

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
MARIA LUISA TERRIBILE BUDEL

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE POLIHIDROXIBUTIRATO CARREGADAS
COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO VÍRUS SARS-CoV-2

CURITIBA
2022

MARIA LUISA TERRIBILE BUDEL

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS DE POLIHIDROXIBUTIRATO CARREGADAS
COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO VÍRUS SARS-CoV-2

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciência Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Budel, Maria Luisa Terribile.

Desenvolvimento de nanopartículas de polihidróxibutirato carregadas com proteínas recombinantes do vírus SARS-CoV-2. / Maria Luisa Terribile Budel. – Curitiba, 2022.
1 recurso on-line : PDF.

Orientador: Marcelo Müller dos Santos.

Coorientador: Emanuel Maltempi de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. COVID-19 (doença). 2. SARS-CoV-2. 3. Nanopartículas. 4. Polímeros. 5. Bactérias.
I. Título. II. Santos, Marcelo Müller dos. III. Souza, Emanuel Maltempi de. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARIA LUISA TERRIBILE BUDEL** intitulada: **Desenvolvimento de nanopartículas de polihidróxibutirato carregadas com proteínas recombinantes do vírus SARS-CoV-2**, sob orientação do Prof. Dr. MARCELO MÜLLER DOS SANTOS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Abril de 2022.

Assinatura Eletrônica

29/04/2022 10:36:06.0

MARCELO MÜLLER DOS SANTOS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

30/05/2022 15:23:07.0

WANDERSON DUARTE DA ROCHA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/06/2022 16:27:40.0

DAYANE ALBERTON

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 179612

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 179612

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Almir e Edite, por todo apoio, amor, confiança, e por sempre estarem ao meu lado independente das minhas escolhas. Vocês são minha referência de felicidade, amor e sucesso em todos os aspectos da vida.

Ao meu irmão Vinicius, por toda irritação e exemplo que sempre me impulsionaram a ir mais longe.

A minha sobrinha Vitória, que todos os dias com sua curiosidade me impulsiona a aprender ainda mais, além de todo o amor e luz que transbordam dela que me preenchem.

Aos meus avós Adilceo, Roza, Dileta (*in memoriam*) e Cláudio que sempre acreditaram em mim e são minha base para tudo. Em especial meu vô Adilceo, que todos os dias, mesmo agora com sua “presença ausente”, me ajudou a buscar ser melhor e nunca desistir dos meus sonhos.

Ao meu orientador Professor Dr. Marcelo Müller dos Santos, que me deu a oportunidade de iniciar na carreira científica, me ensinou, incentivou a buscar cada vez mais conhecimento, e pelas conversas que mesmo fora do âmbito acadêmico sempre foram enriquecedoras. Obrigada!

Ao meu coorientador Professor Dr. Emanuel Maltempi de Souza, pela oportunidade, pelos ensinamentos e por todas as sugestões e incentivo neste trabalho.

À Professora Lucimara Stolz Roman e a Doutoranda Maiara de Jesus Bassi do Departamento de Física da UFPR, por toda a ajuda nos experimentos de AFM e pelas discussões sempre enriquecedoras.

Ao Professor Breno Castello Branco Beirão e toda sua equipe do Departamento de Patologia Básica, que me ajudaram com os experimentos de ELISA e também com os ensaios de imunizações.

Ao Professor Guilherme Lanzi Sasaki, pela ajuda nos experimentos de RMN e GC-MS e também pelas sugestões nas “conversas de corredor”.

À Professora Fabiane Gomes de Moraes Rego do Departamento de Análises Clínicas da UFPR e ao Professor Alexander Welker Biondo do Departamento de Medicina Veterinária da UFPR, pelo fornecimento das amostras de soro que foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu amigo Dr. Luis Paulo Silveira Alves, que desde a iniciação científica teve paciência para me ensinar o básico, como o “preparo” até técnicas de clonagem e quantificação de PHB. E também ao longo desses dois anos de mestrado, por ter me ajudado em diversos experimentos, incentivado a não desistir a cada resultado errado ou inesperado e ter me falado para tentar de novo ou “em paralelo”, sem desistir de mim. E principalmente pela sua amizade, que me é tão cara.

À minha amiga e companheira de projeto Dr^a Maritza Araujo Todo Bom, pela amizade, paciência e ajuda em vários experimentos. Agradeço também pelo auxílio com os gráficos de box plot apresentados nessa dissertação.

À minha amiga Isabela Rodrigues, pela ajuda nos experimentos de purificação de proteína, nos quais me ajudava desde o planejamento até na parte de lavar as vidrarias, e por todo amor, amizade e acolhimento que recebi de você, com certeza me fez chegar até aqui.

Ao amigo Thiago Apolônio, por toda paciência, disponibilidade e ajuda nos experimentos de Western Blot.

Aos meus amigos cientistas Marcos Andrei de Almeida Barbosa, Monike Felipe Gomes, Carolina “Carol” Maria da Silva Castro, Marcos Damrley Galvão da Luz por todo acolhimento, companheirismo, amor e força durante todo o período de mestrado e de pandemia, no qual foram meus alicerces dentro do laboratório e a própria felicidade e liberdade fora dele.

Aos amigos do laboratório 279, André Sampaio, Fernanda Pinhelli, Manuel Piñero Gavídia e Ryu Massaki por toda amizade e por todos os conhecimentos compartilhados.

À minha amiga Dra. Fernanda Gravina pelo apoio no início do meu mestrado, nos momentos mais complicados da pandemia, por segurar minha “barra”, e pela paciência em discussões científicas mesmo a distância.

A todos os amigos do anexo e dos laboratórios 271, 272 e 275 por toda ajuda e troca.

Aos técnicos do grupo NFN, Dona Roseli Prado e Valter Antonio de Baura por toda paciência, acolhimento e boa vontade em ajudar a sanar todas as minhas dúvidas e contribuir profundamente para a minha formação.

Ao técnico Dr. Arquimedes Santana, pela ajuda e disponibilidade em vários experimentos, discussão de resultados e as boas risadas que todas as conversas proporcionavam.

A todos os professores e alunos do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, principalmente do Núcleo de Fixação de Nitrogênio.

Aos meus amigos de graduação GRR2015, por todos os momentos que compartilhamos, por me apoiarem e me ajudarem a sempre ver o lado bom das coisas. Sempre serei grata a UFPR pela sorte de ter encontrado vocês.

Aos meus amigos da vida toda, que me escutaram reclamar das minhas dificuldades com experimentos, relatórios, apresentações e essa dissertação, sem compreender de todo o que eu dizia, mas que me acolheram e me incentivaram a não desistir dos meus sonhos. Principalmente a Ana Kappes, Jo Amaral e Ana Ercole, a minha caminhada tem sido mais feliz com vocês.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica) pela oportunidade.

Às agências financiadoras CAPES e CNPq.

Por fim a Universidade Federal do Paraná e seus docentes pela oportunidade de aprender e de continuar buscando cada vez mais conhecimento.

” A vida é um desencontrar-se consigo mesmo.” (Álvaro de Campos, Livro de Versos)

RESUMO

A rápida disseminação da doença COVID-19 ao redor do mundo levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarar uma pandemia em março de 2020. Até o início desse projeto em maio de 2020 não havia nenhum tratamento terapêutico disponível para combater o novo coronavírus, evidenciando assim a urgência no desenvolvimento de uma vacina, que foi atingido em dezembro de 2020 com as primeiras doses da vacina da Pfizer - BioNTech sendo aplicadas em cidadãos do Reino Unido. O principal alvo para o desenvolvimento da vacina contra a COVID-19 é a utilização da glicoproteína Spike, que através do domínio de ligação ao receptor celular (RBD) interage com a enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2) do hospedeiro. O uso de nanopartículas como um sistema de entrega de antígeno e imunização vem recebendo grande atenção. O polímero bacteriano denominado polihidroxibutirato (PHB), destaca-se como uma alternativa para a síntese de nanopartículas funcionalizadas para produção de vacinas, visto que micropartículas de PHB carreando antígenos em sua superfície foram utilizadas com sucesso para a imunização de camundongos contra tuberculose e hepatite C. O objetivo desse trabalho foi produzir de forma econômica e sustentável nanopartículas funcionalizadas de PHB com antígenos do vírus SARS-CoV-2, com o intuito de desenvolver novas técnicas de imunodiagnóstico e vacinas. Para isso foram construídos 2 plasmídeos tendo como base o vetor pET29b com cauda de 6-histidinas na porção N-terminal: o plasmídeo N-SBD com a sequência da proteína do nucleocapsídeo (N) de SARS-CoV-2 e o outro plasmídeo RBD-SBD com a sequência do domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína Spike do SARS-CoV-2, as duas construções foram planejadas para conter a sequência do domínio de ligação do substrato (SBD) da PHB depolimerase de *Alcaligenes faecalis* como uma tag de ancoragem das proteínas expressas nas nanopartículas de PHB. As proteínas foram superexpressas em *Escherichia coli* BL21(DE3). A proteína RBD-SBD foi purificada através da extração dos corpos de inclusão, já a proteína N-SBD foi purificada por cromatografia de afinidade a Ni²⁺. As nanopartículas de PHB foram produzidas através do método de nanoprecipitação por diálise lenta contra água ultrapura. As nanopartículas de PHB conjugadas com as proteínas recombinantes foram aplicadas em ensaios de Western blot e ELISA para confirmar a capacidade de serem reconhecidas por anticorpos anti-Spike e anti-N. Ensaios de imobilização com 15 µg das proteínas RBD-SBD e N-SBD nas nanopartículas de PHB confirmaram a ligação do domínio SBD nas nanopartículas de PHB. As proteínas RBD-SBD e N-SBD foram utilizadas como antígeno em ensaios de ELISA com amostras de soros diluídas em 1:2.000. Nos ensaios com a proteína RBD-SBD as amostras de soro negativo para COVID-19 apresentaram valores de fluorescência a 450 nm de 0,25, e para as amostras de soro positivo para COVID-19 apresentaram valores de fluorescência a 450 nm de 1,1. Nos ELISA com a proteína N-SBD as amostras de soro negativo para COVID-19 apresentaram valores de fluorescência a 450 nm de 0,10, e para as amostras de soro positivo para COVID-19 apresentaram valores de fluorescência a 450 nm de 0,7.

Palavras-chave: COVID-19. SARS-CoV-2. Nanopartículas. Polihidroxibutirato (PHB).

ABSTRACT

The rapid spread of the COVID-19 disease around the world led the World Health Organization (WHO) to declare a pandemic in March 2020. Until the start of this work in May 2020, there was no therapeutic treatment available to combat the new coronavirus, thus highlighting the urgency in the development of a vaccine, which was reached in December 2020 with the first doses of the Pfizer – BioNTech vaccine being administered to UK citizens. The main target for development of the vaccine against COVID-19 is the use of Spike glycoprotein, which, through the cellular receptor binding domain (RBD) interacts with the host's angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). The use of nanoparticles as an antigen delivery and immunization system has received great attention. The bacterial polymer called polyhydroxybutyrate (PHB) stands out as an alternative for the synthesis of functionalized nanoparticles for vaccine production, whereas PHB microparticles carrying antigens on their surface were successfully used to immunize mice against tuberculosis and hepatitis C. The objective of this work was to economically and sustainably produce functionalized PHB nanoparticles with SARS-CoV-2 virus antigens, in order to develop new immunoassay and vaccine techniques. For this, 2 plasmids were constructed based on the pET29b vector with a 6-His tag in the N-terminal portion: the N-SBD plasmid with the nucleocapsid protein (N) sequence of SARS-CoV-2 and the other RBD-SBD plasmid with the receptor binding domain (RBD) sequence of the Spike protein of SARS-CoV-2, the two constructs were designed to contain the substrate binding domain (SBD) sequence of the PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* as an anchor tag of proteins expressed in PHB nanoparticles. Proteins were overexpressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). The RBD-SBD protein was purified by extraction of inclusion bodies, while the N-SBD protein was purified by Ni²⁺ affinity chromatography. PHB nanoparticles were produced by slow dialysis nanoprecipitation method against ultrapure water. PHB nanoparticles conjugated to recombinant proteins were applied in Western blot and ELISA assays to confirm the ability to be recognized by anti-Spike and anti-N antibodies. Immobilization assays with 15 µg of RBD-SBD and N-SBD proteins on PHB nanoparticles confirmed the binding of SBD domain on PHB nanoparticles. The RBD-SBD and N-SBD proteins were used as antigen in ELISA assays with serum samples diluted 1: 2.000. In assays with the RBD-SBD protein, serum samples negative for COVID-19 showed fluorescence values at 450 nm of 0,25, and for samples of positive serum for COVID-19, they showed fluorescence values at 450 nm of 1,1. In the ELISA with N-SBD protein, The negative serum samples for COVID-19 showed fluorescence values at 450 nm of 0,10, and for the positive serum samples for COVID-19, they presented fluorescence values at 450 nm of 0,7.

Keywords: COVID-19. SARS-CoV-2. Nanoparticles. Polyhydroxybutyrate (PHB).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Representação genérica da morfologia do vírus SARS-CoV-2 com as suas principais proteínas (PEIRIS et al., 2004).	21
Figura 2 - Organização do monômero da proteína Spike do SARS-CoV-2.	22
Figura 3 - Estrutura geral do RBD de SARS-CoV-2 ligado a enzima ACE2 (LAN et al, 2020). ..	22
Figura 4 - Organização dos domínios da proteína N do SARS-CoV-2.	23
Figura 5 - Eletromicrografia de transmissão dos grânulos de PHB no interior das células de <i>H. seropedicae</i> (ALVES et al., 2016).	24
Figura 6 - Estrutura geral do polihidroxialcanoato e suas variações conforme o tamanho da sua cadeia lateral (MARVI et al., 2013).	25
Figura 7 - Via de biossíntese do PHB em bactérias.	26
Figura 8 – Modelo do grânulo do PHB de <i>R. eutropha</i> H16 com as suas proteínas associadas (MÜLLER-SANTOS et al., 2020).	26
Figura 9 - Modelo esquemático da enzima PHB depolimerase, mostrando a interação do SBD com o PHB (adaptado de HIRAIISHI et al, 2006).	28
Figura 10 - Eletroforese SDS-PAGE das frações da expressão do domínio RBD de SARS-CoV-2 com cauda SBD em <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).	45
Figura 11 – Eletroforese SDS-PAGE da fração do domínio RBD de SARS-CoV-2 com cauda SBD recuperada dos corpos de inclusão.	47
Figura 12 - Eletroforese SDS-PAGE das frações de expressão da proteína N de SARS-CoV-2 com cauda SBD em <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).	48
Figura 13 - Eletroforese SDS-PAGE das frações da purificação da proteína N de SARS-CoV-2 com cauda SBD.	49
Figura 14 - Eletroforese SDS-PAGE da proteína N de SARS-CoV-2 com cauda SBD após a purificação por cromatografia de afinidade.	49
Figura 15 - Eletroforese SDS-PAGE das frações de expressão das proteínas sfGFP e mRFP com cauda SBD em <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).	50
Figura 16 - Eletroforese SDS-PAGE das frações da purificação por cromatografia de afinidade das proteínas sfGFP e mRFP com cauda SBD.	51
Figura 17 - Eletroforese SDS-PAGE das proteínas sfGFP e mRFP com cauda SBD após diálise.	52
Figura 18 - Eletroforese SDS-PAGE das frações da imobilização das proteínas recombinantes RBD-SBD e N-SBD de SARS-CoV-2 com cauda SBD e sfGFP-SBD.	53

Figura 19 – Imagens topográficas em 2D das nanopartículas de PHB obtidas através de microscopia de força atômica em diferentes temperaturas de secagem em estufa.	54
Figura 20 - Imagens topográficas em 2D das nanopartículas de PHB obtidas através de microscopia de força atômica utilizando diferentes métodos de secagem.	55
Figura 21 – Imunodeteção da proteína RBD-SBD por Western Blot.....	56
Figura 22 - Imunodeteção da proteína N-SBD por Western Blot.	57
Figura 23 - ELISA com a proteína RBD-SBD de SARS-CoV-2 como antígeno.....	58
Figura 24 - Comparação entre o Kit Comercial de ELISA e o ensaios com o antígeno RBD-SBD de SARS-CoV-2.....	60
Figura 25 - ELISA indireto utilizando a proteína RBD-SBD imobilizada em nanopartículas de PHB.	61
Figura 26 - ELISA indireto utilizando a proteína RBD-SBD imobilizada em nanopartículas de PHB.	62
Figura 27 - ELISA com a proteína N-SBD de SARS-CoV-2 como antígeno.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estirpes bacterianas e Plasmídeos.....	31
Tabela 2. Oligonucleotídeos de DNA utilizados nesse estudo.....	32
Tabela 3 - Anticorpos utilizados nesse estudo.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AFM - Microscopia de força atômica

Amp - Ampicilina

BSA - Albumina de soro bovino

D.O. - Densidade Ótica

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimático

GG – Estratégia de clonagem *Golden Gate*

IPTG - isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

Km – Canamicina

N – Proteína do Nucleocapsídeo do SARS-CoV-2

NPs - Nanopartículas

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PHA - Polohidroxicanoatos

PHB - Polihidroxibutirato

RBD – *Receptor Binding Domain*

r.p.m. – Rotação por minuto

S – Proteína *Spike* do SARS-CoV-2

SBD - *Substrate Binding Domain*

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante

TMB - 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 JUSTIFICATIVA.....	18
1.2 OBJETIVOS.....	19
1.2.1 Objetivos específicos	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 COVID-19	20
2.2 PROTEÍNA SPIKE E A INTERAÇÃO COM ECAII.....	21
2.3 PROTEÍNA DO NUCLEOCAPSÍDEO (N).....	23
2.4 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA) E POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB).....	24
2.5 NANOTECNOLOGIA E SUA APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO IMUNOENSAIO E VACINAS	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 ESTIRPES BACTERIANAS, PLASMÍDEOS E OLIGONUCLEOTÍDEOS DE DNA.....	31
3.2 MEIOS DE CULTIVO.....	32
3.3 SOLUÇÕES DE ANTIBIÓTICOS.....	33
3.4 PREPARO DE BACTÉRIAS QUIMIOCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	
33	
3.5 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL.....	33
3.6 ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE	34
3.7 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÃO DESNATURANTE.....	34
3.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS	35
3.9 REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE (PCR)	35
3.10 LIGAÇÃO DE DNA	35
3.11 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS PARA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	35
3.11.1 Protocolo Golden Gate.....	36
3.12 SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES SFGFP-SBD E MRFP-SBD.....	37
3.13 SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RBD-SBD	37
3.14 SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA N-SBD	38
3.15 PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PHB FUNCIONALIZADAS.	38

3.16	TESTE DE IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE RBD-SBD, N-SBD, SFGFP-SBD E MRFP-SBD	39
3.17	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOPARTÍCULAS DE PHB ATRAVÉS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	40
3.18	WESTERN BLOT.....	40
3.19	ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICO (ELISA).....	42
3.19.1	ELISA COMERCIAL PARA ANTICORPOS CONTRA A SPIKE DE SARS-COV-2	43
3.19.2	ELISA INDIRETO COM NPs DA PROTEÍNA RBD-SBD DE SARS-COV-2...	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1	SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTES RBD -SBD	44
4.2	SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE N-SBD	47
4.3	SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES SFGFP-SBD E MRFP-SBD.....	49
4.4	TESTE DE IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE RBD-SBD, N-SBD E SFGFP-SBD	52
4.5	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOPARTÍCULAS DE PHB ATRAVÉS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	53
4.6	RECONHECIMENTO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES RBD-SBD E N-SBD ATRAVÉS DO ENSAIO DE WESTERN BLOT.....	55
4.7	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE RBD-SBD DE SARS-COV-2 COMO ANTÍGENO PARA ENSAIO DE ELISA.....	57
4.8	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE N-SBD DE SARS-COV-2 COMO ANTÍGENO PARA ENSAIO DE ELISA.....	63
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
5.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, vários casos atípicos de pneumonia foram relatados por autoridades chinesas em alguns hospitais de Wuhan, província de Hubei, na China, esses casos de pneumonia estavam ligados epidemiologicamente a um mercado de frutos do mar (WU et al., 2020). Poucos dias depois foi confirmado que a causa da pneumonia era o novo coronavírus SARS-CoV-2 (LAKE et al., 2020). A Síndrome Respiratória Aguda Grave, causada pelo vírus SARS-CoV-2, foi denominada COVID-19. A rápida disseminação do SARS-CoV-2 levou a OMS a declarar uma pandemia (LI et al., 2020). Até 5 de abril de 2022, 497.057.239 de casos por COVID-19 foram confirmados e 6.179.104 óbitos foram registrados (WHO, 2022). A pandemia de COVID-19 evidenciou a urgência de compreender aspectos fundamentais da biologia do vírus SARS-CoV-2 e o desenvolvimento de métodos eficientes de diagnóstico e de vacinação para combater a doença e possíveis futuros surtos de outros coronavírus que venham a surgir (LI et al., 2020).

Um dos principais alvos para o desenvolvimento de vacinas e métodos para o diagnóstico contra a COVID-19 foi a glicoproteína *Spike* (proteína S) inteira, ou fragmentos dessa proteína como antígeno. Como o próprio nome já informa, a proteína transmembrana Spike de SARS-CoV-2 se projeta na superfície do vírus como espículas e, através do domínio RBD, a Spike interage com a enzima conversora de angiotensina 2 (ECAII) do hospedeiro (LAKE, M., 2020; WANG et al, 2020). Portanto, devido ao seu papel crucial na interação de SARS-CoV-2 com a célula hospedeira, o domínio RBD apresenta grande potencial para o desenvolvimento de vacinas (LAN et al, 2020).

Atualmente, a maioria das vacinas comerciais utiliza patógenos atenuados para a imunização humana, entretanto ainda há a possibilidade desse patógeno atenuado recuperar a sua virulência após ser administrado no organismo, principalmente de imunodeprimidos. Outra técnica de produção de vacinas é a utilização de componentes do patógeno (proteínas ou peptídeos) associados com adjuvantes vacinas, que potencializam as respostas imunológicas ao antígeno, sendo uma alternativa para uma imunização efetiva e sem riscos contra doenças infecciosas (PATI et al., 2018).

Nos últimos anos, o uso de nanopartículas como um sistema de entrega de antígeno e imunização vem recebendo grande atenção. Para serem empregados no

desenvolvimento de vacinas, as nanopartículas devem: proteger o antígeno contra a degradação proteolítica prematura; facilitar o reconhecimento e processamento pelas células apresentadoras de antígenos; e devem ser seguras para o uso humano (PATI et al., 2018).

Diante disso, o polímero bacteriano denominado polihidroxibutirato (PHB), destaca-se como uma alternativa para a síntese de nanopartículas funcionalizadas para produção de vacinas (PATI et al., 2018). O PHB é produzido industrialmente por fermentação microbiana em larga escala utilizando insumos agroindustriais de baixo custo, como por exemplo bagaço da cana-de-açúcar, o que reduz o valor final do material, tornando um polímero vantajoso para a produção de nanopartículas. Além disso, o PHB também é biodegradável e biocompatível, já sendo utilizado na fabricação de implantes e como carreador de medicamentos (HU et al., 2020). Micropartículas de PHB carreando antígenos em sua superfície foram utilizadas com sucesso para a imunização de camundongos contra tuberculose e hepatite C, demonstrando assim que a utilização desse polímero é uma alternativa para produção de vacinas (MARTINEZ-DONATO et al, 2016; PARLANE et al, 2011).

Diante do potencial das partículas de PHB como carreadoras de antígenos, esse projeto de mestrado teve como objetivo a produção de nanopartículas funcionalizadas de PHB para aplicação médica, no desenvolvimento de testes diagnósticos para a COVID-19 e em testes vacinais utilizando proteínas recombinantes de SARS-CoV-2 como antígenos tendo as nanopartículas de PHB como sistema de entrega de antígenos virais.

Os resultados que serão apresentados nessa dissertação fazem parte de um projeto maior que visa o desenvolvimento de uma vacina baseada em nanopartículas de PHB contra COVID-19. Os resultados pré-clínicos de imunização de camundongos e análise imunológicas não serão apresentados aqui pois foram desenvolvidos em parceria com colaboradores do Departamento de Patologia Básica e do Instituto Carlos Chagas-Fiocruz-PR. Sendo assim o foco dessa dissertação foi desenvolver um protocolo de preparação de nanopartículas de PHB, de imobilização de proteínas recombinantes de SARS-CoV-2 nas nanopartículas preparadas e caracterizar o reconhecimento dessas proteínas por anticorpos de fontes comerciais ou de soros de pacientes positivos para COVID-19.

1.1 JUSTIFICATIVA

Diante dos esforços mundiais para o desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de vacinas e testes diagnósticos, a utilização de nanopartículas de polímeros como carreadoras de medicamento e antígenos vem chamando atenção, visto as suas características de estabilidade nos tecidos e corrente sanguínea, proteção contra a degradação prematura, facilidade no reconhecimento e processamento do antígeno para o sistema imune e por serem seguras para o uso humano. Nessa perspectiva o biopolímero bacteriano PHB surge como uma alternativa interessante para o desenvolvimento de nanopartículas como carreadoras de antígeno.

Sendo assim este trabalho busca desenvolver nanopartículas funcionalizadas de PHB que possibilitem o carregamento de antígenos do vírus SARS-CoV-2 para o uso potencial como imunizante contra a COVID-19 e no desenvolvimento de teste diagnósticos sorológicos.

1.2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi produzir de forma econômica e sustentável nanopartículas funcionalizadas de PHB com antígenos do vírus SARS-CoV-2.

1.2.1 Objetivos específicos

- Construir plasmídeos para expressão de antígenos recombinantes do SARS-CoV-2 na bactéria *E. coli*;
- Purificar os antígenos recombinantes do SARS-CoV-2 e imobilizá-los na superfície de nanopartículas de PHB;
- Utilizar as proteínas recombinantes RBD-SBD e N-SBD como antígenos para teste diagnóstico do tipo ELISA;
- Testar a utilização das nanopartículas de PHB como “âncora” para o antígeno em testes diagnóstico ELISA;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COVID-19

O surto da doença Coronavírus (COVID-19) começou na China em dezembro de 2019, e com a rápida disseminação foi declarada uma pandemia mundial pela OMS. A transmissão dessa virose tem como principal via gotículas respiratórias e pode ser transmitida através de contato pessoa a pessoa, até de pacientes assintomáticos (DI GENNARO et al., 2020).

A manifestação clínica da COVID-19 varia de formas assintomáticas a condições clínicas caracterizadas por insuficiência respiratória grave, na qual há necessidade de ventilação mecânica e suporte em unidade de terapia intensiva (UTI), podendo apresentar manifestações sistêmicas em termos de sepse e falência de múltiplos órgãos (DI GENNARO et al., 2020). Os principais sintomas da doença, antes do agravamento clínico, são a febre, dor de garganta, falta de ar, cefaleia e rinorreia. Ainda não há sintomas específicos da COVID-19, que possa ajudar a distinguir de outras doenças respiratórias, sendo assim a testagem é o principal caminho para a contenção das altas taxas de transmissão (DI GENNARO et al., 2020).

A COVID-19 é causada pelo novo coronavírus, o SARS-CoV-2, que faz parte de uma família de vírus envelopados bem diversificada, a família Coronaviridae. Essa família é composta por 4 gêneros Alpha-Cov, Beta-Cov, Gamma-CoV e Delta-Cov. O SARS-CoV-2 pertence ao gênero Beta-Cov, juntamente com o SARS-CoV e o MERS, que nas últimas duas décadas causaram surtos epidemiológicos; o SARS-CoV em 2003-2004 e o MERS iniciou em 2013 e até o presente momento ainda está em circulação na população (WANG et al, 2020; YUHAN et al, 2020).

O SARS-CoV-2 é caracterizado por uma morfologia esférica com projeções na superfície da proteína transmembrana Spike e possui uma simples fita de RNA como material genético (Figura 1). A entrada do novo coronavírus SARS-CoV-2 em células de humanos é dada pela interação entre a proteína Spike e a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) que também é o mecanismo de infecção do SARS-CoV (WANG et al, 2020).

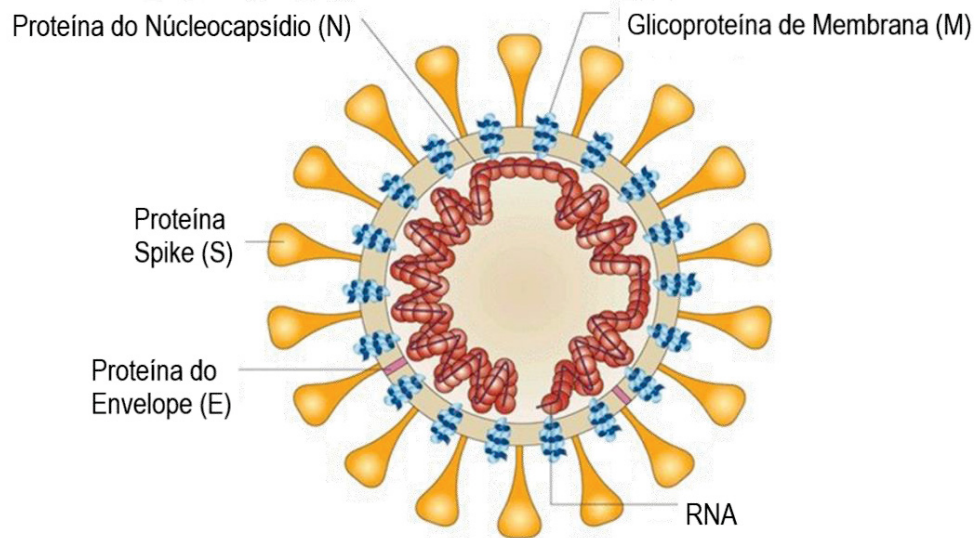


Figura 1 -Representação genérica da morfologia do vírus SARS-CoV-2 com as suas principais proteínas (PEIRIS et al., 2004).

2.2 PROTEÍNA SPIKE E A INTERAÇÃO COM ECAII

O vírus SARS-CoV-2 atravessa as membranas mucosas, principalmente as mucosas nasal e da laringe, e assim entra no pulmão pelas vias respiratórias. O vírus então ataca os órgãos que expressam a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), como pulmões, coração, sistema renal e trato gastrointestinal (DI GENNARO, et al., 2020).

A entrada do coronavírus nas células hospedeiras é mediada pela glicoproteína trimérica e transmembrana Spike (ou proteína S). Os monômeros da glicoproteína S podem ser divididos em duas subunidades: S1, responsável pela ligação ao receptor celular do hospedeiro ACE2 e a S2 responsável pela fusão a membrana do hospedeiro (WALLS *et al*, 2020). A subunidade S1 que é composta pelo peptídeo sinal na região N-terminal, o domínio RBD, e os subdomínios SD1 e SD2, já na subunidade S2 encontra-se a região transmembrana, um domínio intracelular e o peptídeo de fusão a membrana do hospedeiro (Figura 2).

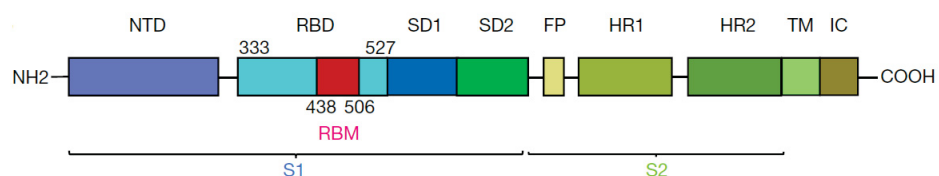


Figura 2 - Organização do monômero da proteína Spike do SARS-CoV-2.

Topologia geral do monômero da proteína Spike de SARS-CoV-2. A subunidade S1 é composta pelos SD1, subdomínio 1; SD2, subdomínio 2, RBD, domínio da ligação do receptor, e a subunidade S2 é composta por FP, peptídeo de fusão; HR1 e 2, regiões de repetição; IC, domínio intracelular; TM, região transmembrana; (LAN *et al*, 2020).

O domínio RBD (*Receptor Binding Domain*) do SARS-CoV-2 possui uma região central formada por 5 folhas β antiparalelas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ e $\beta 7$) com α hélices e alças curtas de conexão. Entre as folhas $\beta 4$ e $\beta 7$, há a inserção das curtas folhas $\beta 5$ e $\beta 6$, das hélices $\alpha 4$ e $\alpha 5$ e alças, essa inserção é o RBM (motivo de ligação ao receptor), que contém grande parte dos resíduos de contato com a ACE2. O RBM entra em contato com o lado inferior de um pequeno lóbulo da ACE2, onde o RBM se acomoda com a sua conformação côncava na hélice N-terminal da ACE2. A ligação do domínio RBD ao receptor ACE2 é uma parte crítica para o SARS-CoV-2 entrar nas células alvo (Figura 3) (LAN *et al*, 2020).

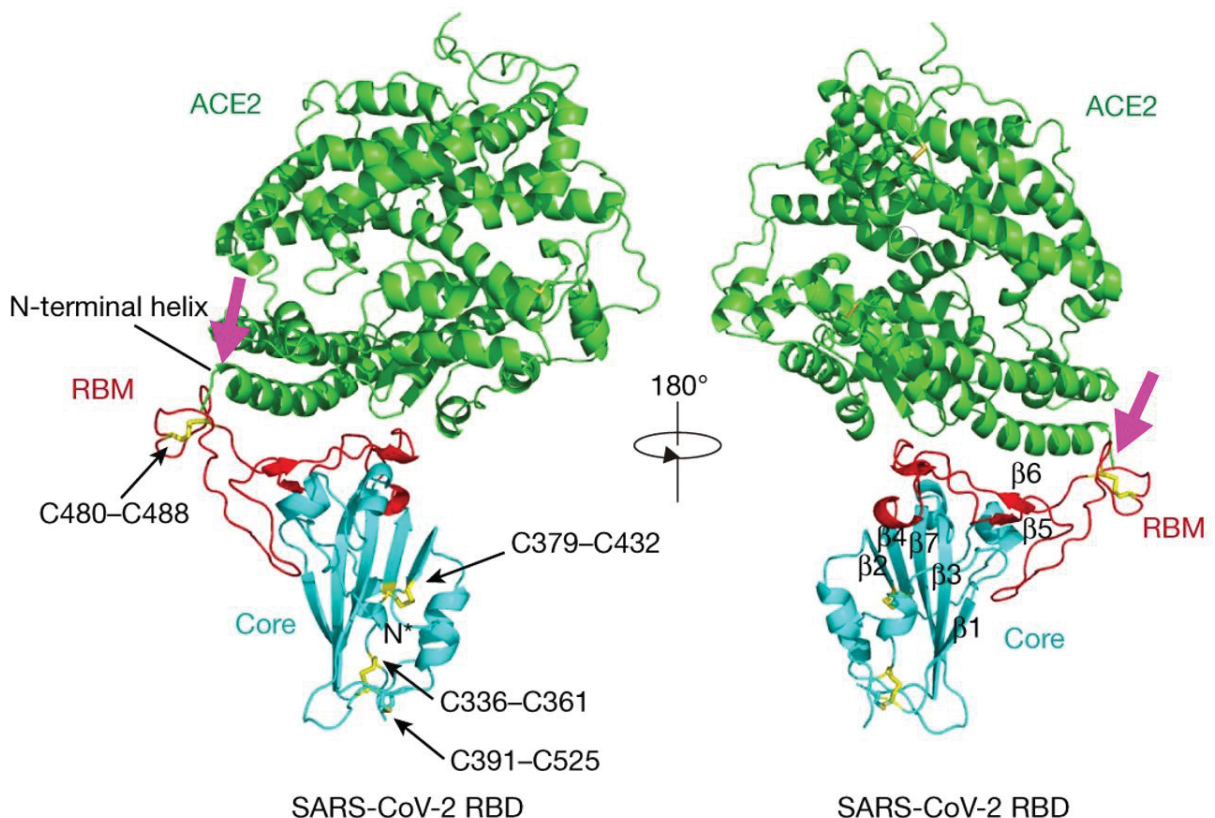


Figura 3 - Estrutura geral do RBD de SARS-CoV-2 ligado a enzima ACE2 (LAN *et al*, 2020).

Em verde, é representada a ACE2. A região central do RBD de SARS-CoV-2 é representado em ciano e o RBM em vermelho. As ligações dissulfeto do RBD de SARS-CoV-2 são mostradas em amarelo, e indicada pelas flechas rosa está a interação do RBM com a parte N-terminal da hélice da ACE2.

Diante da importância do domínio RBD de SARS-CoV-2 para a ligação ao receptor celular ACE2 e a anticorpos, o RBD apresenta grande potencial para o desenvolvimento de vacinas (LAN *et al*, 2020).

2.3 PROTEÍNA DO NUCLEOCAPSÍDEO (N)

O vírus SARS-CoV-2 possui proteínas estruturais como a proteína Spike (S), a proteína de membrana (M), a proteína do envelope (E) e a proteína do nucleocapsídeo (N). Sabe-se que as proteínas M e E são essenciais para o ciclo de vida do vírus. Como dito anteriormente, a proteína S é importante para a interação do vírus com a célula do hospedeiro, as células que expressam a enzima ACE2 (LIU, *et al.*, 2020).

A proteína N é uma das principais proteínas estruturais do vírus e está envolvida na transcrição e replicação do RNA viral, encapsula o RNA viral para proteger o material genético e entra na célula hospedeira junto com o RNA viral para facilitar a replicação (CUI *et al.*, 2015). Além disso a proteína N apresenta alta atividade imunogênica e é abundantemente expressa durante a infecção (LIU *et al.*, 2020).

A proteína N é constituída de dois domínios independentes, o domínio N-terminal (NTD), e o domínio C-terminal (CTD), e esses domínios são conectados por um *linker* intrinsecamente desordenado (IDL) (Figura 4). Além disso, nas extremidades dos domínios NTD e CTD há duas regiões desordenadas que são denominadas *N-arm* e *C-tail* (McBRIDE *et al.*, 2014). Sabe-se que o domínio NTD está relacionado a ligação do RNA na proteína, já o domínio CTD está relacionado a ligação do RNA e na sua replicação, já o *linker* regula a atividade de ligação ao RNA da proteína N, afetando a interação entre os domínios NTD e CTD (JIA *et al.*, 2021).



Figura 4 - Organização dos domínios da proteína N do SARS-CoV-2.

A proteína N é composta por uma região desordenada *N-arm* localizada na lateral N-terminal do domínio N-terminal (NTD), seguida por um *linker*, que conecta o domínio NTD ao domínio C-terminal (CTD), que é seguido por outra região desordenada denominada *C-tail* (JIA *et al.*, 2021).

Diante da função da proteína N na replicação e transcrição do RNA viral, sua presença durante a infecção é alta, o que pode induzir fortes respostas imunes (JIA et al., 2021). Assim a proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 é um dos antígenos amplamente utilizados para sorodiagnóstico da COVID-19. Além disso, a proteína N surge como um potencial alvo para a produção de vacinas (YAMAOKA et al., 2021).

2.4 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA) E POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)

Atualmente, a mais promissora alternativa ecológica e economicamente sustentável para a substituição dos plásticos de origem petroquímica é a utilização de poliésteres de origem microbiana, tais como os polihidroxicanoatos (PHA). Os PHAs são poliésteres produzidos pela condensação enzimática de tioésteres de hidroxilacil-CoA (ANDERSON & DAWES, 1990; MADISON & HUISMAN, 1999). Algumas bactérias acumulam grânulos de PHA no seu interior como um armazenamento de carbono (Figura 5). Quando em estresse ambiental como na ausência de nutrientes, tais como fósforo, enxofre, nitrogênio ou oxigênio, mas em excesso de carbono, bactérias frequentemente acumulam grandes quantidades de PHA (STEINBÜCHEL, 1998; ANDERSON & DAWES, 1990).

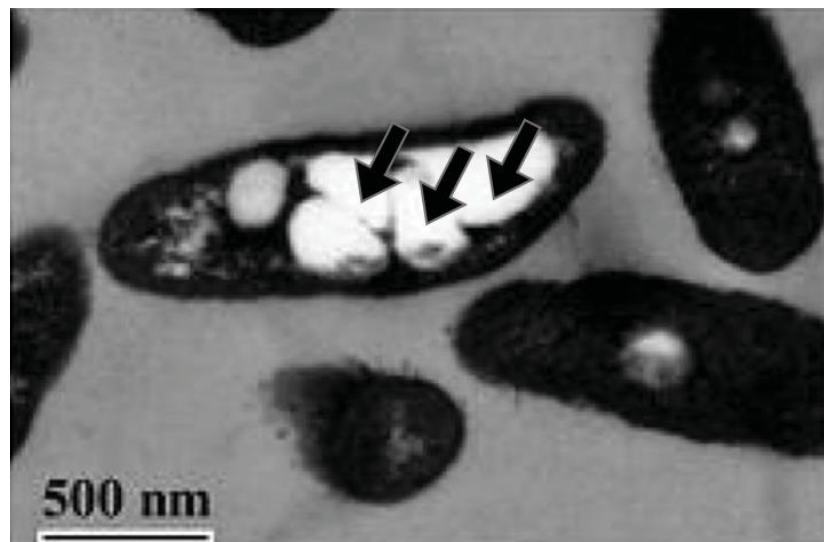


Figura 5 - Eletromicrografia de transmissão dos grânulos de PHB no interior das células de *H. seropedicae* (ALVES et al., 2016).

As flechas pretas indicam onde é possível visualizar os grânulos de PHB dentro da célula bacteriana.

Dentre todos os tipos de PHA já caracterizados, o polihidroxiobutirato (PHB) é o PHA mais abundante em bactérias. No entanto, bactérias dos gêneros *Ralstonia sp.*, *Paucimonas sp.* e *Pseudomonas sp.* podem produzir outros tipos de PHA; isto varia conforme o tamanho da cadeia lateral da estrutura química do polímero (Figura 6) (BYROM 1987; STEINBUCHER, 1995; WILLIAMS & PEOPLES, 1996; MADISON & HUISMAN, 1999). Outro fator que pode influenciar o tipo de PHA que a bactéria produz é a fonte de carbono utilizada. De acordo com Sacomboio e colaboradores (2017), *Herbaspirillum seropedicae* é capaz de produzir PHB utilizando malato, glucose, xilose e frutose.

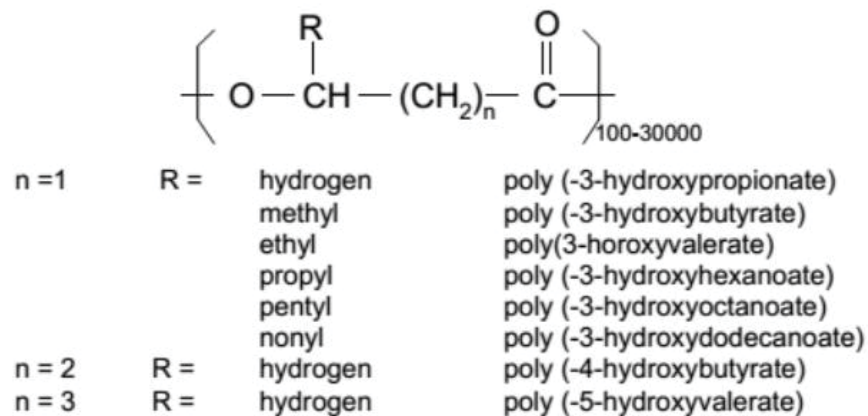


Figura 6 - Estrutura geral do polihidroxiacanoato e suas variações conforme o tamanho da sua cadeia lateral (MARVI et al., 2013).

A síntese de PHB ocorre quando há excesso de carbono na forma de acetil-CoA, que é condensado via enzima β -cetoacil-CoA tiosintase (codificada pelo gene *phbA*) gerando acetoacetil-CoA. Acetoacetil-CoA é reduzido a 3-hidroxiacetil-CoA pela enzima acetoacetil-CoA redutase (codificada pelo gene *phbB*) dependente de NADPH. A enzima PHB sintase (codificada pelo gene *phbC*) catalisa a polimerização de 3-hidroxiacetil-CoA formando o grânulo de PHB (Figura 7). O polímero é acumulado dentro da bactéria e pode ser degradado pela PHB depolimerase (codificada pelo gene *phaZ*) (TOKIWA; UGWU, 2007).

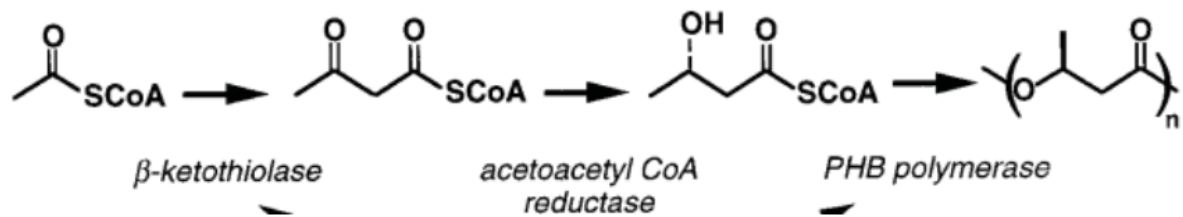


Figura 7 - Via de biossíntese do PHB em bactérias.

A síntese do polímero segue três passos com a atuação das três enzimas a β -cetoacil-CoA tiosase, a acetoacetyl-CoA reductase e a PHB polimerase ou sintase (MADISON & HUISMAN, 1999).

O grânulo formado no interior da célula, também chamado de carbonossomo, é coberto por diversas proteínas funcionais, entre elas a PHA sintase, fasinas, proteínas regulatórias e PHA depolimerases (Figura 8). O grânulo tem natureza hidrofóbica, mas é coberto pelas fasinas, que são proteínas anfipáticas, que permitem a estabilidade do grânulo, visto que a parte hidrofóbica da fasina interage com o polímero, e a parte hidrofílica fica exposta se associando ao citoplasma da célula bacteriana (NEUMANN et al., 2008). As fasinas também controlam a relação superfície-volume do PHB evitando assim a coalescência dos grânulos (PIEPER & FÜRST et al., 1995; WIECZOREK et al., 1995; STEINBÜCHEL et al., 1995; JENDROSSEK, 2009).

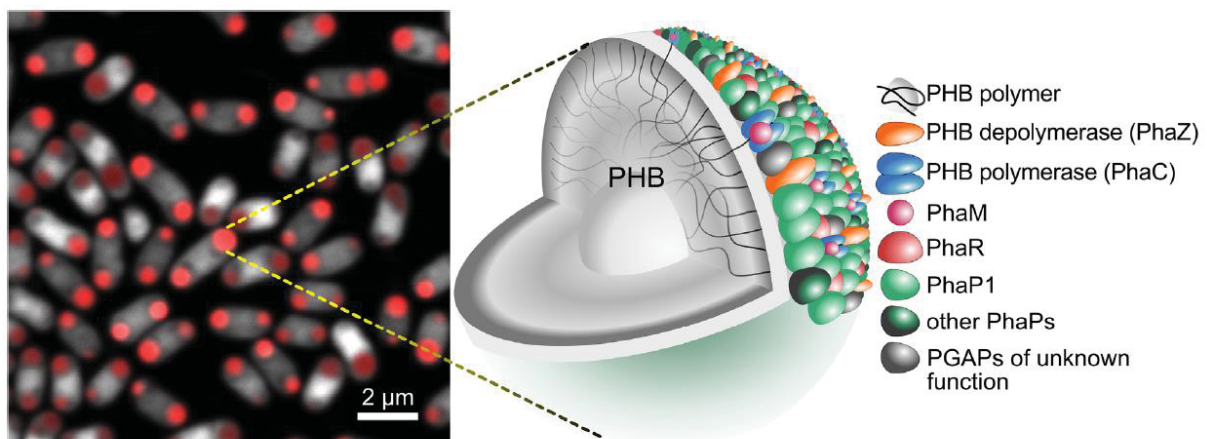


Figura 8 – Modelo do grânulo do PHB de *R. eutropha* H16 com as suas proteínas associadas (MÜLLER-SANTOS et al., 2020).

Quando as bactérias se encontram em situações de estresse, como escassez de energia, de nutrientes, choque térmico ou necessitam de uma fonte de carbono, elas mobilizam os grânulos de PHA pela atuação das PHA depolimerases, clivando o

polímero em monômeros de 3-hidroxibutirato e assim contribuem para a disponibilização direta de substrato energético para a bactéria (STEINBÜCHEL & HEIN, 2001; VIGNESWARI et al., 2015; ALVES et al., 2020; MÜLLER-SANTOS et al., 2020).

Devido a essas vantagens no processo de síntese, o PHB tem sido extensivamente aproveitado na biotecnologia (VIEYRA et al., 2018). Na área médica, grânulos nanométricos de PHB apresentam diferentes vantagens, devido essencialmente a sua biocompatibilidade com tecidos biológicos, diminuindo seu risco de toxicidade após sua administração (MOREIRA et al., 2022).

A imobilização de proteínas em sua superfície, através dos seus radicais metilas, é uma estratégia emergente utilizada na nanomedicina (DEEPAK et al., 2009; MORADALI; REHM, 2020; KAI; LOH, 2014). Combinada com a engenharia genética, suas características impulsionaram o potencial *drug delivery* desse polímero em pesquisas envolvendo as terapias gênica (ZHAO et al., 2018), antineoplásica (BABOS et al., 2020; KILIÇAY et al., 2011), antimicrobiana (PERVEEN; MASOOD; HAMMED, 2020; MURUEVA et al., 2014) e indutora de crescimento tecidual (DONG et al., 2014). Beneficiaram também sua participação em plataformas diagnósticas utilizando PhaC (CHEN et al., 2014; GRAGE; REHM, 2008), PhaP (ATWOOD; REHM, 2009; BACKSTROM; BROCKELBANK; REHM, 2007) e PhaZ como domínios de ancoragem para imobilização de antígenos virais e bacterianos (PARK et al., 2006). Diferentes sistemas heterólogos de expressão também foram usados para purificar proteínas (BANKI; GERNGROSS; WOOD, 2005; BARNARD et al., 2005; WANG et al., 2008) e imobilizar enzimas nas nanoesferas de PHB usando PhaP e PhaC principalmente como proteína de fusão (BLATCHFORD et al., 2012; MULLANEY; REHM, 2010; PETERS; REHM, 2006; RASIAH; REHM, 2009).

As PHA depolimerases são enzimas do metabolismo de microrganismos produtores de PHA, responsáveis pela depolimerização dos grânulos. Essas enzimas são classificadas em dois grupos dependendo do seu substrato, sendo um grupo as enzimas que degradam intracelularmente apenas PHA nativos restritos à reserva energética. E o outro grupo referente a PHA depolimerases extracelulares, que estão presentes em microrganismos produtores e consumidores de PHA extracelular (JENDROSSEK, 2009; JENDROSSEK et al., 2013).

As duas classes de PhaZ descritas apresentam 3 domínios bem definidos e conservados (Figura 9), responsáveis por etapas diferentes na degradação enzimática do poliéster (HIRAISHI et al., 2010^a; PAPAGEORGIU et al., 2008). O domínio N-terminal apresenta um sítio α/β hidrolase, homólogo ao padrão catalítico e estrutural da Lipase A (LipA) de *Bacillus subtilis*. Basicamente este domínio é composto de 11 folhas- β e 8 α -hélices, que resguardam a tríade de aminoácidos S136-W242-H306 no seu sítio ativo. Uma região linker maleável conecta o domínio catalítico N-terminal ao domínio C-terminal, também denominado de SBD (*Substrate Binding Domain*). Este domínio, por sua vez, é responsável pela etapa de adsorção do substrato à enzima (PAPAGEORGIU et al., 2008; WAKADKAR et al., 2010).

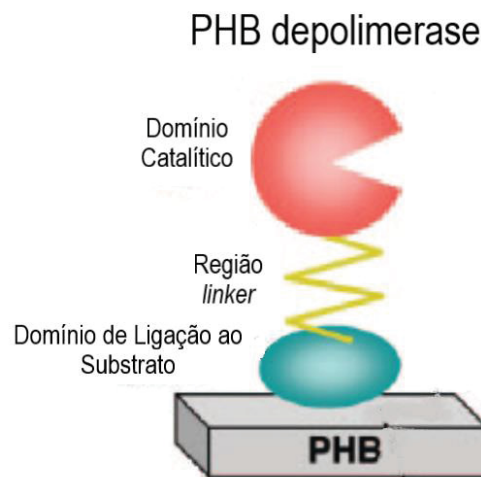


Figura 9 - Modelo esquemático da enzima PHB depolimerase, mostrando a interação do SBD com o PHB (adaptado de HIRAISHI et al, 2006).

O domínio C-terminal da depolimerase, o SBD é composto de 40 a 60 aminoácidos e é responsável pela interação entre a enzima depolimerase e grânulo de PHB. O SBD é um domínio específico e estável aos grânulos de PHB (JENDROSSEK & HANDRICK, 2002).

SBD já foi demonstrado como uma âncora para a ligação de antígenos virais e bacterianos e medicamentos, além de ser utilizado também nos processos de purificação de sistemas heterólogos de expressão e em dispositivos de diagnóstico (JENDROSSEK & HANDRICK, 2002; PARK et al., 2006).

2.5 NANOTECNOLOGIA E SUA APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO

IMUNOENSAIO E VACINAS

A utilização da nanotecnologia na medicina é definida como o emprego das distintas propriedades dos nanomateriais e nanodispositivos, incluindo das nanopartículas (NPs), na medicina moderna para a execução de diagnóstico, terapia e prevenção de doenças tradicionais e epidemiologicamente emergentes (CARUTHERS et al., 2007; FREITAS, 2005). O principal diferencial em utilizar as nanopartículas na área médica está relacionado à sua extensa área superficial, decorrente de seu tamanho reduzido na escala nanométrica (KHAN et al., 2019; 2021; SANDERS, 2019).

Nanopartícula (NP) é o termo que se refere a qualquer material particulado, de estrutura e composição variadas, com pelo menos uma de suas três dimensões presente na escala nanométrica (1 a 100 nm ou 10^{-9} m) (KHAN et al., 2021; TOMA, 2016). Nos últimos anos, o emprego das nanopartículas tem expandido exponencialmente em diagnósticos e tratamento de doenças, nas plataformas de imunização, na engenharia de tecidos e na constituição de sanitizantes e EPIs (HASANZADEH et al., 2021; KHAN et al., 2021; SMITH et al., 2015), principalmente as nanopartículas poliméricas.

Outra vantagem derivada da escala nanométrica é a sua propriedade de carrear matéria a alvos específicos. Para essa finalidade, os polímeros têm recebido destaque. Devido ao seu peso molecular, sua estrutura porosa e seus grupos funcionais facilmente manipuláveis, esses materiais possibilitam o carregamento de proteínas e biomoléculas de modo mais estável e versátil, tanto em sua superfície como as nanoesferas, quanto no seu interior como as nanocápsulas (MANSHA et al., 2017; KHAN et al., 2019).

Ao longo do tempo, doenças infecciosas vêm surgindo como uma ameaça a vida de milhares de pessoas, como a atual pandemia da COVID-19. O grande desafio é que essas doenças não possuem tratamentos terapêuticos disponíveis, sendo assim a utilização de vacinas para a imunização da população e desenvolvimento de testes diagnósticos torna-se imprescindível (DYE, 2014).

Para uma vacina ser considerada efetiva é preciso atender três critérios: ser segura para os seres humanos, estável dentro do organismo e ser perene até garantir a resposta imune com um menor número de doses. Atualmente as vacinas comerciais

que estão disponíveis são baseadas na utilização do patógeno morto ou atenuado, na utilização de subunidades do patógeno (proteínas ou peptídeos), e na utilização de DNA ou mRNA. Entretanto apesar de serem efetivas, na técnica que utiliza o patógeno atenuado há a possibilidade do patógeno recuperar a sua virulência e causar a doença, principalmente em pessoas imunodeprimidas. Já no caso das vacinas que utilizam subunidades do patógeno há a necessidade de utilização de adjuvantes e um número maior de dosagens. E por fim a técnica que utiliza DNA ou RNA tem como principais desafios a garantia de entrega eficiente no alvo desejado e a degradação prematura dos agentes imunogênicos. Assim a utilização de um sistema de nanopartículas carreadoras de antígenos torna-se uma estratégia interessante (PATI et al, 2018).

A utilização de um sistema de nanopartículas carreadoras de antígenos é capaz de proteger a vacina de degradações prematuras, ajuda na estabilidade, tem propriedades adjuvantes, e auxilia na entrega do imunogênico as células apresentadoras de antígeno. Recentemente nanopartículas poliméricas vem recebendo grande atenção no desenvolvimento de vacinas, visto que são de fácil preparo, biocompatíveis, biodegradáveis, com baixa citotoxicidade e propriedades que permitem alterar a superfície com facilidade (PATI et al, 2018).

Nessa perspectiva de tratamento e testagem de doenças, o desenvolvimento de novas técnicas de imunoenaios rápidas, sensíveis e simples são importantes para a análise da resposta imune e a soroconversão. Apesar dos imunoenaios não sejam adequados para detecção de fase aguda da doença, há uma série de aplicações relevantes como por exemplo: avaliar a resposta imune de forma qualitativa e quantitativa, possibilitam a análise precisa da taxa de infecção em uma área afetada, o que é uma variável essencial para determinar a taxa de letalidade da infecção, permitem também a identificação de indivíduos com uma forte resposta imune (grande produção de anticorpos), que poderiam servir como doadores para geração de soroterapia de convalescença, e por fim os imunoenaios permitem determinar quem é imune e quem não é. Com essa informações são úteis para implantação pelos profissionais de saúde estratégias que limitem o risco de exposição e a propagação inadvertida do vírus (AMANAT et al, 2020).

Existem várias técnicas disponíveis para diagnosticar infecções virais, entretanto poucas são rentáveis, específicas para vírus e aplicáveis em diagnósticos de rotina. Para a detecção do vírus são utilizados dois tipos de ensaios: detecção das

partículas virais intactas ou antígenos virais por imunorreação, ou detecção do DNA viral via PCR e hibridização. E para detecção de antígenos são utilizados o ensaio imunofluorimétrico (IFMA) ou ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA) que são mais fáceis de realizar devido a simplicidade no preparo das amostras levando a um alto rendimento (VALANNE et al, 2005). Entretanto, o soro de algumas amostras pode causar distúrbios na imunorreação levando a resultados ambíguos e a baixa sensibilidade obtida com os marcadores convencionais deixa espaço para melhoria (VALANNE et al, 2005).

Diante disso, a utilização de nanopartículas para imunoenaios surge como uma excelente alternativa, visto que apresentam uma grande área de superfície, possibilitando uma análise ainda mais sensível, e também mais precisa devido a utilização de tag específicos para a interação em nanopartículas (VALANNE et al, 2005; PARK et al, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ESTIRPES BACTERIANAS, PLASMÍDEOS E OLIGONUCLEOTÍDEOS DE DNA

As bactérias e plasmídeos utilizados neste trabalho estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Estirpes bacterianas e Plasmídeos.

ESTIRPES/PLASMÍDEOS	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA/FONTE
Estirpes		
<i>Escherichia coli</i> TOP 10	Estirpe utilizada para transformação de plasmídeos, preparação plasmidial e transformação de reações de ligação de DNA em etapas de clonagem. Sm ^R ; F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL endA1</i> λ-.</i>	INVITROGEN Inc.
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Estirpe utilizada para a superexpressão de proteínas utilizando o sistema pET. <i>hsdS, gal(cIts 857 ind1 Sam7, nin5 lacUV5-T7 gene1)</i>	(SAMBROOK et al., 1989)
Plasmídeos		
pBlueScript II KS (+)	Plasmídeo de alto número de cópias para clonagem, Amp ^R .	Agilent Technologies
pET28a(+)	Vetor de expressão; expressão de proteínas fusionadas a uma cauda	Novagen

	de histidinas N-terminal a partir de um promotor <i>T7/lacO</i> . Km ^R .	
pET29b(+)	Vetor de expressão; expressão de proteínas fusionadas a uma cauda de histidinas N-terminal a partir de um promotor <i>T7/lacO</i> . Km ^R .	Novagen
pET29b(+)-RBD-SBD	Expressa a proteína RBD-SBD de SARS-CoV-2 com a tag SBD da PHA depolimerase de <i>Alcaligenes faecalis</i> , com cauda 6His do pET29b. Km ^R .	Este trabalho. Sintetizado pela empresa Genscript(EUA).
pET29b(+)-N-SBD	Expressa a proteína N-SBD de SARS-CoV-2 com a tag SBD da PHA depolimerase de <i>Alcaligenes faecalis</i> , com cauda 6His do pET29b. Km ^R .	Este trabalho. Sintetizado pela empresa Genscript(EUA).
pET28a(+)-sfGFP-SBD	Expressa a proteína verde fluorescente sfGFP-SBD com a tag SBD da PHA depolimerase de <i>Alcaligenes faecalis</i> , com cauda 6His do pET28a. Km ^R .	Este trabalho.
pET28a(+)-mRFP-SBD	Expressa a proteína vermelho fluorescente mRFP-SBD com a tag SBD da PHA depolimerase de <i>Alcaligenes faecalis</i> , com cauda 6His do pET28a. Km ^R .	Este trabalho.

Fonte: a autora (2022).

Tabela 2. Oligonucleotídeos de DNA utilizados nesse estudo.

NOME	SEQUÊNCIA (5' -> 3')	SÍTIO DE RESTRIÇÃO
Fw_sfGFP_GG	TGGTCTCTCATGCGTAAAGGCGAA	Bsal
Rev_sfGFP_GG	TGGTCTCGGATCCTTTGTACAGTTC	Bsal
Fw_mRFP_GG	TGGTCTCTCATGGCTTCCTCCGAAG	Bsal
Rev_mRFP_GG	TGGTCTCGGATCCAGCACCGGTGG	Bsal
Fw_SBD_GG	TGGTCTCAGATCTACCACCAAATCT	Bsal
Rev_SBD_GG	TGGTCTCCTCGAGTTACGGGCAGTT	Bsal
Rev_SBD_GG2	TGGTCTCCTCGAGCGGGCAGTTAC	Bsal

Fonte: a autora (2022).

3.2 MEIOS DE CULTIVO

Meios de cultivo utilizados para multiplicação das estirpes de *E. coli*, bem como sua composição: Meio Luria Bertani (LB) (SAMBROOK et al., 1989): Triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 10 g/L. O meio LB ágar (LA) foi obtido pela adição de 15 g/L de ágar ao meio LB.

3.3 SOLUÇÕES DE ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos utilizados para seleção das estirpes de *E. coli* e dos plasmídeos utilizados foram Tetraciclina 10 µg/mL, Ampicilina 250 µg/mL e Canamicina 100 µg/mL. As soluções de estoque dos antibióticos foram preparadas como descrito por SAMBROOK et al., 1989 e mantidas a 4°C.

3.4 PREPARO DE BACTÉRIAS QUIMIOCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

As células foram crescidas inicialmente em meio LB, por 16 horas a 37°C sob agitação de 120 rpm. O inóculo foi feito em 50 mL de meio LB na proporção de 1:100 em um Erlenmeyer de 250 mL e crescido até atingir D.O.₆₀₀ aproximada de 0,4. A cultura foi centrifugada por 10 minutos, 4°C e 5.000 rpm, e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspenso em 30 mL de MgCl₂ 100 mM em banho de gelo. As células foram novamente coletadas por centrifugação por 10 minutos a 4.000 rpm à 4°C e então o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspenso em 30 mL de solução de CaCl₂ 100 mM gelada estéril. Essa suspensão foi mantida em gelo por 20 minutos e depois centrifugada por 10 minutos a 4.000 rpm à 4°C. Descartado o sobrenadante, o *pellet* foi ressuspenso 30 mL de CaCl₂ em 15% (m/v) de glicerol, centrifugada por 10 minutos a 4.000 rpm à 4°C. Depois de descartado o sobrenadante, o *pellet* foi ressuspenso em 1,5 mL de CaCl₂ em 15% de glicerol (m/v). Por fim as bactérias foram aliquotadas (100 µL) em microtubos de 1,5 mL e estocadas a -80°C.

Para transformação bacteriana, foi adicionado 3 µL de plasmídeo ou 10 µL da solução da reação de ligação de DNA a 100 µL de bactérias competentes, e a mistura foi incubada por 30 minutos no gelo. Em seguida foi realizado o choque térmico à 42°C por 45 segundos em banho-maria, adicionado 900 µL de LB e incubado por 60 minutos em estufa a 37°C para recuperação. Posteriormente, 300 µL da suspensão de bactérias foi espalhada na superfície do meio LA com antibiótico referente a resistência do plasmídeo utilizado, e incubadas em estufa à 37°C por 16 horas.

3.5 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

As colônias de *E. coli* foram inoculadas em meio LB contendo antibiótico (correspondente a resistência do vetor utilizado) à 37°C sob agitação de 120 rpm por 16 horas. Para extração do DNA plasmidial, 1,5 mL de cultura de *E. coli* foi transferidas para microtubos de polipropileno e centrifugada à 14.400 rpm por 60 segundos.

Depois de descartar o sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensão em 200 μ L de GET (glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl pH 8,0 25 mM). Em seguida foram acrescentados 200 μ L de solução de lise (NaOH 0,2 M, SDS 1% (m/v)), homogeneizou-se suavemente por 1 minuto, e a lise foi interrompida com a adição de 200 μ L de Kacf (Acetato de Potássio 3 M, Ácido fórmico 1,8 M). A solução resultante foi centrifugada por 10 minutos à 14.400 rpm, em temperatura ambiente, o sobrenadante recuperado, transferido para outro tubo e adicionados 200 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v). A mistura foi homogeneizada e centrifugada por 5 minutos. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. O DNA plasmidial foi precipitado pela adição de 0,6 volume de isopropanol, seguido de centrifugação de 10 minutos a 14.400 rpm, em temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 1mL de etanol 70% (v/v), centrifugado por 10 minutos a 14.400 rpm, seco em estufa e ressuspensão em 30 μ L de água estéril.

3.6 ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE

As eletroforeses para análise e separação de moléculas de DNA foram realizadas em gel de agarose. A concentração de agarose foi de 1% (m/v) no tampão TAE (40 mM de Tris base; 1 mM de EDTA pH 8,0 e 20 mM de ácido acético). Para a aplicação das amostras foi adicionado a cada 2 μ L de amostra 2 μ L de corante FSUDS (azul de bromofenol 0.8% (m/v), ficol 10% (m/v), xileno cianol 0.4% (m/v), SDS 1% (m/v), EDTA 1,8 mM, pH 8,0), na primeira linha foram aplicados 3 μ L de marcador de peso molecular de DNA (GeneRuler™ 1kb DNA ladder, Fermentas), e por fim aplicado campo elétrico de 80 V e ~40 mA por 50 minutos. Após terminar a corrida, o gel foi corado em brometo de etídio (0,5 μ g/mL) por 15 minutos e revelado em luz UV a 312 nm.

3.7 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÃO DESNATURANTE

As eletroforeses de proteína foram realizadas por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). A concentração do gel separador utilizado em todas as eletroforeses de proteína realizadas foi de 12% (m/v) de poliacrilamida e do gel de empilhamento foi de 4% (m/v) de acrilamida. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo a orientação do fabricante (Biorad). As amostras foram misturadas com tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol,

0,0625 mol/L de Tris-HCl pH 6,8, 5% de β -mercaptoetanol) e aquecidas por 5 min à 95°C antes da aplicação. A voltagem da corrida foi de 170 V, utilizando o tampão Laemmli (3 g/L de Tris-base, 14 g/L de glicina e 1 g/L de SDS). Após a eletroforese, as proteínas do gel foram coradas com 0,25% (m/v) Coomassie Blue R-250 e descoradas em uma solução com 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético.

3.8 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As proteínas purificadas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), segundo especificações que acompanham o Reagente de Bradford (Biorad). As reações continham 30 μ L de amostra e 170 μ L de reagente e foram preparadas em microplacas de 96 poços. Para curva padrão, foi utilizada a proteína albumina de soro bovino (BSA) em concentrações de 20 a 100 μ g/mL. A medida de absorvância foi realizada em leitor de microplacas, em comprimento de ondas de 595 nm.

3.9 REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE (PCR)

Para reações de PCR utilizou-se um sistema de 20 μ L ao qual foi adicionado 1-5 ng/mL de DNA molde, 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo de DNA (*primer*), 0,2 mM de uma solução de dNTPs, 2 μ L de tampão de reação X7 (20 mM Tris-HCl pH 8,8; 10 mM KCl; 6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2 mM MgSO_4 ; 0,1 mg/ml BSA e 0,1% (m/v) Triton X-100) e 0,2 μ L de solução de PfuX7 (NORHOLM, 2010).

A amplificação foi realizada em termociclador com os seguintes parâmetros: 1 ciclo de 1,5 minuto a 98°C, 30 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 55°C, 60°C ou 65°C e 30 segundos a 72°C, e por fim 10 minutos a 72°C.

3.10 LIGAÇÃO DE DNA

As reações de ligação consistiram em sistemas de 10 μ L, composto por 1 μ L de tampão T4 DNA ligase 10X, 0,5 μ L de enzima T4 DNA ligase e quantidades de vetor e inserto em proporção 1:3, e foram incubadas a 16°C por pelo menos 16h.

3.11 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS PARA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As sequências de DNA das proteínas RBD-SBD e N-SBD de SARS-CoV-2 foram sintetizadas sob demanda pela empresa Genscript (EUA), com códons

otimizados para expressão em *E. coli* e montadas em plasmídeos para expressão. As duas construções foram planejadas com cauda de 6-histidinas na porção N-terminal para facilitar a purificação e foram clonadas no plasmídeo pET29b para superexpressão na bactéria *E. coli* BL21(DE3) a partir do promotor forte de transcrição T7.

As construções das proteínas recombinantes sfGFP-SBD e mRFP-SBD foram planejadas computacionalmente no software SnapGene seguindo o protocolo de Marillonnet and Grützner, 2020, consistiram na ligação de segmentos de DNA em plasmídeos seguindo o método Golden Gate (Engler et al., 2008). A estratégia baseia-se no uso de enzimas de restrição do tipo IIs (p.ex.: Bsal), que cortam fora de sua sequência de reconhecimento. Com o planejamento adequado dos sítios de clivagem, dois ou mais fragmentos cortados por Bsal podem ser ligados formando um produto único e sem o local de restrição original. Esse método é adequado para se ligar mais de um fragmento de DNA de forma modular em plasmídeos recombinantes com a incubação de uma reação de digestão dos fragmentos de DNA e ligação simultânea, e posterior transformação em *E. coli* TOP10.

Para a construção das proteínas recombinantes sfGFP-SBD e mRFP-SBD, os insertos foram amplificados por PCR, a cauda SBD foi amplificada do *template* pET29b-RBD-SBD, o gene que codifica para a proteína RFP (*Red Fluorescent Protein*) foi amplificado a partir do *template* J61002 do repositório iGEM (pode ser acessado no link https://parts.igem.org/Part:BBa_J61002), e o gene que codifica para a proteína sfGFP (Green Fluorescent Protein) foi amplificado a partir do *template* pSB1A2-J114-sfGFP, construído pelo aluno Brenno Wendler Miranda. Os fragmentos amplificados foram subclonados no vetor pBluescript KS (+), e confirmados pelo sequenciamento pelo método Sanger. Após a confirmação os fragmentos *sfGFP-SBD* e *mRFP-SBD* foram transferidos para o vetor pET28a entre os sítios de restrição *XhoI* e *NcoI* pelo método Golden Gate como mencionado anteriormente.

3.11.1 Protocolo Golden Gate

Para cada reação da estratégia de clonagem Golden Gate (GG) foi utilizado um sistema de 15 μ L ao qual foram adicionados 20fmols do vetor GG, onde foram clonados os insertos, e também 20fmol dos insertos subclonados, 1 μ L da enzima T4 Ligase, 1,5 μ L do tampão T4 Ligase 10x, 0,5 μ L da enzima Bsal (Marillonnet and Grützner, 2020).

As reações ocorreram em termociclador com os seguintes parâmetros: 50 ciclos de 2 minutos a 37°C e 5 minutos à 16°C, 1 ciclo de 5 minutos a 50°C, e por fim 1 ciclo a 80°C. Após a incubação as reações foram transformadas em células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10.

3.12 SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES SFGFP-SBD E MRFP-SBD

Os plasmídeos recombinantes contendo os genes codificadores das proteínas sfGFP-SBD e mRFP-SBD ligados ao vetor de expressão pET28a foram transformados na estirpe *E. coli* BL21(DE3). Os transformantes foram cultivados em meio LB a 37°C a 120 rpm até uma D.O.₆₀₀ 0,5-0,6. Nessa D.O. foi adicionado o indutor de expressão IPTG na concentração final de 0,5 mM. A expressão prosseguiu durante 4 horas a 37°C. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 rpm durante 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas e rompidas por sonicação em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl). A expressão das proteínas de interesse foi avaliada por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% (m/v).

Para purificar as proteínas sfGFP-SBD e RFP-SBD foi utilizada cromatografia de afinidade ao Ni²⁺. Para tanto, a fração solúvel foi injetada em uma coluna HiTrap Chelating carregada com 100 mM de NiCl₂ e equilibrada com tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl e 20 mM Imidazol. As proteínas foram eluidas em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl e gradiente de 50 mM a 1M de Imidazol.

3.13 SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RBD-SBD

O plasmídeo pET29b-RBD-SBD foi transformado em *E. coli* BL21(DE3). As colônias transformantes foram inoculadas em meio LB a 30°C a 120 rpm e cultivadas por 24h para expressão por autoindução. Após a expressão, as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 rpm durante 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas e lisadas por sonicação em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl). A expressão das proteínas de interesse foi avaliada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida a 12% (m/v).

Para a purificação da proteína RBD-SBD, a fração solúvel foi descartada e os corpos de inclusão foram lavados três vezes com tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0,

0,5% (m/v) de Triton X-100 e 1 M de Ureia. Após as sucessivas lavagens, os corpos de inclusão foram ressuspensos no tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e Ureia 8 M em temperatura ambiente aspirando e expelindo o líquido com a pipeta até a desagregação dos corpos de inclusão. A proteína desnaturada foi transferida para uma membrana de celulose com limite de exclusão de 12 kDa para diálise contra 2 L de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl por 24 horas a temperatura ambiente.

3.14 SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA N-SBD

O plasmídeo pET29b(+)-N-SBD foi transformado em *E. coli* BL21(DE3). As colônias transformantes foram inoculadas em meio LB a 37°C a 120 rpm até uma D.O.₆₀₀ de 0,3-0,5. Depois as culturas foram incubadas a 16°C por 30 minutos. Após este período, foi adicionado o indutor de expressão IPTG na concentração final de 0,3 mM. A expressão prosseguiu *overnight* a 16°C a 120 rpm. Após a expressão, as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 rpm durante 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas e lisadas por sonicação em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl). A expressão da proteína de interesse foi avaliada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% (m/v).

Para purificar a proteína N-SBD foi utilizada a cromatografia de afinidade ao Ni²⁺. Para tanto, a fração solúvel foi injetada em uma coluna HiTrap Chelating carregada com 100 mM de NiCl₂ e equilibrada com tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl e 20 mM Imidazol. A fração de N-SBD foi eluída em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl e gradiente de 50 mM a 1M de Imidazol.

3.15 PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PHB FUNCIONALIZADAS.

As nanopartículas de PHB foram produzidas de acordo com o método de nanoprecipitação descrito por Shakeri *et al.* (2014). Primeiramente, 5 mg de PHB comercial (Sigma Aldrich) foram pesados em tubos de vidro com tampa de rosca e em seguida foram dissolvidos em 3 mL de 2,2,2-trifluoroetanol – TFE (Sigma Aldrich). Para melhor solubilização do PHB em TFE, a solução foi incubada em banho-maria a 60°C por cerca de 3 minutos ou até que a mistura ficasse translúcida. Posteriormente, a solução foi dialisada *overnight* através de uma membrana de celulose com limite de

exclusão de 12 kDa contra 2 L de água MiliQ autoclavada com trocas em 1, 2, 3, 6 e 9 horas.

Depois da diálise, as nanopartículas foram utilizadas diretamente nos ensaios de funcionalização ou concentradas por centrifugação antes dos experimentos. Para concentrar as nanopartículas, 1 mL de glicerol 50% (m/v) foi pipetado em tubos de microcentrifuga de 2 mL seguido de 1 mL das nanopartículas dialisadas, e as soluções não se misturaram, apresentando duas fases. Após centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente, os tubos foram mantidos por 1 hora em temperatura ambiente para que as nanopartículas ficassem depositadas no fundo do microtubo. Após esse intervalo, as duas soluções do sobrenadante foram descartadas e as nanopartículas foram removidas por pipetagem.

3.16 TESTE DE IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE RBD-SBD, N-SBD, SFGFP-SBD E MRFP-SBD

A funcionalização das nanopartículas foi realizada através da imobilização do antígeno ou proteínas recombinantes, sendo as proteínas RBD-SBD Spike do SARS-CoV-2, a N-SBD do SARS-CoV-2, sfGFP-SBD e mRFP-SBD, que foram expressas em *E. coli* BL21(DE3). Primeiramente, 50 μ L de nanopartículas de PHB foram misturados com 50 μ L de proteína em uma concentração próxima de 0,3 mg mL⁻¹ e a mistura foi incubada a 30 °C por 5 minutos. Após o período de incubação, a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 2 minutos em temperatura ambiente. Então, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL (fração não ligada) e o precipitado de nanopartículas com a proteína imobilizada foi lavado 3 vezes com 500 μ L de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 150 mM NaCl. Os sobrenadantes de cada lavagem também foram transferidos para novos microtubos (fração de lavagem 1, 2 e 3). Controles negativos foram realizados com tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 150 mM NaCl e nanopartículas de PHB.

Para verificar a imobilização de RBD nas nanopartículas de PHB, 20 μ L de tampão de amostra Laemili 1x foi adicionado ao precipitado e após as amostras serem fervidas por cerca de 10 minutos, todas as frações foram analisadas por gel SDS-PAGE 12%. A desnaturação das proteínas imobilizadas nas nanopartículas faz com que elas se desliguem do PHB e se solubilizem no tampão de amostra, permitindo o monitoramento da imobilização por SDS-PAGE.

3.17 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOPARTÍCULAS DE PHB ATRAVÉS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.

A caracterização morfológica e topográfica das nanopartículas de PHB foi realizada por microscopia de força atômica com o microscópio Shimadzu modelo SPM-9700 em parceria com a Prof^a. Dr^a. Lucimara Stolz Roman e a Dr^a. Maiara Bassi do Departamento de Física da UFPR. Nesse experimento, 50 µL de nanopartículas em solução aquosa foram depositados em lâminas de vidro com dimensões de 1,00 x 1,00 cm. Após a deposição, as lâminas foram incubadas *overnight* em temperatura ambiente para secagem. A secagem das amostras também foi realizada em estufas de 30, 37 e 60 °C. Além disso, as amostras também foram secas em dessecador para tentar reduzir o tempo dessa etapa.

As amostras foram analisadas através de imagens geradas com resolução atômica através da medida das forças de atração ou repulsão entre os átomos da superfície da amostra e da sonda que varre a área em que a amostra está. Esta varredura é feita por intermédio de um sistema piezoelétrico, com deslocamento nas posições x, y e z com precisão de décimo de Angstrom, o que se dá através da variação da tensão aplicada. O deslocamento é controlado por um circuito de realimentação cuja função é manter a força e/ou altura constante. As medidas de comprimento e diâmetro obtidas foram coletadas e analisadas através do software do equipamento.

3.18 WESTERN BLOT

As amostras a serem analisadas foram aplicadas em gel de poliacrilamida desnaturante utilizando o método descrito por LAEMMLI (1970). Após a eletroforese desnaturante, o gel foi equilibrado em tampão cátodo (C – 0,025 M Tris-HCl pH 10; 20% metanol; 0,04 M ácido caprício). A membrana de nitrocelulose PVDF (Hybond ECL – GE Healthcare) foi previamente ativada em metanol, lavada em água destilada e equilibrada em solução A2 (0,025 M Tris-HCl pH 10; 20% metanol). O sistema foi montado num aparato de transferência semi-seco.

A placa do ânodo foi inicialmente coberta com 4 camadas de papel filtro previamente imersas em solução A1 (0,3 M Tris-HCl pH10; 20% metanol). Duas camadas de papel filtro contendo solução A2 foi colocada no sistema, seguido da membrana de PVDF previamente imersa na solução A2. O gel foi, então, colocado sobre a membrana (com cuidado para evitar bolhas de ar no sistema). Seis camadas

de papel filtro contendo solução C (0,025 M Tris pH 10; 20% metanol; 0,04 M ácido capróico) foram colocadas sobre o gel. Um bastão de vidro foi utilizado para comprimir o sistema de transferência e expelir eventuais bolhas de ar. A placa do cátodo foi colocada sobre as folhas de papel filtro, o sistema foi conectado a uma fonte de eletroforese a 80 mA por 1 hora. A transferência foi avaliada através de um gel “espelho”, que foi corado com Coomassie Blue R-250 e descoradas em uma solução com 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada com 5% (m/v) de leite em pó desnatado em tampão TBST (Tris-HCl pH 7,6; 20 mM; NaCl 150 mM; Tween 20 0,1% (m/v)) por 1 hora. Em seguida, a membrana foi lavada com TBST por 5 minutos com agitação constante. Essa lavagem foi repetida 3 vezes trocando o tampão. Após a lavagem a membrana foi incubada com 1:5.000 de anticorpo primário em solução 5% de leite em pó desnatado em TBST por 1 hora e 30 minutos. Depois desse período de incubação com o anticorpo primário a membrana foi lavada com TBST por 5 minutos com agitação constante, essa lavagem foi repetida 3 vezes trocando o tampão. A membrana foi incubada com a solução de 1:10.000 de anticorpo secundário (anti IgG de coelho conjugado com a enzima peroxidase HRP – Bio-Rad) em solução de 3% (m/v) de leite em pó desnatado em TBST por 1 hora em agitação constante. Após esse tempo, a membrana passou por três lavagens de 5 minutos com TBST e foi submetida à etapa de revelação utilizando o sistema ECL (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. Os sinais de luminescência foram capturados em filmes de raio-X (BioMax – GE Healthcare). Os anticorpos utilizados nesse trabalho estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Anticorpos utilizados nesse estudo.

Anticorpo	Diluição	Fonte
Anticorpo policlonal - Anti-Spike-RBD-SARS-CoV-2 de coelho	1:5000	Sino Biological Inc
Anticorpo policlonal - Anti-Nucleocapsídeo-SARS-CoV-2 de coelho	1:5000	Invitrogen - Thermo Fisher Scientific
Anti-IgG de coelho conjugado com a enzima Peroxidase (HRP)	1:10000	Bio-Rad Laboratories
Anti-IgG humana conjugada com a enzima Peroxidase (HRP)	1:3000	Invitrogen - Thermo Fisher Scientific

Fonte: a autora (2022).

3.19 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICO (ELISA)

As proteínas recombinantes RBD-SBD e N-SBD foram utilizadas como antígeno no ensaio de ELISA indireto, que é realizado em 2 etapas: um anticorpo primário que reconhece especificamente o antígeno e um anticorpo secundário conjugado com uma enzima que reconhece o anticorpo primário.

Para esse ensaio 100 μL da proteína na concentração de 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ em tampão Bicarbonato/Carbonato 50mM pH 9,6 foi adicionado em microplacas de 96 poços (Nunc MaxiSorp™ – Invitrogen), e incubados em estufa a 37°C para que as proteínas adsorvessem na placa. Após esse período, as placas foram esvaziadas por inversão e lavadas com 300 μL de tampão fosfato em solução salina (PBS 1x 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 e 1,4 mM KH_2PO_4 em pH 7,4) esse procedimento foi repetido três vezes.

Após a lavagem, foi adicionado 300 μL do tampão de bloqueio 2% de BSA (Albumina de soro bovino) em PBS 1x e a placa foi incubada em estufa 37°C por 1 hora. Posteriormente o conteúdo da placa foi descartado por inversão e a microplaca foi lavada três vezes com 300 μL de PBS 1x. Após a lavagem foi adicionado 100 μL do anticorpo primário ou de amostras de soro, que foram diluídos em tampão de bloqueio. A microplaca foi então incubada em temperatura ambiente por 1 hora.

Após esse período de incubação a microplaca foi esvaziada e lavada três vezes com tampão PBS 1x. Depois da lavagem foi adicionado 100 μL do anticorpo secundário conjugado com a enzima peroxidase HRP em solução de tampão de bloqueio, e a microplaca foi incubada em temperatura ambiente por 1 hora. Ao final da incubação a microplaca foi lavada como descrito anteriormente. A cada poço foram adicionadas 50 μL do substrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina – solução comercial pronta para uso da Sigma-Aldrich) e, após 5 minutos e sob abrigo da luz, adicionou-se 50 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 1N) com o objetivo de parar as reações, as quais foram quantificadas no espectrofotômetro de microplacas Synergy LX Multi-Mode Reader (BioTek Instruments) com absorção de luz a 450 nm. Para a interpretação dos dados, os valores de absorbância obtidos dos poços denominadas controle/branco foram subtraídos das absorbâncias das amostras. Em seguida as médias aritméticas dos valores das absorbâncias das amostras positivas e negativas foram calculadas, bem como os seus respectivos desvios padrão, utilizando o

programa Microsoft Excel 2010. Os anticorpos utilizados nesse trabalho estão listados na Tabela 3.

As amostras de soro utilizadas nesse trabalho foram disponibilizadas pela Professora Fabiane Gomes de Moraes Rego do Departamento de Análises Clínicas da UFPR e pelo Professor Alexander Welker Biondo do Departamento de Medicina Veterinária da UFPR.

3.19.1 ELISA COMERCIAL PARA ANTICORPOS CONTRA A SPIKE DE SARS-COV-2

Para comparar os resultados obtidos com os ensaios de ELISA feitos em nosso laboratório, utilizamos o kit comercial SARS-CoV-2 Spike Protein Serological IgG ELISA Kit da Cell Signaling Technology e seguimos as especificações do fabricante.

3.19.2 ELISA INDIRETO COM NPs DA PROTEÍNA RBD-SBD DE SARS-COV-2

Após a confirmação da imobilização do domínio RBD da proteína Spike nas nanopartículas de PHB, ensaios de ELISA indireto foram realizados. Para isso, após a imobilização da proteína RBD-SBD nas nanopartículas de PHB, a mistura foi centrifugada (10.000 x *g*, 2 min, a temperatura ambiente) e o sobrenadante removido. Após a remoção do sobrenadante, 300 µL da solução de bloqueio BSA 2% (m/v) albumina de soro bovino em PBS 1x foram adicionados ao microtubo e as amostras foram incubadas a 37 °C por 1 hora.

Posteriormente, a mistura foi centrifugada (10.000 x *g*, 2 min, a temperatura ambiente) novamente e o sobrenadante removido. Então, as nanopartículas foram lavadas com PBS 1x mais 3 vezes. Depois, 200 µL de anticorpo primário anti-Spike-RBD-SARS-CoV-2 de coelho (Tabela 3) diluído 1:1.000 em solução de bloqueio (BSA 2%, m/v) foram adicionados aos microtubos. A mistura foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente e centrifugada (10.000 x *g*, 2 min, a temperatura ambiente) e o sobrenadante removido. As nanopartículas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS 1x e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase HRP (Tabela 3) diluído 1:3.000 em solução de bloqueio (BSA 2%, m/v) foi adicionado.

A mistura foi incubada novamente em temperatura ambiente por 1 hora. Após esse intervalo, a mistura foi centrifugada (10.000 x *g*, 2 min, a temperatura ambiente) e o sobrenadante removido. A amostra foi lavada mais 3 vezes com tampão PBS 1x

e, então, 100 µL de TMB (3,3',5',5'-Tetrametilbenzidina – solução comercial pronta para uso da Sigma-Aldrich) foram adicionados a amostra. Após 5 minutos, a mistura foi novamente centrifugada (10.000 x g, 2 min, a temperatura ambiente) e o sobrenadante foi transferido para uma microplaca de 96 poços de fundo chato. Posteriormente, 100 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄, 1N) foram adicionados a cada poço para bloquear a reação. Em seguida, a absorbância das amostras foi lida a 450 nm em leitor de microplaca. Nesse ensaio, a proteína RBD ligada ao PHB é reconhecida pelo anticorpo primário e por sua vez o anticorpo primário é reconhecido pelo secundário. Essa ligação entre o anticorpo é identificada através da adição do substrato TMB que em contato com a enzima peroxidase conjugada ao anticorpo secundário emite um sinal, que nesse caso é a coloração azul. Após a adição do ácido, a coloração da reação foi alterada para o amarelo.

Alternativamente, o anticorpo primário anti-Spike-RBD-SARS-CoV-2 de coelho foi substituído por amostras de soro de pacientes COVID-19 positivos nos testes de ELISA para verificar se o antígeno RBD-SBD também seria reconhecido pelo anticorpo presente nas amostras de soro humano.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTES RBD-SBD

A proteína recombinante RBD-SBD, com domínio RBD da Spike de SARS-CoV-2 e a cauda SBD foi expressa a partir do vetor pET29b utilizando a estirpe de *E. coli* BL21(DE3). Para expressar a proteína RBD-SBD foram testados dois protocolos de expressão, o primeiro foi com o crescimento dos transformantes em LB a 37°C a 120 rpm até uma DO₆₀₀ 0,5-0,6. Nesse ponto foi adicionado o indutor de expressão IPTG na concentração final de 0,5 mM. A expressão prosseguiu durante 4 horas a 37°C. O segundo teste foi com o crescimento dos transformantes a 30°C, 120 rpm por 24 horas. Nesse caso, não se adicionou IPTG ao cultivo. Para avaliar a solubilidade das proteínas, após a ruptura das células bacterianas por sonicacão, as amostras foram centrifugadas e separadas em extrato bruto, fração solúvel e insolúvel. Posteriormente, as frações do extrato bruto (antes da centrifugação), solúvel e insolúvel foram analisadas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida de acordo com o protocolo estabelecido por Laemmli (1970).

De acordo com o perfil proteico da expressão da proteína RBD-SBD (Figura 9), foi possível observar bandas correspondentes a massa molecular esperada (~33 kDa) para a proteína RBD-SBD nas frações insolúveis dos dois protocolos de expressão testados. Como a RBD-SBD foi expressa nos dois testes, o protocolo de autoindução da expressão a 30°C durante 24 horas foi escolhido, visto que já foi demonstrado na literatura a expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* pelo sistema de expressão com promotor T7 representando 50% do total de proteínas bacterianas expressas (BRIAND et al., 2016).

Além disso, a utilização desse protocolo de expressão é interessante devido aos seguintes fatores: (i) não há necessidade de acompanhar o crescimento bacteriano para verificar qual a melhor D.O. para a adição do IPTG; (ii) redução dos custos da expressão da proteína em bactéria; (iii) a utilização do IPTG não é economicamente viável para produção de proteínas recombinantes em larga escala; e (iv) a indução com IPTG para a produção de proteínas para uso terapêutico em humanos possui limitações relacionadas a sua toxicidade (BRIAND et al., 2016).

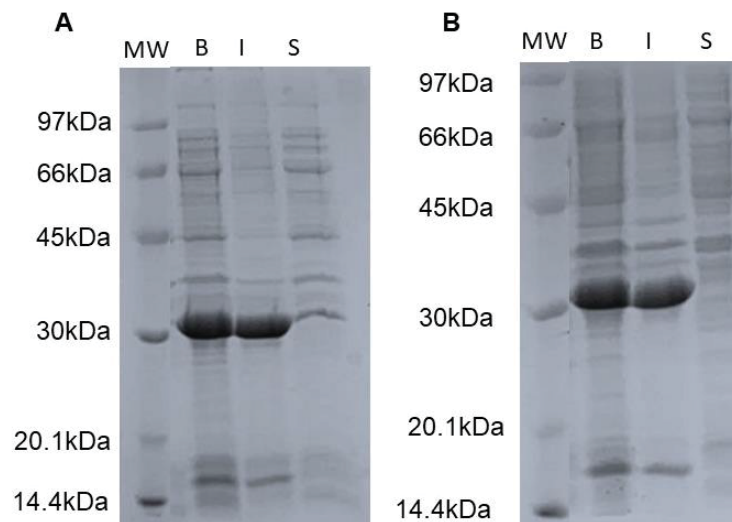


Figura 10 - Eletroforese SDS-PAGE das frações da expressão do domínio RBD de SARS-CoV-2 com cauda SBD em *Escherichia coli* BL21(DE3).

Figura A expressão da proteína RBD-SBD com o protocolo de indução com 0,5 mM de IPTG seguido de 4 horas de expressão. Figura B, expressão da proteína RBD-SBD pelo protocolo de autoindução a 30°C por 24 horas. MW: marcador molecular, B: extrato bruto, S e I correspondem, respectivamente, às frações solúvel e insolúvel.

A insolubilidade da RBD-SBD expressa em *E. coli* já era esperada devido aos problemas inerentes a estratégia de expressão heteróloga e pela ausência de formação de pontes dissulfeto ou pela formação de pontes dissulfeto em pontos

inadequados da proteína, resultando em enovelamento defeituoso e precipitação na forma de corpos de inclusão na fração insolúvel. Além disso, a ausência de glicosilação em *E. coli* pode afetar diretamente a qualidade do dobramento do domínio RBD da Spike expresso na bactéria. Para solubilizar a RBD-SBD, os corpos de inclusão foram primeiramente lavados com um tampão contendo Triton X-100 para remover possíveis resíduos de membrana plasmática da bactéria e ureia a 1 M para remover proteínas agregadas aos corpos de inclusão. Para solubilizar os corpos de inclusão a concentração de ureia foi aumentada para 8M. Mesmo com 8 M do agente desnaturante, os corpos de inclusão ainda demonstraram certa resistência para se solubilizarem, mas aspirando e expelindo o tampão várias vezes foi possível solubilizar uma quantidade significativa dos corpos de inclusão. Embora o aumento de temperatura pudesse eventualmente melhorar a solubilidade da proteína RBD-SBD em ureia 8 M, a solubilização dos corpos de inclusão foi sempre realizada a temperatura ambiente para evitar reações de carbamilação entre a ureia e aminoácidos da RBD-SBD. A amostra foi recuperada e analisada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (Figura 10). A proteína foi dosada pelo método de Bradford, atingindo concentração de 0,56 µg/µL.

Após a extração da proteína RBD-SBD dos corpos de inclusão ainda podemos verificar uma banda de aproximadamente 15kDa (Figura 10), que parece estar relacionada com a banda de 33kDa da proteína RBD-SBD, visto que na expressão ela já aparece, como é possível visualizar na figura 9, assim é possível inferir que essa banda seja uma parte da proteína RBD-SBD, que sofreu a ação proteolítica ou uma falha de expressão da proteína, que pode ocasionar na diminuição do seu tamanho. Além disso, através do ensaio de Western blot na seção 4.6 podemos verificar que as duas bandas são reconhecidas pelo anticorpo Anti-Spike-RBD-SARS-CoV-2, confirmando que as duas bandas possuem umas sequências de aminoácidos que é reconhecida pelo anticorpo.

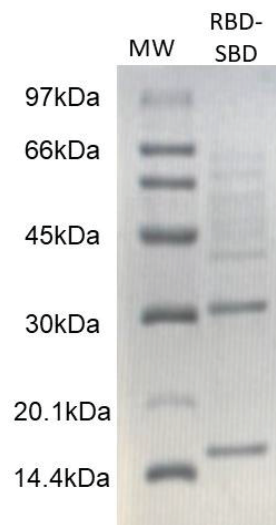


Figura 11 – Eletroforese SDS-PAGE da fração do domínio RBD de SARS-CoV-2 com cauda SBD recuperada dos corpos de inclusão.

A primeira linha corresponde ao marcador de massa molecular (MW) e a segunda linha corresponde a proteína RBD-SBD (foi aplicado no gel 2,8 µg da proteína) recuperada através da solubilização em tampão 50 mM Tris-HCl e 8M Ureia e posterior diálise.

4.2 SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE N-SBD

A proteína N-SBD do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 foi expressa a partir do vetor de expressão pET28a utilizando a estirpe de *E. coli* BL21(DE3). Para expressar a proteína N-SBD foram testados dois protocolos de expressão, o primeiro foi com o crescimento dos transformantes em LB a 37°C a 120 rpm até DO_{600} 0,5-0,6. Nesse ponto foi adicionado o indutor de expressão IPTG na concentração final de 0,5 mM. A expressão prosseguiu durante 4 horas a 37°C. O segundo teste foi com o crescimento dos transformantes a 37 °C a 120 rpm até uma DO_{600} 0,3-0,5, depois as culturas foram colocadas para crescer a 16°C por 30 minutos, após este período foi adicionado o indutor de expressão IPTG na concentração final de 0,3mM. A expressão prosseguiu *overnight* a 16°C a 120 rpm. Para avaliar a solubilidade das proteínas, após a ruptura das células bacterianas por sonicacão, as amostras foram centrifugadas e separadas em extrato bruto, fração solúvel e insolúvel. Posteriormente, as frações do extrato bruto (antes da centrifugação), solúvel e insolúvel foram analisadas através de eletroforese em gel de poliácridamida (Figura 11).

De acordo com a figura 11 é possível verificar o perfil de expressão da proteína N-SBD, em que foi possível observar bandas correspondentes à massa molecular esperada (~53 kDa) para a proteína N-SBD. No teste de expressão de indução com

IPTG a 37°C a 120 rpm por 4h a proteína N-SBD foi observada na fração insolúvel, já no protocolo de indução com IPTG a 16°C a 120 rpm *overnight*, a proteína N-SBD foi observada na fração solúvel, assim este protocolo de expressão foi utilizado para todos os outros ensaios.

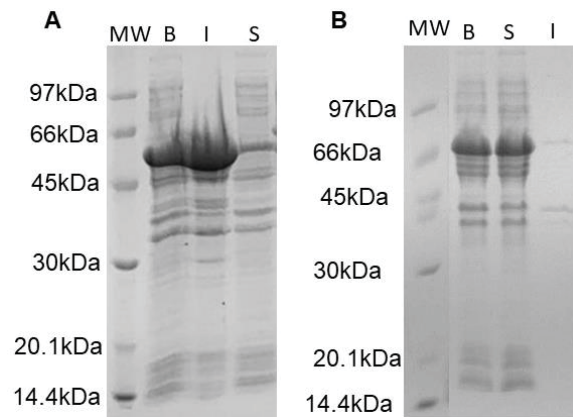


Figura 12 - Eletroforese SDS-PAGE das frações de expressão da proteína N de SARS-CoV-2 com cauda SBD em *Escherichia coli* BL21(DE3).

Figura A expressão da proteína N-SBD com o protocolo de indução com 0,5 mM de IPTG seguido de 4 horas de expressão. Figura B expressão da proteína N-SBD pelo protocolo de indução com 0,3 mM de IPTG a 16°C *overnight*. MW: marcador molecular, B: extrato bruto, S: extrato solúvel e I: extrato insolúvel.

Para purificar a proteína N-SBD foi utilizada a cromatografia de afinidade ao Ni^{2+} . Para tanto, a fração solúvel foi injetada em uma coluna HiTrap Chelating carregada com 100 mM de NiCl_2 e equilibrada com tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl e 20 mM Imidazol. A fração de N-SBD foi eluída em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl e gradiente de 50 mM a 200mM de Imidazol (Figura 12).

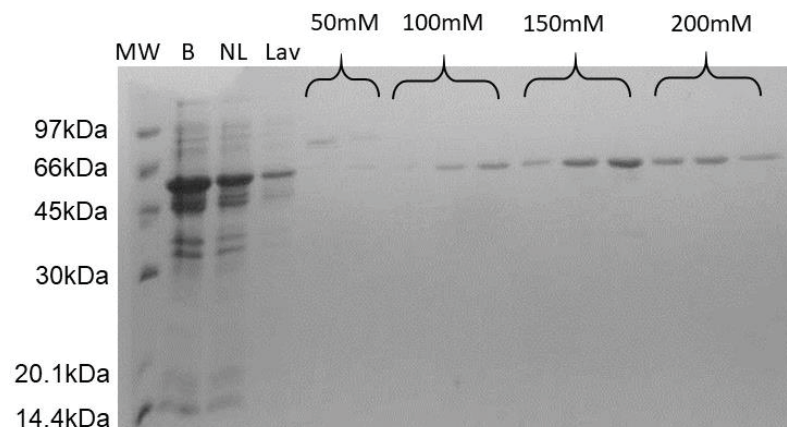


Figura 13 - Eletroforese SDS-PAGE das frações da purificação da proteína N de SARS-CoV-2 com cauda SBD.

A primeira linha corresponde ao marcador de massa molecular (MW), a segunda linha corresponde a fração bruta (B) de expressão da proteína N-SBD, a terceira linha corresponde a fração não ligada (NL), a quarta linha corresponde a fração de lavagem (Lav), e as linhas seguintes são correspondentes ao gradiente de 50 mM à 200mM de imidazol de eluição da proteína N-SBD.

Após a purificação da proteína N-SBD, as frações eluídas nas concentrações de 150mM e 200mM de Imidazol foram transferidas para uma membrana de celulose com limite de exclusão de 12 kDa para diálise contra 1 L de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl *overnight* a temperatura ambiente. Posteriormente, a amostra foi recuperada e analisada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% (Figura 13). A proteína foi dosada pelo método de Bradford, no qual verificou-se a concentração de 0,44µg/µL.

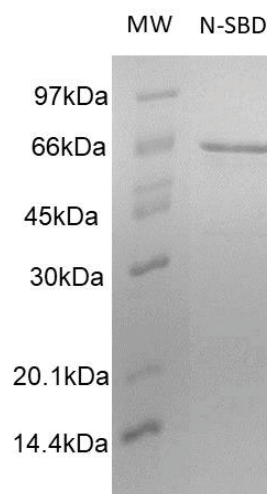


Figura 14 - Eletroforese SDS-PAGE da proteína N de SARS-CoV-2 com cauda SBD após a purificação por cromatografia de afinidade.

A primeira linha corresponde ao marcador de massa molecular (MW) e a segunda linha corresponde a proteína N-SBD purificada (foram aplicados no gel 2,2 µg da proteína) através da cromatografia de afinidade de Ni²⁺ e posterior diálise.

4.3 SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES SFGFP-SBD E MRFP-SBD

A obtenção dessas duas proteínas fluorescentes sfGFP-SBD e mRFP-SBD irá possibilitar a avaliação de como ocorre a interação entre a tag SBD e as nanopartículas de PHB, se as proteínas têm a mesma força de interação através de

testes de competição de imobilização com uma mistura dessas duas proteínas. Outro experimento que será feito com essas proteínas é a microscopia de força atômica para visualizar como ocorre a imobilização das proteínas nas nanopartículas.

As proteínas recombinantes sfGFP-SBD e mRFP-SBD foram expressas a partir do vetor de expressão pET28a utilizando a estirpe de *E. coli* BL21(DE3). Os transformantes foram inoculados em meio LB a 37°C a 120 rpm até uma DO₆₀₀ 0,5-0,6. Nesse ponto foi adicionado o indutor de expressão IPTG na concentração final de 0,5 mM. A expressão prosseguiu durante 4 horas a 37°C. Para avaliar a solubilidade das proteínas, após a ruptura das células bacterianas por sonicação, as amostras foram centrifugadas e separadas em extrato bruto, fração solúvel e insolúvel. Posteriormente, as frações do extrato bruto (antes da centrifugação), solúvel e insolúvel foram analisadas através de eletroforese SDS-PAGE 12% (Figura 14).

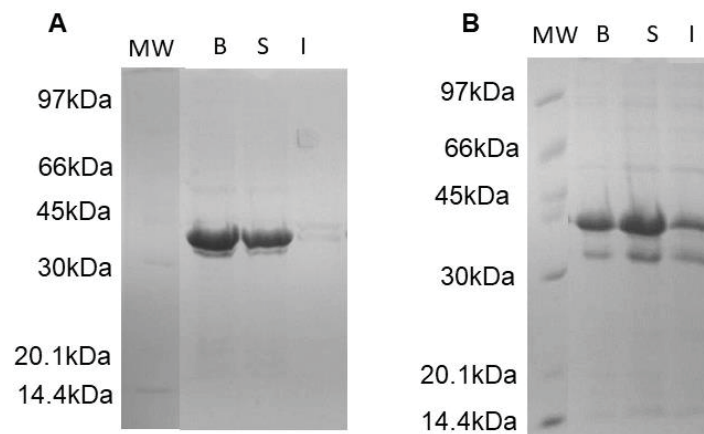


Figura 15 - Eletroforese SDS-PAGE das frações de expressão das proteínas sfGFP e mRFP com cauda SBD em *Escherichia coli* BL21(DE3).

Figura A expressão da proteína sfGFP-SBD com o protocolo de indução com 0,5mM de IPTG seguido de 4 horas de expressão. Em B, expressão da proteína mRFP-SBD com o protocolo de indução com 0,5mM de IPTG seguido de 4 horas de expressão. MW: marcador molecular, B: extrato bruto, S: extrato solúvel e I: extrato insolúvel.

Na figura 14 A, observa-se uma banda superexpressa de peso molecular ao redor de 33 kDa que corresponde a proteína sfGFP-SBD. Da mesma forma, na figura 14 B, nota-se uma banda superexpressa ao redor de 33 kDa o peso molecular correspondente da proteína mRFP-SBD.

Após a expressão, tanto a proteína sfGFP-SBD quanto mRFP-SBD foram recuperadas na fração solúvel. Diante disso, para a purificação dessas proteínas foi utilizada a cromatografia de afinidade. Para tanto, a fração solúvel foi injetada em uma coluna HiTrap Chelating carregada com 100 mM de NiCl₂ e equilibrada com tampão

50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl e 20 mM Imidazol. A fração de N-SBD foi eluída em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl e gradiente de 50 mM a 200 mM de Imidazol (Figura 15).

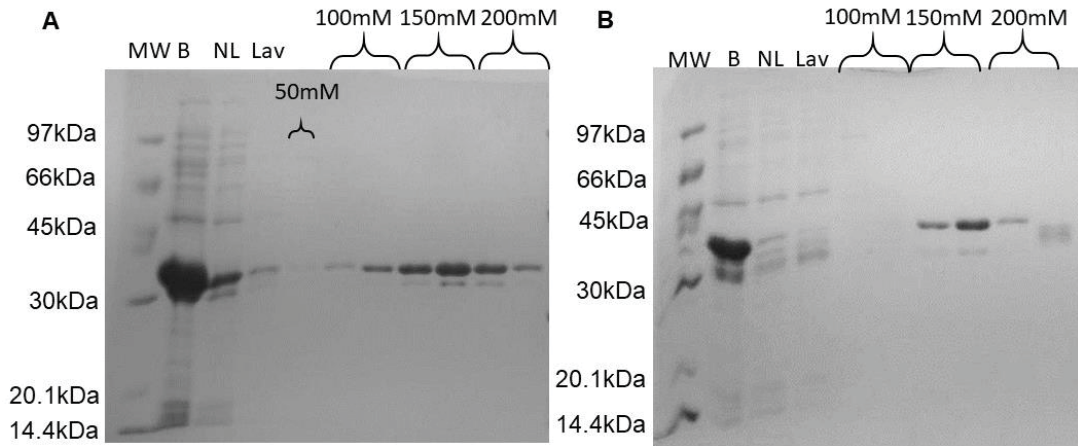


Figura 16 - Eletroforese SDS-PAGE das frações da purificação por cromatografia de afinidade das proteínas sfGFP e mRFP com cauda SBD.

Em A, tem-se o gel referente a purificação da proteína sfGFP-SBD. MW: marcador de massa molecular, B: fração bruta, NL: fração não ligada, Lav: fração de lavagem, e as linhas seguintes são correspondentes ao gradiente 50 mM à 200mM de imidazol de eluição da proteína sfGFP-SBD. Em B, tem-se o gel referente a purificação da proteína mRFP-SBD. MW: marcador de massa molecular, a B: fração bruta, NL: fração não ligada, Lav: fração de lavagem, e as linhas seguintes são correspondentes ao gradiente 50 mM à 200mM de imidazol de eluição da proteína mRFP-SBD.

Após a purificação da proteína sfGFP-SBD, as frações eluídas na concentração de 150 mM de Imidazol foram transferidas para uma membrana de celulose com cut-off de 12 kDa para diálise contra 1 L de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl *overnight* a temperatura ambiente. Posteriormente, a amostra foi recuperada e analisada por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% (Figura 16). A proteína foi dosada pelo método de Bradford, no qual verificou-se a concentração de 0,76 µg/µL.

Após a purificação da proteína mRFP-SBD, as frações eluídas na concentração de 150 mM de Imidazol foram transferidas para uma membrana de celulose com cut-off de 12kDa para diálise contra 1L de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl *overnight* a temperatura ambiente. Posteriormente, a amostra foi recuperada e analisada por eletroforese de gel SDS-PAGE 12% (Figura 16). A proteína foi dosada pelo método de Bradford, no qual verificou-se a concentração de 0,4 µg/µL.

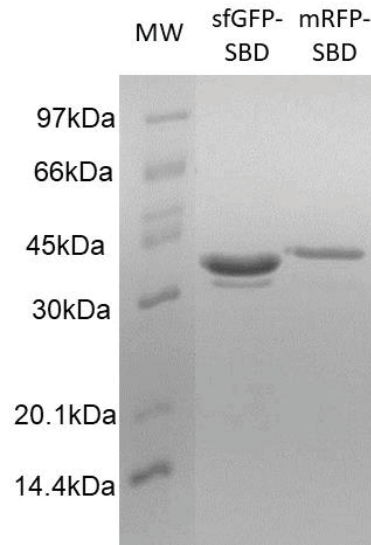


Figura 17 - Eletroforese SDS-PAGE das proteínas sfGFP e mRFP com cauda SBD após diálise.

A primeira linha corresponde ao marcador de massa molecular (MW) e a segunda linha corresponde a proteína sfGFP-SBD (foi aplicado no gel 3,8 µg da proteína) e a terceira linha corresponde a proteína mRFP-SBD (foi aplicado no gel 2 µg da proteína).

4.4 TESTE DE IMOBILIZAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE RBD-SBD, N-SBD E SFGFP-SBD

Após a expressão e purificação das proteínas recombinantes RBD-SBD, N-SBD e sfGFP-SBD foi feito o ensaio de imobilização das proteínas nas nanopartículas de PHB através da cauda SBD, que é o domínio de ligação ao substrato (SBD) da PHA depolimerase de *Alcaligenes faecalis*. Para isso foram realizados os ensaios em temperatura ambiente. Primeiro, 50 µL da fração dialisada das proteínas após a purificação foram incubadas com 50 µL de nanopartículas de PHB em um microtubo de 1,5 mL. A amostra foi levemente misturada e incubada por 5 minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada (10.000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente) e o sobrenadante foi removido. Em seguida, as nanopartículas foram ressuspensas em tampão PBS e centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi novamente removido e todas as frações foram analisadas através de gel de SDS-PAGE (Figura 17).

Para verificar a imobilização de RBD-SBD nas nanopartículas, o tampão de amostra foi adicionado diretamente as nanopartículas remanescentes da última centrifugação. A princípio, após a fervura, a proteína imobilizada nas nanopartículas

seria desnaturada e se desligaria das nanopartículas fazendo com que fosse possível visualizar as proteínas em tampão de amostra.

Conforme mostra a Figura 17, foi possível observar as proteínas recombinantes RBD-SBD, N-SBD e sfGFP-SBD na fração ligada as nanopartículas (proteína recombinante + NPs).



Figura 18 - Eletroforese SDS-PAGE das frações da imobilização das proteínas recombinantes RBD-SBD e N-SBD de SARS-CoV-2 com cauda SBD e sfGFP-SBD.

Na primeira linha contém o marcador de massa molecular (MW), a linha 1 contém a fração de RBD-SBD (~33kDa) purificada e dialisada (RBD-SBD), a linha 2 contém a fração de RBD-SBD imobilizada nas nanopartículas de PHB, a linha 3 a fração não ligada e a linha 4 a fração de lavagem. Na linha 5 há a fração da proteína N-SBD (~53kDa) purificada e dialisada, a linha 6 contém a fração de N-SBD imobilizada nas nanopartículas de PHB, a linha 7 a fração não ligada e na linha 8 a fração de lavagem. Na linha 9 há a fração da proteína sfGFP-SBD purificada e dialisada, a linha 10 contém a fração de sfGFP-SBD (~34kDa) imobilizada nas nanopartículas de PHB, na linha 11 a fração não ligada e na linha 12 a fração de lavagem. Para todas as amostras, 5 μ L de proteína foram aplicados em gel de Tris-Glicina 12%.

4.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOPARTÍCULAS DE PHB ATRAVÉS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.

Após a preparação das nanopartículas por nanoprecipitação, as amostras foram analisadas por imagens obtidas através de microscopia de força atômica. Primeiramente, para determinar o melhor método de secagem, as nanopartículas em suspensão aquosa foram depositadas em lâminas de vidro e incubadas em estufas de 30, 37 e 60°C. Nessa etapa, as amostras secaram em menos de 2 horas, mas conforme pode ser observado na Figura 18, em 37°C as nanopartículas de PHB

parecem ter formado grandes agregados e em 60 °C parecem ter sofrido algum tipo de degradação, visto que a morfologia ficou bastante irregular.

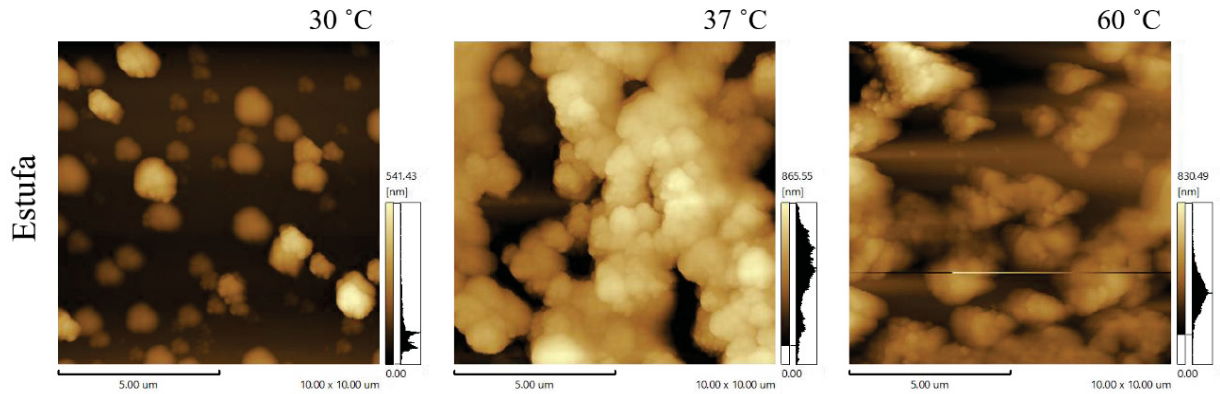


Figura 19 – Imagens topográficas em 2D das nanopartículas de PHB obtidas através de microscopia de força atômica em diferentes temperaturas de secagem em estufa.

Ao lado das imagens é possível verificar o diâmetro médio em nanômetros obtido através da análise da topografia da amostra de nanopartículas de PHB.

O aumento da temperatura de secagem aumentou o tamanho médio das nanopartículas na topografia observada em 30°C, que de 541,43nm, passou para 865,55nm e 830,49nm em 37°C e 60°C, respectivamente. No entanto, em todas as condições testadas, depois de aproximadamente 1 hora de incubação, foi possível observar a formação de agregados esbranquiçados na lâmina. Essa formação de agregados durante a secagem pode influenciar de forma significativa a organização das nanopartículas e, conseqüentemente, a análise das imagens e cálculo do tamanho das nanopartículas presentes na amostra.

Dessa forma, outros métodos de secagem também foram testados (Figura 19). A princípio a secagem no dessecador resultou em um padrão parecido com o obtido em 60 °C, mas ainda mais irregular e com grumos ainda maiores. Em prato quente, o efeito da temperatura foi maior, provavelmente pela lâmina de vidro estar em contato direto com a amostra de nanopartículas. Apesar de ser possível identificar a morfologia das nanopartículas em alguns pontos das imagens, a agregação prejudicou a estimativa dos tamanhos das partículas. No entanto, na secagem em temperatura ambiente, apesar de ser possível observar algum nível de agregação e uma diversidade no tamanho, as nanopartículas ficaram dispostas de forma mais homogênea possibilitando a estimativa do tamanho de 100 a 500 nm.

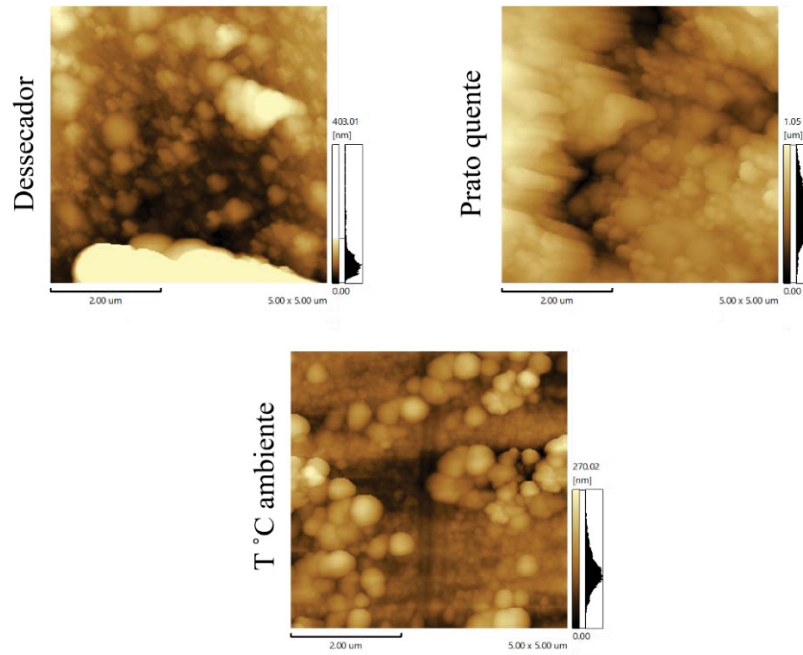


Figura 20 - Imagens topográficas em 2D das nanopartículas de PHB obtidas através de microscopia de força atômica utilizando diferentes métodos de secagem.

Ao lado das imagens é possível verificar o diâmetro médio em nanômetros obtido através da análise da topografia da amostra de nanopartículas de PHB.

4.6 RECONHECIMENTO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES RBD-SBD E N-SBD ATRAVÉS DO ENSAIO DE WESTERN BLOT

Após a purificação da proteína recombinante RBD-SBD de SARS-CoV-2 e a sua confirmação por gel de SDS-PAGE, foi realizado o ensaio de Western Blot para verificar o reconhecimento da proteína por imunodeteção.

Para isso foi aplicado em 1 μg da amostra de RBD-SBD em gel de SDS-PAGE 12%, transferida para uma membrana de PVDF. Para o reconhecimento da proteína RBD-SBD foi utilizado o anticorpo primário Anti-Spike-RBD-SARS-CoV-2 de coelho na diluição 1:5000, e o anticorpo secundário Anti-IgG de coelho conjugado com a enzima peroxidase HRP na diluição de 1:10.000, após a incubação com os anticorpos foi revelado em filmes de raio-X com exposição de 2 minutos com o substrato.

Como pode ser observado na figura 20, a proteína RBD-SBD foi imunodetectada, confirmando assim que a proteína expressada e purificada é reconhecida pelo anticorpo Anti-Spike-RBD-SARS-CoV-2. Diante desse resultado, a proteína RBD-SBD pode ser utilizada para ensaios de imunização como o antígeno para apresentação ao sistema imune. Além disso essa proteína RBD-SBD pode ser utilizada como antígeno em teste diagnóstico sorológico, como o ELISA. Com esse

resultado também pudemos confirmar que a banda de aproximadamente 15 kDa está relacionada a proteína RBD-SBD de 33 kDa. Portanto, infere-se que essa banda de 15 kDa é resultado de uma atividade proteolítica ou de uma expressão falha da proteína RBD-SBD, o que fica evidente com a menor imunogenicidade da banda de 15 kDa.

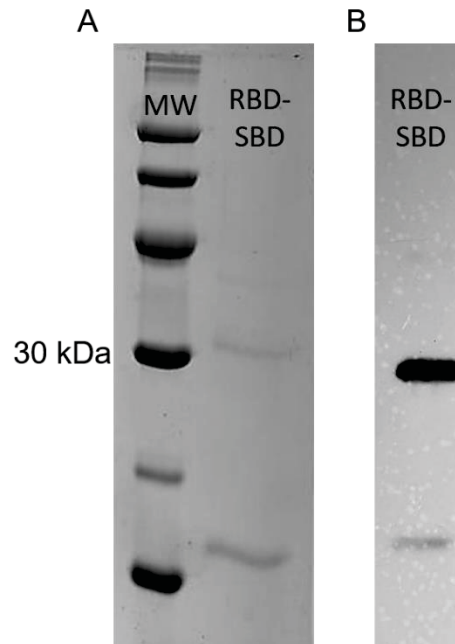


Figura 21 – Imunodeteccção da proteína RBD-SBD por Western Blot.

Em A eletroforese SDS-PAGE, MW: marcador molecular, e na segunda linha: proteína RBD-SBD com concentração de 1 μ g. Em B filme de Western Blot com o anticorpo Anti-Spike-RBD-SARS-CoV-2 de coelho revelado com 2 minutos de exposição com o substrato.

Da mesma forma apos a purificação da proteina recombinante N-SBD de SARS-CoV-2 e a sua confirmação por gel de SDS-PAGE, foi realizado o ensaio de Western Blot para verificar o reconhecimento da proteina por imunodetecco.

Para isso foi aplicado 0,1 μ g de N-SBD em gel de SDS-PAGE 12%, transferida para uma membrana de PVDF. Para o reconhecimento da proteina RBD-SBD foi utilizado o anticorpo primário Anti-Nucleocapsídeo-SARS-CoV-2 de coelho na diluição 1:5.000, e o anticorpo secundário Anti-IgG de coelho conjugado com a enzima peroxidase HRP na diluição de 1:10.000, apos a incubação com os anticorpos foi revelado em filmes de raio-X com exposição de 2 minutos com o substrato.

Como pode ser observado na figura 21, a proteina N-SBD foi imunodetectada, confirmando assim que a proteina expressada e purificada  reconhecida pelo anticorpo Anti-Nucleocapsídeo-SARS-CoV-2, sugerindo assim que essa proteina

pode ser utilizada para ensaios de imunização para teste da utilização dessa proteína como antígenos para produção de vacina, e também para a uso dessa proteína como antígeno em teste diagnóstico sorológico, como o ELISA.

Com esse ensaio de Western blot verifica-se a degradação que a amostra da proteína purificada N-SBD sofreu com a presença de 3 bandas, sendo as duas bandas inferiores da proteína com tamanho próximo de 45 kDa, e a banda superior com o tamanho da proteína N-SBD é de aproximadamente 53 kDa. Essa degradação pode ser decorrente da ausência de inibidores de protease durante todo o processo de expressão e purificação da proteína. Além disso, outra situação que pode ter facilitado a degradação da amostra da proteína N-SBD foi que o tampão de diálise não possuía nenhum elemento crioprotetor, como por exemplo o glicerol.

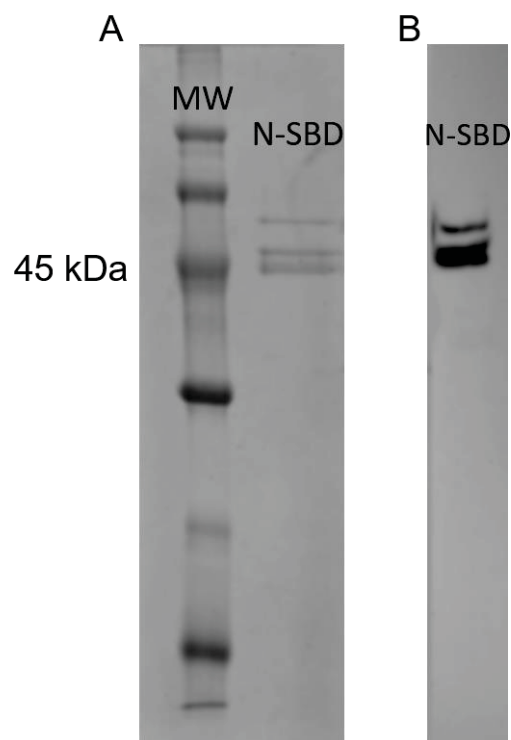


Figura 22 - Imunodeteção da proteína N-SBD por Western Blot.

Em A eletroforese SDS-PAGE, MW: marcador molecular e na segunda linha a proteína N-SBD com concentração de 0,1µg. Em B filme de Western Blot com o anticorpo Anti-Nucleocapsideo-SARS-CoV-2 de coelho revelado com 2 minutos de exposição com o substrato.

4.7 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE RBD-SBD DE SARS-COV-2 COMO ANTÍGENO PARA ENSAIO DE ELISA.

Após a confirmação do reconhecimento da proteína recombinante RBD-SBD de SARS-CoV-2 por Western Blot foram feitos alguns ensaios de ELISA indireto com soros positivos e negativos para a COVID-19 para avaliar a viabilidade da utilização dessa proteína como antígeno para teste diagnóstico.

Para isso, a proteína RBD-SBD foi adicionada em microplacas de 96 poços com a massa de 500 ng, para reconhecer o antígeno foram utilizadas 9 amostras de soros negativos e 4 amostras de soros positivos para COVID-19 na diluição de 1:2.000, e o anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado com a enzima peroxidase HRP na diluição 1:3.000, após a incubação com o anticorpo secundário foi adicionado o substrato TMB e as reações foram paradas com a adição de ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 1N), e posteriormente quantificadas no espectrofotômetro a 450 nm.

Para cada amostra foi feito um controle negativo, no qual não foi adicionado o antígeno no poço, os valores de absorbância obtidos nesses controles negativos foram subtraídos dos valores de absorbância obtidos com as amostras que continham o antígeno adsorvido em seu poço, após essa subtração obtínhamos o valor real de absorbância de cada amostra. Em seguida, as médias aritméticas dos valores de absorbância das amostras positivas e negativas foram calculadas, como pode ser visualizado na figura 22.

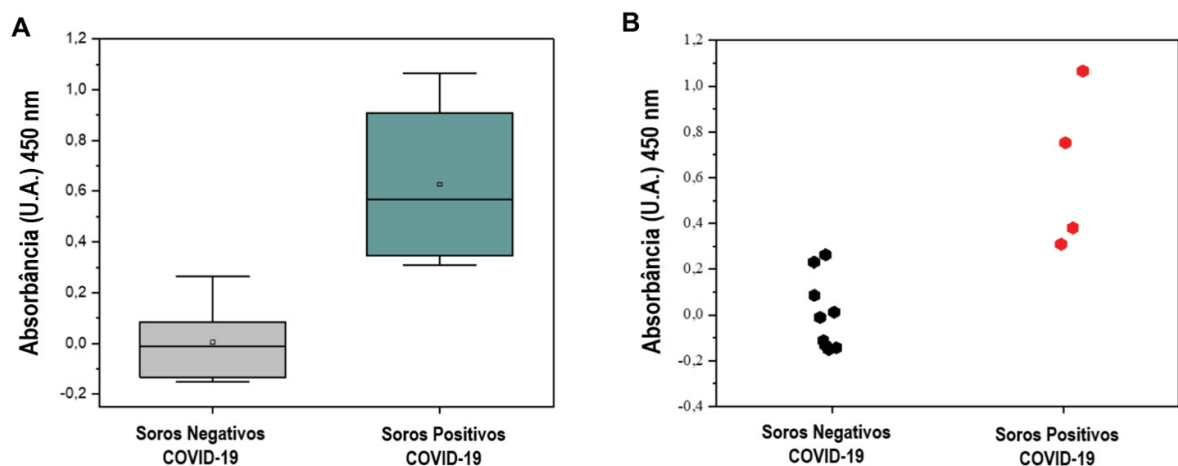


Figura 23 - ELISA com a proteína RBD-SBD de SARS-CoV-2 como antígeno.

O ensaio foi feito em microplacas de ELISA com soros positivos e negativos para COVID-19 diluídos (1:2.000) e anticorpo secundário anti-IgG humana (1:3.000). Os resultados foram avaliados por absorbância em 450 nm. Em A, tem-se a análise estatística da distribuição das amostras com o valor da média e mediana. Em B distribuição dos valores de absorbância das amostras.

É possível verificar na figura 22, que as amostras negativas para COVID-19 variaram nos valores de absorvância de -0,2 a 0,25, já para as amostras positivas obtivemos valores de absorvância 0,3 a 1,1, indicando assim que a proteína RBD-SBD é sensível a detecção de anticorpos produzidos pelos indivíduos que tiveram a doença. Todas as amostras negativas não passaram de um valor de absorvância de 0,25, indicando a especificidade do antígeno. Entretanto, duas amostras positivas ficaram com valores de absorvância próximos a 0,3, nesses casos é possível discutir que cada amostra de soro possui suas particularidades e que há também diferença de produção de anticorpos no período da infecção com COVID-19. Além disso, as diluições de soro que foram utilizadas são maiores que as descritas na literatura que são de 1:450 e 1:100 (LIU et al., 2020; NI et al., 2020), podendo assim levantar a discussão que o nosso ensaio é ainda mais sensível e que ao utilizarmos a diluição de 1:2.000 obtivemos valores de absorvância para amostras de soro negativas abaixo de zero.

Para avaliarmos a sensibilidade do ensaio ELISA utilizando como antígenos a RBD-SBD de SARS-CoV-2, comparamos o nosso ensaio com o kit comercial SARS-CoV-2 Spike Protein Serological IgG ELISA Kit da Cell Signaling Technology. Para isso utilizamos 6 amostras de soro negativo e de soro positivo, para podermos comparar utilizamos a mesma diluição para os soros de 1:2.000, e a diluição de 1:3.000 para o anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado com a enzima peroxidase HRP.

Na figura 23, podemos visualizar que os dois ensaios obtiveram valores de absorvância de 0 a 0,1 para as amostras de soro negativo para COVID-19. Já para as amostras positivas com o kit obtivemos valores de absorvância de 0 a 3,2, e para o ensaio com RBD-SBD como antígeno obtivemos valores de 0,4 a 1,1. Sendo assim, o kit comercial e o ensaio desenvolvido com RBD-SBD desacordaram em duas amostras positivas, que pelos resultados obtidos pelo kit as amostras positivas ficaram com valores de absorvância que indicam como amostras negativas.

Com esses resultados infere-se que o ensaio de ELISA desenvolvido nesse trabalho apresentou sensibilidade maior que a do kit comercial, visto que utilizamos a diluição 1:2.000 e o indicado pelo fabricante é que a diluição seja de 1:800. Entretanto não utilizamos a diluição sugerida pelo fabricante porque os valores de absorvância não seriam comparáveis. Assim pudemos verificar que a proteína RBD-SBD tem uma alta imunogenicidade que permite o diagnóstico com diluições maiores

das amostras de soro. Além disso, a utilização da proteína RBD-SBD produzida em *E. coli* é interessante na redução do custo de produção do antígeno para teste diagnóstico quando comparado com a produção em células humanas, como HEK293 utilizada nesse kit.

Entretanto ainda são necessários novos ensaios com um número maior de amostras para confirmar a sensibilidade do nosso teste quando comparado ao comercial.

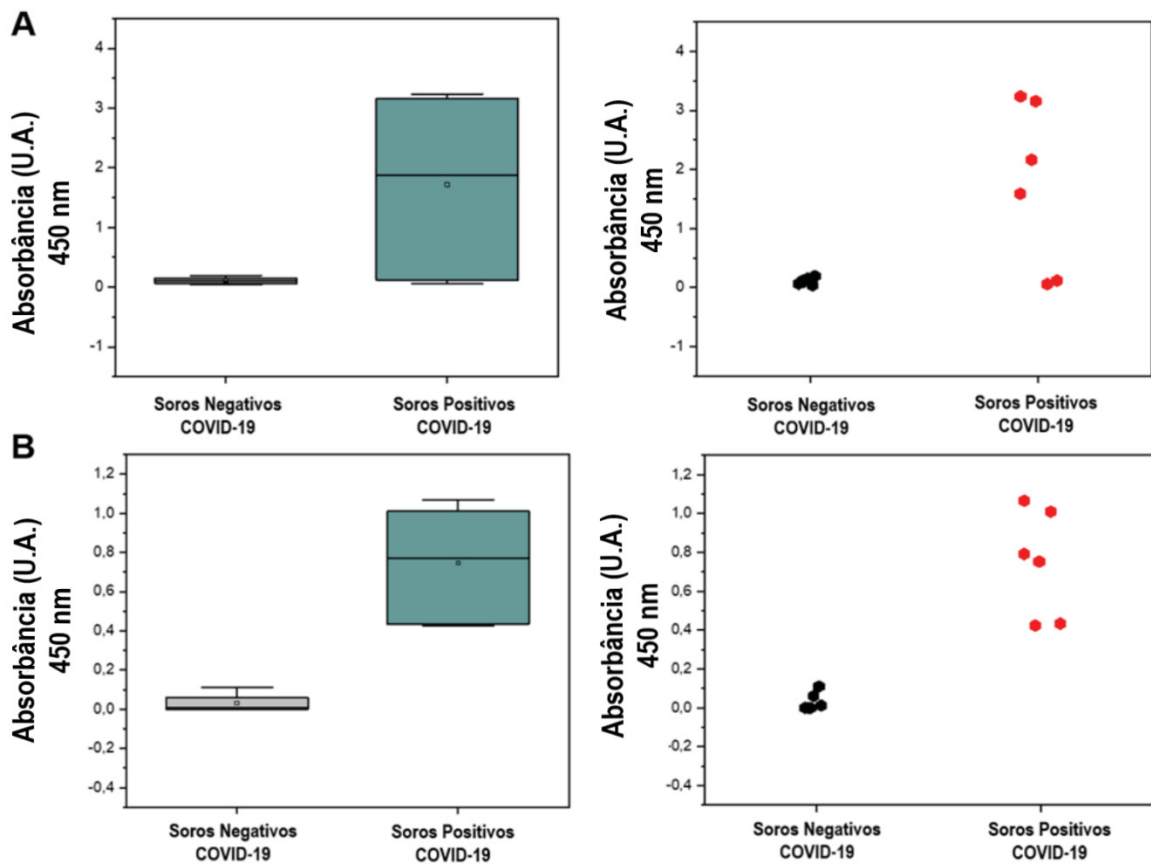


Figura 24 - Comparação entre o Kit Comercial de ELISA e o ensaios com o antígeno RBD-SBD de SARS-CoV-2.

Em A ensaio feito com o kit comercial de ELISA (SARS-CoV-2 Spike Protein Serological IgG ELISA Kit da Cell Signaling Technology). Em B ensaio com o antígeno RBD-SBD de SARS-CoV-2. Os ensaios foram feitos em microplacas de ELISA com soros positivos e negativos para COVID-19 diluídos (1:2000) e anticorpo secundário anti-IgG humana (1:3000). Os resultados foram avaliados por absorbância em 450nm.

Após a imobilização da proteína RBD-SBD nas nanopartículas de PHB, ensaios de ELISA indireto foram realizados para verificar se a RBD expressa em BL21 (DE3) seria reconhecida como antígeno pelo anticorpo IgG anti-RBD comercial. Nesse

experimento, o reconhecimento da proteína RBD ligada ao PHB pelo anticorpo primário Anti-Spike-RBD-SARS-CoV-2 é identificada pela ligação do anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com a enzima peroxidase HRP. Nesse caso, o substrato TMB entra em contato com a enzima peroxidase conjugada ao anticorpo secundário. A oxidação de TMB pela HRP forma um composto de cor azul que quando protonado na presença do ácido sulfúrico tem cor amarela intensa. A ligação do anticorpo primário a RBD é considerada diretamente proporcional a intensidade da cor amarela.

Como pode ser observado na Figura 24 A, a intensidade da cor amarela indica que a proteína RBD-SBD imobilizada nas nanopartículas de PHB foi reconhecida pelo anticorpo IgG anti-RBD. Quando comparadas ao controle negativo (apenas nanopartículas sem a proteína RBD-SBD), as duas concentrações de anticorpo secundário foram suficientes para detectar os anticorpos ligados a RBD-SBD (FIGURA 24 A). No entanto, a diluição 1:3.000 do anticorpo secundário IgG anti-RBD resultou em uma leitura em absorvância 450 nm maior do que a diluição 1:1.000 (FIGURA 24 B).

Através desse ensaio pudemos inferir que a realização do ELISA indireto com o antígeno RBD-SBD imobilizado em NPs é reconhecida pelos anticorpos e verificamos que a diluição de 1:3.000 do anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com a enzima peroxidase HRP é a melhor diluição para os futuros ensaios.

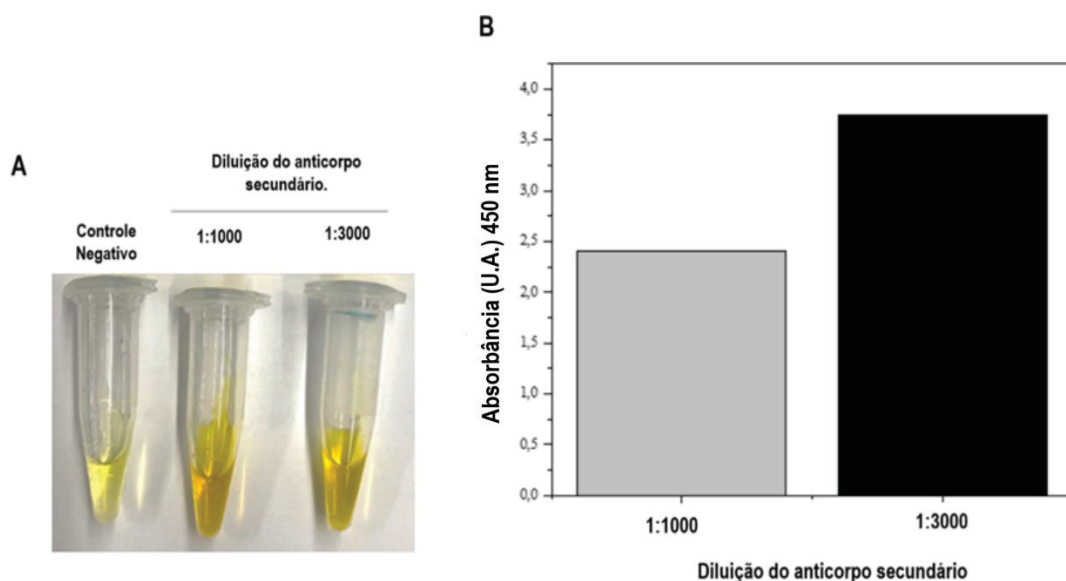


Figura 25 - ELISA indireto utilizando a proteína RBD-SBD imobilizada em nanopartículas de PHB.

A: fotografia dos microtubos onde foram realizados os ensaios de ELISA indireto para verificar o reconhecimento de RBD-SBD expressa em *Escherichia coli* BL21 (DE3) por anticorpos anti-RBD comercial. Controle negativo: nanopartículas de PHB; Teste: nanopartículas de PHB revestidas com a proteína RBD-SBD em duas diluições de anticorpo secundário. B: as absorbâncias obtidas para cada um dos testes em leitura a 450 nm.

Após a obtenção dos resultados mostrados na figura 24, foi feito um ELISA indireto imobilizando a proteína RBD-SBD nas NPs de PHB com amostras de soro negativo e positivo para a COVID-19. Nesse ensaio a proposta foi avaliar qual a sensibilidade do ELISA com a imobilização do antígeno nas NPs, já que o esperado é que como o antígeno está imobilizado em NPs em solução há uma maior área de interação do antígeno com os anticorpos das amostras de soro. Para isso utilizamos 4 amostras de soro negativo e 4 amostras de soro positivo, e para verificar se há uma maior sensibilidade nesse ensaio fizemos diferentes diluições do soro, que pode ser visualizado na figura 25.

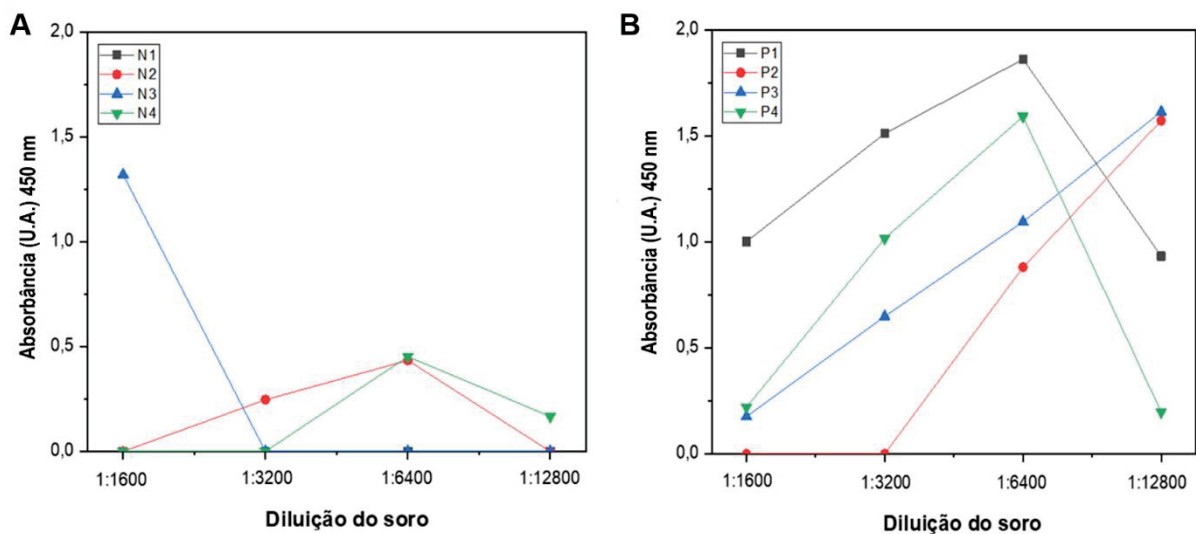


Figura 26 - ELISA indireto utilizando a proteína RBD-SBD imobilizada em nanopartículas de PHB.

O ensaio foi feito em microtubos com a proteína RBD-SBD imobilizada na NPs de PHB com soros positivos e negativos para COVID-19 diluídos (1:1.600; 1:3.200; 1:6.400; 1:12.800) e anticorpo secundário anti-IgG humana (1:3000). Os resultados foram avaliados por absorbância em 450 nm. A: distribuição dos valores de absorbância das amostras de soro negativo (N1, N2, N3 e N4) para COVID-19. B: a distribuição das amostras de soro positivo (P1, P2, P3 e P4) para COVID-19.

Com esse ensaio podemos inferir que a diluição das amostras de soro de 1:6.400 foi a melhor diluição para a comparação entre os valores de absorbância das amostras, para as amostras negativas que apresentaram valores de 0 a 0,45, e as

para as amostras positivas apresentaram valores de absorvância de 0,8 a 2,8. Visto que por exemplo a amostra positiva P1 tem o valor de absorvância seis vezes maior que a amostra negativa N2, que teve o maior valor de absorvância para essa diluição. Entretanto ainda são necessário novos ensaios com um n amostral maior para podermos fazer análises estatísticas da sensibilidade do nosso teste, como descrito por LIU et al (2020) foram utilizadas 214 soros positivos para COVID-19 para avaliar o teste desenvolvido por estes autores.

4.8 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE N-SBD DE SARS-COV-2 COMO ANTÍGENO PARA ENSAIO DE ELISA.

Após a confirmação do reconhecimento da proteína recombinante N-SBD de SARS-CoV-2 por Western Blot foi feito ELISA indireto com soros positivos e negativos para a COVID-19 para avaliar a viabilidade da utilização dessa proteína como antígeno para teste diagnóstico.

Para isso, a proteína N-SBD foi adicionada em microplacas de 96 poços com a massa de 500 ng, para reconhecer o antígeno foram utilizadas 5 amostras de soros negativo e soros positivo para COVID-19 na diluição de 1:2.000, e o anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado com a enzima peroxidase HRP na diluição 1:3.000, após a incubação com o anticorpo secundário foi adicionado o substrato TMB e as reações foram paradas com a adição de ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 1N), e posteriormente quantificadas no espectrofotômetro com 450 nm.

Para cada amostra foi feito um controle negativo, no qual não foi adicionado o antígeno no seu poço, os valores de absorvância desses controles negativos foram subtraídos dos valores de absorvância obtidos com as amostras que continham o antígeno absorvido em seu poço, após essa subtração obtínhamos o valor real de absorvância de cada amostra. Em seguida as médias aritméticas dos valores das absorvâncias das amostras positivas e negativas foram calculadas, como pode ser visualizado na figura 26.

Na figura 26, podemos visualizar que as amostras negativas ficaram no intervalo de -0,1 e 0,1 de absorvância, confirmando assim as amostras negativas para a COVID-19, quando comparadas com os valores de absorvância de 0,1 a 0,7 das amostras positivas. Ainda são necessários outros ensaios com uma maior quantidade de amostras para verificar se os valores obtidos de absorvância para as amostras

positivas apresentam um padrão com valores maiores, visto que 3 amostras positivas ficaram com valores de absorbância muito próximos dos valores de absorbância obtidos para as amostras negativas. Também é importante ressaltar que nenhuma amostra negativa foi considerada positiva, esse resultado indica a forte especificidade gerada pelo antígeno, assim a proteína N-SBD expressa por *E. coli* pode ser utilizada como antígeno para testes sorológicos.

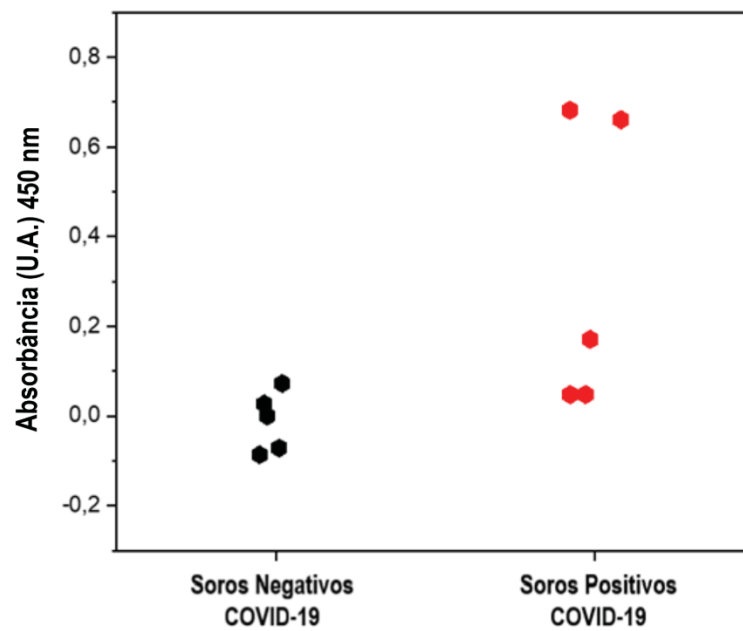


Figura 27 - ELISA com a proteína N-SBD de SARS-CoV-2 como antígeno.

O ensaio foi feito microplacas de ELISA com soros positivos e negativos para COVID-19 diluídos (1:2000). Os resultados foram avaliados por absorbância em 450nm, em preto as amostras de soro negativo para COVID-19 e em vermelho as amostras positivas para COVID-19.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com esse trabalho foi possível utilizar as proteínas RBD-SBD e N-SBD como antígeno para ensaios de ELISA, após a expressão em *E. coli* BL21(DE3) e purificação por cromatografia de afinidade ao Ni²⁺.

Foram construídos os plasmídeos para a expressão das proteínas sfGFP e mRFP fusionadas ao domínio SDB de PHA depolimerase de *Alcaligenes faecalis*, através da estratégia de clonagem Golden Gate. Posteriormente foram expressas em *E. coli* BL21(DE3) e purificadas por cromatografia de afinidade ao Ni²⁺.

Com esse trabalho foi estabelecido um método para a produção de nanopartículas de PHB através de nanoprecipitação descrito por Shakeri *et al.* (2014). Após a produção das NPs de PHB foram feitos testes que confirmaram a ligação do domínio SDB da PHA depolimerase de *Alcaligenes faecalis* através da imobilização das proteínas RBD-SBD, N-SBD e sfGFP-SBD.

Além disso, verificamos que é possível realizar ensaios de ELISA imobilizando os antígenos RBD-SBD e N-SBD em NPs de PHB, o que torna o ensaio mais barato e ainda mais sensível.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para futuros trabalhos temos como perspectiva a utilização das proteínas fluorescentes fusionadas ao domínio SDB, sfGFP-SBD e mRFP-SBD, em ensaios de microscopia intravital para colocação das NPs e verificar a sua dispersão dentro do organismo dos camundongos. Assim seria possível inferir em que regiões as nanopartículas se encontram e quanto tempo levam para ser consumida pelo organismo do hospedeiro. Também utilizaremos essas proteínas fluorescentes fusionadas a tag SBD para melhor caracterizar a interação da tag nas NPs de PHB através da microscopia de força atômica.

Realizar mais experimentos de AFM para melhor caracterizar as NPs e verificar como que se estabelece a interação do domínio SDB de PHA depolimerase de *Alcaligenes faecalis* com as NPs de PHB.

Realizar novas imunizações em camundongos com os antígenos RBD-SBD e N-SBD e verificar qual é a sua resposta quanto a produção de anticorpos.

REFERÊNCIAS

ALVES, Luis PS et al. Backup expression of the PhaP2 phasin compensates for phaP1 deletion in *Herbaspirillum seropedicae*, maintaining fitness and PHB accumulation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 739, 2016.

AMANAT, Fatima et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. **Nature medicine**, v. 26, n. 7, p. 1033-1036, 2020.

ATWOOD, Jane A.; REHM, Bernd HA. Protein engineering towards biotechnological production of bifunctional polyester beads. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 1, p. 131-137, 2009.

BABOS, György et al. Poly (3-hydroxybutyrate)-based nanoparticles for sorafenib and doxorubicin anticancer drug delivery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 7312, 2020.

BÄCKSTRÖM, B. T.; BROCKELBANK, J. A.; REHM, B. H. A. *Escherichia coli* recombinante produz grânulos de biopoliéster feitos sob medida para aplicações em classificação de células ativadas por fluorescência: exibição funcional da interleucina-2 de camundongo e glicoproteína oligodendrócitos de mielina. **BMC Biotechnol**, v. 7, p. 1-3. 2007.

BANKI, Mahmoud Reza; GERNGROSS, Tillman U.; WOOD, David W. Novel and economical purification of recombinant proteins: intein-mediated protein purification using in vivo polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association. **Protein science**, v. 14, n. 6, p. 1387-1395, 2005.

BARNARD, Gavin C. et al. Integrated recombinant protein expression and purification platform based on *Ralstonia eutropha*. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 10, p. 5735-5742, 2005.

BLATCHFORD, Paul A. et al. Immobilization of organophosphohydrolase OpdA from *Agrobacterium radiobacter* by overproduction at the surface of polyester inclusions inside engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 5, p. 1101-1108, 2012.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRIAND, Loïc et al. A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

CARUTHERS, Shelton D.; WICKLINE, Samuel A.; LANZA, Gregory M. Nanotechnological applications in medicine. **Current opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 26-30, 2007.

CHEN, Shan-Yu; CHIEN, Yi-Wen; CHAO, Yun-Peng. In vivo immobilization of D-hydantoinase in *Escherichia coli*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 118, n. 1, p. 78-81, 2014.

CUI, Lei et al. The nucleocapsid protein of coronaviruses acts as a viral suppressor of RNA silencing in mammalian cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 9029-9043, 2015.

DEEPAK, Venkataraman et al. Purification, immobilization, and characterization of nattokinase on PHB nanoparticles. **Bioresource technology**, v. 100, n. 24, p. 6644-6646, 2009.

DONG, Cui-Ling et al. Sustained PDGF-BB release from PHBHHx loaded nanoparticles in 3D hydrogel/stem cell model. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 103, n. 1, p. 282-288, 2015.

DYE, Christopher. After 2015: infectious diseases in a new era of health and development. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1645, p. 20130426, 2014.

ENGLER, Carola; KANDZIA, Romy; MARILLONNET, Sylvestre. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. **PloS One**, v. 3, n. 11, p. e3647, 2008.

ERRICO, Cesare et al. Poly(hydroxyalkanoates)-based polymeric nanoparticles for drug delivery. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, 2009.

FREITAS JR, Robert A. What is nanomedicine?. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 1, n. 1, p. 2-9, 2005.

GRAGE, Katrin; REHM, Bernd HA. In vivo production of scFv-displaying biopolymer beads using a self-assembly-promoting fusion partner. **Bioconjugate chemistry**, v. 19, n. 1, p. 254-262, 2008.

HASANZADEH, Akbar et al. Nanotechnology against COVID-19: Immunization, diagnostic and therapeutic studies. **Journal of Controlled Release**, v. 336, p. 354-374, 2021.

HIRAISHI, Tomohiro et al. Effects of mutations in the substrate-binding domain of poly [(R)-3-hydroxybutyrate](PHB) depolymerase from *Ralstonia pickettii* T1 on PHB degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7331-7338, 2006.

HU, Jin et al. A novel long-acting azathioprine polyhydroxyalkanoate nanoparticle enhances treatment efficacy for systemic lupus erythematosus with reduced side effects. **Nanoscale**, v. 12, n. 19, p. 10799-10808, 2020.

JENDROSSEK, Dieter. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 10, p. 3195-3202, 2009.

JENDROSSEK, Dieter; HANDRICK, René. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 403, 2002.

JIA, Zhenghu et al. Crystal structures of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein C-terminal domain and development of nucleocapsid-targeting nanobodies. **The FEBS Journal**, 2021.

KAI, D.; LOH, X. J. Polihidroxialcanoatos: modificações químicas para aplicações biomédicas. *ACS Sustentar. Eng. Chemistry*, v. 02, p. 106-119. 2014.

KILIÇAY, Ebru et al. Preparation and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)(PHBHHX) based nanoparticles for targeted cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, p. 310-320, 2011.

KHALIL, Omar Arafat Kdudsi; DA SILVA KHALIL, Sara. SARS-CoV-2: taxonomia, origem e constituição. **Revista de Medicina**, v. 99, n. 5, p. 473-479, 2020.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: properties, applications and toxicities. *Arab J Chem* 12: 908. 2017.

KHAN, Salman et al. A review on nanotechnology: Properties, applications, and mechanistic insights of cellular uptake mechanisms. **Journal of Molecular Liquids**, p. 118008, 2021.

LAEMMLI, Ulrich Karl. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAKE, Mary A. What we know so far: COVID-19 current clinical knowledge and research. **Clinical Medicine**, v. 20, n. 2, p. 124, 2020.

LAN, Jun et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature**, v. 581, n. 7807, p. 215-220, 2020.

LI, Haiou et al. Updated approaches against SARS-CoV-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. e00483-20, 2020.

LIU, Wanbing et al. Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies against SARS-CoV-2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 6, p. e00461-20, 2020.

MANSHA, Muhammad et al. Synthesis, characterization and visible-light-driven photoelectrochemical hydrogen evolution reaction of carbazole-containing conjugated polymers. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 16, p. 10952-10961, 2017.

MARILLONNET, Sylvestre; GRÜTZNER, Ramona. Synthetic DNA assembly using golden gate cloning and the hierarchical modular cloning pipeline. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 130, n. 1, p. e115, 2020.

MARTÍNEZ-DONATO, G. et al. Protective T cell and antibody immune responses against hepatitis C virus achieved using a biopolyester-bead-based vaccine delivery system. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 23, n. 4, p. 370-378, 2016.

MCBRIDE, Ruth; VAN ZYL, Marjorie; FIELDING, Burtram C. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. **Viruses**, v. 6, n. 8, p. 2991-3018, 2014.

MORADALI, M. Fata; REHM, Bernd HA. Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 195-210, 2020.

MOREIRA, Juliana Botelho et al. Polyhydroxybutyrate (PHB)-based blends and composites. In: **Biodegradable Polymers, Blends and Composites**. Woodhead Publishing, 2022. p. 389-413.

MULLANEY, Jane A.; REHM, Bernd HA. Design of a single-chain multi-enzyme fusion protein establishing the polyhydroxybutyrate biosynthesis pathway. **Journal of biotechnology**, v. 147, n. 1, p. 31-36, 2010.

MURUEVA, A. V. et al. The use of polymeric microcarriers loaded with anti-inflammatory substances in the therapy of experimental skin wounds. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 157, n. 5, p. 597-602, 2014.

NEUMANN, Liv et al. Binding of the major phasin, PhaP1, from *Ralstonia eutropha* H16 to poly (3-hydroxybutyrate) granules. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 8, p. 2911-2919, 2008.

NI, Ling et al. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. **Immunity**, v. 52, n. 6, p. 971-977. e3, 2020.

PARK, Tae Jung et al. Polyhydroxyalkanoate chip for the specific immobilization of recombinant proteins and its applications in immunodiagnostics. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 11, n. 2, p. 173-177, 2006.

PARLANE, Natalie A. et al. Production of a particulate hepatitis C vaccine candidate by an engineered *Lactococcus lactis* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 24, p. 8516-8522, 2011.

PARLANE, Natalie A. et al. Vaccines displaying mycobacterial proteins on biopolyester beads stimulate cellular immunity and induce protection against tuberculosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 1, p. 37-44, 2012.

PARLANE, Natalie A. et al. Novel particulate vaccines utilizing polyester nanoparticles (bio-beads) for protection against *Mycobacterium bovis* infection—a review. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 158, n. 1-2, p. 8-13, 2014.

PATI, Rashmirekha; SHEVTSOV, Maxim; SONAWANE, Avinash. Nanoparticle vaccines against infectious diseases. **Frontiers in immunology**, p. 2224, 2018.

PEIRIS, Joseph SM; GUAN, Yi; YUEN, KY7096017. Severe acute respiratory syndrome. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p. S88-S97, 2004.

PIEPER-FÜRST, U. et al. Identification of the region of a 14-kilodalton protein of *Rhodococcus ruber* that is responsible for the binding of this phasin to polyhydroxyalkanoic acid granules. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 9, p. 2513-2523, 1995.

PERVEEN, Kousar; MASOOD, Farha; HAMEED, Abdul. Preparation, characterization and evaluation of antibacterial properties of epirubicin loaded PHB and PHBV nanoparticles. **International journal of biological macromolecules**, v. 144, p. 259-266, 2020.

PETERS, Verena; REHM, Bernd HA. In vivo enzyme immobilization by use of engineered polyhydroxyalkanoate synthase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1777-1783, 2006.

RASIAH, I. A.; REHM, B. H. A. One-Step Production of Immobilized-Amylase in Recombinant *Escherichia coli*. **Applied & Environmental Microbiology**, v. 75, n. 07, p. 2012-2016. 2009.

SACOMBOIO, Euclides Nenga Manuel et al. The transcriptional regulator NtrC controls glucose-6-phosphate dehydrogenase expression and polyhydroxybutyrate synthesis through NADPH availability in *Herbaspirillum seropedicae*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

SANDERS, W. C. **Basic Principles of Nanotechnology**. 1 ed. London: CRC Press. 195 p. 2019.

SHAKERI, Fatemeh; SHAKERI, Shahryar; HOJJATOLESLAMI, Mohammad. Preparation and characterization of carvacrol loaded polyhydroxybutyrate nanoparticles by nanoprecipitation and dialysis methods. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 4, p. N697-N705, 2014.

SMITH, Josiah D.; MORTON, Logan D.; ULERY, Bret D. Nanoparticles as synthetic vaccines. **Current opinion in biotechnology**, v. 34, p. 217-224, 2015.

SOUPENE, Eric et al. Physiological studies of *Escherichia coli* strain MG1655: growth defects and apparent cross-regulation of gene expression. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 18, p. 5611-5626, 2003.

STEINBÜCHEL, Alexander et al. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 13, p. 94-105, 1995.

TOMA, H. E. Nanotecnologia molecular: materiais e dispositivos. 1 ed. v. 06. São Paulo: **Blucher**. p. 336. 2016.

VALANNE, Antti et al. A sensitive adenovirus immunoassay as a model for using nanoparticle label technology in virus diagnostics. **Journal of clinical virology**, v. 33, n. 3, p. 217-223, 2005.

VIEYRA, Horacio et al. Cytotoxicity and biocompatibility of biomaterials based in polyhydroxybutyrate reinforced with cellulose nanowhiskers determined in human peripheral leukocytes. **Biomedical Materials**, v. 13, n. 4, p. 045011, 2018.

WALLS, Alexandra C. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281-292. e6, 2020.

WANG, Zhihui et al. A novel self-cleaving phasin tag for purification of recombinant proteins based on hydrophobic polyhydroxyalkanoate nanoparticles. **Lab on a Chip**, v. 8, n. 11, p. 1957-1962, 2008.

WANG, Jingfang et al. Molecular simulation of SARS-CoV-2 spike protein binding to pangolin ACE2 or human ACE2 natural variants reveals altered susceptibility to infection. **The Journal of General Virology**, v. 101, n. 9, p. 921, 2020.

WIECZOREK, Roman et al. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 9, p. 2425-2435, 1995.

WHO. Coronavirus disease (COVID-19) Situation Report – 114. Disponível em: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200513-covid-19-sitrep-114.pdf>. Acesso em: 5 de abril 2022.

YAMAOKA, Yutaro et al. Whole nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 may cause false-positive results in serological assays. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. 7, p. 1291-1292, 2021.

YUAN, Meng et al. A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. **Science**, v. 368, n. 6491, p. 630-633, 2020.

ZHAO, Jing et al. Polyester-based nanoparticles for nucleic acid delivery. **Materials Science and Engineering: C**, v. 92, p. 983-994, 2018.