 10.1038/s41586-021-03207-w.
52. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, Grifoni A, Ramirez SI, Haupt S, Frazier A, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science (1979).* 2021;371. doi: 10.1126/science.abf4063.
53. Robbiani DF, Gaebler C, Muecksch F, Lorenzi JCC, Wang Z, Cho A, Agudelo M, Barnes CO, Gazumyan A, Finkin S, et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature.* 2020;584:437–442. doi: 10.1038/s41586-020-2456-9.
54. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, Grifoni A, Ramirez SI, Haupt S, Frazier A, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science (1979).* 2021;371. doi: 10.1126/science.abf4063.
55. Rodda LB, Netland J, Shehata L, Pruner KB, Morawski PA, Thouvenel CD, Takehara KK, Eggenberger J, Hemann EA, Waterman HR, et al. Functional SARS-CoV-2-

- Specific Immune Memory Persists after Mild COVID-19. *Cell*. 2021;184:169-183.e17. doi: 10.1016/j.cell.2020.11.029.
56. Turner JS, Kim W, Kalaidina E, Goss CW, Rauseo AM, Schmitz AJ, Hansen L, Haile A, Klebert MK, Pusic I, et al. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans. *Nature*. 2021;595:421–425. doi: 10.1038/s41586-021-03647-4.
 57. Long Q-X, Liu B-Z, Deng H-J, Wu G-C, Deng K, Chen Y-K, Liao P, Qiu J-F, Lin Y, Cai X-F, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020;26:845–848. doi: 10.1038/s41591-020-0897-1.
 58. Woodruff MC, Ramonell RP, Nguyen DC, Cashman KS, Saini AS, Haddad NS, Ley AM, Kyu S, Howell JC, Ozturk T, et al. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat Immunol*. 2020;21:1506–1516. doi: 10.1038/s41590-020-00814-z.
 59. Kaneko N, Kuo H-H, Boucau J, Farmer JR, Allard-Chamard H, Mahajan VS, Piechocka-Trocha A, Lefteri K, Osborn M, Bals J, et al. Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. *Cell*. 2020;183:143-157.e13. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.025.
 60. Zhang J, Wu Q, Liu Z, Wang Q, Wu J, Hu Y, Bai T, Xie T, Huang M, Wu T, et al. Spike-specific circulating T follicular helper cell and cross-neutralizing antibody responses in COVID-19-convalescent individuals. *Nat Microbiol*. 2020;6:51–58. doi: 10.1038/s41564-020-00824-5.
 61. Sokal A, Chappert P, Barba-Spaeth G, Roeser A, Fourati S, Azzaoui I, Vandenberghe A, Fernandez I, Meola A, Bouvier-Alias M, et al. Maturation and persistence of the anti-SARS-CoV-2 memory B cell response. *Cell*. 2021;184:1201-1213.e14. doi: 10.1016/j.cell.2021.01.050.
 62. Wang Z, Muecksch F, Schaefer-Babajew D, Finkin S, Viant C, Gaebler C, Hoffmann H-H, Barnes CO, Cipolla M, Ramos V, et al. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. *Nature*. 2021;595:426–431. doi: 10.1038/s41586-021-03696-9.
 63. Dugan HL, Stamper CT, Li L, Changrob S, Asby NW, Halfmann PJ, Zheng N-Y, Huang M, Shaw DG, Cobb MS, et al. Profiling B cell immunodominance after SARS-CoV-2 infection reveals antibody evolution to non-neutralizing viral targets. *Immunity*. 2021;54:1290-1303.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2021.05.001.
 64. Suthar MS, Zimmerman MG, Kauffman RC, Mantus G, Linderman SL, Hudson WH, Vanderheiden A, Nyhoff L, Davis CW, Adekunle O, et al. Rapid Generation of

- Neutralizing Antibody Responses in COVID-19 Patients. *Cell Rep Med*. 2020;1:100040. doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100040.
65. Isho B, Abe KT, Zuo M, Jamal AJ, Rathod B, Wang JH, Li Z, Chao G, Rojas OL, Bang YM, et al. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. *Sci Immunol*. 2020;5. doi: 10.1126/sciimmunol.abe5511.
 66. Wajnberg A, Amanat F, Firpo A, Altman DR, Bailey MJ, Mansour M, McMahon M, Meade P, Mendu DR, Muellers K, et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science* (1979). 2020;370:1227–1230. doi: 10.1126/science.abd7728.
 67. Wang K, Long Q-X, Deng H-J, Hu J, Gao Q-Z, Zhang G-J, He C-L, Huang L-Y, Hu J-L, Chen J, et al. Longitudinal Dynamics of the Neutralizing Antibody Response to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2021;73:e531–e539. doi: 10.1093/cid/ciaa1143.
 68. Muecksch F, Wise H, Batchelor B, Squires M, Semple E, Richardson C, McGuire J, Clearly S, Furrie E, Greig N, et al. Longitudinal Serological Analysis and Neutralizing Antibody Levels in Coronavirus Disease 2019 Convalescent Patients. *J Infect Dis*. 2021;223:389–398. doi: 10.1093/infdis/jiaa659.
 69. Seow J, Graham C, Merrick B, Acors S, Pickering S, Steel KJA, Hemmings O, O’Byrne A, Kouphou N, Galao RP, et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nat Microbiol*. 2020;5:1598–1607. doi: 10.1038/s41564-020-00813-8.
 70. Chen Y, Zuiani A, Fischinger S, Mullur J, Atyeo C, Travers M, Lelis FJN, Pullen KM, Martin H, Tong P, et al. Quick COVID-19 Healers Sustain Anti-SARS-CoV-2 Antibody Production. *Cell*. 2020;183:1496-1507.e16. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.051.
 71. Chen Y, Zuiani A, Fischinger S, Mullur J, Atyeo C, Travers M, Lelis FJN, Pullen KM, Martin H, Tong P, et al. Quick COVID-19 Healers Sustain Anti-SARS-CoV-2 Antibody Production. *Cell*. 2020;183:1496-1507.e16. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.051.
 72. Long Q-X, Tang X-J, Shi Q-L, Li Q, Deng H-J, Yuan J, Hu J-L, Xu W, Zhang Y, Lv F-J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med*. 2020;26:1200–1204. doi: 10.1038/s41591-020-0965-6.
 73. Shenoy S. SARS-CoV-2 (COVID-19), viral load and clinical outcomes; lessons learned one year into the pandemic: A systematic review. *World J Crit Care Med*. 2021;10:132–150. doi: 10.5492/wjccm.v10.i4.132.

74. Woodruff MC, Ramonell RP, Nguyen DC, Cashman KS, Saini AS, Haddad NS, Ley AM, Kyu S, Howell JC, Ozturk T, et al. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat Immunol.* 2020;21:1506–1516. doi: 10.1038/s41590-020-00814-z.
75. Russell MW, Moldoveanu Z, Ogra PL, Mestecky J. Mucosal Immunity in COVID-19: A Neglected but Critical Aspect of SARS-CoV-2 Infection. *Front Immunol.* 2020;11. doi: 10.3389/fimmu.2020.611337.
76. Wang Z, Lorenzi JCC, Muecksch F, Finkin S, Viant C, Gaebler C, Cipolla M, Hoffmann H-H, Oliveira TY, Oren DA, et al. Enhanced SARS-CoV-2 neutralization by dimeric IgA. *Sci Transl Med.* 2021;13. doi: 10.1126/scitranslmed.abf1555.
77. Cervia C, Nilsson J, Zurbuchen Y, Valaperti A, Schreiner J, Wolfensberger A, Raeber ME, Adamo S, Weigang S, Emmenegger M, et al. Systemic and mucosal antibody responses specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2021;147:545-557.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2020.10.040.
78. Fröberg J, Gillard J, Philipsen R, Lanke K, Rust J, van Tuijl D, Teelen K, Bousema T, Simonetti E, van der Gaast-de Jongh CE, et al. SARS-CoV-2 mucosal antibody development and persistence and their relation to viral load and COVID-19 symptoms. *Nat Commun.* 2021;12:5621. doi: 10.1038/s41467-021-25949-x.
79. Sterlin D, Mathian A, Miyara M, Mohr A, Anna F, Claër L, Quentric P, Fadlallah J, Devilliers H, Ghillani P, et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci Transl Med.* 2021;13. doi: 10.1126/scitranslmed.abd2223.
80. Fontanet A, Cauchemez S. COVID-19 herd immunity: where are we? *Nat Rev Immunol.* 2020;20:583–584. doi: 10.1038/s41577-020-00451-5.
81. Pollard AJ, Bijker EM. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunol.* 2021;21:83–100. doi: 10.1038/s41577-020-00479-7.
82. Li M, Wang H, Tian L, Pang Z, Yang Q, Huang T, Fan J, Song L, Tong Y, Fan H. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7:146. doi: 10.1038/s41392-022-00996-y.
83. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, Baum A, Pascal K, Quandt J, Maurus D, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature.* 2020;586:594–599. doi: 10.1038/s41586-020-2814-7.

84. Lederer K, Castaño D, Gómez Atria D, Oguin TH, Wang S, Manzoni TB, Muramatsu H, Hogan MJ, Amanat F, Cherubin P, et al. SARS-CoV-2 mRNA Vaccines Foster Potent Antigen-Specific Germinal Center Responses Associated with Neutralizing Antibody Generation. *Immunity*. 2020;53:1281-1295.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2020.11.009.
85. Turner JS, O'Halloran JA, Kalaidina E, Kim W, Schmitz AJ, Zhou JQ, Lei T, Thapa M, Chen RE, Case JB, et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccines induce persistent human germinal centre responses. *Nature*. 2021;596:109–113. doi: 10.1038/s41586-021-03738-2.
86. Ahluwalia P, Vaibhav K, Ahluwalia M, Mondal AK, Sahajpal N, Rojiani AM, Kolhe R. Infection and Immune Memory: Variables in Robust Protection by Vaccines Against SARS-CoV-2. *Front Immunol*. 2021;12. doi: 10.3389/fimmu.2021.660019.
87. Goel RR, Apostolidis SA, Painter MM, Mathew D, Pattekar A, Kuthuru O, Gouma S, Hicks P, Meng W, Rosenfeld AM, et al. Distinct antibody and memory B cell responses in SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals after mRNA vaccination. *Sci Immunol*. 2021;6. doi: 10.1126/sciimmunol.abi6950.
88. Cox RJ, Brokstad KA. Not just antibodies: B cells and T cells mediate immunity to COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020;20:581–582. doi: 10.1038/s41577-020-00436-4.
89. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, Diemert D, Spector SA, Rouphael N, Creech CB, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *New England Journal of Medicine*. 2021;384:403–416. doi: 10.1056/NEJMoa2035389.
90. Bos R, Rutten L, van der Lubbe JEM, Bakkers MJG, Hardenberg G, Wegmann F, Zuijdgeest D, de Wilde AH, Koornneef A, Verwilligen A, et al. Ad26 vector-based COVID-19 vaccine encoding a prefusion-stabilized SARS-CoV-2 Spike immunogen induces potent humoral and cellular immune responses. *NPJ Vaccines*. 2020;5:91. doi: 10.1038/s41541-020-00243-x.
91. Heath PT, Galiza EP, Baxter DN, Boffito M, Browne D, Burns F, Chadwick DR, Clark R, Cosgrove CA, Galloway J, et al. Safety and Efficacy of the NVX-CoV2373 Coronavirus Disease 2019 Vaccine at Completion of the Placebo-Controlled Phase of a Randomized Controlled Trial. *Clinical Infectious Diseases*. 2023;76:398–407. doi: 10.1093/cid/ciac803.
92. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, Perez JL, Pérez Marc G, Moreira ED, Zerbini C, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine*. 2020;383:2603–2615. doi: 10.1056/NEJMoa2034577.

93. Zhu F-C, Guan X-H, Li Y-H, Huang J-Y, Jiang T, Hou L-H, Li J-X, Yang B-F, Wang L, Wang W-J, et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet*. 2020;396:479–488. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31605-6.
94. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, Angus B, Baillie VL, Barnabas SL, Bhorat QE, et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *The Lancet*. 2021;397:99–111. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32661-1.
95. Tauzin A, Nayrac M, Benlarbi M, Gong SY, Gasser R, Beaudoin-Bussi eres G, Brassard N, Laumaea A, V ezina D, Pr evost J, et al. A single dose of the SARS-CoV-2 vaccine BNT162b2 elicits Fc-mediated antibody effector functions and T cell responses. *Cell Host Microbe*. 2021;29:1137-1150.e6. doi: 10.1016/j.chom.2021.06.001.
96. Tomalka JA, Suthar MS, Deeks SG, Sekaly RP. Fighting the SARS-CoV-2 pandemic requires a global approach to understanding the heterogeneity of vaccine responses. *Nat Immunol*. 2022;23:360–370. doi: 10.1038/s41590-022-01130-4.
97. Diebold SS. Determination of T-cell fate by dendritic cells. *Immunol Cell Biol*. 2008;86:389–397. doi: 10.1038/icb.2008.26.
98. Ueno H, Schmitt N, Palucka AK, Banchereau J. Dendritic cells and humoral immunity in humans. *Immunol Cell Biol*. 2010;88:376–380. doi: 10.1038/icb.2010.28.
99. Paton RS, Overton CE, Ward T. The rapid replacement of the SARS-CoV-2 Delta variant by Omicron (B.1.1.529) in England. *Sci Transl Med*. 2022;14. doi: 10.1126/scitranslmed.abo5395.
100. Campbell F, Archer B, Laurenson-Schafer H, Jinnai Y, Konings F, Batra N, Pavlin B, Vandemaele K, Van Kerkhove MD, Jombart T, et al. Increased transmissibility and global spread of SARS-CoV-2 variants of concern as at June 2021. *Eurosurveillance*. 2021;26. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100509.
101. Liu Y, Liu J, Plante KS, Plante JA, Xie X, Zhang X, Ku Z, An Z, Scharton D, Schindewolf C, et al. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 infection and transmission. *Nature*. 2022;602:294–299. doi: 10.1038/s41586-021-04245-0.
102. Carabelli AM, Peacock TP, Thorne LG, Harvey WT, Hughes J, de Silva TI, Peacock SJ, Barclay WS, de Silva TI, Towers GJ, et al. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nat Rev Microbiol*. 2023; doi: 10.1038/s41579-022-00841-7.

103. Davies NG, Jarvis CI, Edmunds WJ, Jewell NP, Diaz-Ordaz K, Keogh RH. Increased mortality in community-tested cases of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7. *Nature*. 2021;593:270–274. doi: 10.1038/s41586-021-03426-1.
104. Galloway SE, Paul P, MacCannell DR, Johansson MA, Brooks JT, MacNeil A, Slayton RB, Tong S, Silk BJ, Armstrong GL, et al. Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage — United States, December 29, 2020–January 12, 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2021;70:95–99. doi: 10.15585/mmwr.mm7003e2.
105. Wang P, Casner RG, Nair MS, Wang M, Yu J, Cerutti G, Liu L, Kwong PD, Huang Y, Shapiro L, et al. Increased resistance of SARS-CoV-2 variant P.1 to antibody neutralization. *Cell Host Microbe*. 2021;29:747-751.e4. doi: 10.1016/j.chom.2021.04.007.
106. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido D da S, Mishra S, Crispim MAE, Sales FCS, Hawryluk I, McCrone JT, et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science (1979)*. 2021;372:815–821. doi: 10.1126/science.abh2644.
107. Zhou D, Dejnirattisai W, Supasa P, Liu C, Mentzer AJ, Ginn HM, Zhao Y, Duyvesteyn HME, Tuekprakhon A, Nutalai R, et al. Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera. *Cell*. 2021;184:2348-2361.e6. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.037.
108. Singh J, Rahman SA, Ehtesham NZ, Hira S, Hasnain SE. SARS-CoV-2 variants of concern are emerging in India. *Nat Med*. 2021;27:1131–1133. doi: 10.1038/s41591-021-01397-4.
109. Zhang J, Xiao T, Cai Y, Lavine CL, Peng H, Zhu H, Anand K, Tong P, Gautam A, Mayer ML, et al. Membrane fusion and immune evasion by the spike protein of SARS-CoV-2 Delta variant. *Science (1979)*. 2021;374:1353–1360. doi: 10.1126/science.abl9463.
110. Dyer O. Covid-19: Omicron is causing more infections but fewer hospital admissions than delta, South African data show. *BMJ*. 2021;n3104. doi: 10.1136/bmj.n3104.
111. Callaway E. Heavily mutated Omicron variant puts scientists on alert. *Nature*. 2021;600:21–21. doi: 10.1038/d41586-021-03552-w.
112. Barrett ADT, Titball RW, MacAry PA, Rupp RE, von Messling V, Walker DH, Fanget NVJ. The rapid progress in COVID vaccine development and implementation. *NPJ Vaccines*. 2022;7:20. doi: 10.1038/s41541-022-00442-8.
113. Liu Z, VanBlargan LA, Bloyet L-M, Rothlauf PW, Chen RE, Stumpf S, Zhao H, Errico JM, Theel ES, Liebeskind MJ, et al. Identification of SARS-CoV-2 spike

- mutations that attenuate monoclonal and serum antibody neutralization. *Cell Host Microbe*. 2021;29:477-488.e4. doi: 10.1016/j.chom.2021.01.014.
114. Cao Y, Wang J, Jian F, Xiao T, Song W, Yisimayi A, Huang W, Li Q, Wang P, An R, et al. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Nature*. 2022;602:657–663. doi: 10.1038/s41586-021-04385-3.
 115. Huang J, Honda W. CED: a conformational epitope database. *BMC Immunol*. 2006;7:7. doi: 10.1186/1471-2172-7-7.
 116. Liu H, Wilson IA. Protective neutralizing epitopes in SARS-CoV-2. *Immunol Rev*. 2022;310:76–92. doi: 10.1111/imr.13084.
 117. Wang H, Wu X, Zhang X, Hou X, Liang T, Wang D, Teng F, Dai J, Duan H, Guo S, et al. SARS-CoV-2 Proteome Microarray for Mapping COVID-19 Antibody Interactions at Amino Acid Resolution. *ACS Cent Sci*. 2020;6:2238–2249. doi: 10.1021/acscentsci.0c00742.
 118. Jiang H, Li Y, Zhang H, Wang W, Yang X, Qi H, Li H, Men D, Zhou J, Tao S. SARS-CoV-2 proteome microarray for global profiling of COVID-19 specific IgG and IgM responses. *Nat Commun*. 2020;11:3581. doi: 10.1038/s41467-020-17488-8.
 119. Li Y, Lai D, Zhang H, Jiang H, Tian X, Ma M, Qi H, Meng Q, Guo S, Wu Y, et al. Linear epitopes of SARS-CoV-2 spike protein elicit neutralizing antibodies in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. 2020;17:1095–1097. doi: 10.1038/s41423-020-00523-5.
 120. Farrera-Soler L, Daguier J-P, Barluenga S, Vadas O, Cohen P, Pagano S, Yerly S, Kaiser L, Vuilleumier N, Winssinger N. Identification of immunodominant linear epitopes from SARS-CoV-2 patient plasma. *PLoS One*. 2020;15:e0238089. doi: 10.1371/journal.pone.0238089.
 121. Wang A, Tian Y, Liu H, Ding P, Chen Y, Liang C, Du Y, Jiang D, Zhu X, Yin J, et al. Identification of three conserved linear B cell epitopes on the SARS-CoV-2 spike protein. *Emerg Microbes Infect*. 2022;11:2120–2131. doi: 10.1080/22221751.2022.2109515.
 122. Lim HX, Masomian M, Khalid K, Kumar AU, MacAry PA, Poh CL. Identification of B-Cell Epitopes for Eliciting Neutralizing Antibodies against the SARS-CoV-2 Spike Protein through Bioinformatics and Monoclonal Antibody Targeting. *Int J Mol Sci*. 2022;23:4341. doi: 10.3390/ijms23084341.
 123. Zhu H, Hu S, Jona G, Zhu X, Kreiswirth N, Willey BM, Mazzulli T, Liu G, Song Q, Chen P, et al. Severe acute respiratory syndrome diagnostics using a coronavirus

- protein microarray. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103:4011–4016. doi: 10.1073/pnas.0510921103.
124. Qi H, Zhou H, Czajkowsky DM, Guo S, Li Y, Wang N, Shi Y, Lin L, Wang J, Wu D, et al. Rapid Production of Virus Protein Microarray Using Protein Microarray Fabrication through Gene Synthesis (PAGES). *Molecular & Cellular Proteomics*. 2017;16:288–299. doi: 10.1074/mcp.M116.064873.
 125. Meade P, Kuan G, Strohmeier S, Maier HE, Amanat F, Balmaseda A, Ito K, Kirkpatrick E, Javier A, Gresh L, et al. Influenza Virus Infection Induces a Narrow Antibody Response in Children but a Broad Recall Response in Adults. *mBio*. 2020;11. doi: 10.1128/mBio.03243-19.
 126. De Santis GC, Mendrone A, Langhi D, Covas DT, Fabron A, Cortez AJP, Dinardo CL, Ubiali EMA, Marques JFC, Bordin JO, et al. Suggested guidelines for convalescent plasma therapy for the treatment of COVID-19. *Hematol Transfus Cell Ther [Internet]*. 2021;43:212–213. doi: 10.1016/j.htct.2021.03.001.
 127. Wendel S, Kutner JM, Machado R, Fontão-Wendel R, Bub C, Fachini R, Yokoyama A, Candelaria G, Sakashita A, Achkar R, et al. Screening for SARS-CoV-2 antibodies in convalescent plasma in Brazil: Preliminary lessons from a voluntary convalescent donor program. *Transfusion (Paris)*. 2020;60. doi: 10.1111/trf.16065.
 128. Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res*. 2017;45. doi: 10.1093/nar/gkx346.
 129. Edgar RC. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*. 2004;5. doi: 10.1186/1471-2105-5-113.
 130. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Res*. 2004;14. doi: 10.1101/gr.849004.
 131. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25. doi: 10.1002/jcc.20084.
 132. Niu L, Wittrock KN, Clabaugh GC, Srivastava V, Cho MW. A Structural Landscape of Neutralizing Antibodies Against SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain. *Front Immunol*. 2021;12. doi: 10.3389/fimmu.2021.647934.
 133. Piccoli L, Park YJ, Tortorici MA, Czudnochowski N, Walls AC, Beltramello M, Silacci-Fregni C, Pinto D, Rosen LE, Bowen JE, et al. Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by

- Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell*. 2020;183. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.037.
134. Salazar E, Kuchipudi S V., Christensen PA, Eagar T, Yi X, Zhao P, Jin Z, Long SW, Olsen RJ, Chen J, et al. Convalescent plasma anti-SARS-CoV-2 spike protein ectodomain and receptor-binding domain IgG correlate with virus neutralization. *Journal of Clinical Investigation*. 2020;130:6728–6738. doi: 10.1172/JCI141206.
 135. Premkumar L, Segovia-Chumbez B, Jadi R, Martinez DR, Raut R, Markmann AJ, Cornaby C, Bartelt L, Weiss S, Park Y, et al. The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci Immunol*. 2020;5. doi: 10.1126/sciimmunol.abc8413.
 136. Shrock E, Fujimura E, Kula T, Timms RT, Lee I-H, Leng Y, Robinson ML, Sie BM, Li MZ, Chen Y, et al. Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and correlates of severity. *Science* (1979). 2020;370. doi: 10.1126/science.abd4250.
 137. Cao Y, Jian F, Wang J, Yu Y, Song W, Yisimayi A, Wang J, An R, Chen X, Zhang N, et al. Imprinted SARS-CoV-2 humoral immunity induces convergent Omicron RBD evolution. *Nature*. 2022; doi: 10.1038/s41586-022-05644-7.
 138. Dupont L, Snell LB, Graham C, Seow J, Merrick B, Lechmere T, Maguire TJA, Hallett SR, Pickering S, Charalampous T, et al. Neutralizing antibody activity in convalescent sera from infection in humans with SARS-CoV-2 and variants of concern. *Nat Microbiol*. 2021;6. doi: 10.1038/s41564-021-00974-0.
 139. Yazdani Z, Rafiei A, Yazdani M, Valadan R. Design an Efficient Multi-Epitope Peptide Vaccine Candidate Against SARS-CoV-2: An in silico Analysis. *Infect Drug Resist*. 2020;Volume 13:3007–3022. doi: 10.2147/IDR.S264573.
 140. Rakib A, Sami SA, Mimi NJ, Chowdhury MdM, Eva TA, Nainu F, Paul A, Shahriar A, Tareq AM, Emon NU, et al. Immunoinformatics-guided design of an epitope-based vaccine against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 spike glycoprotein. *Comput Biol Med*. 2020;124:103967. doi: 10.1016/j.combiomed.2020.103967.
 141. Musicò A, Frigerio R, Mussida A, Barzon L, Sinigaglia A, Riccetti S, Gobbi F, Piubelli C, Bergamaschi G, Chiari M, et al. SARS-CoV-2 Epitope Mapping on Microarrays Highlights Strong Immune-Response to N Protein Region. *Vaccines* (Basel). 2021;9:35. doi: 10.3390/vaccines9010035.
 142. Yarmarkovich M, Warrington JM, Farrel A, Maris JM. Identification of SARS-CoV-2 Vaccine Epitopes Predicted to Induce Long-Term Population-Scale Immunity. *Cell Rep Med*. 2020;1:100036. doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100036.

143. Zhang B, Hu Y, Chen L, Yau T, Tong Y, Hu J, Cai J, Chan K-H, Dou Y, Deng J, et al. Mining of epitopes on spike protein of SARS-CoV-2 from COVID-19 patients. *Cell Res.* 2020;30:702–704. doi: 10.1038/s41422-020-0366-x.
144. Liu Z, Xu W, Xia S, Gu C, Wang X, Wang Q, Zhou J, Wu Y, Cai X, Qu D, et al. RBD-Fc-based COVID-19 vaccine candidate induces highly potent SARS-CoV-2 neutralizing antibody response. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5:282. doi: 10.1038/s41392-020-00402-5.
145. Smith TRF, Patel A, Ramos S, Elwood D, Zhu X, Yan J, Gary EN, Walker SN, Schultheis K, Purwar M, et al. Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19. *Nat Commun.* 2020;11:2601. doi: 10.1038/s41467-020-16505-0.
146. Wall EC, Wu M, Harvey R, Kelly G, Warchal S, Sawyer C, Daniels R, Hobson P, Hatipoglu E, Ngai Y, et al. Neutralising antibody activity against SARS-CoV-2 VOCs B.1.617.2 and B.1.351 by BNT162b2 vaccination. *The Lancet.* 2021.
147. Wang Y, Liu M, Gao J. Enhanced receptor binding of SARS-CoV-2 through networks of hydrogen-bonding and hydrophobic interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117. doi: 10.1073/pnas.2008209117.
148. Cameroni E, Bowen JE, Rosen LE, Saliba C, Zepeda SK, Culap K, Pinto D, VanBlargan LA, De Marco A, di Iulio J, et al. Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 Omicron antigenic shift. *Nature.* 2022;602:664–670. doi: 10.1038/s41586-021-04386-2.
149. Wang P, Nair MS, Liu L, Iketani S, Luo Y, Guo Y, Wang M, Yu J, Zhang B, Kwong PD, et al. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature.* 2021;593. doi: 10.1038/s41586-021-03398-2.
150. Nitahara Y, Nakagama Y, Kaku N, Candray K, Michimuko Y, Tshibangu-Kabamba E, Kaneko A, Yamamoto H, Mizobata Y, Makeya H, et al. High-Resolution Linear Epitope Mapping of the Receptor Binding Domain of SARS-CoV-2 Spike Protein in COVID-19 mRNA Vaccine Recipients. *Microbiol Spectr.* 2021;9. doi: 10.1128/spectrum.00965-21. Cited in: : PMID: 34756082.
151. Li Y, Ma M liang, Lei Q, Wang F, Hong W, Lai D yun, Hou H, Xu Z wei, Zhang B, Chen H, et al. Linear epitope landscape of the SARS-CoV-2 Spike protein constructed from 1,051 COVID-19 patients. *Cell Rep.* 2021;34. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108915.
152. Yoshida S, Ono C, Hayashi H, Fukumoto S, Shiraishi S, Tomono K, Arase H, Matsuura Y, Nakagami H. SARS-CoV-2-induced humoral immunity through B cell epitope analysis in COVID-19 infected individuals. *Sci Rep.* 2021;11. doi: 10.1038/s41598-021-85202-9.

153. Gattinger P, Niespodziana K, Stiasny K, Sahanic S, Tulaeva I, Borochova K, Dorofeeva Y, Schlederer T, Sonnweber T, Hofer G, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 requires antibodies against conformational receptor-binding domain epitopes. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2022;77. doi: 10.1111/all.15066.
154. Kim S, Liu Y, Ziarnik M, Seo S, Cao Y, Zhang XF, Im W. Binding of human ACE2 and RBD of Omicron enhanced by unique interaction patterns among SARS-CoV-2 variants of concern. *J Comput Chem*. 2023;44:594–601. doi: 10.1002/jcc.27025.
155. Hansen J, Baum A, Pascal KE, Russo V, Giordano S, Wloga E, Fulton BO, Yan Y, Koon K, Patel K, et al. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. *Science* (1979). 2020;369. doi: 10.1126/science.abd0827.
156. Wu Y, Wang F, Shen C, Peng W, Li D, Zhao C, Li Z, Li S, Bi Y, Yang Y, et al. A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2. *Science* (1979). 2020;368:1274–1278. doi: 10.1126/science.abc2241.
157. Chen RE, Zhang X, Case JB, Winkler ES, Liu Y, VanBlargan LA, Liu J, Errico JM, Xie X, Suryadevara N, et al. Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies. *Nat Med*. 2021;27. doi: 10.1038/s41591-021-01294-w.
158. Wang R, Zhang Q, Ge J, Ren W, Zhang R, Lan J, Ju B, Su B, Yu F, Chen P, et al. Analysis of SARS-CoV-2 variant mutations reveals neutralization escape mechanisms and the ability to use ACE2 receptors from additional species. *Immunity*. 2021;54. doi: 10.1016/j.immuni.2021.06.003.
159. Wang Z, Schmidt F, Weisblum Y, Muecksch F, Barnes CO, Finkin S, Schaefer-Babajew D, Cipolla M, Gaebler C, Lieberman JA, et al. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature*. 2021;592:616–622. doi: 10.1038/s41586-021-03324-6.
160. Avanzato VA, Matson MJ, Seifert SN, Pryce R, Williamson BN, Anzick SL, Barbian K, Judson SD, Fischer ER, Martens C, et al. Case Study: Prolonged Infectious SARS-CoV-2 Shedding from an Asymptomatic Immunocompromised Individual with Cancer. *Cell*. 2020;183:1901-1912.e9. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.049.
161. Choi B, Choudhary MC, Regan J, Sparks JA, Padera RF, Qiu X, Solomon IH, Kuo H-H, Boucau J, Bowman K, et al. Persistence and Evolution of SARS-CoV-2 in an Immunocompromised Host. *New England Journal of Medicine*. 2020;383:2291–2293. doi: 10.1056/NEJMc2031364.

162. Kemp SA, Collier DA, Datir RP, Ferreira IATM, Gayed S, Jahun A, Hosmillo M, Rees-Spear C, Mlcochova P, Lumb IU, et al. SARS-CoV-2 evolution during treatment of chronic infection. *Nature*. 2021;592:277–282. doi: 10.1038/s41586-021-03291-y.
163. Resende PC, Bezerra JF, Vasconcelos RHT de, Arantes I, Appolinario L, Mendonça AC, Paixao AC, Rodrigues ACD, Silva T, Rocha AS, et al. Spike E484K mutation in the first SARS-CoV-2 reinfection case confirmed in Brazil, 2020. <https://virological.org/t/spike-e484k-mutation-in-the-first-sars-cov-2-reinfection-case-confirmed-in-brazil-2020/584>. 2021.
164. Naveca F, Costa C da, Nascimento V, Souza V, Corado A, Nascimento F, Costa Á, Duarte D, Silva G, Mejía M, et al. SARS-CoV-2 reinfection by the new Variant of Concern (VOC) P.1 in Amazonas, Brazil. <https://virological.org/t/sars-cov-2-reinfection-by-the-new-variant-of-concern-voc-p-1-in-amazonas-brazil/596>. 2021.
165. DAVENPORT FM, HENNESSY A V., FRANCIS T. Epidemiologic and immunologic significance of age distribution of antibody to antigenic variants of influenza virus. *J Exp Med*. 1953;98. doi: 10.1084/jem.98.6.641.
166. Yaugel-Novoa M, Bourlet T, Paul S. Role of the humoral immune response during COVID-19: guilty or not guilty? *Mucosal Immunol*. 2022;15:1170–1180. doi: 10.1038/s41385-022-00569-w.
167. Farkash I, Feferman T, Cohen-Saban N, Avraham Y, Morgenstern D, Mayuni G, Barth N, Lustig Y, Miller L, Shouval DS, et al. Anti-SARS-CoV-2 antibodies elicited by COVID-19 mRNA vaccine exhibit a unique glycosylation pattern. *Cell Rep*. 2021;37:110114. doi: 10.1016/j.celrep.2021.110114.
168. Chakraborty S, Gonzalez JC, Sievers BL, Mallajosyula V, Chakraborty S, Dubey M, Ashraf U, Cheng BY-L, Kathale N, Tran KQT, et al. Early non-neutralizing, afucosylated antibody responses are associated with COVID-19 severity. *Sci Transl Med*. 2022;14. doi: 10.1126/scitranslmed.abm7853.
169. Kaplonek P, Cizmeci D, Fischinger S, Collier A, Suscovich T, Linde C, Broge T, Mann C, Amanat F, Dayal D, et al. mRNA-1273 and BNT162b2 COVID-19 vaccines elicit antibodies with differences in Fc-mediated effector functions. *Sci Transl Med*. 2022;14. doi: 10.1126/scitranslmed.abm2311.
170. Wang Q, Bowen A, Valdez R, Gherasim C, Gordon A, Liu L, Ho DD. Antibody Response to Omicron BA.4–BA.5 Bivalent Booster. *New England Journal of Medicine*. 2023;388:567–569. doi: 10.1056/NEJMc2213907.
171. Ju B, Fan Q, Wang M, Liao X, Guo H, Wang H, Ge X, Liu L, Zhang Z. Antigenic sin of wild-type SARS-CoV-2 vaccine shapes poor cross-neutralization of BA.4/5/2.75

subvariants in BA.2 breakthrough infections. *Nat Commun* [Internet]. 2022;13:7120. doi: 10.1038/s41467-022-34400-8.

172. Lee I-J, Sun C-P, Wu P-Y, Lan Y-H, Wang I-H, Liu W-C, Yuan JP-Y, Chang Y-W, Tseng S-C, Tsung S-I, et al. A booster dose of Delta × Omicron hybrid mRNA vaccine produced broadly neutralizing antibody against Omicron and other SARS-CoV-2 variants. *J Biomed Sci*. 2022;29:49. doi: 10.1186/s12929-022-00830-1.

10. ANEXOS

Anexo A. Sequência dos peptídeos sintetizados no *array*.

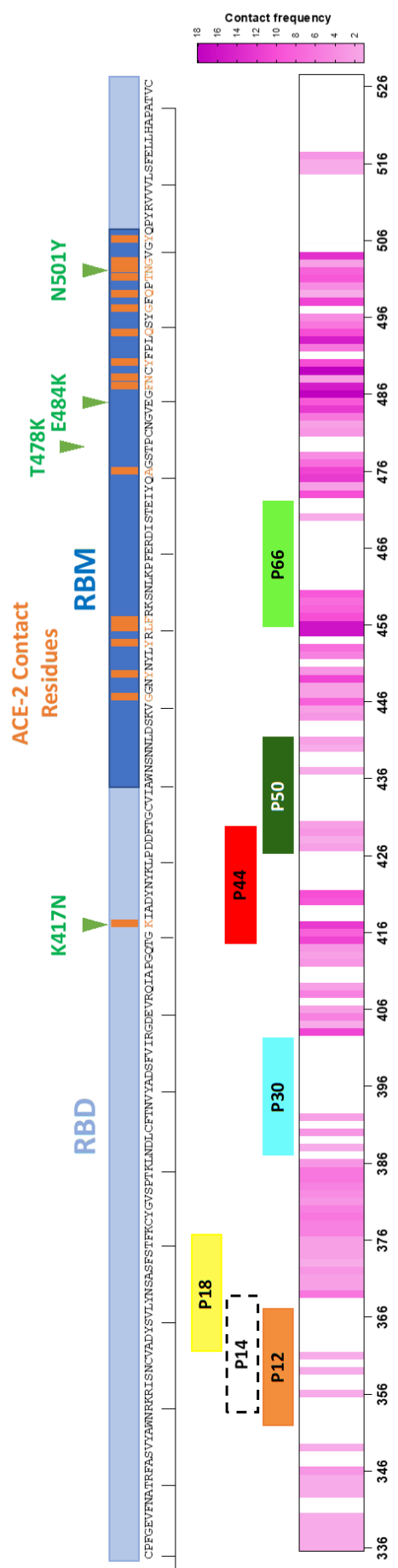
Sequência	ID do peptídeo
GGSGSGSRVQPTES	-8
SGSGSRVQPTESIV	-7
SGSRVQPTESIVRF	-6
SGRVQPTESIVRFPN	-5
RVQPTESIVRFPNIT	-4
QPTESIVRFPNITNL	-3
TESIVRFPNITNLCP	-2
SIVRFPNITNLCPFG	-1
VRFPNITNLCPFGEV	0
FPNITNLCPFGEVFN	1
NITNLCPFGEVFNAT	2
TNLCPFGEVFNATRF	3
LCPFGEVFNATRFAS	4
PFGEVFNATRFASVY	5
GEVFNATRFASVYAW	6
VFNATRFASVYAWNR	7
NATRFASVYAWNRKR	8
TRFASVYAWNRKRIS	9
FASVYAWNRKRISNC	10
SVYAWNRKRISNCVA	11
YAWNRKRISNCVADY	12
WNRKRISNCVADYSV	13
RKRISNCVADYSVLY	14
RISNCVADYSVLYNS	15
SNCVADYSVLYNSAS	16
CVADYSVLYNSASF	17
ADYSVLYNSASFSTF	18
YSVLYNSASFSTFKC	19
VLYNSASFSTFKCYG	20
YNSASFSTFKCYGVS	21
SASFSTFKCYGVSPT	22
SFSTFKCYGVSPTKL	23
STFKCYGVSPTKLND	24

FKCYGVSPTKLNDC	25
CYGVSPKLNDCFT	26
GVSPKLNDCFTNV	27
SPTKLNDCFTNVYA	28
TKLNDCFTNVYADS	29
LNDCFTNVYADSFV	30
DLCFTNVYADSFVIR	31
CFTNVYADSFVIRGD	32
TNVYADSFVIRGDEV	33
VYADSFVIRGDEVRQ	34
ADSFVIRGDEVRQIA	35
SFVIRGDEVRQIAPG	36
VIRGDEVRQIAPGQT	37
RGDEVRQIAPGQTGK	38
DEVRQIAPGQTGKIA	39
VRQIAPGQTGKIADY	40
QIAPGQTGKIADYNY	41
APGQTGKIADYNYKL	42
GQTGKIADYNYKLPD	43
TGKIADYNYKLPDDF	44
KIADYNYKLPDDFTG	45
ADYNYKLPDDFTGCV	46
YNYKLPDDFTGCVIA	47
YKLPDDFTGCVIAWN	48
LPDDFTGCVIAWNSN	49
DDFTGCVIAWNSNNL	50
FTGCVIAWNSNNLDS	51
GCVIAWNSNNLDSKV	52
VIAWNSNNLDSKVGG	53
AWNSNNLDSKVGGNY	54
NSNNLDSKVGGNYNY	55
NNLDSKVGGNYNYLY	56
LDSKVGGNYNYLYRL	57
SKVGGNYNYLYRLFR	58
VGGNYNYLYRLFRKS	59
GNVNYLYRLFRKSNL	60
YNYLYRLFRKSNLKP	61
YLYRLFRKSNLKPFE	62
YRLFRKSNLKPFERD	63
LFRKSNLKPFERDIS	64
RKSNLKPFERDISTE	65
SNLKPFERDISTEY	66
LKPFERDISTEYQA	67
PFERDISTEYQAGS	68

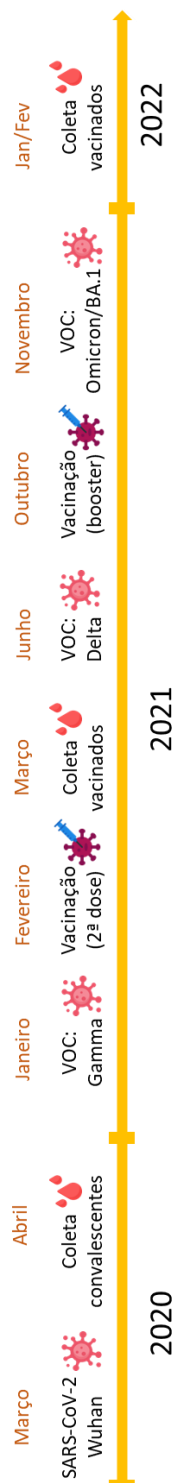
ERDISTEIQAGSTP	69
DISTEIQAGSTPCN	70
STEIQAGSTPCNGV	71
EIQAGSTPCNGVEG	72
YQAGSTPCNGVEGFN	73
AGSTPCNGVEGFNCY	74
STPCNGVEGFNCYFP	75
PCNGVEGFNCYFPLQ	76
NGVEGFNCYFPLQSY	77
VEGFNCYFPLQSYGF	78
GFNCYFPLQSYGFQP	79
NCYFPLQSYGFQPTN	80
YFPLQSYGFQPTNGV	81
PLQSYGFQPTNGVGY	82
QSYGFQPTNGVGYQP	83
YGFQPTNGVGYQPYPYR	84
FQPTNGVGYQPYPYRVV	85
PTNGVGYQPYPYRVVVL	86
NGVGYQPYPYRVVLSF	87
VGYQPYPYRVVLSFEL	88
YQPYPYRVVLSFELLH	89
PYRVVLSFELLHAP	90
RVVLSFELLHAPAT	91
VVLSFELLHAPATVC	92
LSFELLHAPATVCGP	93
FELLHAPATVCGPKK	94
LLHAPATVCGPKKST	95
HAPATVCGPKKSTNL	96
PATVCGPKKSTNLVK	97
TVCGPKKSTNLVKNK	98
CGPKKSTNLVKNKCV	99
PKKSTNLVKNKCVNF	100
KSTNLVKNKCVNFGS	101
TNLVKNKCVNFGSGS	102
LVKNKCVNFGSGSGS	103
VKNKCVNFGSGSGSG	104

Anexo B. Sequência linear da proteína RBD mostrando a região RBM com foco nos resíduos de contato com o receptor ECA2. Os 8 peptídeos imunodominantes IgG/IgA (P6, P12, P14,

P18, P30, P44, P50 e P66) são evidenciados de acordo com suas posições nos resíduos da RBD. O *heatmap* rosa representa a frequência na qual os nAbs contatam cada aminoácido.



Anexo C. Linha do tempo do SARS-CoV-2, evidenciando as épocas de surgimento de variantes, vacinações e coleta de amostras.



Linha do tempo do SARS-CoV-2 e da vacinação no Brasil (sem escala)

Anexo D. Descrição dos peptídeos lineares encontrados nos convalescentes.

Descrição dos Peptídeos Lineares Imunogênicos do SARS-CoV-2								
ID peptídeo	Sequência	% Reconhecimento Global	Sequencia Reportada Predita	Origem	Score de Antigenicidade	Toxicidade	Alergenicidade	Fonte
3	GSGCPFGEVFNATRF	33,3	CPFGEVFNATRF	RBD	0.0965	Não-tóxico	Alérgeno	ABCPRED
			PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVA	RBD	0.4113	Não-tóxico	Não-alérgeno	Elipro
			PNITNLCPFGEVFNATRFAS	RBD	0.5575	Não-tóxico	Alérgeno	ABCPRED
			LCPFGEVFNATRFASVYAWN	RBD	0.1673	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			PNITNLCPFGEVFNATRF	RBD	0.6006	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			NITNLCPFGEVFNATRF	RBD	0.611	Toxina	Não-alérgeno	ABCPRED
			TNLCPFGEVFNATRF	RBD	0.388	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVA	RBD	0.4113	Não-tóxico	Não-alérgeno	Elipro
12	YAWNRKRISNCVADY	33,3	TNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADY	RBD	0.2542	NS	Alérgeno	Elipro
			YAWNRKRISNCVADYS	RBD	0.2628	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			SVYAWNRKRISNCVADYS	RBD	0.2293	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			VYAWNRKRISNCVADYSV	RBD	0.1551	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			VYAWNRKRISNCVADYSVLY	RBD	0.1216	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			ATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTF	RBD	0.4565	NS	Alérgeno	Elipro
			TNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADY	RBD	0.2542	NS	Alérgeno	Elipro
14	RKISNCVADYSVLY	55,5	ASVYAWNRKRISNCVADY	RBD	0.1958	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			NRKRISNCVADYSVLYNSAS	RBD	0.0274	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			VYAWNRKRISNCVADYSVLY	RBD	0.1216	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			ATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTF	RBD	0.4565	NS	Alérgeno	Elipro
			NRKRISNCVADYSVLYNS	RBD	0.0152	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			NRKRISNCVADYSVLY	RBD	0.0823	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			RKRISNCVADYSVLYN	RBD	-0,0708	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			RKRISNCVADYSVLYNSA	RBD	-0,0939	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED, FBCPred
18	ADYSVLYNSASFSTF	36,5	AWNRKRISNCVADYSVLY	RBD	0.2161	Toxina	Alérgeno	ABCPRED
			AWNRKRISNCVADYSVLYNS	RBD	0.1387	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			ADYSVLYNSASFSTF	RBD	NS	NS	NS	Rakib <i>et al.</i>
			VADYSVLYNSASFSTFK	RBD	0.1972	Não-tóxico	Alérgeno	ABCPRED
			ATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTF	RBD	0.4565	NS	Alérgeno	Elipro
			SNCVADYSVLYNSASFSTFK	RBD	-0,0103	Não-tóxico	Alérgeno	ABCPRED
18	ADYSVLYNSASFSTF	36,5	CVADYSVLYNSASFSTFK	RBD	0.0657	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			NCVADYSVLYNSASFSTF	RBD	0.0071	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED

30	LNDLCFTNVYADSFV	61,9	SPTKLNLCFTNVYADSFVI	RBD	0.9482	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			PTKLNLCFTNVYADSFVIR	RBD	0.9772	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			YGVSPKLNLCFTNVYADSFV	RBD	1.404	Não-tóxico	Alérgeno	BCPREDS
			TKLNLCFTNVYADSFVIRG	RBD	1.049	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			KLNDLCFTNVYADSFVIR	RBD	1.069	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			TKLNLCFTNVYADSFVI	RBD	1.027	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			KLNDLCFTNVYADSFVIRGD	RBD	0.932	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
44	TGKIADYNYKLPDDF	73,0	LNDLCFTNVYADSFVIRG	RBD	0.7651	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			YNYKLPDDFTGCVIA	RBD	0.7009	Não-tóxico	Não-alérgeno	Trevor <i>et al.</i>
			APGQTGKIADYNYKLPDDFT	RBD	1.042	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED, IEDB
			DEVQRJAPGQTGKIADYNYKLPDDFT	RBD	0.9773	Não-tóxico	Não-alérgeno	Li <i>et al.</i>
			IAPGQTGKIADYNYKLPDDFTG	RBD	1.131	Toxina	Alérgeno	BCPREDS
			PGQTGKIADYNYKLPDDFTG	RBD	1.012	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			TGKIADYNYKLPDDFT	RBD	0.9642	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			QTGKIADYNYKLPDDFTGCV	RBD	0.6255	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			DEVQRJAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGKKK	RBD	1.041	Não-tóxico	Não-alérgeno	Li <i>et al.</i>
			TGKIADYNYKLPDDFTGCVI	RBD	0.5848	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			QTGKIADYNYKLPDDF	RBD	0.986	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			GQTGKIADYNYKLPDDFT	RBD	1.056	Não-tóxico	Alérgeno	ABCPRED
			TGKIADYNYKLPDDFTGC	RBD	0.6148	Não-tóxico	Alérgeno	ABCPRED
			50	DDFTGCVIAWNSNNL	31,7	DDFTGCVIAWNSNNL	RBD	NS
DDFTGCVIAWNSNNLDSK	RBD	0.3503				Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED, FBCPred
KIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVG	RBD	0.7009				Não-tóxico	Não-alérgeno	Yazdani <i>et al.</i>
KLPDDFTGCVIAWNSNNLDS	RBD	0.0285				Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
YKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSK	RBD	0.2192				Não-tóxico	Alérgeno	FBCPred
GKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSYNYLYR	RBD	0.4477				NS	Alérgeno	Elipro
PDDFTGCVIAWNSNNL	RBD	0.1077				Não-tóxico	Não-alérgeno	FBCPred
LPDDFTGCVIAWNSNNLDSK	RBD	0.2532				Não-tóxico	Não-alérgeno	FBCPred
PDDFTGCVIAWNSNNLDS	RBD	0.1508				Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED, BCPREDS
66	SNLKPFFERDISTEY	39,6	KLPDDFTGCVIAWNSNNL	RBD	-0,0227	Não-tóxico	Alérgeno	ABCPRED
			SNLKPFFERDISTEY	RBM	NS	NS	NS	Musico <i>et al.</i>
			KSNLKPFFERDISTEYQAGS	RBM	0.2212	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			VGGNYNYLYRFRKSNLKPFFERDISTEYQAGS	RBM	0.1172	Não-tóxico	Não-alérgeno	Yamarkovich <i>et al.</i>
			RFRKSNLKPFFERDISTEY	RBM	-0,0299	Não-tóxico	Não-alérgeno	ABCPRED
			VGGNYNYLYRFRKSNLKPFFERDISTEYQAGSTPC	RBM	0.21	Não-tóxico	Não-alérgeno	Li <i>et al.</i>
			SNLKPFFERDISTEYQAGST	RBM	0.82	Não-tóxico	Alérgeno	ABCPRED, Vashi <i>et al.</i>
			YRFRKSNLKPFFERDISTEYQAGSTPCNGVEGFN	RBM	0.3951	NS	Não-alérgeno	IEDB
			FRKSNLKPFFERDISTEY	RBM	0.2315		Alérgeno	ABCPRED
			RKSNLKPFFERDISTEYQ	RBM	0.2263	Não-tóxico	Alérgeno	ABCPRED
KSNLKPFFERDISTEYQA	RBM	0.2293	Não-tóxico	Alérgeno	ABCPRED			

