



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE
TECNOLOGIA



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE PROTEÍNAS DE FUSÃO
DE SARS-CoV-2 PARA FINS DE DIAGNÓSTICO E
IMUNIZAÇÃO**

Bianca Soares Astolfi

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva

Bolsista CAPES - 88887.666825/2022-00

**São Carlos - SP
2023**

BIANCA SOARES ASTOLFI

PRODUÇÃO RECOMBINANTE DE PROTEÍNAS DE FUSÃO DE
SARS-CoV-2 PARA FINS DE DIAGNÓSTICO E IMUNIZAÇÃO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia
do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva - Presidente

Prof. Dr. Euclides Matheucci Junior (UFSCar)

Prof.Dr. Paulo Inácio da Costa (UNESP)

São Carlos
2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Bianca Soares Astolfi, realizada em 27/10/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva (UFSCar)

Prof. Dr. Euclides Matheucci Junior (UFSCar)

Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa (UNESP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que tiveram suas vidas afetadas de alguma forma pela COVID-19. Espero que esse trabalho e outros que venham a ser desenvolvidos possam futuramente contribuir positivamente no controle da doença.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, agradeço imensamente a oportunidade que me ofereceu com esse trabalho. Por sempre estar disponível e disposto a ajudar em todo esse processo, que sabemos que não é fácil. Por todos os ensinamentos, conselhos valiosos e encorajamento que com certeza levarei para minha vida. A você toda minha gratidão e admiração.

Ao Dr. Carlos Roberto Prudêncio (Instituto Adolfo Lutz), ao Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior (Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia), à Prof. Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), ao Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa e à Prof. Dra. Iracilda Zeppone Carlos (ambos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara), e todos os outros pesquisadores envolvidos. Agradeço a todos pelas colaborações que foram de extrema importância para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do LBM, Amanda, Camila, Eduardo, Felipe, Gabrieli, Henrique, Iara, Josi, Thais e Yan, por tornar todo esse processo mais leve. Em especial, agradeço a duas “LBMers”, Iara por ter me acolhido, por ter me visto perdida em tantos momentos e ter me ajudado a enxergar soluções em todas elas até a finalização da escrita deste trabalho, sempre com a maior delicadeza e gentileza desse mundo. E a Amanda, por ter sido meu porto seguro em toda essa etapa. Sem você, com certeza teria sido mais difícil.

Agradeço a minha família, meus pais Rosana e Júlio César, e aos pais que meus pais me deram Bruno e Cássia, meus avós Maria Helena e José Braz, minha tia Adriana, meu irmão Felipe meu pacotinho de amor e meu namorado Eliézer. Vocês forneceram a base, todo o amor, preocupação e carinho necessários para que eu chegasse até aqui. Vocês são a minha vida, e tudo até aqui só aconteceu graças a vocês.

Agradeço também aos meus amigos, Beatriz, Ivero, Lara, Ana Victoria, Analu, Britinho, Tauane Raíssa, Igor e Jaqueline. Obrigada por serem esses amigos sensacionais, por me ajudar a descontrair, incentivar e por terem me acolhido sempre que precisei.

Ao PPGBiotec pelo suporte oferecido para a realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa de pesquisa.

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

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

PORTARIA Nº 206, DE 4 DE SETEMBRO DE 2018

CONSIDERANDO o constante dos autos do processo nº 23038.013648/2018-51, resolve:

Art. 1º Os trabalhos produzidos ou publicados, em qualquer mídia, que decorram de atividades financiadas, integral ou parcialmente, pela CAPES, deverão, obrigatoriamente, fazer referência ao apoio recebido.

Art. 2º Para fins de identificação da fonte de financiamento fica autorizada a utilização do código 001 para todos os financiamentos recebidos.

Art. 3º Deverão ser usadas as seguintes expressões, no idioma do trabalho:

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

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

RESUMO

No atual cenário da COVID-19 ainda existe uma demanda por métodos de diagnóstico mais eficazes e estratégias de imunização aprimoradas. Até o momento, o Domínio de Ligação ao Receptor (RBD) da proteína Spike (S) tem sido o foco das abordagens de diagnóstico e imunização. No entanto, a proteína Spike é suscetível a mutações, o que pode comprometer as estratégias de controle atuais. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo produzir proteínas de fusão recombinantes do SARS-CoV-2, contendo fragmentos gênicos e epítopos das proteínas Envelope (E) e Membrana (M), fusionadas ao RBD. Essas proteínas foram projetadas para serem imunogênicas e potencialmente úteis em plataformas de diagnóstico e imunização. O processo de produção envolveu a clonagem das sequências codificadoras e expressão *Escherichia coli* Rosetta (DE3). Embora a expressão tenha sido insolúvel, etapas subsequentes de solubilização foram implementadas com sucesso. Testes de reatividade com soros de coelhos imunizados com uma vacina de DNA-RBD, soros de pacientes com COVID-19 e pré-pandêmicos mostraram que todas as proteínas de fusão foram reconhecidas, embora com diferentes eficiências. A proteína de fusão que inclui fragmentos da proteína E no N-terminal e epítopos da proteína M no C-terminal fusionadas ao RBD (E-RBD-M) se destacou como a mais promissora. Essa fusão, juntamente com o RBD, foi usada em esquemas de imunização de camundongos, desencadeando uma resposta imune humoral robusta, com a produção de anticorpos de alta avidéz avaliados por ELISA. Além disso, os soros gerados por ambas as proteínas demonstraram a capacidade de gerar anticorpos neutralizantes, comprovada por ensaios de inibição da ligação do RBD com ACE2. O RBD e a fusão foram testados em soros de pacientes com COVID-19 e vacinados, bem como em soros negativos para a infecção. A fusão E-RBD-M, embora sensível, mostrou-se menos específica em comparação com o RBD. A resposta imune celular também foi avaliada por qPCR e ELISA, revelando a indução de altas quantidades de citocinas após a imunização e reestímulo de esplenócitos, sugerindo uma resposta celular robusta. Esses resultados destacam o potencial das fusões RBD como candidatas promissoras para diagnóstico e imunização contra a COVID-19, representando uma abordagem simples e econômica de produção com imunogenicidade comparável ao RBD sozinho expresso neste trabalho.

Palavras chaves: COVID-19; SARS-CoV-2; Epítopos; Vacina; Diagnóstico.

ABSTRACT

In the current COVID-19 scenario, there is still a demand for more effective diagnostic methods and improved immunization strategies. So far, the Receptor Binding Domain (RBD) of the Spike protein (S) has been the focus of diagnostic and immunization approaches. However, the Spike protein is susceptible to mutations, which can compromise current control strategies. In this context, this study aimed to produce recombinant fusion proteins of SARS-CoV-2, containing gene fragments and epitopes from the Envelope (E) and Membrane (M) proteins, fused to the RBD. These proteins were designed to be immunogenic and potentially useful in diagnostic and immunization platforms. The production process involved cloning the coding sequences and expression in *Escherichia coli* Rosetta (DE3). Although the expression was insoluble, successful solubilization steps were implemented subsequently. Reactivity tests with sera from rabbits immunized with a DNA-RBD vaccine, sera from COVID-19 patients, and pre-pandemic sera showed that all fusion proteins were recognized, although with varying efficiencies. The fusion protein that includes fragments of the E protein at the N-terminal and epitopes of the M protein at the C-terminal fused to the RBD (E-RBD-M) stood out as the most promising. This fusion, along with the RBD, was used in mouse immunization schemes, triggering a robust humoral immune response, with the production of high-avidity antibodies assessed by ELISA. Furthermore, sera generated by both proteins demonstrated the ability to generate neutralizing antibodies, as evidenced by assays inhibiting RBD binding with ACE2. The RBD and the fusion were tested with sera from COVID-19 patients and vaccinated individuals, as well as sera negative for the infection. The E-RBD-M fusion, while sensitive, proved to be less specific compared to the RBD. Cellular immune response was also evaluated by qPCR and ELISA, revealing the induction of high levels of cytokines after immunization and restimulation of splenocytes, suggesting a robust cellular response. These results highlight the potential of RBD fusions as promising candidates for COVID-19 diagnosis and immunization, representing a simple and cost-effective production approach with immunogenicity comparable to the RBD expressed in this study.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; Epitopes; Vaccine; Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	15
Figura 1. Árvore filogenética da ordem Nidovirales	15
Figura 2: Representação esquemática do vírion SARS-CoV-2 e seu genoma	16
Figura 3. Estrutura da glicoproteína spike	17
Figura 4. Estrutura da proteína do nucleocapsídeo	18
Figura 5. Estrutura proteína do envelope	19
Figura 6. Estrutura glicoproteína de membrana	19
Figura 7: Esquema proposto do ciclo de replicação do SARS-CoV-2	21
Figura 8. Relações filogenéticas variantes SARS-CoV-2	23
CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS	31
Figura 9. Esquema dos cassetes das proteínas de fusão	34
Figura 10. Esquema de imunização	41
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
Figura 11: Alinhamento entre a sequência referência do RBD e das proteínas E e M com as principais VOCs	46
Figura 12. Predição da estrutura tridimensional das fusões com o RBD	50
Figura 13. Amplificação dos fragmentos codificantes para fusões RBD	51
Figura 14. Confirmação da clonagem pela clivagem do plasmídeo pET28a+inserto	52
Figura 15. Análise da expressão recombinante do RBD e das fusões.	53
Figura 16. Reatividade de anticorpos séricos contra RBD e fusões expressas em E.coli por ensaios de dot blot.	56
Figura 17. Lavagem dos corpos de inclusão e solubilização em alta pressão e pH alcalino.	69
Figura 18. Espectros de fluorescência do RBD e E-RBD-M após solubilização	60
Figura 19. Índice de avidéz RBD e E-RBD-M	62
Figura 20. Detecção de IgG no soro de indivíduos sintomáticos com SARS-CoV-2 utilizando RBD e E-RBD-M (procarioto) em comparação com RBD eucarioto	64
Figura 21. Ensaios de neutralização e competição do RBD com o ACE2	67
Figura 22. Perfis de mRNA de citocinas de esplenócitos de camundongos BALB/c estimuladas com as proteínas RBD e E-RBD-M in vitro	69
Figura 23. Concentração de IFN- γ em RBD e E-RBD-M	71
ANEXO 1 Mapa do pET-28a	94

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS	31
Tabela 1. Predição de epítomos das proteínas de membrana e envelope do SARS-CoV-2	32
Tabela 2. Combinação de primers utilizados para construção das sequências codificantes	34
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação das fusões	35
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
Tabela 4. Propriedades bioquímicas das fusões	48
Tabela 5. Rendimento da produção das fusões por litro de cultura	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	Receptor da enzima conversora de angiotensina
ARG	Arginina
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albumin
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CAPS	Ácido N-ciclohexil-3-aminopropanossulfônico
CD	Domínio conector
cDNA	DNA Complementar
CH	Hélice central
CI	Corpos de inclusão
ConA	Concanavalina A
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
CTD	Domínio C terminal
D.O.	Densidade óptica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatos
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
HCl	Ácido Clorídrico

His (H)	Histidina
HRP	Enzima peroxidase de rábano
IPTG	Isopropil-B-D-Tio Galactopiranosídeo
KCl	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico
KSCN	Tiocianato de potássio
LB	Luria-Bertani
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National center of biotechnology information</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato salino
PBST	Tampão fosfato salino com <i>tween</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
proteína E	Proteína do envelope
proteína M	Proteína da membrana
proteína N	Proteína do nucleocapsídeo
proteína S	Proteína spike
RBD	<i>Receptor binding domain</i>
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA

RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas oxidativas
SARS-CoV	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
TLRs	Receptores <i>toll like</i>
TM	Segmento transmembranar
VOC	Variantes de preocupação

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	15
1.1. Etiologia e Organização Genômica SARS-CoV-2	15
1.2. Ciclo de Replicação e Resposta Imunológica	20
1.3. Pandemia COVID-19	22
1.4. Controle da Covid-19: Métodos de Diagnóstico e Vacinas	24
1.5. Proteínas Estruturais de Sars-Cov-2 como Imunógenos	27
1.7. OBJETIVOS	30
1.7.1. Objetivos Gerais	30
1.7.2. Objetivos Específicos	30
CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1. Animais e Comitê de Ética	31
2.2. Análises <i>in silico</i>	31
2.3. Análises Estatísticas	31
2.4. Construção e Expressão Recombinante das Fusões	32
2.4.1 Amplificação das Sequências Codificantes	32
2.4.3. Indução da Expressão das Fusões RBD	37
2.4.4 Solubilização dos Corpos de Inclusão com Ureia e Purificação do RBD e Fusões	37
2.5. Avaliação da Imunogenicidade das Fusões	38
2.5.1. Ensaio de Dot Blot	38
2.6. Solubilização em Alta Pressão Hidrostática e Caracterização	39
2.6.1 Solubilização dos Corpos de Inclusão em Alta Pressão Hidrostática	39
2.6.2 Fluorescência Intrínseca do Triptofano	40
2.7. Imunização dos Camundongos	40
2.8. Avaliação da Resposta Imune Humoral e Celular	41
2.8.1 Detecção de IgG e Avaliação Da Avidéz	41
2.8.2. Determinação de Anticorpos Neutralizantes e Competição por Afinidade ao ACE2	43
2.8.3. Reestímulo <i>in vitro</i> dos Esplenócitos	44
2.8.4 Expressão Gênica De Citocinas por PCR em Tempo Real (RT-qPCR)	44
2.8.5. Medições de IFN- γ	45
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1.1 Monitoramento das Variantes de Preocupação	46
3.1.2. Propriedades Bioquímicas das Fusões	48

3.2. Construção e Expressão Recombinante das Fusões	51
3.2.1. Amplificação das Sequências Codificantes	51
3.2.2. Clonagem Vetores de Expressão	52
3.2.3. Indução da Expressão das Fusões RBD	53
3.2.4. Solubilização dos Corpos de Inclusão e Purificação do RBD e Fusões	54
3.2. Avaliação da Imunogenicidade das Fusões	56
3.2.1. Dot Blot	56
3.3. Solubilização e Caracterização	58
3.3.1. Solubilização em Alta Pressão Hidrostática	58
3.3.2. Características Conformacionais por Fluorescência Intrínseca do Triptofano	60
3.4.1. Detecção de IgG e Avaliação da Avidéz	62
3.4.2. Determinação de Anticorpos Neutralizantes e Competição por Afinidade ao ACE2	66
3.4.3. Expressão Gênica de Citocinas por PCR em Tempo Real (RT-qPCR)	68
3.4.4. Medições de IFN- γ	70
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	73
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE A	84
ANEXO 1	93

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1. ETIOLOGIA E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA SARS-COV-2

Os coronavírus, são considerados patógenos zoonóticos, pertencentes a ordem Nidovirales, família Coronaviridae e subfamília Coronavirinae (Figura 1). No qual quatro gêneros são incluídos: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus e Deltacoronavirus. Sabe-se que sete subtipos de coronavírus infectam humanos, sendo que os alfacoronavírus causam infecções leves associadas ao trato respiratório superior, enquanto os betacoronavírus podem causar infecções graves e mortes (SHARMA, *et al.*, 2021; RAVI, SAXENA, PANDA. 2022; MESEL-LEMOINE, *et al.*, 2012).

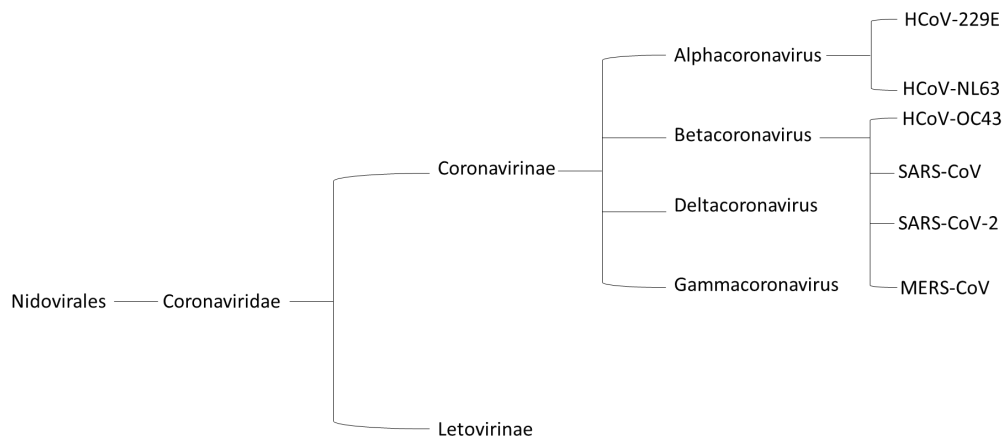


Figura 1. Árvore filogenética da ordem Nidovirales (Adaptado de WARTECKI, RZYMSKI, 2020)

O SARS-CoV-2 (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2), é o sétimo coronavírus conhecido a infectar humanos até o momento. Ele é um membro do gênero Betacoronavirus, no qual inclui, além do SARS-CoV-2, outros dois coronavírus patogênicos, o SARS-CoV (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave) e o MERS-CoV (Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio), que possuem identidade de genoma com SARS-CoV-2 de 82% e 50%, respectivamente. Os três CoVs, possuem o maior genoma viral de RNA, variando de 26 a 32 kb de comprimento (NAQVI, *et al.*, 2020; REDONDO, *et al.*, 2021; ZABIDI, *et al.*, 2023).

O SARS-CoV-2 é esférico, envelopado e circundado com as proteínas estruturais (Figura 2 A), com cerca de 80 – 120 nm de diâmetro, com múltiplas proteínas S glicosiladas homotriméricas projetadas externamente, conferindo-lhes uma aparência de uma coroa

(YADAV, *et al.*, 2021). E, com base na sua classificação taxonômica, o SARS-CoV-2, compreende um genoma de RNA de fita simples de sentido positivo, não segmentado, envelopado, com uma estrutura cap 5' e cauda poli-A 3', organizado em 14 quadros de leitura aberta (ORFs) (Figura 2 B) (DONG, *et al.*, 2020; RAHIMI, MIRZAZADEH, TAVAKOLPOUR, 2021; REDONDO, *et al.*, 2021).

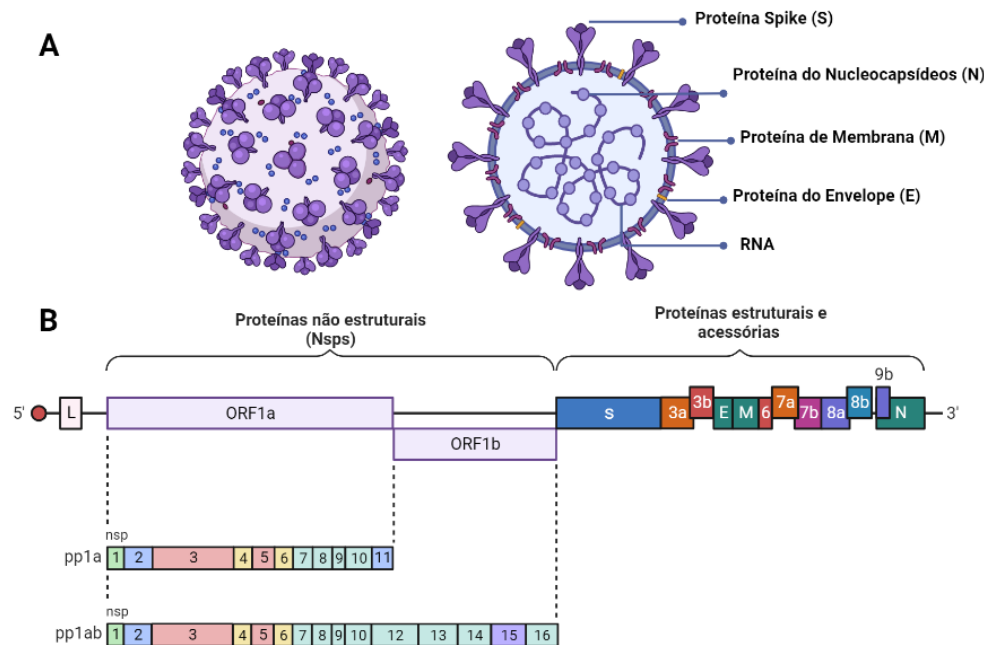


Figura 2: Representação esquemática do vírion SARS-CoV-2 e seu genoma (A) Localização das proteínas estruturais transmembrana S, M, E, e a proteína N ligada ao RNA viral. (B) Representação do genoma viral, na extremidade 5' ORF1a e ORF1b, das proteínas não estruturais. Na extremidade 3', localização dos genes de expressão das proteínas estruturais e acessórias (S - ORF3a; ORF3b; E - M; ORF6; ORF7a; ORF7b; ORF8a; ORF8b; ORF9b - N) (Imagem adaptada de Hartenian, *et al.*, 2020, no BioRender).

A primeira ORF (ORF 1 a/b), localizada na extremidade 5', ocupa cerca de dois terços de todo o do genoma, e codifica as poliproteínas pp1a, pp1b. Essas poliproteínas são processadas por proteases virais (*papain-like protease e main-protease*) para produzir proteínas não estruturais (Nsp1 a Nsp16) que juntamente com alguns fatores do hospedeiro, formam um complexo de transcrição e replicação (ALANAGREH, ALZOUGHLOOL, ATOUM, 2020). A região restante de 10 kb, que precede a extremidade 3', codifica as proteínas estruturais, sendo elas proteínas de superfície (S), envelope (E), membrana (M) e

nucleocapsídeo (N). As quatro proteínas estruturais são exigidas pela maioria dos CoVs para produzir uma partícula viral completa, além de alguns CoVs codificarem proteínas adicionais com sobreposição de funções compensatórias, das quais nove são codificadas pelos seguintes genes: ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF14 e ORF10. (YADAV, *et al.*, 2021; MALICK, 2022). Estas se diferem das Nsps por não apresentarem homologia com proteínas de outros grupos de vírus, possuindo papéis indiretos na função viral (GORKHALI, *et al.*, 2021).

A glicoproteína spike (figura 3) é constituída de duas subunidades, S1 e S2. O S1 medeia a adesão do vírus com a célula hospedeira, e o S2 ajuda na sua fusão com a membrana da célula no receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), sofrendo grandes rearranjos estruturais para promover a fusão da membrana (HU, *et al.*, 2021). Estruturalmente, a região N e C terminal de S1 dobram-se como dois domínios separados: domínio N-terminal (NTD) e domínio C-terminal (CTD). O CTD contém um domínio de ligação ao receptor (RBD) que se liga ao receptor ACE2 (JAMWAL, *et al.*, 2021). A região S2 inclui peptídeo de fusão (FP), região proximal de peptídeo de fusão (FPPR), hélice central (CH), domínio conector (CD), segmento transmembranar (TM) e a cauda citoplasmática (ZHANG, *et al.*, 2021).

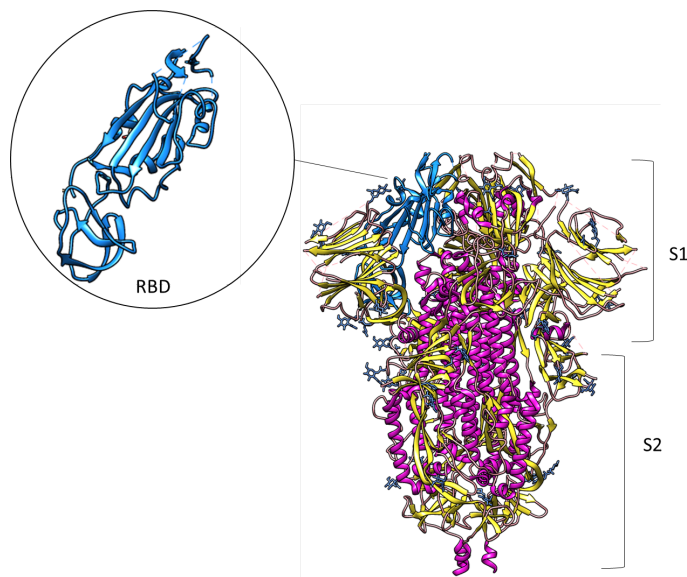


Figura 3. Estrutura da glicoproteína spike. Estrutura completa glicoproteína spike (PBD: 6VXX), destacando o RBD e as subunidades S1 e S2.

As proteínas do nucleocapsídeo (figura 4) fazem parte da organização estrutural do vírus, elas possuem três domínios altamente conservados: um domínio N-terminal (NTD), um domínio de ligação ao RNA e um domínio C-terminal (CTD) (ZENG, *et al.*, 2020). A função fundamental da proteína N é identificar e envolver o RNA do vírus em uma estrutura helicoidal simétrica, ela se liga ao RNA formando uma ribonucleoproteína que ajuda na entrada da célula hospedeira e na interação com os processos celulares após a fusão do vírus (BAI, *et al.*, 2021; SATARKER, NAMPOOTHIRI, 2020). Em particular, a proteína N neutraliza as respostas antivirais mediadas pelo hospedeiro através de sua atividade de ligação ao RNA, agindo como um inibidor viral através do silenciamento do RNA (WU, *et al.*, 2023)

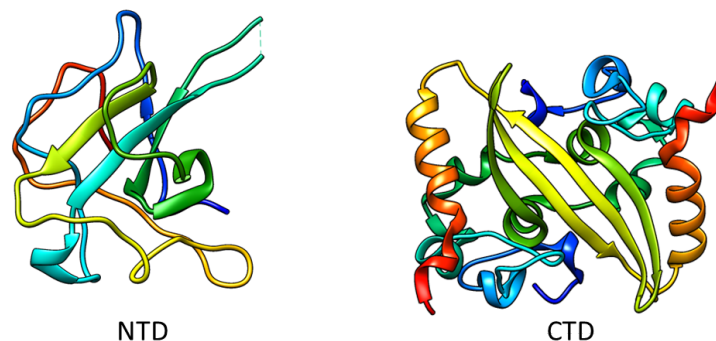


Figura 4. Estrutura da proteína do nucleocapsídeo. Domínio NTD e CTD da estrutura da proteína do nucleocapsídeo (PDB: 6WZO; 7VBD)

A proteína do envelope (figura 5) é a menor entre as proteínas estruturais, e abundantemente expressa dentro da célula infectada. Ela possui uma região N-terminal externa ao vírion, e uma cauda hidrofóbica em direção ao citoplasma da região C-terminal (SATARKER, NAMPOOTHIRI, 2020). A proteína E tem participação na montagem, brotamento viral, podendo também induzir a curvatura da membrana, além de sua atividade de canal iônico. Além disso, a proteína E evita que a proteína de membrana se agregue em complexos insolúveis (RAVI, SAXENA, PANDA, 2022; KUNG, *et al.*, 2022).

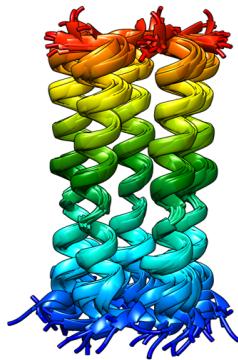


Figura 5. Estrutura proteína do envelope. Estrutura pentamérica do domínio transmembrana da proteína do envelope (PDB: 7K3G)

A proteína de membrana (figura 6) é constituída por três domínios principais: um ecto-domínio N-terminal curto, três Hélices Transmembrana (marcadas como TMH1, TMH2 e TMH3) e um endodomínio C-terminal longo localizado na face citoplasmática dos vírions (MARQUES-PEREIRA, *et al.*, 2022). A proteína M interage com outras proteínas virais estruturais e tem um papel organizador na montagem do vírus, pois direciona a formação do envelope e fornece a matriz à qual o nucleocapsídeo pode se ligar para brotamento (BAI, ZHONG, GAO, 2022).

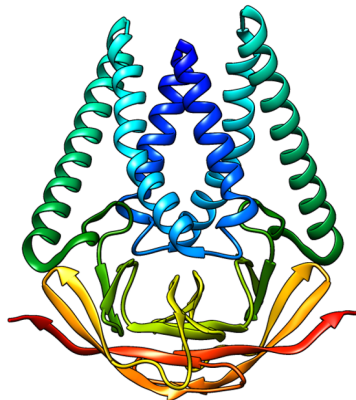


Figura 6. Estrutura glicoproteína de membrana. Estrutura completa glicoproteína de membrana (PDB: 8CTK).

1.2. CICLO DE REPLICAÇÃO E RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A fixação e internalização do SARS-CoV-2 é promovida pela proteína S que, a partir da interação RBD-ACE2 faz com que a proteína S sofra clivagem proteolítica, catalisada por

várias proteases do hospedeiro, como a furina e TMPRSS2. O processamento proteolítico ativa a proteína S e permite a fusão da membrana viral-hospedeiro, seguida pela liberação do RNA no citoplasma (Figura 7, 1) (SCHENTEN, BHATTACHARYA, 2021; ZHANG, *et al.*, 2021). Outra via de entrada que pode ser utilizada pelo vírus é o endossomo, no qual as catepsinas podem clivar a proteína spike, mas esta via não é utilizada de forma eficiente em células epiteliais primárias (LAMERS, *et al.*, 2022).

A liberação do genoma do SARS-CoV-2 marca o início de um complexo programa de expressão gênica viral, iniciando com o RNA viral recrutando os ribossomos do hospedeiro e servindo como mRNA para a tradução das replicases ORF1a e ORF1b (Figura 7, 2) (MALONE, *et al.*, 2022; V'KOVSKI, *et al.*, 2021). Durante a síntese, essas poliproteínas são clivadas por proteases virais localizadas dentro de nsp3 (PL pro) e nsp5 (M pro ou 3CL pro), produzindo as 16 proteínas de replicação (Figura 7, 3) (BAGGEN, *et al.*, 2021).

As proteínas não estruturais, participam ativamente no processo de replicação do vírus, como a montagem do complexo de replicação-transcrição (RTC), desenvolvimento de meios para evasão da resposta imunológica do hospedeiro, modificação do RNA viral, formação de compartimentos de membrana dupla, que sequestram a membrana do retículo endoplasmático, além de facilitar a atividade da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (SAWICKI, SAWICKI, SIDDELL, 2007; KASUGA, *et al.*, 2021; ZHANG, *et al.* 2021).

Este complexo gera um modelo de cadeia negativa, para que sirvam como moldes para a síntese de RNAs subgenômicos de cadeia positiva (Figura 7, 4) que, por sua vez, codificam proteínas estruturais e acessórias (BAGGEN, *et al.* 2021). As membranas derivadas do retículo endoplasmático (RE) e complexo de golgi quando reorganizadas pelas nsps, formam vesículas de membrana dupla, criando um microambiente protetor para replicação de RNA genômico e transcrição de mRNAs sub genômicos (V'KOVSKI, *et al.*, 2021; KNOOPS, *et al.*, 2008). As novas proteínas estruturais traduzidas trafegam para o RE ou membranas de golgi e se combinam com RNA genômico e proteínas N para criar partículas virais (Figura 7, 5 e 6).

A montagem no compartimento intermediário RE-Golgi leva à criação de vesículas contendo vírions (Figura 2, 7) que podem se fundir com a membrana plasmática durante a exocitose e liberar o vírus no espaço extracelular (Figura 7, 8) (DIAMOND, KANNEGANTI, 2022).

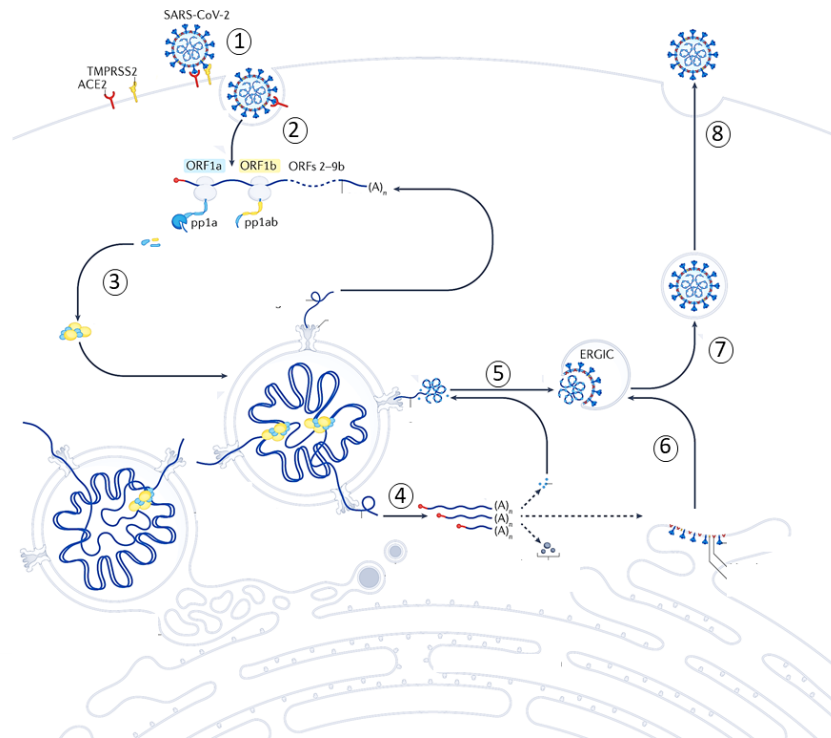


Figura 7: Esquema proposto do ciclo de replicação do SARS-CoV-2. As etapas 1, 2, 3, 4 e 5 representam a entrada, tradução das replicases, formação do complexo RdRp, replicação de RNA genômico viral e transcrição de mRNAs subgenômicos. Enquanto 6, 7, 8 e 9 representam a montagem dos complexos de N-RNA com as proteínas estruturais e exocitose do vírus para continuar o ciclo viral em outra célula (Imagem adaptada de Malone, *et al.*, 2022))

O SARS-CoV-2 é eficaz em retardar o desencadeamento de respostas imunes inatas intracelulares, permitindo um ciclo de replicação ininterrupto, visto que as respostas imunes adaptativas não são ativadas até que ocorram os alarmes imunes inatos (SETTE, CROTTY, 2021). O início da patogênese é marcado pelo dano tecidual, resultado da replicação viral. A extensão desse dano determina uma segunda fase, na qual ocorre o recrutamento de células imunes efetoras, causando uma resposta inflamatória local e sistêmica (MERAD, *et al.*, 2022).

Quando o SARS-CoV-2 infecta as células-alvo, o RNA do vírus atua como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são reconhecidos pelos receptores padrão como receptores toll-like (TLRs), e sinalizam a invasão viral, estimulando a secreção de interferons e fatores nucleares dependentes de citocinas pró-inflamatórias (SOUSA, BRITES, 2020; LIU, WILSON, 2022). No citoplasma, em resposta à invasão viral, ocorre agregação de proteínas, fluxo de cálcio e formação de espécies reativas oxidativas (ROS). Juntas, essas respostas culminam na iniciação do inflamassoma, induzindo cascatas inflamatórias e de

coagulação, que resultam na piroptose celular (TAN, KOMARASAMY, BALASUBRAMANIAM, 2021). A piroptose libera padrões moleculares que são reconhecidos por células epiteliais vizinhas e macrófagos alveolares, desencadeando a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Essas proteínas atraem monocitos, macrófagos e células T para o local da infecção, promovendo mais inflamação e estabelecendo um ciclo de feedback pró-inflamatório (TAY, *et al.*, 2020).

Esses processos associados promovem o recrutamento de neutrófilos e de linfócitos, e regulam positivamente os receptores de quimiocinas que orientam sua migração para os linfonodos, estimulando o amadurecimento de células B e T. Desta forma as células T CD4+ estimulam a produção de imunoglobulina IgG e IgM pelas células B. Os linfócitos T podem ainda retromigrar para o tecido inflamado para combater o vírus através da produção de citocinas antivirais, e suprimir a replicação viral e a morte específica do antígeno de células infectadas (MORTAZ, *et al.*, 2020; CELARDO, *et al.*, 2020).

As respostas imunes adaptativas são importantes para o controle e eliminação da infecção viral e, na maioria dos casos, esse processo é capaz de resolver a infecção. No entanto, em alguns casos, ocorre uma resposta imune disfuncional, que pode causar patologia pulmonar grave e até mesmo sistêmica. Isso ocorre devido a resposta do hospedeiro a um vírus geralmente não ser uniforme e as infecções poderem infligir diferentes graus de morbidade e mortalidade (SETTE, CROTTY, 2021, TAY, *et al.*, 2020; BLANCO-MELLO, *et al.*, 2020).

1.3. A PANDEMIA COVID-19

Desde seu surgimento inicial no final de 2019 em Wuhan, China, o SARS-CoV-2, agente etiológico da doença do Coronavírus 2 (COVID-19), infectou globalmente mais de 760 milhões de pessoas, resultando em 6,9 milhões de mortes (SHANMUGARAJ, *et al.*, 2023; WHO, 2023; FUMAGALLI, *et al.*, 2021). Os números referentes às infecções por SARS-CoV-2 ocorreram devido ser uma infecção altamente contagiosa, que pode evoluir de um quadro leve a moderado de pneumonia, para lesões invasivas nos pulmões, contribuindo para o desenvolvimento de pneumonia, dispneia, linfopenia, síndrome do desconforto respiratório agudo, falência de múltiplos órgãos e morte de indivíduos infectados (LU, *et al.*, 2020; KUNG, *et al.*, 2022).

A pandemia de COVID-19 causou impactos drásticos na saúde humana e na economia global, e o rápido desenvolvimento para implementação nos serviços públicos de ferramentas de diagnóstico e vacinas foi decisivo para conter a pandemia. Fazendo com que os casos graves da doença passassem a se concentrar em populações que não foram completamente imunizadas (BAGNO, *et al.*, 2022; SHANMUGARAJ, *et al.*, 2023; MOURA, *et al.*, 2021).

Atualmente mais de 11 bilhões de doses de vacinas já foram administradas em todo o mundo, e, apesar de um amplo programa de vacinação global contra a COVID-19, com o surgimento de variantes de preocupação do SARS-CoV-2 (VOCs), a população mundial tem enfrentado a quarta onda pandêmica. A OMS tem cinco variantes de preocupação: Alpha, Beta, Gamma, Delta e Omicron (Figura 8) (AZEVEDO, *et al.*, 2023; BAGNO, *et al.*, 2022; WHO, 2023). E as mutações presentes nessas variantes afetam a ligação do RBD viral ao ACE2 e/ou a infecciosidade do vírus e/ou a neutralização do vírus por anticorpos em diferentes graus (QIAO, *et al.*, 2022; LIU, *et al.*, 2022).

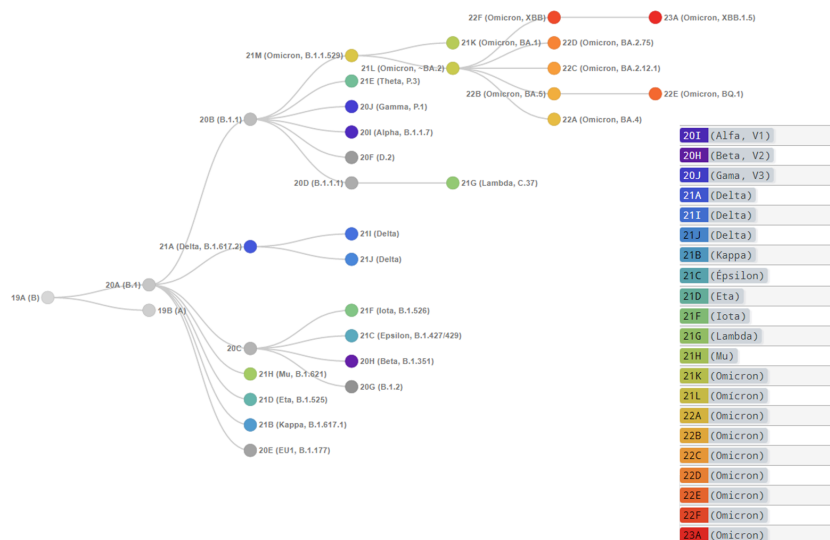


Figura 8. Relações filogenéticas das variantes SARS-CoV-2. Filodinâmica do SARS-CoV-2 demonstrando as relações filogenéticas entre as variantes que surgiram devido às mutações, ao longo do tempo (Imagem adaptada de CoVariants do site Nextstrain <https://covariants.org/>)

Mesmo com o surgimento de novas epidemias provocadas pelas VOCs, todos os indivíduos vacinados mantiveram a capacidade de neutralização contra as variantes alpha, beta, gama e delta. Devido à estimulação da vacinação por anticorpos neutralizantes de variantes cruzadas e resposta celular (CEVIK, *et al.*, 2021).

A Omicron, por sua vez, tem o dobro do número de mutações em comparação às demais variantes e, por isso, ela está associada a uma maior capacidade de evadir a imunidade da infecção anterior por SARS-CoV-2. As mudanças estruturais da Omicron podem diminuir a interação com os anticorpos, porém, não evadem completamente os anticorpos neutralizantes. Apesar disso, seu surgimento dificulta o diagnóstico e reduz a eficácia das vacinas atuais. Em dezembro de 2022, a variante Omicron representava a única VOC remanescente em circulação (MISTRY, *et al.*, 2021; ZHU, *et al.*, 2022; AZEVEDO, *et al.*, 2023).

As dificuldades com o surgimento das VOCs exigiram doses de reforço, no entanto, mesmo após a quarta dose, as vacinas COVID-19 atuais não conseguem controlar a replicação viral e prevenir a doença leve a moderada durante um período predominante de Omicron. Sugerindo que a COVID-19 pode se tornar uma doença endêmica que deve ser incluída no calendário de vacinação periódica de vários países (AZEVEDO, *et al.*, 2023).

1.4. CONTROLE DA COVID-19: MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO E VACINAS

A pandemia do SARS-CoV-2 e o surgimento de variantes exigiu uma ação rápida e o desenvolvimento de vacinas em um prazo sem precedentes, além da necessidade de métodos de diagnóstico mais adaptativos para a detecção de infecções por SARS-CoV-2. (KRAMER, *et al.*, 2020; FERNANDES, *et al.*, 2022).

O primeiro passo no manejo da COVID-19 é a detecção rápida e precisa do vírus, pois a capacidade de diagnóstico é crucial para controlar as infecções e reduzir as taxas de mortalidade (TAHA, *et al.*, 2023; KEVADIYA, *et al.*, 2021). O método mais utilizado, devido sua alta sensibilidade e especificidade, é a transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR). A RT-qPCR detecta ácidos nucleicos do SARS-CoV-2 presentes nos fluidos nasofaríngeos. Ensaio baseado nesse tipo de detecção normalmente utilizam kits direcionados aos genes ORF1b (incluindo RdRp) e as proteínas N e/ou S, e são considerados a primeira escolha para a detecção de SARS-CoV-2 (HU, *et al.*, 2021; KEVADIYA, *et al.*, 2021; ZHU, *et al.*, 2022). Este método é considerado padrão-ouro para o diagnóstico de SARS-CoV-2, porém, tem suas próprias desvantagens como ferramenta de detecção, devido ao trabalho de instrumentação e o tempo de resposta (YAGHOOBIZADEH, *et al.*, 2023; WANG, *et al.*, 2022). Além disso, ele também é limitado pela carga viral. O RT-qPCR não é sensível a cargas virais excessivamente baixas no estágio inicial da infecção

por SARS-CoV-2, e em casos de evolução para casos mais graves, a carga viral nos fluidos respiratórios é mais alta a partir da terceira e quarta semana (ZHU, *et al.*, 2022; KEVADIYA, *et al.*, 2021).

Em contraste com as abordagens de detecção de ácido nucleico no campo da detecção e rastreamento da evolução do SARS-CoV-2, as abordagens baseadas em anticorpos podem ser usadas para investigações epidemiológicas. Os testes mais utilizados se baseiam nos ensaios de ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática), Western blotting, LFIA (Imunoensaios de Fluxo Lateral) (HU, *et al.*, 2021; YAGHOOBIZADEH, *et al.*, 2023). O diagnóstico sorológico, realizado através destas metodologias, é especialmente importante em pacientes com doença leve a moderada que podem se apresentar tardiamente, além das primeiras duas semanas do início da doença (SETHURAMAN, JEREMIAH, 2020).

Apesar da importância da rápida detecção por método de diagnóstico para direcionar ao tratamento adequado da infecção, as vacinas continuam a ser o principal pilar da prevenção e proteção contra infecções por SARS-CoV-2 (KRAMER, *et al.*, 2020).

Os dados do desenvolvimento pré-clínico de vacinas candidatas para SARS-CoV e MERS-CoV permitiram que a etapa inicial do desenho exploratório da vacina fosse essencialmente omitida, economizando um tempo considerável (KRAMER, *et al.*, 2020). Atualmente, mais de 200 vacinas contra o SARS-CoV-2, foram anunciadas, sendo algumas aprovadas para uso emergencial e administrados em uma população, enquanto outras estão sob investigação pré-clínica e clínica (GHAEMI, *et al.*, 2022; KRAMER, *et al.*, 2020).

A maioria das vacinas contra o SARS-CoV-2, incluindo as disponíveis para uso emergencial, são categorizadas como: vacinas tradicionais de vírus inativados e atenuadas, (Sinopharm - BIBP-CorV; Sinovac - CoronaVac; Covaxin – BBV152), vetor viral (Janssen - Ad26.COVS.2.S; Oxford-AstraZeneca - AZD1222/ChAdOx1), mRNA (Pfizer/BioNTech Comirnaty - BNT162b2; Moderna - mRNA-1273), e de proteínas recombinantes (Novavax - NVX-CoV2373; Nuvaxovid - SARS-CoV-2 rS; Convidecia - Ad5-nCoV-S) (MISTRY, *et al.*, 2022; WHO, 2023).

As vacinas inativadas são derivadas de vírus cultivados em cultura e depois quimicamente inativados, que podem fornecer epítomos antigênicos conformacionalmente nativos, expressos de forma estável. Porém, a composição da vacina inativada é relativamente complexa, incluindo múltiplos imunógenos que potencialmente causam reações adversas

(CREECH, WALKER, SAMUELS, 2021; PENG, *et al.*, 2021). Já as atenuadas incorporam-se a uma versão enfraquecida do vírus vivo com virulência reduzida. Esta abordagem também serve como plataforma para a produção de vacinas baseadas em vetores competentes para replicação. O desenvolvimento desse tipo de vacina é baseado na integração de genes codificadores de antígenos exógenos, nos genomas de vírus cujos genes nocivos foram removidos. Induzindo efetivamente o organismo a produzir anticorpos neutralizantes de alto título. Os vírus mais comumente usados são derivados de cepas de Adenovírus imunocomprometidos para replicação, manipulados para expressar um transgene, como a proteína S (KRAMMER, 2020; CREECH, WALKER, SAMUELS, 2021; PENG, *et al.*, 2021).

As vacinas baseadas em mRNA têm o potencial de melhorar significativamente o desenvolvimento de vacinas para muitos patógenos. Nessas vacinas, as nanopartículas lipídicas são usadas para proteger o mRNA que codifica a proteína S e são estabilizadas por pré-fusão a caminho do espaço intracelular. O hospedeiro usa o mRNA para produzir a proteína alvo (proteína S), que induz uma resposta imune coordenada. As vacinas baseadas em mRNA contra a COVID-19 demonstraram alta eficácia e têm sido amplamente utilizadas no mundo (CREECH, WALKER, SAMUELS, 2021; AZEVEDO, *et al.*, 2023).

Outra abordagem para o desenvolvimento de vacinas é a entrega das proteínas como uma subunidade da proteína recombinante em um sistema de expressão. Sendo incapaz de causar doença, a plataforma de vacina de subunidade de proteína é considerada mais segura do que as plataformas de vírus inteiro (vivos atenuados e inativados), por não exibir toda a complexidade antigênica do vírus e conter PAMPs (AL-JIGHEFEE, *et al.*, 2021; CREECH, WALKER, SAMUELS, 2021). Junto às proteínas recombinantes, a administração de adjuvantes imuno potenciadores é comum para aumentar o título e a durabilidade das respostas de anticorpos, sendo uma estratégia de grande importância (GHAEMI, *et al.*, 2022).

Atualmente, vem sendo administradas as vacinas de reforço bivalentes, que conferem proteção adicional contra infecções sintomáticas causadas por sub-linhagens da Omicron relacionadas com BA.5, XBB e XBB.1.5 em pessoas que já receberam até a quarta dose de vacinas monovalentes. Versões adaptadas de vacinas anteriormente aprovadas para uso emergencial como Oxford-AstraZeneca, Sputnik V e Novavax estão sendo formuladas, assim como versões específicas das vacinas contra a variante Omicron (ZABIDI, *et al.*, 2023).

À medida que a campanha de vacinação global em larga escala contra o SARS-CoV-2 continua, permanece um vazio na compreensão da eficácia das vacinas. Dados de ensaios clínicos evidenciam que a maioria das vacinas disponíveis possuem mais de 90% de eficácia, porém, dada a natureza rápida e reacionária da resposta da vacina contra o SARS-CoV-2, pouco se sabe sobre a durabilidade das vacinas além de 6 meses (LIU, *et al.*, 2021).

Ao considerar a eficácia da vacina contra novas variantes, há pelo menos três elementos a considerar: se os anticorpos desencadeados pelas vacinas atuais podem reconhecer e neutralizar essas novas variantes; se existem respostas imunes celulares de reação cruzada a essas variantes; e, o impacto real das variantes na proteção clínica fornecida pelas vacinas. Devido a isso é necessário continuar a reunir o máximo de dados possível sobre a eficácia das vacinas específicas para variantes para avaliar os programas de implementação de vacinas de reforço em curso (CEVIK, *et al.*, 2021; ZABIDI, *et al.*, 2023).

1.5. PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DE SARS-COV-2 COMO IMUNÓGENOS

As mutações presentes nas variantes do SARS-CoV-2 põem em risco as estratégias utilizadas no controle do vírus, colocando em risco a utilidade de certas plataformas de diagnóstico e imunização. Sabendo disso, a maioria dos sistemas desenvolvidos são direcionados à proteína S, a qual possui a maior taxa de mutações entre as proteínas estruturais (ASCOLI, *et al.*, 2022; PLANTE, *et al.*, 2021). Desta forma, o surgimento de variantes do SARS-CoV-2 renovou o interesse no uso de outras proteínas estruturais (E, M, N) para o desenvolvimento de kits de diagnósticos e de imunizantes. Como consequência, a busca por epítomos das células B e das regiões de ligação ao MHC-I das proteínas estruturais tornaram-se relevantes na investigação (THOMAS, 2022).

Atualmente como alternativa, a proteína N é o antígeno mais comumente utilizado, podendo essa ser utilizada sozinha e/ou administrada em conjunto com o RBD (KUMAR, *et al.*, 2023). Alguns trabalhos demonstram a eficácia da proteína N aplicada no diagnóstico, também fusionado ao RBD como antígeno vacinal. No trabalho de Azevedo, *et al.*, 2022, os autores demonstraram o uso da proteína N em um kit diagnóstico de ELISA IgG. A escolha do antígeno foi devido a proteína N ser imunodominante durante a replicação do SARS-CoV-2. E, com isso, eles apresentaram um kit baseado na proteína N com desempenho semelhante a testes de fabricantes bem estabelecidos que utilizam o RBD da proteína S. No trabalho de

Castro, *et al.*, 2022, foi apresentado uma proteína quimérica contendo o RBD desdobrado da proteína Spike e da proteína N, que foi reconhecida por anticorpos IgG induzindo a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ e CD8⁺ de doadores humanos convalescentes e vacinados. Em camundongos imunizados com a mesma quimera, a imunização induziu fortes respostas humorais e de células T, tornando-se altamente resistentes à cepas Wuhan-1, Delta e às variantes Omicron do SARS-CoV-2.

Assim como a proteína N, as proteínas M e E são altamente conservadas, com baixas taxas de mutação e, portanto, aplicações baseadas nessas proteínas podem também ser uma estratégia, relacionados ao uso da proteína S. Essas proteínas são encontradas em abundância na partícula viral, podendo esperar um nível de reatividade alto de anticorpos durante a infecção por SARS-CoV-2 (THAKUR, *et al.*, 2022; JÖRRISSEN, *et al.*, 2021). Além disso, sugere-se que as proteínas M e E, devido sua identidade conservada são alvos de imunidade induzida por células T. Alguns trabalhos anteriores de imunidade contra SARS-CoV e MERS-CoV, demonstraram que vários epítopos de células T foram identificados nas proteínas M e E. Nesse sentido, essas proteínas podem ajudar a ampliar a resposta das células T e melhorar a proteção cruzada se incluídas em vacinas SARS-CoV-2 (DAI, GAO, 2021).

Apesar da carência de trabalhos validando experimentalmente o potencial antigênico dessas proteínas em plataformas de diagnóstico e imunização, alguns estudos anteriormente publicados obtiveram sucesso para ambas as propostas, demonstrando o potencial antigênico das duas proteínas. A proteína M e E já foram identificadas como altamente imunogênicas ao serem reconhecidas no soro de pacientes infectados na fase aguda. A proteína M exibe domínios antigênicos reconhecidos por IgG, IgM e IgA (JÖRRISSEN, *et al.*, 2021; MARTIN, *et al.*, 2021). Estudos recentes também evidenciaram que assim como a proteína N, a proteína M é uma das mais imunogênicas do SARS-CoV-2, e os epítopos raramente alterados desta proteína nas variantes do SARS-CoV-2, podem aumentar a imunidade das células T (ARIETA, *et al.*, 2023).

Alguns estudos em relação à patogenicidade da proteína E, apontam que ela é um importante gatilho para a resposta inflamatória do hospedeiro, ativando o inflamassoma, sendo um determinante da patogenicidade. Os vírus recombinantes testados em camundongos com a proteína E sem atividade de canal iônico demonstraram possuir uma redução considerável no dano epitelial pulmonar e na inflamação e redução da mortalidade dos animais

(SANTOS-MENDOZA, 2023). Sugerindo que a proteína E pode ser um alvo ideal para o desenvolvimento de vacinas e medicamentos, e também um alvo para imunoterapias, não apenas desencadeando uma resposta imune dirigida, mas também interferindo diretamente na regulação e, portanto, na função da proteína alvo para combater o SARS-CoV-2 (POGGIO, *et al.*, 2023).

Sabendo disso, torna-se interessante a identificação de epítomos, ou locais no antígeno onde os anticorpos se ligam, para o desenho de vacinas e anticorpos terapêuticos baseados nessas proteínas. Até o momento, todos os anticorpos neutralizantes visam epítomos da proteína spike (LIU, WILSON, 2022). Porém, alguns trabalhos propõem o uso de epítomos e regiões antigênicas das proteínas E e M. O estudo de Waqas *et al.*, (2020) determinou, por imunoinformática, o uso de peptídeos das proteínas estruturais, visando uma vacina peptídica multi-epítomo. No trabalho de Macedo (2022), a autora desenvolveu uma proteína multi-epítomo com os peptídeos previstos por Waqas *et al.*, (2020). Nos ensaios realizados pela autora, a proteína recombinante mostrou-se imunogênica, além de ser capaz de ser reconhecida por soro de pacientes portadores da doença. Estes resultados sugerem o potencial dos epítomos para serem usados como vacina peptídica contra a COVID-19 ou em kits de diagnóstico.

Considerando também que, o uso do RBD recombinante como imunizante demonstra certa susceptibilidade à deriva antigênica, pois além das mutações atreladas a ele, é uma proteína pequena quando expressa sozinha e, embora potentes anticorpos neutralizantes se liguem ao RBD, ela carece de outros epítomos neutralizantes que estão presentes no pico completo (KRAMMER, 2020). Com isso, a incorporação de mais de um antígeno, seja na forma de multímeros ou de antígenos distintos administrados em formas fundidas, pode apresentar um papel sinérgico ao provocar respostas de anticorpos antivirais mais fortes. Demonstrando que o RBD fusionado a epítomos das proteínas estruturais tem potencial como alternativa às plataformas atuais de diagnóstico e imunização (GHAEMI, *et al.*, 2022; GUIRAKHO, *et al.*, 2020).

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. OBJETIVOS GERAIS

Construção e expressão em *Escherichia coli* de proteínas quiméricas resultantes da fusão do Domínio de Ligação ao Receptor (RBD), da proteína Spike, a fragmentos gênicos N-terminal e epítomos estruturais das proteínas do Envelope e Membrana do SARS-CoV-2, visando aplicações dos imunógenos em diagnóstico imunológico e potencial estratégia de imunização contra a COVID-19.

1.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construção dos plasmídeos de expressão contendo a fusão entre os fragmentos N-terminal e epítomos das proteínas do envelope (E) e de membrana (M) ao domínio RBD da proteína Spike; além da expressão do RBD;
- Clonagem em pET28a para expressão em *Escherichia coli* Rosetta (DE3);
- Solubilização dos corpos de inclusão;
- Imunização de camundongos com as proteínas de fusão;
- Avaliação da imunogenicidade dos anticorpos;
- Avaliação da resposta celular.

CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS E COMITÊ DE ÉTICA

Os camundongos BALB/c fêmeas (8 - 10 semanas de idade e aproximadamente 25 g de peso) foram obtidos do Instituto Adolfo Lutz (IAL). Os animais foram alojados em gaiolas com seis animais a 25°C e receberam comida isenta de antibióticos e água ad libitum. Todos os protocolos foram previamente aprovados pela Comissão Institucional de Cuidados e Uso de Animais (CEUA/IAL n° 04/2023), e pelo Conselho de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.

2.2. ANÁLISES *IN SILICO*

As informações sobre as sequências dos genes de interesse, referente ao genoma completo da primeira cepa SARS-CoV-2 isolado no Brasil (GenBank®: MT126808.1); e as sequências citadas por Waqas *et al.*, (2020), referentes aos epítomos das proteínas do Envelope (NCBI_Protein = QHW06051.1), Membrana (NCBI_Protein = QHQ82467.1), e Spike (NCBI_Protein = QHR63260.2), foram obtidas no banco de dados NCBI (*National Center of Biotechnology Information*). Os alinhamentos das sequências foram feitos na plataforma Clustal Omega. E, para analisar a conservação das proteínas foi realizado um alinhamento usando a plataforma BLAST (NCBI). O peso molecular e o ponto isoelétrico foram calculados utilizando a ferramenta ProtParam (Plataforma Expasy), e a antigenicidade determinada pela VaxiJen. A predição por modelagem da estrutura secundária de cada proteína foi gerada por homologia com outras estruturas já existentes em bancos de dados, utilizando o programa Colab AlphaFold 2, e editadas utilizando o programa de modelagem molecular UCSF Chimera. A análise da estrutura das proteínas foi realizada utilizando o programa PSIPRED.

2.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 8.0.2. Os testes utilizados em cada análise dos dados estão explicados nas legendas das figuras. Em geral, a comparação entre os grupos foi realizada por meio do teste t não pareado ou por ANOVA unidirecional. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando valores de $p \leq 0,05$.

2.4. CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO RECOMBINANTE DAS FUSÕES

2.4.1 AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES

A expressão das proteínas de fusão foram planejados com base no RBD da proteína Spike, fusionado a fragmentos gênicos e epítomos das proteínas do envelope (E) e de membrana (M). A seleção para a composição das fusões ocorreu devido o RBD, ser o principal alvo como antígeno vacinal e de diagnóstico. E, para compor as fusões ao RBD, os fragmentos gênicos das proteínas E e M foram selecionados por se tratarem de proteínas transmembranas com regiões potencialmente antigênicas externas ao vírus; enquanto os epítomos das proteínas E e M foram selecionados com base no estudo de Waqas *et al.*, (2020), que propõem através de análises de imunoinformática, o uso desses peptídeos em vacinas (tabela 1).

Tabela 1. Predição de epítomos das proteínas de membrana e envelope do SARS-CoV-2

Número de Resíduos	Sequência	Afinidade ao MHC	Afinidade de ligação	Afinidade de clivagem C-terminal	Score
Envelope					
34	LTALRLCAY	0,5594	2,345	0,672	2,6158
Membrana					
213	SSDNIALLV	0,6531	2,7729	0,9682	2,9325
171	ATSRTLSSYY	0,5463	2,3195	0,8879	2,6158

Tabela adaptado de Waqas, *et al.*, (2020)

Partindo disso, foram desenhados três pares de oligonucleotídeos iniciadores: RBD-fw e RBD-rv; RBD-E-fw e RBD-E-rv; RBD-M-fw e RBD-M-rv, sintetizados pela empresa *Exxtend Biotecnologia*.

Para os primers RBD-fw e RBD-rv, foi adicionado ao primer forward um sítio para a enzima de restrição de *NcoI*, seguido da sequência hibridizável com a região 5' do domínio RBD. No primer reverse, foi adicionado um sítio para a enzima de restrição de *SalI*, seguido

da sequência hibridizável ao domínio RBD, com adição de um sítio da TEV-protease para posterior retirada da his-tag.

Para os primers RBD-E-fw e RBD-E-rv, foi adicionado no primer forward um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição de *NcoI*, seguido da sequência contendo os primeiros 16 resíduos N-terminais da proteína E mais Linker-S, acrescidos da sequência hibridizável com a região 5' do domínio RBD. No primer reverse, foi adicionada um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição de *Sall*, seguido da sequência hibridizável do domínio RBD, acompanhados de um Linker-S, ligando a um conjunto de epítomos presente na proteína E, e um sítio TEV-protease para posterior retirada da his-tag.

Para os primers RBD-M-fw e RBD-M-rv, no primer forward foi adicionado um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição de *NcoI*, seguido da sequência contendo os primeiros 19 resíduos N-terminais da proteína M mais Linker-S, acrescidos da sequência hibridizável com a região 5' do domínio RBD. No primer RBD-M-rv, um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição de *Sall* foi adicionado, seguido da sequência hibridizável do domínio RBD mais Linker-S, ligando a dois conjuntos de epítomos presentes na região C-terminal da proteína M, e um sítio TEV-protease para posterior retirada da his-tag.

Esses pares de primers foram utilizados em combinações diferentes nas reações de PCR, que codificaram a sequência de oito proteínas de fusão além do próprio RBD. Todas as construções possuem a sequência do domínio RBD, se distinguindo nas fusões com os fragmentos gênicos e os epítomos E e M. As fusões construídas a partir dessas combinações estão exemplificadas na tabela 2 e na figura 9.

Tabela 2. Combinação de primers utilizados para construção das sequências codificantes

	Fusões	Primers
RBD-E	RBD - epítipo E	RBD-fw + RBD-E-rv
RBD-M	RBD - epítipos C-terminais M	RBD-fw + RBD-M-rv
E-RBD-E	16 resíduos N-terminais da proteína E - RBD - epítipo E	RBD-E-fw + RBD-E-rv
E-RBD	16 resíduos N-terminais da proteína E - RBD	RBD-E-fw + RBD-rv
E-RBD-M	16 resíduos N-terminais da proteína E - RBD - epítipos C-terminais M	RBD-E-fw + RBD-M-rv
M-RBD-M	19 resíduos N-terminais da proteína M -RBD - epítipos C-terminais M	RBD-M-fw + RBD-M-rv
M-RBD	19 resíduos N-terminais da proteína M - RBD	RBD-M-fw + RBD-rv
M-RBD-E	19 resíduos N-terminais da proteína M - RBD - epítipo E	RBD-M-fw + RBD-E-rv

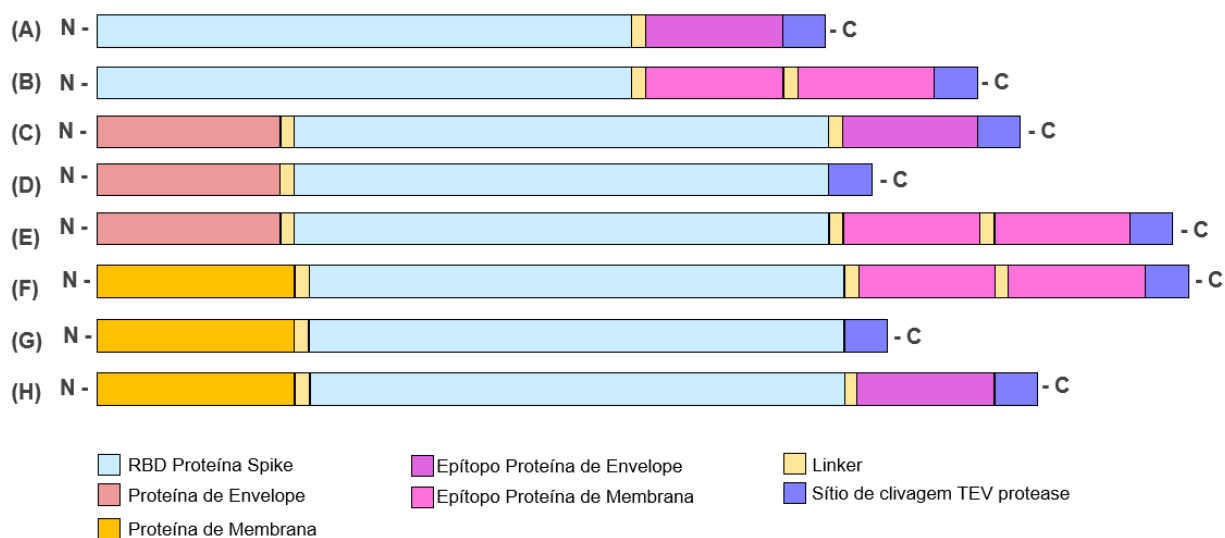


Figura 9. Esquema dos cassetes das proteínas de fusão. (A) RBD-E; (B) RBD-M; (C) E-RBD-E; (E) E-RBD; (E) E-RBD-M; (F) M-RBD-M; (G) M-RBD; (H) M-RBD-E.

Para a construção das sequências codificantes das fusões, foram amplificadas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a partir do cDNA completo de SARS-CoV-2, referente a cepa selvagem (Wuhan-1), o qual foi cedido pelo grupo do Professor Dr. Glaucius Oliva, do Instituto de Física da USP, em São Carlos. Utilizando os primers *forward* NcoI-RBD-fw, NcoI-RBD-M-fw, NcoI-RBD-E-fw; e, *reverse* SallI-RBD-rv, SallI-RBD-M-rv, SallI-RBD-E-rv, com sítios de restrição para as enzimas *NcoI* e *SallI* para expressão em *Escherichia coli* Rosetta (DE3). Para obtenção das fusões foram realizadas as seguintes combinações de primers como constam na tabela 3.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação das fusões	
Pares de primers	Sequência (5'-3')
NcoI-RBD-F	TATACCATGGGCCCTAATATTACAAACTTGTGCCCTTTTG
SallI-RBD-R	AAAGTCGACACCTTGAAAGTACAGGTTTTCTCAAGTGTCTGTG GATCACGGAC
NcoI-RBD-E-F	TATACCATGGGCATGGCTGATTCTAACGGTACTATTACTG
SallI-RBD-E-R	AAAGTCGACACCTTGAAAGTACAGGTTTTCGTAAGCACACAGT CTCAGAGCAGTCAGAGAACCACCACCCTCAAGTGTCTGTG GATCACGGAC
NcoI-RBD-M-F	TATACCATGGGCATGTACTCTTTTGTCTGAAGAACTG
SallI-RBD-M-R	AAAGTCGACACCTTGAAAGTACAGGTTTTCAACCAGCAGAGCA ATGTTATCAGAAGAAGAACCACCACCACCGTAGTAAGACAGAGT TCTAGAAGTAGCAGAACCACCACCCTCAAGTGTCTGTGGAT CACGGAC

Em negrito os sítios para as enzimas de restrição *NcoI* e *SallI*.

As amplificações das fusões RBD foram realizadas em um volume de 25 µL. Para isso foram utilizados, 0,2 mM de dNTP (Promega), 1x tampão Taq High Fidelity (Cellco), 10 µM de cada primer e 2,5 U da enzima Taq High Fidelity Polymerase (Cellco). O protocolo de amplificação foi realizado no termociclador Veriti (Applied Biosystems), e os ciclos utilizados na reação seguiram os seguintes parâmetros: 95 °C por 3 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94°C de desnaturação por 1 minuto, 45 °C de hibridização por 1:30 minuto, 72°C por 2:30 minutos de extensão e 72 °C por 7 minutos finais. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio e purificados do gel utilizando Agarose Gel Extraction Kit (Cellco).

2.4.2. CLONAGEM DOS VETORES DE EXPRESSÃO

Os fragmentos purificados foram clivados com as enzimas *NcoI* e *Sall*, assim como o vetor de expressão pET28a. A reação de clivagem foi realizada utilizando 1 µg de DNA, 1x tampão Tango, 10 U de cada enzima de restrição (Thermo Fisher Scientific), em um volume de 30 µL. A reação foi incubada a 37°C por 2 horas. Após a reação de clivagem para obtenção de extremidades coesivas, os fragmentos de DNA foram ligados ao vetor pET-28a em uma proporção 3:1 (plasmídeo/inserto), utilizando 1x tampão T4 ligase e 2,5 U da enzima T4 DNA ligase (Cellco) em uma reação de 20 µL por 16 horas a 15°C.

Após esse período, 20 µL da reação foram utilizados para transformação por choque térmico em células quimiocompetentes de *E. coli* da linhagem DH5α. A transformação por choque térmico ocorreu pela incubação por 90 segundos a 42°C e 3 minutos no gelo, seguidos da adição de 800 µL de meio LB e incubação a 37°C por 1 hora. Dado esse período, foram plaqueados 100 µL das células transformadas em meio LB Ágar com canamicina 25 µg/mL, e as placas incubadas por 16 horas a 37°C.

Os clones recombinantes foram identificados por PCR de colônia, utilizando os primers específicos do gene descritos na tabela 3. Como DNA molde, uma pequena quantidade de colônia foi picada utilizando palitos estéreis adicionados a uma reação contendo: 0,4 mM dNTP (Promega), 2,5 mM MgCl₂ (Thermo), 1x tampão da Taq DNA Polymerase (Thermo), 10 µM de cada primer, em uma reação de 20 µL. A reação foi submetida a 95°C de desnaturação por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação 94°C por 40 segundos, hibridização 50°C por 50 segundos, extensão 72°C por 1:30 minutos. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Os clones recombinantes selecionados por PCR de colônia foram isolados e purificados seguindo o método de lise alcalina descrito por Sambrook *et al.*, (2001).

Os plasmídeos contendo as fusões RBD foram confirmados através da análise de restrição. Foram utilizados na reação 100 ng de DNA, 1x tampão Tango, 5 U das enzimas *NcoI* e *Sall* (Thermo Fisher Scientific), em um volume de 15 µL. A reação foi incubada por 2 horas a 37°C e, posteriormente, analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Para uma confirmação efetiva dos clones recombinantes, foi realizado o sequenciamento Sanger, utilizando o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, com os primers T7 promoter (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') e T7 terminator (5' TAGTTATTGCTCAGCGG 3').

2.4.3. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DAS FUSÕES COM O RBD

Para expressão das proteínas, 1 µg dos plasmídeos recombinantes (pET28a-RBD; pET28a-RBD-E; pET28a-RBD-M; pET28a-E.RBD.E; pET28a-E-RBD; pET28a-E-RBD-M; pET28a-M-RBD-M; pET28a-M-RBD; pET28a-M-RBD-E) foi utilizado para transformação em células de *E.coli* quimiocompetentes, da linhagem Rosetta DE3. As células foram transformadas por choque térmico e incubadas a 37°C por 1 hora. Posteriormente, 50µL da transformação foi inoculado em 10 mL de LB líquido contendo canamicina e cloranfenicol 25 µg/mL. O inóculo foi incubado a 37°C por 16 horas, sob agitação a 250 rpm.

Passadas as 16 horas, foi realizada uma diluição 1:100 da cultura em 100 mL de LB líquido contendo canamicina e cloranfenicol 25 µg/mL. A cultura foi incubada a 37°C, 250 rpm até que a densidade óptica atingisse DO_{600nm} 0,4 - 0,6. Em seguida, foi adicionado às culturas 0,4 mM do indutor IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo). A indução foi mantida a 37°C, 250 rpm por 4 horas, e alíquotas de 1 mL foram tiradas a cada hora para posterior análise em SDS-PAGE 12%.

2.4.4 SOLUBILIZAÇÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO COM UREIA E PURIFICAÇÃO DO RBD E FUSÕES

Após a indução da expressão, as culturas foram centrifugadas a 4.500 rpm, a 4°C, por 10 minutos, utilizando a centrífuga Sorvall®, para separar as frações solúveis e insolúveis. A fração insolúvel foi então ressuspensa em tampão de lise pH 8 contendo 50 mM de NaH_2PO_4 e 300 mM de NaCl, com adição de 0,5% de Triton X-100. As células ressuspensas foram submetidas à lise por sonicação utilizando o equipamento Sonic Dismembrator 500 (Fisher Scientific) com os seguintes parâmetros: 6 pulsos de 1 minuto, intercalados com intervalos de 30 segundos, à potência de 20%. A suspensão lisada foi posteriormente centrifugada a 10.000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos, utilizando o rotor 28 da Sorvall®, e o sobrenadante foi descartado. O pellet resultante foi novamente ressuspensa nas mesmas condições anteriores e submetido à sonicação seguindo os mesmos parâmetros. A suspensão foi então centrifugada novamente nas mesmas condições e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi então ressuspensa em tampão de solubilização (composto por 50 mM de NaH_2PO_4 , 300 mM de NaCl, 0,1% de Triton X-100, 10 mM de DTT e 10 mM de Imidazol) e incubado a 37°C por 2 horas. Após este período, a suspensão foi homogeneizada por sonicação seguindo os mesmos parâmetros mencionados

anteriormente. O lisado resultante foi então centrifugado a 13.000 rpm, a 4°C, durante 20 minutos, utilizando o rotor 28 da Sorvall®, e o sobrenadante foi coletado e filtrado através de membranas de nitrocelulose com poros de 0,45 µm (Millipore).

As fusões foram purificadas por cromatografia de afinidade, utilizando colunas carregadas com 5 mL de resina Ni-NTA Superflow (Qiagen). Antes da purificação, as colunas foram lavadas com 25 mL de água Milli Q autoclavada e equilibradas com 25 mL de tampão de ligação composto por 50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl, 10 mM de imidazol e 8 M de uréia. O sobrenadante contendo as proteínas foi então passado pela coluna, seguido por uma lavagem com 25 mL de tampão de lavagem (50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl, 20 mM de imidazol) e 8 M de uréia, e ambas as frações foram coletadas. A proteína foi eluída com gradientes de concentração de imidazol e uréia, variando de 50 mM a 500 mM, e as frações resultantes foram coletadas para análise em gel de poliacrilamida a 12%. As frações contendo as proteínas puras foram submetidas à diálise em membranas (Pierce) de 3500 MW utilizando tampão PBS (composto por 1,37 mM de NaCl, 10 mM de Na₂HPO₄ e 2 mM de NaH₂PO₄) a pH 8 e pH 9, por um período de 3 horas a 4°C. Durante o processo de diálise, o tampão foi trocado a cada hora, com redução gradual da concentração de uréia (2 M, 1 M e 0 M).

2.5. AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DAS FUSÕES

2.5.1. ENSAIO DE DOT BLOT

Os ensaios de dot blot foram realizados a fim de averiguar a reatividade das proteínas de fusão, assim como o RBD expresso em *Escherichia coli*, e selecionar a fusão que melhor reagisse. Para que com essa fosse realizado a validação dessa proteína como imunógeno para testes de diagnóstico e para imunização. Desta forma foi utilizado nos ensaios o soro de coelhos IgG anti-RBD, e, como controle negativo, foi utilizado o soro do grupo controle da imunização. Também foi utilizado um pool de soros de indivíduos infectados com a cepa selvagem (Wuhan-1) do SARS-CoV-2, em estado moderado e grave, com alta titulação de IgG. Estes soros foram coletados no Hospital de Infectologia Emílio Ribas no período de pré vacinação. Como controle negativo foi utilizado um pool de soros de indivíduos pré-pandemia.

Para os ensaios de Dot Blot foi utilizado 1 µg de cada proteína revestindo a membrana de 0,22 µm (Hybond, Amersham, Reino Unido). Após a aplicação a membrana foi seca a vácuo no

aparelho Bio-Dot (Bio-Rad). A transferência das proteínas para membrana foi verificada pela coloração com ponceau, e em seguida foi realizado o bloqueio da membrana (PBS + 0,1% Tween 20 suplementado com 5% de leite desnatado) por 1 hora a 25°C.

Após o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes com PBST 0,1%. Os soros foram diluídos em PBST suplementado com 2,5% de leite desnatado, nas diluições de 1:1250, 1:2500, 1:5000, 1:1000, e adicionados a membrana, que em seguida foi incubada por 1 hora a 25°C. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com PBST 0,1% e então incubada com IgG de cabra anti-coelho marcada com HRP (enzima peroxidase de rábano) (1:5000, Santa Cruz Biotechnology™), e IgG de cabra anti-humana marcada com HRP (1:5000, Sigma Aldrich), por 1 hora em temperatura ambiente.

2.6. SOLUBILIZAÇÃO EM ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA E CARACTERIZAÇÃO

2.6.1 SOLUBILIZAÇÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO EM ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Como alternativa ao método de solubilização com uréia, para obtenção das proteínas solúveis, os agregados proteicos foram solubilizados sob condição não desnaturante, em condições alcalinas em alta pressão hidrostática. A princípio, os pellets foram ressuspensos em tampão Caps 100 mM pH 10, contendo 5 mM de EDTA, 1 mM de PSMF e lisozima 50 µg/mL. As suspensões foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos, seguidas de sonicação na presença de 0,1% de deoxicolato de sódio, com ciclos de 1 minutos e intervalos de 30 segundos, utilizando uma frequência de 60 Hz, até a homogeneização dos corpos de inclusão.

Após essa etapa, as suspensões foram novamente centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4°C, e os sobrenadantes foram descartados. Os precipitados insolúveis foram então ressuspensos em tampão Caps 100 mM pH 10, contendo 5 mM de EDTA, 1 mM de PSMF e 0,1% de deoxicolato de sódio. Novamente, as suspensões foram submetidas à sonificação e centrifugação nas mesmas condições mencionadas anteriormente, e o processo de lavagem foi repetido mais uma vez. E, após a conclusão das lavagens, os corpos de inclusão foram ressuspensos em tampão Caps 50 mM pH 10 contendo 1 mM de EDTA e 1 mM de PSMF. A suspensão foi submetida à sonificação e centrifugação por mais três vezes, e os corpos de inclusão foram ressuspensos em 10 mL de tampão do mesmo tampão.

Um volume de 1 mL de cada suspensão contendo 1 mg de proteína foi introduzido em sacos plásticos, que foram selados e colocados em um saco plástico maior, também selado a vácuo. As proteínas foram pressurizadas a 2,5 kbar em uma bomba de alta pressão (modelo PS-50, equipamento de alta pressão dos EUA) a 25°C. A compressão foi realizada por 90 minutos. Após a descompressão, as amostras foram retiradas dos sacos plásticos e centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos para a remoção de agregados insolúveis, e o sobrenadante foi coletado.

2.6.2 FLUORESCÊNCIA INTRÍNSECA DO TRIPTOFANO

Os espectros de emissão de fluorescência intrínseca do triptofano das proteínas foram obtidos utilizando o espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian), com uma cubeta de quartzo 1,0 de caminho óptico. Os parâmetros experimentais utilizados no desenvolvimento do procedimento se mantiveram constantes, correspondendo às janelas de emissão e excitação em 5 nm e submetidas à varredura espectrofotométrica de 300 a 400 nm, com excitação em 280 e 295 nm. Os experimentos foram realizados utilizando uma suspensão aquosa de 1 ml de cada proteína após a compressão em alta pressão hidrostática e como controle foi utilizado as mesmas proteínas desnaturadas com Guanidina HCl 6 M (GndHCl).

2.7. IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS

Para a imunização, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com idades entre 8 e 10 semanas, pesando em média 25 g. Os camundongos foram distribuídos em quatro grupos da seguinte forma: dois grupos de controle, cada um com quatro animais. Um grupo foi tratado apenas tampão Caps, enquanto o outro grupo foi tratado apenas com adjuvante completo de Freund (CFA). Além disso, dois grupos de tratamento foram formados, cada um com seis animais. Esses grupos receberam duas doses de 10 µg de cada proteína, diluídas em uma solução de Caps estéril, à qual foi adicionado 50% (v/v) de adjuvante CFA. Os animais receberam duas doses de imunização por via intramuscular com um intervalo de 21 dias entre as doses. Amostras de sangue foram coletadas por punção da veia submandibular no dia 0 (pré-imune) e novamente após 21 dias, antes da segunda dose.

Os camundongos foram submetidos à eutanásia 21 dias após a segunda dose, utilizando anestesia profunda com uma combinação de quetamina e xilazina (nas doses de 140 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente). As amostras de sangue foram coletadas via veia cava e, posteriormente,

foram submetidas a uma centrifugação a $3000 \times g$, por um período de 15 minutos, em temperatura ambiente, com o objetivo de separar o soro. Os soros contendo os anticorpos anti-RBD e anti-E-RBD-M foram então armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análises posteriores (figura 10).



Figura 10. Esquema de imunização (imagem gerada pela autora no BioRender)

2.8. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR

2.8.1 DETECÇÃO DE IgG E AVALIAÇÃO DA AVIDEZ

Os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) foram conduzidos para avaliar a reatividade dos soros IgG anti-RBD e anti-E-RBD-M em camundongos, com o objetivo de determinar a antigenicidade das proteínas RBD e E-RBD-M. Além disso, para avaliar o potencial uso dessas proteínas em sistemas de imunodiagnóstico, foram realizados ensaios para detectar IgG anti-RBD em um conjunto de 64 amostras de pacientes. Esse conjunto de incluí soros positivos e negativos para COVID-19, abrangendo também amostras de indivíduos vacinados. As amostras de soros positivos foram coletadas durante a primeira onda da pandemia de pacientes que testaram positivo para SARS-CoV-2 e estiveram internados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas antes da vacinação. As amostras de soros de indivíduos vacinados e as amostras de soros negativos (coletadas antes de 2019) foram obtidas a partir de coletas realizadas no Instituto Adolfo Lutz.

Para conduzir os ensaios, foram utilizadas placas de 96 poços de alta ligação (Nunc MaxiSorp™ flat-bottom, Thermo Fisher Scientific™). Para isso, as placas foram revestidas com 1 µg/mL de cada antígeno, incluindo RBD e E-RBD-M, bem como RBD expresso em células HEK. Todos esses antígenos foram diluídos em tampão carbonato com pH 9,6, com um volume de 50 µL/poço, e posteriormente incubamos as placas a 4°C durante a noite.

Na segunda etapa, as placas foram lavadas quatro vezes com 100 µL de PBS suplementado com Tween 20 a 0,5% (PBST 0,5%). Em seguida, foi realizado o bloqueio das placas utilizando 150 µL de uma solução de bloqueio composta por leite em pó desnatado a 5%, diluído em PBST 0,5%, e as placas foram mantidas em incubação por 2 horas a 25°C. Após o bloqueio, foi repetida a etapa de lavagem com PBST 0,05%, e em seguida, as placas foram incubadas com 100 µL/poço de uma diluição 1:100 dos soros de camundongos imunizados com RBD e E-RBD-M, em PBST 0,5% suplementado com 1% de leite desnatado, por 1 hora a 25°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBST 0,05%.

Neste ponto, as placas foram divididas ao meio: metade recebeu 100 µL/poço de tiocianato de potássio (KSCN) a 1,5 M, enquanto a outra metade recebeu 100 µL/poço de PBST 0,05%. As placas foram então incubadas por 20 minutos a 25°C. Após a incubação, foi realizada a lavagem com PBST 0,5% e, em seguida, as placas foram incubadas com 50 µL/poço de uma diluição de 1:5000 de anticorpo secundário conjugado anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) em PBST 0,5% suplementado com 1% de leite desnatado, por 1 hora a 25°C.

Dado o tempo de incubação com o anticorpo secundário, lavamos novamente as placas quatro vezes com PBST 0,5%. A seguir, foi adicionado 50 µL/poço da solução One Step-TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) (Scienco). As placas foram incubadas no escuro por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 1 N. A absorbância a 450 nm, com 630 nm como referência, utilizando um leitor de placas Multiskan MS (Labsystems).

Para estabelecer o ponto de corte, foi determinada a média das absorbâncias dos soros pré-imunização e três vezes o desvio padrão. O IA foi calculado como o valor médio da absorbância da amostra tratada com KSCN dividido pelo valor médio da absorbância das amostras não tratadas, multiplicado por 100%. O seguinte critério foi utilizado para determinar a avides: avides alta acima de 50%, avides intermediária entre 31-49%, e avides baixa para

valores abaixo de 30%. Para os ensaios utilizando amostras de soros humanos, o ponto de corte foi calculado a partir das amostras negativas, e o valor determinado foi utilizado para determinar o índice de ELISA das amostras.

2.8.2. DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES E COMPETIÇÃO POR AFINIDADE AO ACE2

Para avaliar tanto a capacidade de neutralização dos anticorpos anti-RBD e anti-E-RBD-M, quanto a afinidade de ligação das proteínas RBD e E-RBD-M ao ACE2, empregou-se o kit cPASS SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection (GenScript), conforme as instruções do fabricante. Em resumo, foram realizados ensaios em duplicata, diluindo os soros anti-RBD e anti-E-RBD-M em uma diluição de 1:10 no tampão de diluição fornecido pelo kit. Para os ensaios de competição, foram utilizados 12 µg de RBD e E-RBD-M nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128, utilizando o tampão de diluição fornecido pelo kit. As amostras foram então incubadas com RBD conjugado com HRP (HRP-RBD) por 30 minutos a 37°C, visando à neutralização do antígeno pelos anticorpos presentes na amostra.

Após a incubação, 100 uL de cada solução foi transferida para uma placa de captura revestida com ACE2, e a reação foi incubada por 15 minutos a 37°C. Dado esse tempo, a placa foi lavada quatro vezes com o tampão fornecido pelo kit, para a remoção dos complexos gerados pela neutralização, de modo que ficasse aderido a placa apenas RBD-HRP não ligadas a anticorpos. E, no caso das proteínas recombinantes, que ficasse aderido apenas à proteína que foi ligada ao ACE2. Em seguida, foi adicionado 100 uL de TMB como substrato, incubado por 15 minutos e para interromper a reação foi adicionado 50 uL da solução de parada. A leitura da placa foi realizada em 450 nm utilizando leitor de Microplacas AccuSkan GO (Thermo Scientific). Para a interpretação dos resultados à taxa de inibição foi calculada utilizando a equação 1.

$$\left(1 - \frac{\text{Valor da OD da amostra}}{\text{Valor da OD do controle negativo}}\right) \times 100\%$$

(1)

O ponto de corte utilizado para indicar a presença de anticorpos neutralizantes foi definido como igual ou superior a 20%, conforme recomendado pelo kit. Resultados inferiores a 20% foram considerados negativos para a presença de anticorpos neutralizantes. Os mesmos

parâmetros e cálculos de taxa de inibição foram empregados para determinar a afinidade das proteínas recombinantes na competição com o HRP-RBD pelo ACE2.

2.8.3. REESTIMULO *IN VITRO* DOS ESPLÊNOCITOS

Os esplenócitos de camundongos foram isolados por maceração do baço através de um filtro, seguido de tratamento em solução salina balanceada de Hanks (HBSS) para lise de eritrócitos. O número de células foi ajustado para 20×10^6 células/poço e então estimulado com 5 $\mu\text{g/mL}$ de RBD e E-RBD-M. Como controle positivo foi utilizado a concanavalina A (Sigma, 5 $\mu\text{g/mL}$). Após 48 horas da estimulação, os sobrenadantes foram coletados para determinação dos níveis IFN- γ por ELISA, enquanto as células foram colocadas em TRIzol para extração do RNA total.

2.8.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS POR PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

A extração do RNA total foi realizada a partir dos esplenócitos previamente estimulados com as proteínas no qual cada animal foi imunizado, assim como concanavalina A, utilizando o mini kit PureLink RNA (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, foi realizada a transcriptase reversa para obtenção do cDNA empregando o kit GoScript Reverse Transcription System (Promega), conforme as instruções do fabricante.

Após a obtenção do cDNA referente a cada cultura, foi realizado qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*), para analisar a resposta celular através da quantificação relativa da expressão gênica de citocinas. Para isso o experimento foi realizado em triplicatas o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega), utilizando primers específicos. A expressão gênica relativa foi normalizada em relação à expressão endógena do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) em cada controle basal representativo.

O protocolo de RT-qPCR foi realizado no termociclador de PCR em tempo real ABI 7500 Fast (Applied Biosystems), e os ciclos utilizados na reação seguiram os seguintes parâmetros: 95 °C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C de desnaturação por 15 segundos, 60°C de hibridização por 1 minuto, 72°C por 2:30 minutos de extensão e 72 °C por 7 minutos finais. A fluorescência foi registrada durante as etapas de alongamento em cada

ciclo. Para a interpretação dos resultados, foi considerada a quantificação relativa de um gene alvo em relação ao gene de referência, calculado utilizando a equação 2.

$$RQ = \frac{\text{Eficiência do alvo } \Delta Ct}{\text{Eficiência da referência } \Delta Ct} \quad (2)$$

2.8.5. MEDIÇÕES DE IFN- γ

Para determinar a concentração de citocinas nos sobrenadantes dos esplenócitos de camundongos estimulados, foi utilizado o kit IFN- γ ELISA Ready-SET-Go (eBioscience, Inc) para a dosagem de IFN- γ . Os experimentos foram conduzidos de acordo com as instruções dos fabricantes.

Resumidamente, as placas foram revestidas com o anticorpo de captura (Anti-Mouse IFN- γ) diluído em solução diluente fornecida pelos kits e incubadas a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes com PBST 0,05% e, em seguida, incubadas com 200 uL da solução de bloqueio fornecida pelo kit por 1 hora a 25°C. As placas foram novamente lavadas e incubadas com 100 uL de amostra de sobrenadantes por 2 horas a 25°C, seguidas de nova lavagem.

Em seguida, foi adicionado 100 uL de anticorpo de detecção diluído na solução fornecida pelo kit e incubado por 1 hora a 25°C. Após outra lavagem, 100 uL da diluição de Avidina-HRP foram adicionados a cada poço e incubados por 30 minutos. Por fim, as placas foram lavadas cinco vezes e, em seguida, adicionados 100 uL de TMB a cada poço, com incubação de 15 minutos na ausência de luz. Para interromper a reação, foram adicionados 50 uL de solução de parada. A leitura das placas foi realizada em 450 e 520 nm, e a concentração de cada citocina foi determinada através da média das duplicatas e foram calculadas pela equação gerada pela curva padrão do kit.

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ANÁLISES *IN SILICO*

3.1.1 MONITORAMENTO DAS VARIANTES DE PREOCUPAÇÃO

Durante o desenvolvimento deste trabalho, muitas variantes surgiram carregando novas mutações, particularmente no domínio RBD da proteína spike, juntamente com algumas mutações adicionais em outras partes do genoma do vírus (LAM, *et al.*, 2022). O surgimento dessas mutações causou certa preocupação, devido ao seu potencial impacto na construção das fusões. Os alinhamentos realizados entre o genoma de referência das proteínas estruturais utilizados na construção das fusões, e as principais VOCs circulantes evidenciou as mutações que afetaram a sequência de referência nos últimos anos, como mostrado na figura 11.

Alinhamento RBD

Alinhamento de múltiplas sequências CLUSTAL O(1.2.4)

```

Reference      PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLYNSSASFSTFKCYGVSPTKLND 60
R_Alpha_(B.1.1.7) PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLYNSSASFSTFKCYGVSPTKLND 60
R_Beta_(B.1.351) PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLYNSSASFSTFKCYGVSPTKLND 60
R_Delta_(B.1.617.2) PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLYNSSASFSTFKCYGVSPTKLND 60
R_Gama_(B.1.1.28.1) PNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLYNSSASFSTFKCYGVSPTKLND 60
R_Omicron_(BA.5) PNITNLCPFDEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLYNSFAFFFAFKCYGVSPTKLND 60
*****:***** * * :***** *****

Reference      LCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGVIAWNSNNLDSKVGNY 120
R_Alpha_(B.1.1.7) LCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGVIAWNSNNLDSKVGNY 120
R_Beta_(B.1.351) LCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGNIADYNYKLPDDFTGVIAWNSNNLDSKVGNY 120
R_Delta_(B.1.617.2) LCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGVIAWNSNNLDSKVGNY 120
R_Gama_(B.1.1.28.1) LCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGTIADYNYKLPDDFTGVIAWNSNNLDSKVGNY 120
R_Omicron_(BA.5) LCFTNVYADSFVIRGNEVSQIAPGQTGNIADYNYKLPDDFTGVIAWNSNLDSKVGNY 120
*****:* *****:***** *****:*****

Reference      NYLYRFLFRKSNLKPFFERDI STEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYR 180
R_Alpha_(B.1.1.7) NYLYRFLFRKSNLKPFFERDI STEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYR 180
R_Beta_(B.1.351) NYLYRFLFRKSNLKPFFERDI STEIYQAGSTPCNGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYR 180
R_Delta_(B.1.617.2) NYLYRFLFRKSNLKPFFERDI STEIYQAGSKPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYR 180
R_Gama_(B.1.1.28.1) NYLYRFLFRKSNLKPFFERDI STEIYQAGSTPCNGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYR 180
R_Omicron_(BA.5) NYRYRFLFRKSNLKPFFERDI STEIYQAGNKPCNGVAGVNCYFPLQSYGFRPTYGVGHQPYR 180
*****:***** .***** * .*****:*****

Reference      VVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDI 240
R_Alpha_(B.1.1.7) VVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDI 240
R_Beta_(B.1.351) VVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDI 240
R_Delta_(B.1.617.2) VVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNENGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDI 240
R_Gama_(B.1.1.28.1) VVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNENGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDI 240
R_Omicron_(BA.5) VVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNENGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDI 240
*****:*****

Reference      ADTTDAVRDPQTLE 254
R_Alpha_(B.1.1.7) DDTTDAVRDPQTLE 254
R_Beta_(B.1.351) ADTTDAVRDPQTLE 254
R_Delta_(B.1.617.2) ADTTDAVRDPQTLE 254
R_Gama_(B.1.1.28.1) ADTTDAVRDPQTLE 254
R_Omicron_(BA.5) ADTTDAVRDPQTLE 254

```

Alinhamento Proteína E

Alinhamento de múltiplas seqüências CLUSTAL O(1.2.4)

```

Reference      MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVFLVVTLLAILTALRLCAYCCNIVNVSIVKPSFYVYSRVKLNLSRVPDLLV 75
E_Alpha_(B.1.1.7) MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVFLVVTLLAILTALRLCAYCCNIVNVSIVKPSFYVYSRVKLNLSRVPDLLV 75
E_Beta_(B.1.351)  MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVFLVVTLLAILTALRLCAYCCNIVNVSIVKPSFYVYSRVKLNLSRVPDLLV 75
E_Delta_(B.1.617.2) MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVFLVVTLLAILTALRLCAYCCNIVNVSIVKPSFYVYSRVKLNLSRVPDLLV 75
E_Gama_(B.1.1.28.1) MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVFLVVTLLAILTALRLCAYCCNIVNVSIVKPSFYVYSRVKLNLSRVPDLLV 75
E_Omicron_(BA.5)  MYSFVSEETGTLIVNSVLLFLAFVFLVVTLLAILTALRLCAYCCNIVNVSIVKPSFYVYSRVKLNLSRVPDLLV 75

```

Alinhamento Proteína M

Alinhamento de múltiplas seqüências CLUSTAL O(1.2.4)

```

M_Alpha_(B.1.1.7)  MADSNGTITVEELKLEQWNLVIGFLFLTWCLLQFAYANRRNFLYIIKLI FLWLLWPV 60
M_Beta_(B.1.351)  MADSNGTITVEELKLEQWNLVIGFLFLTWCLLQFAYANRRNFLYIIKLI FLWLLWPV 60
M_Delta_(B.1.617.2) MADSNGTITVEELKLEQWNLVIGFLFLTWCLLQFAYANRRNFLYIIKLI FLWLLWPV 60
M_Gama_(B.1.1.28.1) MADSNGTITVEELKLEQWNLVIGFLFLTWCLLQFAYANRRNFLYIIKLI FLWLLWPV 60
M_Omicron_(BA.5)  MADSNGTITVEELKLEQWNLVIGFLFLTWCLLQFAYANRRNFLYIIKLI FLWLLWPV 60
**:*****
reference          TLACFVLAAYRINWITGGIAIAMAACLVGLMWLSYFIASFRLFARTRSMWSFNPETNILL 120
M_Alpha_(B.1.1.7)  TLACFVLAAYRINWITGGIAIAMAACLVGLMWLSYFIASFRLFARTRSMWSFNPETNILL 120
M_Beta_(B.1.351)  TLACFVLAAYRINWITGGIAIAMAACLVGLMWLSYFIASFRLFARTRSMWSFNPETNILL 120
M_Delta_(B.1.617.2) TLACFVLAAYRINWITGGIAIAMAACLVGLMWLSYFIASFRLFARTRSMWSFNPETNILL 120
M_Gama_(B.1.1.28.1) TLACFVLAAYRINWITGGIAIAMAACLVGLMWLSYFIASFRLFARTRSMWSFNPETNILL 120
M_Omicron_(BA.5)  TLACFVLAAYRINWITGGIAIAMAACLVGLMWLSYFIASFRLFARTRSMWSFNPETNILL 120
**:*****
reference          NVLLHGTILTRP LLESELVIGAVILRGHLRIAGHHLGRCDIKDLPKEITVATSRTL SYY 180
M_Alpha_(B.1.1.7)  NVLLHGTILTRP LLESELVIGAVILRGHLRIAGHHLGRCDIKDLPKEITVATSRTL SYY 180
M_Beta_(B.1.351)  NVLLHGTILTRP LLESELVIGAVILRGHLRIAGHHLGRCDIKDLPKEITVATSRTL SYY 180
M_Delta_(B.1.617.2) NVLLHGTILTRP LLESELVIGAVILRGHLRIAGHHLGRCDIKDLPKEITVATSRTL SYY 180
M_Gama_(B.1.1.28.1) NVLLHGTILTRP LLESELVIGAVILRGHLRIAGHHLGRCDIKDLPKEITVATSRTL SYY 180
M_Omicron_(BA.5)  NVLLHGTILTRP LLESELVIGAVILRGHLRIAGHHLGRCDIKDLPKEITVATSRTL SYY 180
*****
reference          KLGASQRVAGDSGFAAYSRYRIGNYKLN TDHSSSDNIALLVQ 223
M_Alpha_(B.1.1.7)  KLGASQRVAGDSGFAAYSRYRIGNYKLN TDHSSSDNIALLVQ 223
M_Beta_(B.1.351)  KLGASQRVAGDSGFAAYSRYRIGNYKLN TDHSSSDNIALLVQ 223
M_Delta_(B.1.617.2) KLGASQRVAGDSGFAAYSRYRIGNYKLN TDHSSSDNIALLVQ 223
M_Gama_(B.1.1.28.1) KLGASQRVAGDSGFAAYSRYRIGNYKLN TDHSSSDNIALLVQ 223
M_Omicron_(BA.5)  KLGASQRVAGDSGFAAYSRYRIGNYKLN TDHSSSDNIALLVQ 223
*****

```

Figura 11: Alinhamento entre a seqüência referência do RBD e das proteínas E e M com as principais VOCs. Destacado em preto os epitópos referentes a cada seqüência utilizada na construção das fusões. As caixas em preto indicam os resíduos utilizados na construção das fusões. Em azul estão destacadas as mutações.

De acordo com o esperado, a maioria das mutações acometeram o RBD da proteína spike, com frequências diferentes entre as variantes. A Omicron BA.5 e suas outras subvariantes apresentaram duas mutações de substituição na proteína E, sendo uma delas na posição T9I (Treonina - Isoleucina), presente nos fragmentos gênicos que compõem as fusões. O mesmo ocorreu com a proteína M, na qual duas substituições ocorreram na região N-terminal, nas posições D3N (Ácido aspártico - Asparagina) e Q19E (Glutamina - Ácido glutâmico). Apesar de alguns estudos analisarem a frequência das mutações e como isso afeta

a tendência de evolução da patogenicidade do vírus, ainda são escassos os resultados em relação à evasão pela resposta imunológica do hospedeiro. Além disso, as mutações apresentadas pelas proteínas E e M não são comuns nas variantes do SARS-CoV-2.

Em contrapartida, as mutações não afetaram as regiões dos epítomos, tanto o epítipo interno do RBD, como os da proteína E e M, preditos por Waqas *et al.*, (2020), indicando que essas regiões antigênicas podem corresponder a sequências conservadas do genoma viral.

3.1.2. PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DAS FUSÕES

As proteínas de fusão ao RBD se diferem entre si devido aos antígenos que as compõem no N e/ou C-terminal. Devido a isso, as sequências referente a cada fusão foram submetidas à análise da ferramenta Protparam do software ExPASy, para a análise de algumas de suas propriedades bioquímicas. E para realizar a predição da antigenicidade das fusões foi utilizado a plataforma VaxiJen, considerando como provável antígeno valores superiores a 0,4. A tabela 4 contém informações referentes às análises bioquímicas realizadas.

Tabela 4. Propriedades bioquímicas das fusões

	Número de aminoácidos	Massa molecular teórica (kDa)	Ponto isoelétrico (pI)	Coefficiente de extinção ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Índice de instabilidade	Antigenicidade
RBD-E	291	32,5	8,35	42,45	19,82	0,54
RBD-M	305	33,7	8,17	43,82	23,66	0,58
E-RBD-E	311	34,6	7,83	43,32	22,35	0,55
E-RBD	298	33,2	7,32	41,83	22,35	0,51
E-RBD-M	326	35	7,31	45,31	25,80	0,61
M-RBD-M	329	36,4	7,31	43,82	25,18	0,60
M-RBD	301	33,7	7,32	40,84	21,71	0,49
M-RBD-E	315	34,2	7,84	42,45	21,70	0,54

Os parâmetros físico-químicos das proteínas, como composição de aminoácidos, coeficiente de extinção, índice de instabilidade, pI teórico, e peso molecular permitem entender a estabilidade, atividade e natureza das proteínas (GARG, *et al.*, 2016). Esses são

determinados de acordo com o número e composição de aminoácidos. No geral, dependendo da constituição de aminoácidos de cada fusão, elas possuem de 32 a 36 kDa, com pI teórico variando de 7,31 a 8,35. O índice de instabilidade varia entre aproximadamente 19,82 a 25,80, podendo ser considerados estáveis em solução considerando índice inferior a 40 (SAHAY, PIPRODHE, PISE, 2020), e o coeficiente de extinção de 40,84 a 45,31. As fusões também podem ser consideradas como provável antígenos, pois apresentaram boa antigenicidade superior a 0,4.

A predição das estruturas do RBD e das proteínas de fusão foram feitas através do software Colab AlphaFold 2. Esse sistema prevê a estrutura tridimensional da sequência de proteínas com estrutura desconhecida, gerando modelos tão precisos e confiáveis quanto estruturas determinadas experimentalmente (GUPTA, GAUR, SONI, 2022; CRAMER, 2021). A análise da estrutura secundária foi realizada utilizando o software PSIPRED.

A estrutura do RBD que compõem as fusões é composta de 19,6% de alfas-hélice, 44,8% de folhas-beta e 67,2% de coils. A fusão com os fragmentos da proteína E no N-terminal (E-RBD-E; E-RBD; E-RBD-M), inclui uma folha beta no N-terminal dessas proteínas, diferente do RBD sozinho e das outras fusões. Enquanto as proteínas com fusão com fragmentos da proteína M, no N-terminal (M-RBD-M; M-RBD; M-RBD-E), possuem a formação de uma alfa-hélice, resultado da adição dos resíduos M.

As fusões com epítipo E no C-terminal (RBD-E; E-RBD-E; M-RBD-E), promove a formação de uma folha beta, e em sequência região que contém o sítio para TEV protease e a cauda de histidinas, formam uma alfa-hélice. Quanto às fusões com epítipo M no C-terminal (RBD-M; E-RBD-M; M-RBD-M), o primeiro epítipo forma uma folha-beta na estrutura, enquanto o segundo permanece da forma de um coil. Assim, como as fusões com epítipo E, nessas também há a formação de uma alfa-hélice, com um coil nas duas últimas histidinas. A formação dessa alfa hélice, sugere ser resultado das fusões no C-terminal, visto que a estrutura das proteínas, com fusões apenas no N-terminal (E-RBD; M-RBD), assim como o RBD sozinho, não há formação de hélices nesta região.

A figura 12 apresenta os modelos gerados para cada proteína pelo Colab Alphafold 2 destacando as regiões contendo a sequência das fusões ao RBD.

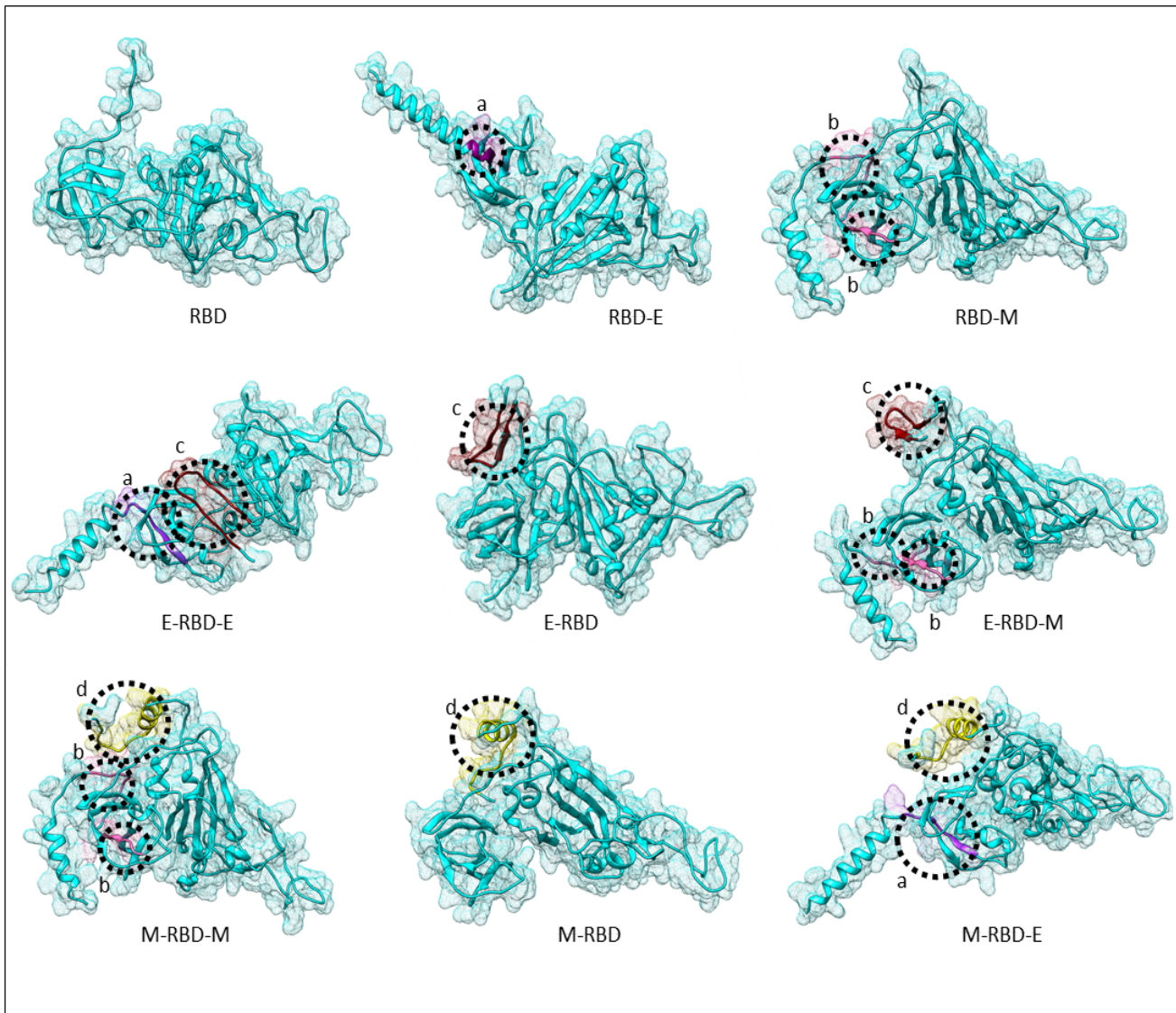


Figura 12. Predição da estrutura tridimensional das fusões com o RBD. As representações gráficas estão apontando na estrutura do RBD em azul: (a) na região C-terminal epítipo da proteína E (em roxo); (b) os dois epítipos da proteína M no C-terminal (em rosa); (c) fragmentos da proteína E no N-terminal (em vermelho); (d) fragmentos da proteína M no N-terminal.

3.2. CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO RECOMBINANTE DAS FUSÕES

3.2.1. AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES

Os primers projetados para amplificar os genes das proteínas de fusão foram eficazes na amplificação dos fragmentos de DNA com os tamanhos esperados a partir do cDNA viral.

Cada fragmento obteve o tamanho previsto, levando em consideração as bases adicionadas pelos primers em cada fusão: RBD (760 pb); RBD-E (836 pb); RBD-M (878 pb); E-RBD-E (899 pb); E-RBD (857 pb); E-RBD-M (942 pb); M-RBD-M (950 pb); M-RBD (866 pb); M-RBD-E (908 pb). Os resultados estão demonstrados pela presença de fragmentos correspondentes no gel de agarose a 1% na figura 13.

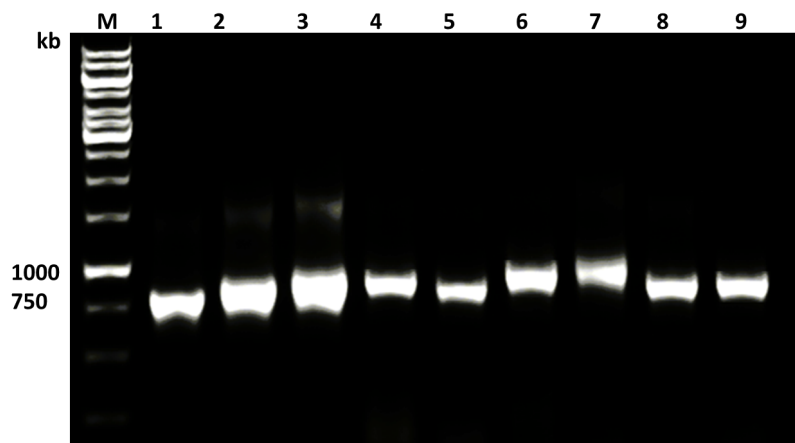


Figura 13. Amplificação dos fragmentos codificantes para fusões RBD. Gel de agarose 1% mostrando em M: Marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific); 1: RBD (760 pb); 2: RBD-E (836 pb); 3: RBD-M (878 pb); 4: E-RBD-E (899 pb); 5: E-RBD (857 pb); 6: E-RBD-M (942 pb); 7: M-RBD-M (950 pb); 8: M-RBD (866 pb); 9: M-RBD-E (908 pb).

Como mostra a figura, além das bandas de amplificação correspondentes às fusões, o gel apresenta bandas espúrias maiores, resultantes de hibridizações inespecíficas dos primers. No entanto, essas bandas não atrapalharam os processos seguintes de clonagem, devido a excisão das bandas de interesse do gel.

3.2.2 CLONAGEM NOS VETORES DE EXPRESSÃO

Para clonagem das regiões codificadoras para a expressão do RBD e suas fusões foi utilizado um sistema de expressão em *E. coli* na linhagem Rosetta (DE3), com o vetor de expressão pET-28a. Essa decisão foi motivada pela rapidez e economia desse sistema quando comparado a expressão em eucariotos. O vetor pET é amplamente reconhecido como uma escolha popular para a expressão de genes heterólogos em *E. coli*, devido ao alto rendimento alcançado sob o controle do promotor T7 lac (GAO *et al.*, 2022). Estudos anteriores também reforçaram a eficácia desse sistema, demonstrando que proteínas de fusão podem ser expressas em níveis elevados em *E. coli* (XU *et al.*, 2021), além disso, já foi confirmado que o RBD da

proteína spike, assim como as fusões relacionadas a ele, podem ser superexpressos com sucesso usando células da linhagem Rosetta (DE3) (MALTONI *et al.*, 2022).

Os oligonucleotídeos iniciadores permitiram a criação de sítios para enzimas de restrição dos fragmentos amplificados. A partir disso, os produtos PCR foram digeridos com as enzimas *NcoI* e *Sall*, criando extremidades coesivas que foram utilizadas em uma reação de ligação ao vetor de expressão pET-28a clivado com as mesmas enzimas. As ligações foram transformadas por choque térmico em células de *E.coli* DH5 α . As sequências de DNA foram confirmadas por restrição, com as mesmas enzimas utilizadas na clonagem (figura 14).

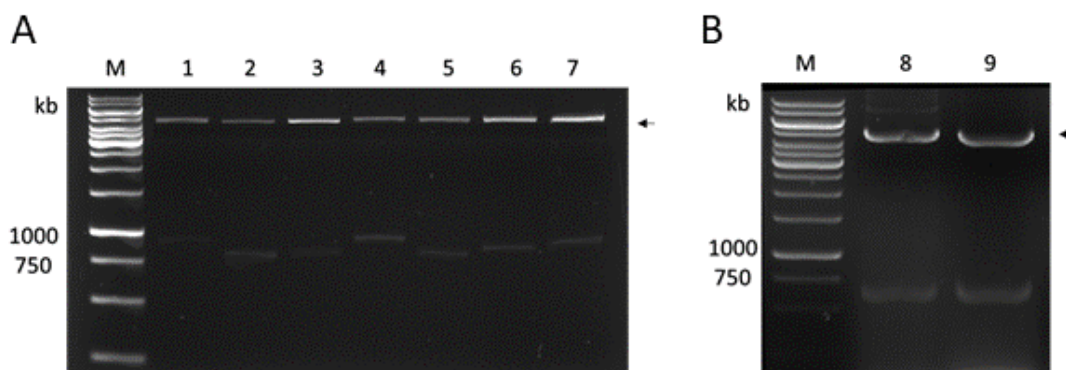


Figura 14. Confirmação da clonagem pela clivagem do plasmídeo pET28a+inserto. Gel de agarose 1% mostrando em M: Marcador molecular GeneRuler (Thermo Scientific); (A) 1: M-RBD-E; 2: RBD-M; 3: M-RBD; 4: M-RBD-M; 5: E-RBD; 6: E-RBD-E; 7: E-RBD-M; 8: (B) RBD; 9: RBD-E. O plasmídeo pET28-a (5369 pb) linearizado está indicado pela seta.

Foram considerados positivos aqueles que apresentaram tamanho esperado para cada sequência após a restrição, e que apresentaram a sequência correta de nucleotídeos pelo sequenciamento Sanger. Um clone de cada fusão foi selecionado para mini preparação plasmidial e, posteriormente, foram transformados por choque térmico em células de *E.coli* Rosetta (DE3), para indução da expressão dos genes das proteínas de fusão.

3.2.3. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DAS FUSÕES RBD

Os plasmídeos recombinantes, contendo o gene das fusões, foram transformados por choque térmico em *E.coli* Rosetta (DE3), e a indução da expressão foi promovida pelo indutor IPTG. Através das análises de eletroforese SDS-PAGE 12%, foi possível observar o perfil da expressão das proteínas ao longo das horas de indução, assim como a solubilidade dos lisados celulares (figura 15).

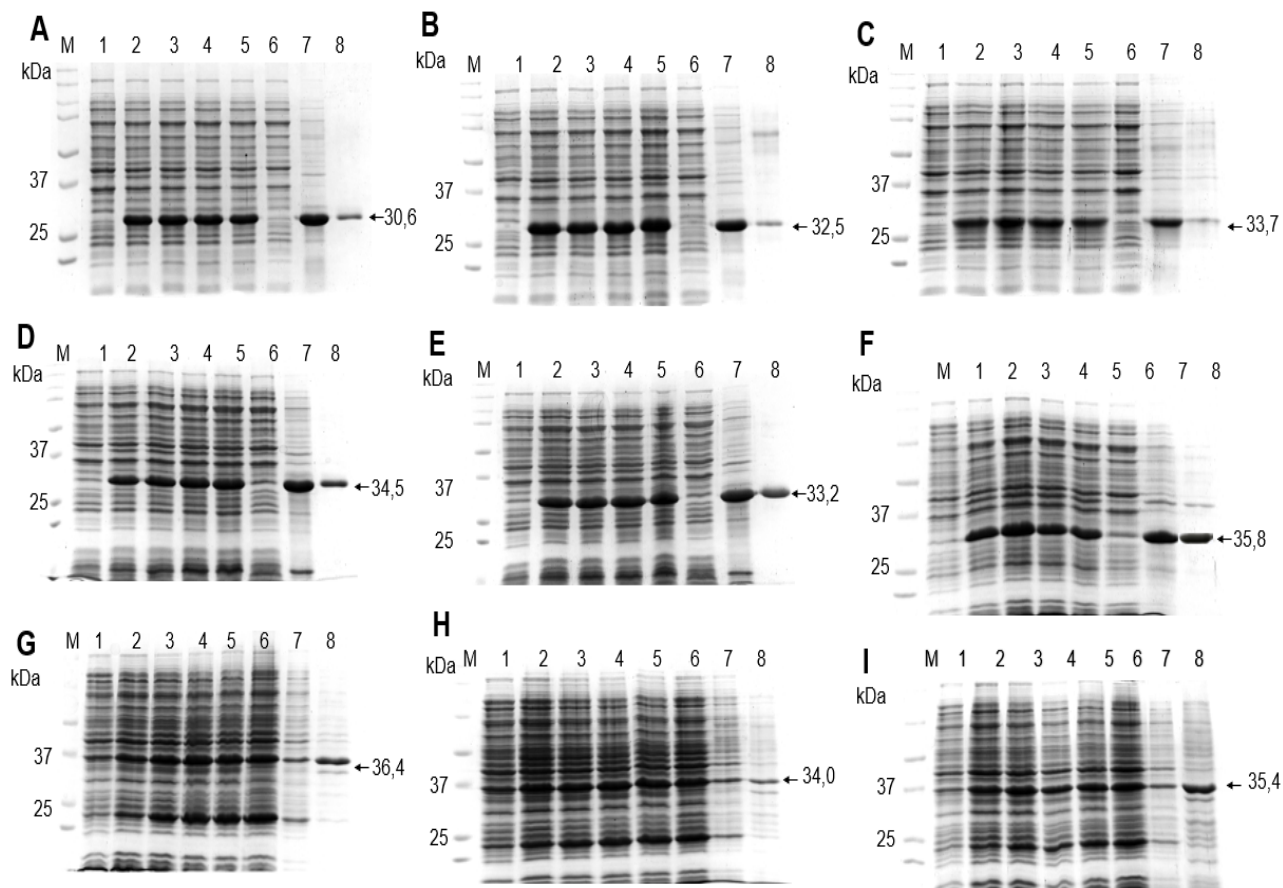


Figura 15. Análise da expressão recombinante do RBD e das fusões. SDS-PAGE 12% mostrando a expressão heteróloga das proteínas em *E.coli*, após 4h de indução com IPTG. M: Prestained Protein (BioRad); amostras coletadas antes da indução (1), após 1 hora (2), 2 horas (3), 3 horas (4), 4 horas (5), das frações solúveis (6) e insolúveis (7) e da solubilização (8). A seta indica a banda referente às proteínas de interesse.

Como apresentado na figura 15, o processo de indução das fusões ao longo de 4 horas, utilizando 0,4 mM de IPTG em 100 mL de cultura, possui perfil de expressão similares; bem expressas na primeira hora de indução, e ausência de aumento significativo nas horas seguintes. Como esperado, na canaleta “não induzido”, antes da adição do indutor IPTG, não houve a expressão das proteínas de interesse. As nove proteínas apresentaram bandas de expressão com tamanhos próximos a massa molecular teórica predita nas análises *in silico*, como mostra a tabela 4.

A solubilidade das proteínas foi observada quanto a separação das frações solúveis e insolúveis, provenientes da lise celular. Todas as proteínas encontraram-se majoritariamente na

fração insolúvel do lisado na forma de corpos de inclusão. A solubilidade das fusões expressas já era prevista, visto que o citoplasma de *E.coli* é um ambiente altamente redutor, e a carga metabólica imposta pela produção recombinante faz com que proteínas superexpressas se agreguem em partículas dobradas incorretamente. Além disso, a sequência de aminoácidos também favorece a formação de corpos de inclusão em proteínas altamente hidrofóbicas, tendo mais chances de se agregar em corpos de inclusão (HUMER, SPADIUT, 2018; SINGH, *et al.*, 2015). A quantidade de aminoácidos, como cisteínas na sequência, também pode favorecer a agregação dessas proteínas. Especificamente o RBD, possui nove resíduos de cisteína, estando assim, suscetível a ambientes redutores, devido a existência de quatro ligações dissulfeto que, por sua vez, podem levar ao dobramento incorreto da proteína e a formação dos corpos de inclusão (TANTIWIWAT, *et al.*, 2022).

3.2.4. SOLUBILIZAÇÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO E PURIFICAÇÃO DO RBD E FUSÕES

Inicialmente, foram feitas tentativas de obter as fusões solúveis utilizando uréia e DTT no tampão de lise para dissolver e desnaturar os corpos de inclusão. Posteriormente as proteínas foram purificadas por coluna de Ni-NTA, e as frações eluídas, foram dialisadas em gradientes decrescentes da uréia. O método de purificação por afinidade ao níquel funcionou bem para as proteínas RBD, RBD-E, E-RBD-E e E-RBD, obtendo grau de pureza satisfatório com tampão de eluição contendo 500 mM de imidazol e 4M de uréia (como mostra a figura 15 indicada pela seta na canaleta 8).

No entanto, as fusões RBD-M, M-RBD, M-RBD-M, M-RBD-E e E-RBD-M mostraram fraca afinidade pela coluna de Ni-NTA. Após a purificação, observou-se que uma grande quantidade dessas proteínas permaneceu retida na coluna e não foi eluída com o tampão de imidazol. Embora a sequência de nucleotídeos estivesse correta, com a cauda de histidina na região C-terminal, essas proteínas não aderiram efetivamente à coluna de afinidade ao níquel, sugerindo a presença de um problema não investigado que afetou sua purificação.

Para lidar com os desafios associados à purificação, optou-se por realizar o aumento do número de lavagens com tampão de lise e sonicação dos corpos de inclusão antes da solubilização, com objetivo remover contaminantes bacterianos. Ressalta-se, que embora o aumento do número de lavagens tenha se mostrado eficaz na obtenção de proteínas solúveis,

essas proteínas não alcançaram o mesmo nível de pureza obtido por cromatografia de Ni-NTA. Além disso, durante o processo de diálise, ocorreu a reagregação das proteínas após a diminuição da concentração de uréia, o que afetou a obtenção das proteínas solúveis por esse método, exigindo a ressuspensão dos agregados em solução antes de sua aplicação.

O cálculo de rendimento das proteínas obtida por litro de cultura de indução, e para determinar a quantidade de proteína utilizada nos ensaios posteriores, foi realizada a quantificação por análise de bandas pelo programa ImageJ, utilizando BSA (*Bovine Serum Albumin*) em concentração conhecida, em SDS-PAGE 12%. O rendimento aproximado obtido para cada proteína consta na tabela 5.

Tabela 5. Rendimento da produção das fusões por litro de cultura

RBD	RBD-E	RBD-M	E-RBD-E	E-RBD	E-RBD-M	M-RBD-M	M-RBD	M-RBD-E
20 mg/mL	15 mg/mL	10 mg/mL	15 mg/mL	15 mg/mL	15 mg/mL	6 mg/mL	6 mg/mL	6 mg/mL

Foram obtidos rendimentos diferentes para cada proteína de fusão. Notavelmente, as proteínas RBD, RBD-E, E-RBD-E, E-RBD e E-RBD-M obtiveram maior rendimento quando comparadas às proteínas RBD-M, M-RBD-M, M-RBD e M-RBD-M. Isso pode decorrer da produtividade particular de cada proteína em *E.coli*, além de outros fatores como a capacidade de retenção da proteína na coluna de Ni-NTA.

3.2. AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DAS FUSÕES

3.2.1 DOT BLOT

Os ensaios de dot blot foram conduzidos para avaliar a imunogenicidade das fusões em soros anti-RBD. Além disso, esses ensaios tiveram como objetivo selecionar a fusão que apresentasse resultados mais promissores para ser utilizada nos esquemas de imunização subsequentes. Para isso, os ensaios foram estabelecidos utilizando as oito proteínas de fusão e o RBD expressos em *E. coli*. As fusões foram utilizadas como antígeno para a detecção de IgG anti-RBD nos soros de coelhos imunizados com vacina de DNA-RBD, bem como em um conjunto de soros humanos confirmados como positivos para infecção por SARS-CoV-2 durante a primeira onda da pandemia. As amostras de soros utilizadas foram previamente

caracterizadas e validadas por ELISA, e continham uma alta titulação de IgG anti-RBD. Para comparar a reatividade das proteínas expressas em *E.coli*, utilizou-se o RBD expresso em células HEK 293 como controle. E, como controle negativo na reação, foi utilizado BSA. Os ensaios foram realizados em diferentes diluições de soros (1:1.250, 1:2.500, 1:5.000 e 1:10.000) (figura 16).

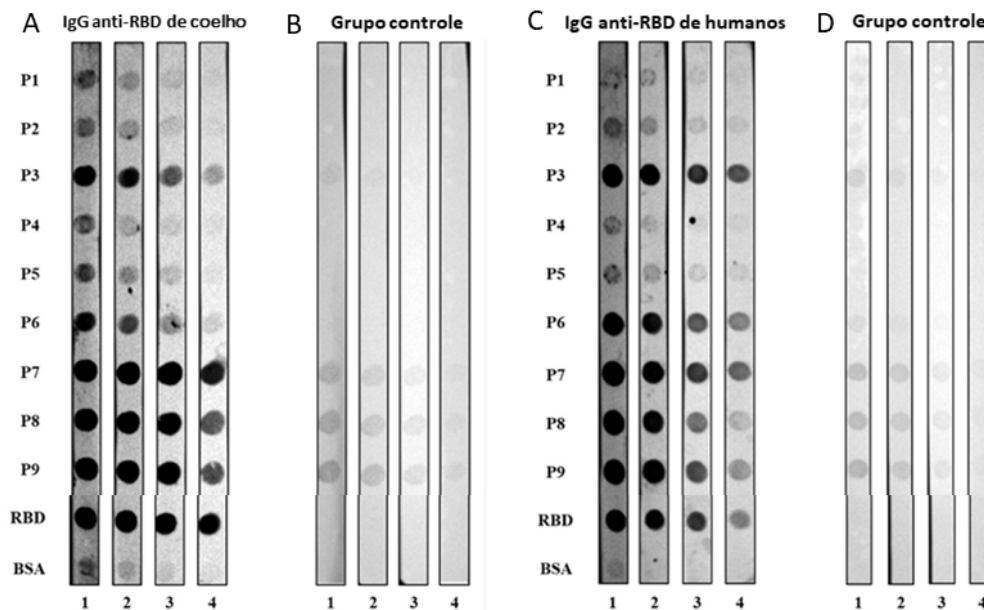


Figura 16. Reatividade de anticorpos séricos contra RBD e fusões expressas em *E.coli* por ensaios de dot blot. (A) Reatividade de proteínas com soro IgG Anti-RBD de coelhos; (B) Controle negativo de reatividade com soro de animais imunizados com PBS; (C) Reatividade das proteínas com soro humano IgG anti-RBD; (D) e controle negativo de reatividade com soro humano negativo para COVID-19. (P1) RBD; (P2) RBD-E; (P3) RBD-M; (P4) E-RBD-E; (P5) E-RBD; (P6) E-RBD-M; (P7) M-RBD-M; (P8) M-RBD; (P9) M-RBD-E. (C+) Células RBD HEK, (C-) BSA. Diluição dos soros, (1) 1:1250, (2) 1:2500, (3) 1:5000 e (4) 1:10000.

As análises por dot blot, de forma geral, demonstraram que as fusões foram eficazes na detecção de anti-RBD nos soros testados. Esses resultados preliminares confirmam a imunogenicidade das fusões. É importante ressaltar que observou-se um padrão de reação semelhante das proteínas nos dois tipos de soros utilizados. Isso sugere que a vacina de DNA provavelmente desencadeia uma resposta imunológica semelhante àquela observada em infecções naturais por SARS-CoV-2, ou seja, a apresentação do RBD deve desencadear as mesmas rotas imunológicas.

A maior reatividade para todos os antígenos foi observada na diluição de 1:1.250, e à medida que a diluição aumentou, notou-se que as fusões que apresentaram maior reatividade

foram aquelas que incluíam o RBD fusionados com fragmentos e/ou epítomos da proteína M (P3 - RBD-M; P6 - E-RBD-M; P7 - M-RBD-M; P8 - M-RBD; P9 - M-RBD-E). No soro de coelhos, todas as proteínas contendo fragmentos da proteína M demonstraram forte reatividade. Embora um padrão de reatividade semelhante tenha sido observado em ambos os soros, quando testadas no soro de humanos, as proteínas que apresentaram melhores resultados foram aquelas contendo epítomos da proteína M no C-terminal (P3 - RBD-M; P6 - E-RBD-M; P7 - M-RBD-M). Em relação às outras fusões contendo fragmentos e/ou epítomos da proteína E (P2 - RBD-E; P4 - E-RBD-E; P5 - E-RBD), elas exibiram uma reatividade mais fraca em ambos os soros. Para essas proteínas, é recomendável conduzir novos testes com variação de parâmetros, como concentração dos antígenos e diluições do soro, a fim de otimizar as condições para uma avaliação mais precisa de seu desempenho nos ensaios. Destaca-se que nenhuma das proteínas, incluindo os controles RBD de eucarioto e BSA, demonstrou reatividade no conjunto de soros negativos para COVID-19 (pré-pandemia).

É importante mencionar que, apesar de todas as fusões conterem o RBD, mesmo que desnaturado, houve uma diferença significativa na reatividade contra os soros anti-RBD. As proteínas com o RBD fusionado com fragmentos M apresentou uma reatividade mais elevada em comparação ao RBD não fusionado a outros antígenos, demonstrando um padrão de reação semelhante ao RBD de eucariotos, que também foi utilizado nos ensaios. Sugerindo que existe a possibilidade das fusões com epítomo M aumentar a reatividade do RBD.

Com base nesses resultados, a escolha para prosseguir com o esquema de imunização foi direcionada para uma das quimeras que continham os epítomos da proteína M na região C-terminal do RBD, pois essas apresentaram os resultados preliminares mais promissores. Além disso, considerando as dificuldades relatadas na solubilização, optou-se por selecionar aquela que apresentou o melhor rendimento na expressão. Portanto, a proteína E-RBD-M foi escolhida para dar continuidade às etapas de solubilização e ao desenvolvimento dos esquemas de imunização.

3.3. SOLUBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS EXPRESSAS

3.3.1. SOLUBILIZAÇÃO EM ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Apesar do rendimento satisfatório obtido pela solubilização com ureia, devido aos problemas relatados em relação a esse método, optou-se por explorar uma alternativa na solubilização das proteínas utilizadas no esquema de imunização de animais. Esta alternativa envolveu o uso de alta pressão hidrostática e pH alcalino.

A solubilização em alta pressão hidrostática é um método eficaz em obter corpos de inclusão solúveis, pois, ela solubiliza agregados de proteínas enfraquecendo as ligações hidrofóbicas e iônicas. E, para alcançar uma solubilização sem desnaturação total da proteína o método é realizado em pH alcalino promovendo a solubilização por repulsão eletrostática (KACHHAWAHA, *et al.*, 2023). Essa metodologia vem sendo empregada em alguns estudos para solubilização de proteínas estruturais do SARS-CoV-2, como no trabalho de Chura-Chambi, *et al.*, (2022), no qual foi realizada a solubilização da proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 a partir de corpos de inclusão, em alta pressão hidrostática a 2,4 kbar e pH 9. A proteína foi obtida em um alto grau de pureza e se apresentou adequada como antígeno para testes *in vitro* na determinação de anticorpos anti-SARS-CoV-2.

O RBD e E-RBD-M foram solubilizados utilizando a associação da alta pressão hidrostática e pH alcalino. Para isso os corpos de inclusão foram ressuspensos em tampão Caps 50 mM na presença de 1 mM EDTA, em duas condições com 0,5 M de arginina e sem a presença do mesmo aminoácido, a fim de verificar se a solubilidade da proteína seria mantida nas duas condições. Desta forma, inicialmente, foram conduzidas testes de solubilidades em diferentes faixas de pH, para isso os corpos de inclusão foram ressuspensos em Caps 50 mM em pH 10, 10,5, 11 e 11,5 com o intuito de estabelecer o pH para a solubilização das proteínas. A solubilidade das proteínas foram confirmadas por SDS-PAGE 12% utilizando amostras dos sobrenadantes.

De acordo com a análise realizada, a solubilidade das proteínas aumentaram concomitantemente com o aumento do pH, e o RBD e E-RBD-M foram solubilizados com maior eficiência em pH 11,0 e 11,5. E essas condições de alcalinidade foram escolhidas para a solubilização das proteínas. Foi obtido 1,23 mg/mL e 4,74 mg/mL dos corpos de inclusão de RBD e E-RBD-M respectivamente, e após a solubilização foi obtido um rendimento final de

0,93 mg/mL e 1,24 mg/mL das duas proteínas em relação à quantidade nos corpos de inclusão, conforme determinado por SDS-PAGE e por medições de absorvância a 280 nm. O RBD e E-RBD-M após a solubilização foram obtidos com uma pureza de aproximadamente 91% e 80%, respectivamente, conforme determinado por análise de bandas em SDS-PAGE utilizando o programa ImageJ (figura 17).

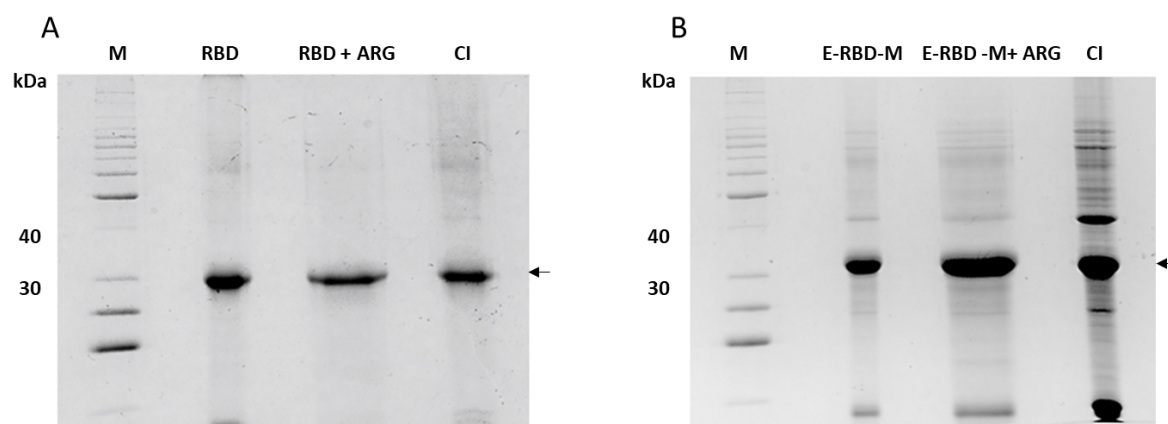


Figura 17. Lavagem dos corpos de inclusão e solubilização em alta pressão e pH alcalino. SDS-PAGE 12% mostrando os tratamentos realizados para a solubilização dos corpos de inclusão. M: BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific); (A) RBD solubilizado sem arginina; RBD solubilizado com a adição de 0,5 M de arginina; Corpos de inclusão (CI), após as lavagens para remoção dos contaminantes. E-RBD-M solubilizado sem arginina; E-RBD-M solubilizado com a adição de 0,5 M de arginina; corpos de inclusão (CI), após as lavagens para remoção dos contaminantes. As setas indicam a banda de interesse.

Após a descompressão não foi observado reagregação e precipitação das proteínas em ambos os tratamentos com e sem arginina. Devido ao rendimento e a pureza obtida, e também às dificuldades na purificação das fusões como já descritas anteriormente neste trabalho, não foram realizadas etapas de purificação por cromatografia. Também não foi realizada diálise para diminuição do pH, devido às chances de reagregação das proteínas, e o pH foi mantido em onze para o esquema de imunização dos animais. Apesar de não existirem muitos relatos na literatura que utilizam antígenos em pH básico, os resultados deste trabalho demonstraram que as doses utilizadas de suspensão protéica em tampão Caps pH 11,0 não causaram nenhum efeito adverso nos animais imunizados.

3.3.2. CARACTERÍSTICAS CONFORMACIONAIS IDENTIFICADAS POR FLUORESCÊNCIA INTRÍNSECA DO TRIPTOFANO

Os ensaios de fluorescência intrínseca do triptofano, foram realizados para avaliar as características conformacionais como o grau de desdobramento das proteínas geradas pelo processo de solubilização. Para isso, foi utilizado 1 mL de cada proteína utilizando como controle cada qual desnaturada com Guanidina HCl 6 M (GndHCl), submetidas a excitação em 280 e 295 nm, nas janelas de emissão e excitação em 5 nm e a varredura foi lida de 300 a 400 nm (figura 18).

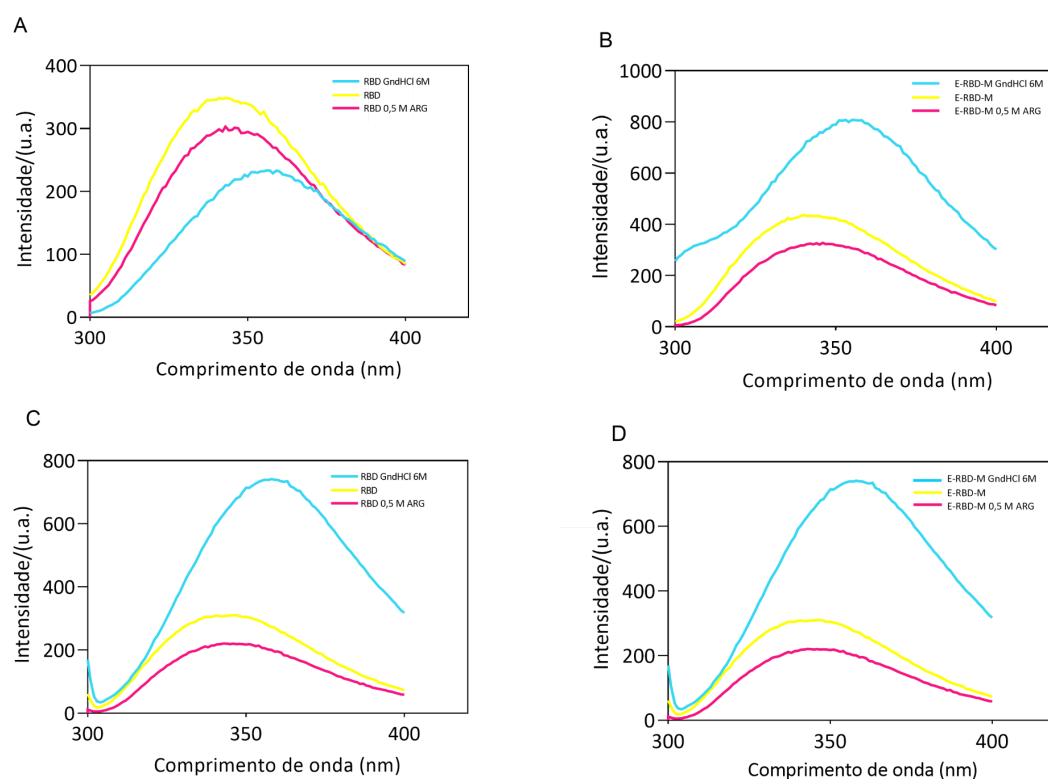


Figura 18. Espectros de fluorescência do RBD e E-RBD-M após solubilização. (A) e (B) Espectros de emissão de fluorescência de triptofano e tirosina em 280 nm, de RBD e E-RBD-M solubilizados com e sem arginina em alta pressão hidrostática e desnaturados com GndHCl 6 M. (C) e (D) espectros de emissão de fluorescência de triptofano em 295 nm, de RBD e E-RBD-M solubilizados com e sem arginina em alta pressão hidrostática e desnaturados com GndHCl 6 M.

A sequência do RBD que constitui as proteínas possuem 3 resíduos de triptofano e 11 resíduos de tirosina. Esses resíduos possuem absorção máxima em 280 nm e quando a proteína é excitada em 295 nm a fluorescência é emitida seletivamente a partir do triptofano

(MUNHOZ, *et al.*, 2022; GARIDEL, *et al.*, 2008). As amostras excitadas em 280 e 295 nm, apresentaram um perfil de emissão muito similar. Com um comprimento de onda máximo (λ_{max}) em 342 e 344 nm para o RBD, e para E-RBD-M, 341 e 344 nm, os resultados indicados são para as amostras solubilizadas sem arginina e tratadas com 0,5 M de arginina, respectivamente. Enquanto as amostras desnaturadas com GndHCl 6 M apresentaram um deslocamento de cerca de 10 nm para região do vermelho em 354 nm em comparação às não tratadas com agentes desnaturantes.

O deslocamento para região do vermelho é característico de desnaturação, as proteínas tratadas com arginina 0,5 M apresentaram um deslocamento maior em relação às que foram solubilizadas sem o inibidor de reagregação. Em ambos os ensaios, as amostras tratadas com arginina apresentaram um λ_{max} maior em cerca de 2 a 3 nm. Isso provavelmente ocorreu devido às características espectrais da fluorescência do triptofano serem altamente sensíveis ao ambiente local que envolve cada resíduo (RUÍZ, GÓMEZ, GARCÍA, 2022). O que sugere que adição de agentes como arginina podem contribuir para alterações significativas no meio que interferem nas propriedades de fluorescência do triptofano.

Os máximos de emissão do triptofano refletem a exposição média dos seus resíduos na conformação da proteína a região hidrofílica, seu espectro de absorção máxima em água é de 345 nm (LAKOWICZ, 2006; RUÍZ, GÓMEZ, GARCÍA, 2022). Os resultados apresentados neste trabalho demonstram uma exposição substancial dos resíduos de triptofano em solução, indicando que RBD e E-RBD-M na presença de arginina apresentam maior grau de desnaturação, enquanto as mesmas proteínas solubilizadas sem o uso de arginina os resíduos de triptofano devem estar pelo menos parcialmente retidos no núcleo hidrofóbico. Apesar desses resultados obtidos pelos espectros de fluorescência, não é possível obter informações sobre estrutura nativa, visto que não foram realizadas as etapas de redobramento para a formação adequada de ligações dissulfeto.

3.4. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR

3.4.1. DETECÇÃO DE IgG E AVALIAÇÃO DA AVIDEZ

Após a conclusão do esquema de imunização, foram realizados ensaios de ELISA com o objetivo de detectar a presença de IgG anti-RBD e anti-E-RBD-M, bem como avaliar a imunorreatividade e a afinidade dos soros de cada camundongo dos grupos pós-imunização. Além disso, buscou-se verificar o potencial das fusões para aplicações em imunodiagnóstico. Deste modo, foram utilizadas as proteínas RBD, E-RBD-M de procarioto e o RBD expresso em células HEK como antígenos de revestimento. A leitura da placa foi realizada na absorbância a 450 e 630 nm, e o IA foi calculado dividindo o valor médio da absorbância da amostra tratada com KSCN pelo valor médio da absorbância das amostras não tratadas e, em seguida, multiplicado por 100%. A figura 19 representa graficamente os índices de avides calculados para os soros de cada um dos animais dos grupos imunizados com RBD e E-RBD-M após 21 dias da segunda imunização.

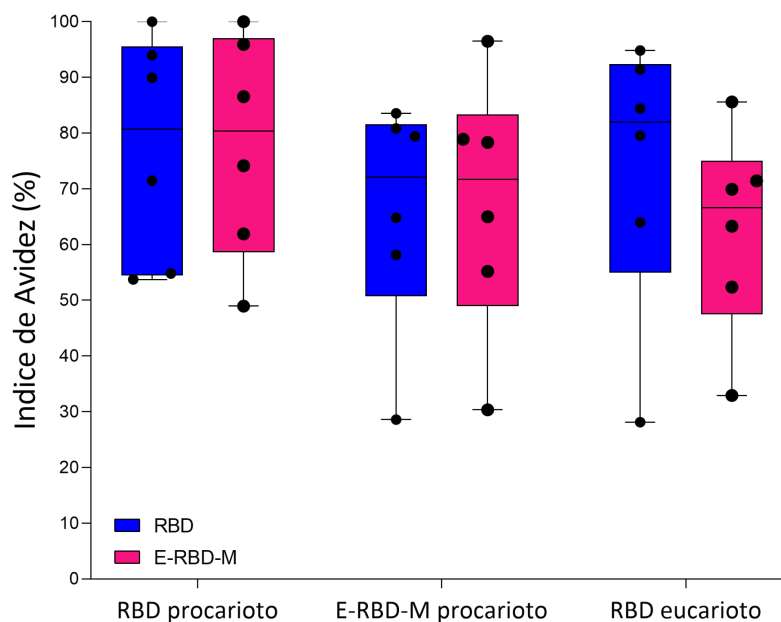


Figura 19. Índice de avides dos soros anti-RBD e anti-E-RBD-M. Avaliação da imunorreatividade de anti-RBD e anti-E-RBD-M e avides contra RBD expresso em *E.coli* como proteína de revestimento; anti-RBD e anti-E-RBD-M e avides contra E-RBD-M expresso em *E.coli* como proteína de revestimento; anti-RBD e anti-E-RBD-M e avides contra RBD expresso em células HEK como proteína de revestimento.

Optou-se por realizar as análises sorológicas individualmente para cada animal imunizado, a fim de avaliar o quão específica foi a resposta imune contra as proteínas recombinantes. Nos primeiros 21 dias após a primeira imunização não foram observados produção significativa de IgG total, aumentando após 42 dias após a primeira imunização, e com duas doses administradas. Os soros anti-RBD e anti-E-RBD-M apresentaram reatividade contra os três antígenos de revestimento testados. No entanto, em todos os testes, foi demonstrado um padrão heterogêneo de reação. Em média, os índices de avidéz calculados para cada grupo foram de 80,71% e 80,36% para RBD e E-RBD-M, respectivamente, quando testados contra o RBD expresso em *E. coli*. Para E-RBD-M como antígeno, 72,14% e 71,68% para RBD e E-RBD-M, respectivamente. Já para o RBD de eucarioto, foram 81,98% e 66,60% para RBD e E-RBD-M, respectivamente. Em todos grupos pelo menos três animais apresentaram avidéz acima da média e três abaixo. Em geral, a maioria dos soros testados, apresentaram uma alta avidéz (>50%), apenas dois animais apresentaram uma baixa avidéz (<30%). Estes resultados demonstram que tanto o RBD recombinante quanto E-RBD-M associada ao CFA são imunogênicos, induzindo altos níveis de anticorpos nos soros dos camundongos imunizados.

Quanto ao padrão heterogêneo observado, ele pode ser atribuído a diversos fatores, tornando difícil determinar a causa da variação na resposta individual de cada animal à imunização. Alguns estudos referem-se à resposta heterogênea diretamente relacionada à composição química do antígeno proteico, bem como à sua via de administração, que direciona a reação imunológica para padrões preferenciais de mudança de IgG (VIDARSSON, DEKKERS, RISPEN, 2014). Sabendo disso, futuramente seria interessante realizar a caracterização da resposta no soro dos animais imunizados, conduzindo uma análise das subclasses de IgG para verificar os subtipos de IgG que a imunização desencadeia, a partir do que foi observado na análise de IgG total em cada animal dos grupos imunizados.

Para avaliar o potencial uso da fusão no imunodiagnóstico, foram conduzidos ensaios de ELISA utilizando RBD e E-RBD-M, assim como RBD expressos em células HEK como antígenos de revestimento para detectar IgG em amostras de soros humanos. Para isso, foram realizados dois ELISAs independentes, analisando um total de 64 amostras de soros, compostas por 12 amostras coletadas na primeira onda da pandemia de pacientes positivos para SARS-CoV-2 internados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (pré-vacinação), 44

amostras de soro de pacientes vacinados, e 12 amostras de soro negativas do Instituto Adolfo Lutz, coletadas antes de 2019. Para as análises foi obtida a média dos dois ensaios de cada proteína, e o desempenho foi determinado por meio da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). A curva foi construída com base em dados quantitativos considerando as taxas de sensibilidade (fração de verdadeiros positivos) e especificidade (fração de falsos positivos). A figura 20 ilustra o Índice ELISA (IE) para cada antígeno de revestimento e variação da sensibilidade e especificidade para cada ponto de corte da curva ROC.

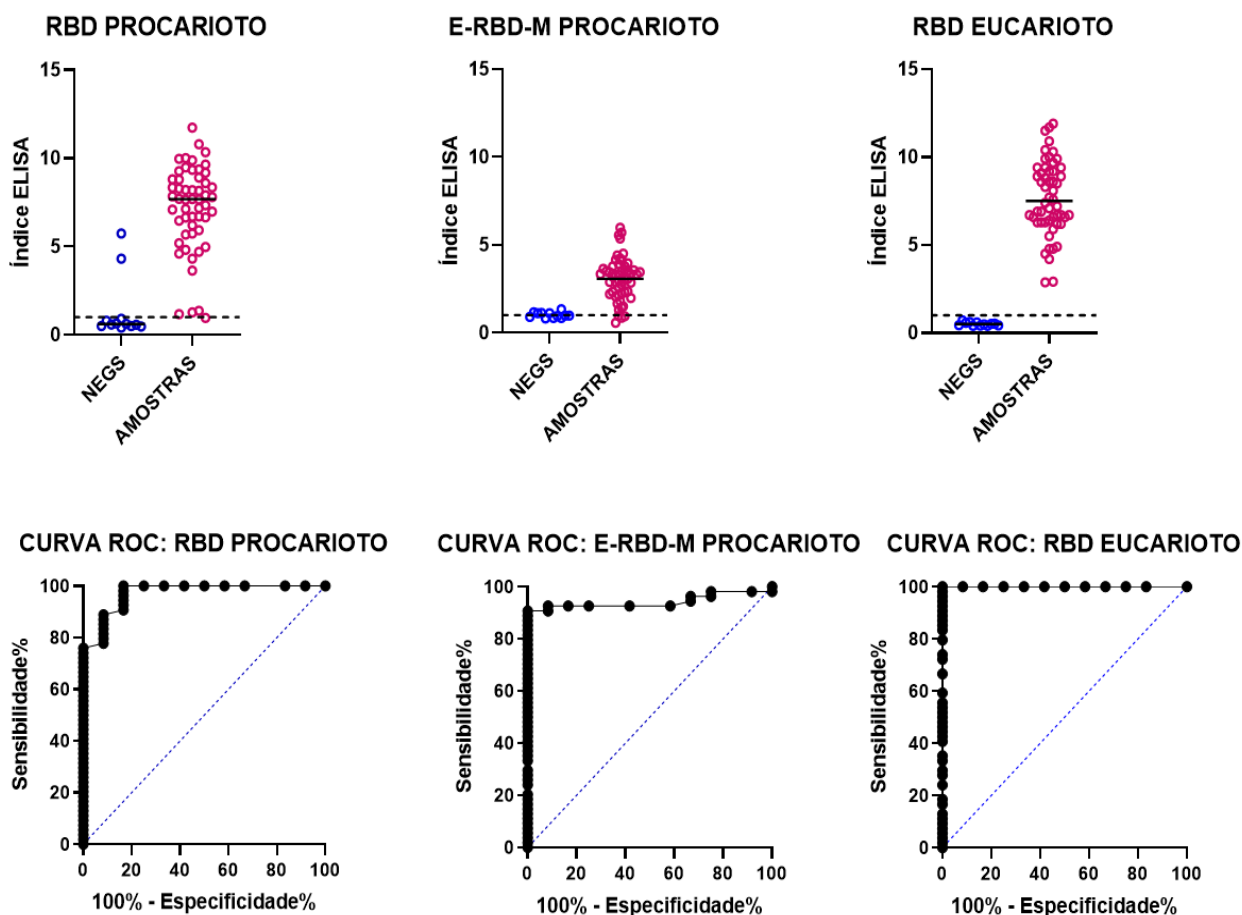


Figura 20. Detecção de IgG no soro de indivíduos com SARS-CoV-2 utilizando RBD e E-RBD-M (procaríoto) em comparação com RBD eucarioto. Os gráficos de pontos mostram valores do índice de ELISA para cada um dos antígenos de detecção; A linha tracejada indica o ponto de indeterminação no valor de corte considerando positivo $IE > 1$. As diferenças estatísticas entre RBD e E-RBD-M. As curvas ROC mostram o desempenho de imunodiagnóstico do RBD e E-RBD-M IgG-ELISA.

O RBD (procarioto) reagiu com 52 das amostras positivas, sendo que 4 delas ficaram na zona de indeterminação na linha de corte. No entanto, houve 2 resultados falso-positivos entre as 12 amostras negativas, resultando em uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 83%. A E-RBD-M reagiu com 50 das amostras positivas, das quais 5 ficaram na zona de indeterminação e 1 apresentou resultado falso-negativo. Em relação às amostras negativas, não ocorreu nenhum falso-positivo; no entanto, todas as amostras ficaram na zona de indeterminação, resultando em uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 50%. Quanto ao RBD (eucarioto), observou-se uma sensibilidade de 100%, com reatividade em todas as 56 amostras testadas. Entre as 12 amostras negativas testadas, não houve resultados falso-positivos, resultando em uma especificidade de 100%.

Os valores da AUC foram notavelmente próximos nos ensaios: 0,97 para o RBD procarioto, 0,95 para E-RBD-M procarioto e 0,99 para RBD eucarioto. Esses resultados sugerem alta precisão e reprodutibilidade dos ensaios, uma vez que o limiar ideal se aproxima de 1, conforme definido na literatura (RÖDER *et al.*, 2023).

O RBD expresso em células eucarióticas apresentou o melhor desempenho em comparação com o RBD e E-RBD-M expressos em procariotos. Esse resultado pode ser atribuído às mudanças na sequência, ao dobramento molecular e às modificações pós-transdução (AYÓN-NÚÑEZ *et al.*, 2022). Além disso, a proteína expressa em células de mamíferos é mais semelhante à proteína encontrada em infecções naturais, tornando-a ideal para fins de imunodiagnóstico.

No entanto, o RBD de procarioto também apresentou resultados satisfatórios, alcançando 100% de sensibilidade e 83% de especificidade. Tornando promissor o uso de sistema procariótico para expressão de antígenos de diagnóstico, visto a facilidade e rapidez na geração de proteínas recombinantes em *E.coli*, que também oferecem uma relação custo-benefício vantajosa em comparação com sistemas eucarióticos (GAO *et al.*, 2022).

No caso do E-RBD-M, seu desempenho inferior pode ser justificado pela falta de informações em relação à sua conformação. Apesar da fusão conter bons epítomos de células B, regiões antigênicas cruciais do RBD podem estar sendo mascaradas pelas fusões. Embora haja relatos na literatura sobre o uso de proteínas quiméricas para o diagnóstico da COVID-19 (FERNANDEZ *et al.*, 2023; GOMES *et al.*, 2021; RAMOS *et al.*, 2023), os resultados deste estudo indicam que a quimera E-RBD-M não é o alvo ideal em termos de especificidade e

sensibilidade quando comparado ao RBD sem fusão associada. Entretanto, pesquisas futuras podem explorar a adequação dessa quimera em outras plataformas de diagnóstico para melhor avaliar seu desempenho.

Em resumo, as proteínas recombinantes de procarioto demonstram ser uma opção interessante devido às vantagens custo-efetivas, incluindo maior produtividade e custos reduzidos em comparação com sistemas eucarióticos (BAGNO *et al.*, 2022). Demonstrando que RBD têm um potencial significativo no contexto do imunodiagnóstico e E-RBD-M, ainda pode ser melhor explorada para sua adequação nesse sistema.

3.4.2. DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES E COMPETIÇÃO POR AFINIDADE AO ACE2

Um ELISA competitivo foi realizado para determinar a atividade inibitória dos soros anti-RBD e anti-E-RBD-M na ligação das placas revestidas com ACE2 a um conjugado RBD-HRP, utilizando o kit cPass™. Para isso os ensaios foram conduzidos em duas etapas: inicialmente, os soros contendo anticorpos anti-RBD e anti-E-RBD-M foram incubados com o RBD recombinante acoplado ao HRP, visando neutralizar o antígeno. Em seguida, a solução foi transferida para uma placa de ELISA com ACE2 imobilizado. Nessa etapa, apenas o RBD que não foi bloqueado pelos anticorpos permaneceu ligado à placa.

Paralelamente, foram realizados ensaios para avaliar a afinidade das proteínas pelo ACE2, seguindo as mesmas etapas mencionadas anteriormente, no final permanecendo ligado a placa apenas a proteína que melhor competiu pelo ACE2. O sinal de densidade óptica foi interpretado, estabelecendo uma correlação inversa com a quantidade de anticorpos neutralizantes presentes, o que refletiu o grau de inibição do processo (HOFMANN *et al.*, 2022). Os resultados referentes à neutralização e competição estão apresentados na figura 21 a e b.

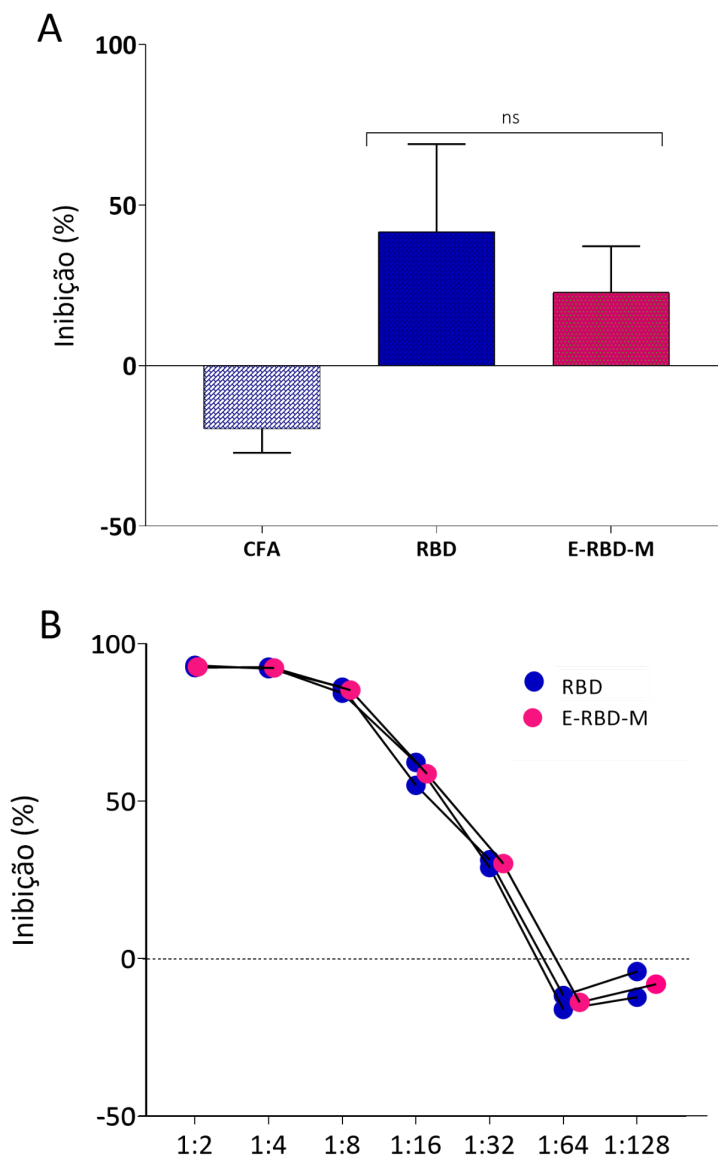


Figura 21. Ensaio de neutralização e competição do RBD com o ACE2. A: Taxa de inibição de anticorpos neutralizantes $\geq 20\%$ para anti-RBD e anti-E-RBD-M no título de 1:10, controle soro dos animais imunizados com CFA; B: taxa de inibição medida pela competição de RBD e E-RBD-M com RBD-HRP pelo ACE-2, nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128. As diferenças estatísticas foram verificadas através do teste t não pareado sendo considerados estatisticamente significativo $p < 0,05$. ns (não significativo).

Nos ensaios realizados, foi observado uma inibição de $\geq 20\%$ no título de 1:10 para a maioria das amostras anti-RBD e anti-E-RBD-M testadas (figura 20, a). Entre os 12 soros analisados (seis de cada proteína), foi notado que o soro de um animal imunizado com RBD e três animais imunizados com E-RBD-M não conseguiram gerar anticorpos neutralizantes.

Além disso, também foi considerado um limite de inibição de $\geq 30\%$, que está correlacionado com a capacidade de neutralização do vírus em sua forma ativa. Nesse aspecto, cinco amostras, entre elas 3 anti-RBD e 2 anti-E-RBD-M, apresentaram valores de inibição acima de $\geq 30\%$.

Os ensaios de competição com o ACE2 demonstraram que ambas as proteínas competem de maneira significativa em diluições mais baixas, demonstrando a capacidade de interagir com o ACE2 e inibir a ligação do RBD-HRP (figura 21, b). Isto levanta a hipótese da possibilidade das proteínas ligadas serem estruturalmente ativas que após os processos de solubilização, não houve alterações significativas que possam resultar na perda de possíveis epítomos chave em torno do motivo de ligação com o ACE2 (POLLET, *et al.*, 2021; LIMONTA-FERNÁNDEZ, *et al.*, 2021). Para avaliar possíveis diferenças estatísticas na capacidade de neutralização entre os soros anti-RBD e anti-E-RBD-M, bem como na afinidade de ligação ao receptor ACE2, foi aplicado o teste t não pareado. A análise resultante não revelou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

É importante destacar que o teste cPass utilizado neste trabalho é validado e comercializado e foi desenvolvido com base na cepa D614 do SARS-CoV-2. Este teste mensura a magnitude do bloqueio mediado por anticorpos na interação entre o ACE2 e o RBD do vírus. Sendo considerado um teste tão específico e sensível quanto os ensaios convencionais com o vírus para detecção de anticorpos neutralizantes (GABITZSCH, *et al.*, 2021; YEO, *et al.*, 2022).

Assim, considerando a precisão do teste, apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas entre a capacidade de neutralização promovida pela imunização com RBD e E-RBD-M, a fusão demonstrou ser igualmente imunogênica e capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes nos soros de camundongos imunizados, comparável ao RBD sozinho.

3.4.3. EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS POR PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

Para avaliar a resposta imune celular, após a administração de duas doses de imunização no dia 42, os animais foram eutanasiados. Os esplenócitos de dois animais de cada grupo foram reestimulados com RBD e E-RBD-M. Como controle em cada experimento, foram utilizados esplenócitos não estimulados e esplenócitos estimulados com concanavalina

A (ConA), para analisar a expressão gênica de mRNA e a produção de citocinas, incluindo o IFN- γ e o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) por qPCR. Os resultados podem ser visualizados na Figura 22.

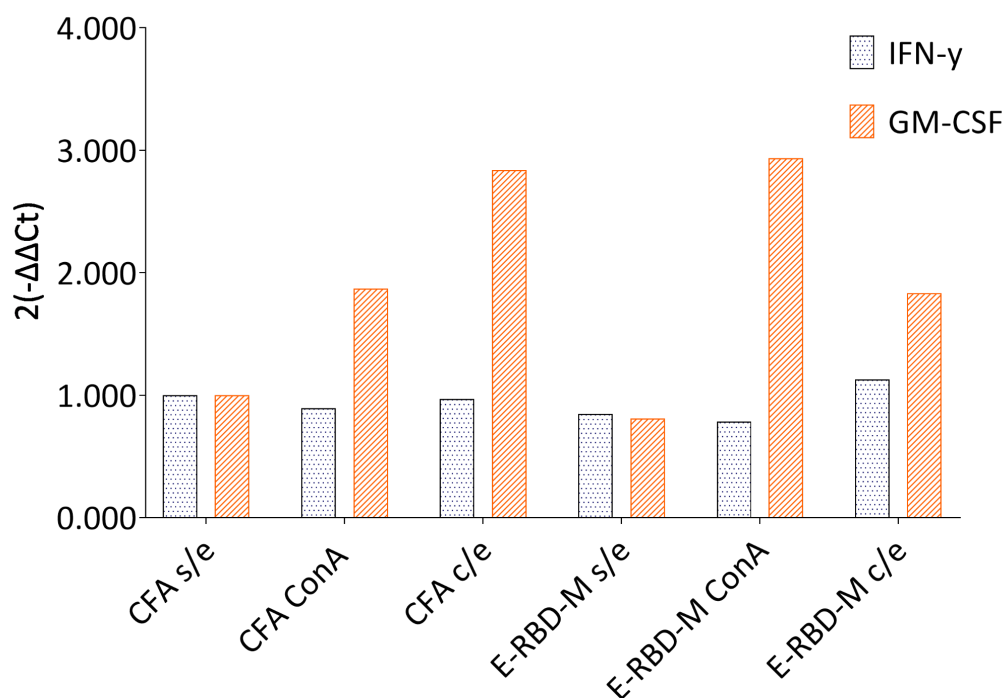


Figura 22. Perfis de expressão de citocinas de esplenócitos de camundongos BALB/c estimuladas com as proteínas RBD e E-RBD-M *in vitro*. O gráfico de barras está representando o perfil de expressão de mRNA de GM-CSF e IFN- γ para cada grupo de imunização sendo: esplenócitos dos animais imunizados apenas com imunizante sem estímulo (CFA s/e); estimulado com ConA (CFA ConA); estimulado com E-RBD-M (CFA c/e) e esplenócitos dos animais imunizados com E-RBD-M sem estímulo (E-RBD-M s/e); estimulado com ConA (E-RBD-M ConA) e estimulados com E-RBD-M (E-RBD-M c/e). Os dados foram expressos como a alteração de uma expressão gênica alvo em comparação com a expressão gênica de referência de mRNA de GAPDH para cada controle basal representativo.

Os resultados da RT-qPCR revelaram que os níveis de expressão de GM-CSF e IFN- γ foram detectados em todos os grupos. Observou-se uma expressão mais elevada de GM-CSF no grupo tratado com ConA, o que era esperado devido à potente capacidade da ConA em estimular células T por meio de sua ligação às glicoproteínas de superfície (ABU-RISH, *et al.*, 2020). Nos grupos de tratamento estimulados com E-RBD-M, tanto nos esplenócitos de animais imunizados com CFA quanto com a proteína, os níveis de expressão foram comparáveis aos observados na presença de concanavalina A. Quanto à expressão de IFN- γ ,

não foi possível distinguir diferenças significativas entre os grupos de imunização com e sem tratamento, uma vez que todos os grupos demonstraram níveis de expressão semelhantes.

Embora os esplenócitos não estimulados geralmente não apresentem altas concentrações de citocinas, algumas variáveis podem estar relacionadas à detecção significativa destas. Essas variáveis incluem níveis basais de expressão, estresse celular e contaminação, que podem resultar na detecção das citocinas. Além disso, é importante considerar a influência do próprio CFA, um adjuvante altamente potente que contém substâncias micobacterianas. O CFA tem o potencial de impactar a imunidade celular e estimular a resposta Th1, levando à síntese de citocinas, como o IFN- γ (JAVADI *et al.*, 2022). Portanto, os níveis significativos observados nos grupos sem tratamento podem ser atribuídos à resposta imune desencadeada pela própria imunização, tanto nos animais imunizados apenas com CFA quanto nos imunizados com CFA+E-RBD-M.

A expressão de genes de citocinas, geralmente é um indicativo da ativação da imunidade celular, e no caso do GM-CSF demonstrou ser mais elevada nos grupos que receberam tratamento. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na expressão entre os grupos tratados e não tratados. Isso sugere a necessidade de uma investigação mais aprofundada dos níveis detectáveis nos grupos controles para garantir a reprodutibilidade dos experimentos. Em geral, os resultados apresentados sugerem que a imunização com E-RBD-M pode induzir a imunidade celular.

3.4.4. MEDIÇÕES DE IFN- γ

A expressão de IFN- γ confirmada por RT-qPCR foi quantificada utilizando o sobrenadante da cultura de esplenócitos após o reestímulo de cada um dos grupos de imunização através da técnica de ponto absorvente imunológico ligado a enzima (ELISpot). A concentração da D.O 450 nm referente a cada amostra foi calculada através da equação da curva padrão fornecida pelo kit. Os resultados expressos em pg/mL estão apresentados na figura 23.

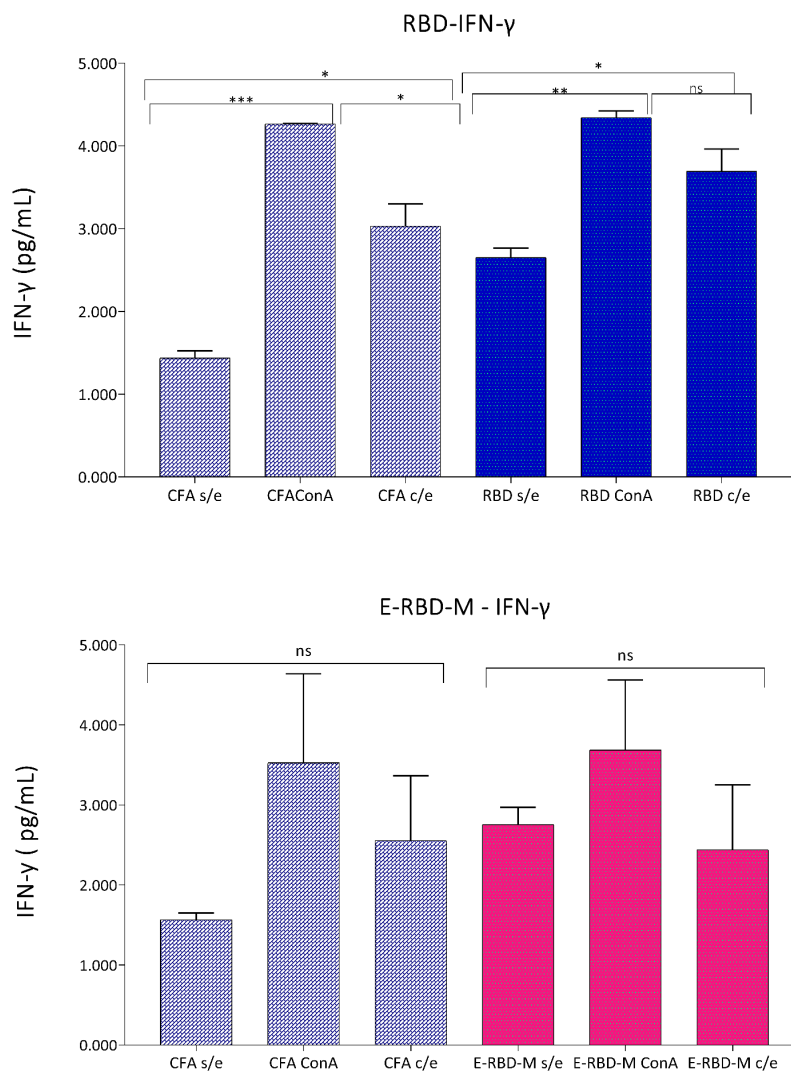


Figura 23. Concentração de IFN- γ . Gráfico de barras representando a concentração de IFN- γ para cada grupo de imunização sendo: Esplenócitos dos animais imunizados apenas com imunizante sem estímulo (CFA s/e); estimulado com ConA (CFA ConA); estimulado com RBD (CFA c/e) e esplenócitos dos animais imunizados com RBD sem estímulo (RBD s/e); estimulado com ConA (RBD ConA) e estimulados com RBD (RBD c/e). Esplenócitos dos animais imunizados apenas com imunizante sem estímulo (CFA s/e); estimulado com ConA (CFA ConA); estimulado com E-RBD-M (CFA c/e) e esplenócitos dos animais imunizados com E-RBD-M sem estímulo (E-RBD-M s/e); estimulado com ConA (E-RBD-M ConA) e estimulados com E-RBD-M (E-RBD-M c/e). Os resultados são apresentados como a média de dois animais por grupo em duplicatas no experimento, e a significância estatística foi determinada por teste t não pareado e testes de comparações múltiplas de Tukey. ns (não significativo); *(p < 0,05); **(p < 0,01); ***(p < 0,001); ****(p < 0,0001).

No caso do RBD, os grupos estimulados com ConA apresentaram concentrações significativamente mais elevadas de IFN- γ em comparação com aqueles tratados com RBD ($p > 0,01$). Além disso, observou-se um aumento significativo na concentração de IFN- γ nos grupos que receberam tratamento com estimulação com RBD em relação aos grupos não estimulados ($p < 0,05$). Por outro lado, no caso do E-RBD-M, altas concentrações também foram observadas nos grupos com e sem tratamento, e não foram observadas diferenças significativas de IFN- γ entre os grupos estimulados e não estimulados.

A estimulação *in vitro* tanto com RBD quanto com E-RBD-M induziu a produção de níveis muito elevados de IFN- γ , sugerindo que os animais imunizados com essas proteínas estão direcionando uma resposta do tipo Th1. Isso está em concordância com o papel bem conhecido do IFN- γ como a principal citocina produzida pelos linfócitos Th1 (CASTRO, *et al.*, 2022), estando de acordo com a literatura visto que células T específicas para antígenos de SARS-CoV-2 exibem um fenótipo de memória central com produção dominante de citocinas do tipo Th1 (TOOR, *et al.*, 2021).

No geral os resultados demonstraram um nível notável de resposta imune celular, como evidenciado pela concentração de IFN- γ , após 42 dias do início do esquema de imunização. Isso sugere a indução de uma resposta imune de longo prazo com o uso das duas proteínas recombinantes, tanto o RBD quanto o E-RBD-M, demonstrando que ambos podem desencadear respostas celulares após a administração. Indicando que E-RBD-M assim como RBD tem o potencial de ser utilizado como um imunógeno vacinal.

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Baseados nos epítomos e fragmentos gênicos das proteínas E e M fusionados no RBD, os primers construídos foram capazes de amplificar as sequências codificantes, a partir do cDNA viral. A expressão das fusões e do RBD, utilizando o vetor pET28-a na cepa de *E.coli* Rosetta (DE3) se mostrou bastante eficiente. Além disso, é um método simples e mais econômico quando comparado à expressão de proteínas em células de mamíferos.

Apesar das proteínas serem expressas de forma insolúvel, a re-solubilização dos corpos de inclusão com ureia demonstrou eficiência em um primeiro momento. Entretanto, a reagregação das proteínas pós diálise e as dificuldades relacionadas ao método de purificação por cromatografia de afinidade, levou a realizar a solubilização dos corpos de inclusão por alta pressão hidrostática. Este método possibilitou a obtenção de quantidades significativas de proteínas, com alto grau de pureza eliminando a necessidade de etapas de purificação.

A imunogenicidade das fusões foram testadas junto ao RBD em um ensaio de dot blot, e todas as fusões foram reconhecidas pelo soro anti-RBD de coelho e pelo pool de soros humanos infectados, em diferentes graus de eficiências, nas quais as proteínas portadoras de epítomos M apresentaram melhores resultados. Além disso, nesse ensaio o RBD expresso no apresentou menor reatividade, demonstrando que as fusões aumentaram o seu reconhecimento pelos anticorpos.

Em sequência para a imunização dos camundongos foi selecionada a fusão que se demonstrou mais promissora no dot blot, (E-RBD-M), junto ao RBD, e sua imunogenicidade foi validada pelos ensaios posteriores de imunidade humoral e celular. Após 42 dias e duas doses de proteínas administradas, o soro dos animais foram coletados e as células do baço reestimuladas com as proteínas.

A imunização gerou a produção de anticorpos de alta avidéz, além disso os soros gerados pela imunização com ambas as proteínas demonstraram a capacidade de gerar anticorpos neutralizantes, comprovada por ensaios de inibição da ligação do RBD com ACE2. Quanto à capacidade de diagnóstico, o RBD e a fusão foram testados em soros de pacientes com COVID-19 e vacinados, bem como em soros negativos para a infecção. A fusão E-RBD-M, embora sensível, mostrou-se menos específica em comparação com o RBD. A resposta imune celular foi avaliada por qPCR e ELISA, revelando a expressão de altas

quantidades IFN- γ após a imunização e reestímulo de esplenócitos, sugerindo uma resposta celular robusta.

Em conclusão, as proteínas expressas em *E. coli* apresentam vantagens custo-efetivas, além de ser um método simples, podendo obter a proteína purificada em poucos dias. O método de solubilização por alta pressão hidrostática, foi capaz de gerar proteínas com alto grau de pureza, eliminando o uso de agentes desnaturantes e etapas de purificação. Portanto, os métodos utilizados neste trabalho foram capazes de produzir antígenos em fusão com o RBD com imunogenicidade comparável ao RBD também expresso neste trabalho, tendo potencial aplicação em plataformas de diagnóstico e imunização.

Até o presente momento, os objetivos de expressão das proteínas, solubilização e validação destas foram alcançados com sucesso. Além dos resultados já gerados por este trabalho a ainda prevê a realização de ensaios para melhor caracterizar as proteínas assim como a resposta imune, e que para isso contará com: i) caracterização biofísica para averiguar a conformação das fusões; ii) caracterizar a resposta imune com ensaios como: subtipo de IgG e citometria de fluxo; iii) solubilização e imunização de animais, e avaliação da imunogenicidade particular com as demais fusões expressas neste trabalho. Entre outros testes que ainda podem ser desenvolvidos pensando no potencial das proteínas de fusão com o RBD.

REFERÊNCIAS

ALANAGREH, Lo'ai; ALZOUGHLOOL, Foad; ATOUM, Manar. The human coronavirus disease COVID-19: its origin, characteristics, and insights into potential drugs and its mechanisms. *Pathogens*, v. 9, n. 5, p. 331, 2020.

AL-JIGHEFEE, Hadeel T. et al. COVID-19 vaccine platforms: Challenges and safety contemplations. *Vaccines*, v. 9, n. 10, p. 1196, 2021.

ARIETA, Christina M. et al. The T-cell-directed vaccine BNT162b4 encoding conserved non-spike antigens protects animals from severe SARS-CoV-2 infection. *Cell*, v. 186, n. 11, p. 2392-2409. e21, 2023.

ASCOLI, Carl A. Could mutations of SARS-CoV-2 suppress diagnostic detection?. *Nature biotechnology*, v. 39, n. 3, p. 274-275, 2021.

AYÓN-NÚÑEZ, Dolores Adriana et al. An RBD-Based Diagnostic Method Useful for the Surveillance of Protective Immunity against SARS-CoV-2 in the Population. *Diagnostics*, v. 12, n. 7, p. 1629, 2022.

AZEVEDO, Patrick O. et al. Differential requirement of neutralizing antibodies and T cells on protective immunity to SARS-CoV-2 variants of concern. *npj Vaccines*, v. 8, n. 1, p. 15, 2023.

BAGGEN, Jim et al. Cellular host factors for SARS-CoV-2 infection. *Nature Microbiology*, v. 6, n. 10, p. 1219-1232, 2021.

BAGNO, Flávia F. et al. Development and validation of an enzyme-linked immunoassay kit for diagnosis and surveillance of COVID-19. *Journal of clinical virology plus*, v. 2, n. 3, p. 100101, 2022.

BAI, Chongzhi; ZHONG, Qiming; GAO, George Fu. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. *Science China Life Sciences*, v. 65, n. 2, p. 280-294, 2022.

BAI, Zhihua et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation. *Viruses*, v. 13, n. 6, p. 1115, 2021.

BLANCO-MELO, Daniel et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell*, v. 181, n. 5, p. 1036-1045. e9, 2020.

CASTRO, Julia T. et al. Promotion of neutralizing antibody-independent immunity to wild-type and SARS-CoV-2 variants of concern using an RBD-Nucleocapsid fusion protein. *Nature Communications*, v. 13, n. 1, p. 4831, 2022.

CELARDO, Ivana et al. The immune system view of the coronavirus SARS-CoV-2. *Biology Direct*, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2020.

CEVIK, Muge et al. COVID-19 vaccines: Keeping pace with SARS-CoV-2 variants. *Cell*, v. 184, n. 20, p. 5077-5081, 2021.

CEVIK, Muge et al. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *bmj*, v. 371, 2020.

CREECH, C. Buddy; WALKER, Shannon C.; SAMUELS, Robert J. SARS-CoV-2 vaccines. *Jama*, v. 325, n. 13, p. 1318-1320, 2021.

CHURA-CHAMBI, Rosa Maria et al. High level SARS-CoV-2 nucleocapsid refolding using mild condition for inclusion bodies solubilization: Application of high pressure at pH 9.0. *PloS One*, v. 17, n. 2, p. e0262591, 2022.

DAI, Lianpan; GAO, George F. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nature Reviews Immunology*, v. 21, n. 2, p. 73-82, 2021.

DIAMOND, Michael S.; KANNEGANTI, Thirumala-Devi. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nature immunology*, v. 23, n. 2, p. 165-176, 2022.

DONG, Yetian et al. A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Signal transduction and targeted therapy*, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2020.

FERNANDES, Queenie et al. Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. *Annals of medicine*, v. 54, n. 1, p. 524-540, 2022.

FERNANDEZ, Zoraida et al. Development and validity assessment of ELISA test with recombinant chimeric protein of SARS-CoV-2. *Journal of Immunological Methods*, v. 519, p. 113489, 2023.

FUMAGALLI, Marcilio Jorge et al. Protective immunity against Gamma and Zeta variants after inactivated SARS-CoV-2 virus immunization. *Viruses*, v. 13, n. 12, p. 2440, 2021.

GABITZSCH, Elizabeth et al. Dual-antigen COVID-19 vaccine subcutaneous prime delivery with oral boosts protects NHP against SARS-CoV-2 challenge. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 729837, 2021.

GARG, Vijay Kumar et al. MFPPi—multi FASTA ProtParam interface. *Bioinformatics*, v. 12, n. 2, p. 74, 2016.

GARIDEL, Patrick et al. Uma avaliação rápida, sensível e econômica da estabilidade conformacional de anticorpos monoclonais por espectroscopia de fluorescência intrínseca de triptofano. *Revista Biotecnologia: Healthcare Nutrition Technology* , v. 9-10, pág. 1201-1211, 2008.

GHAEMI, Amir et al. Recombinant COVID-19 vaccine based on recombinant RBD/Nucleoprotein and saponin adjuvant induces long-lasting neutralizing antibodies and cellular immunity. *Frontiers in Immunology*, v. 13, 2022.

GOMES, Larissa R. et al. Multiepitope proteins for the differential detection of IgG antibodies against RBD of the spike protein and non-RBD regions of SARS-CoV-2. *Vaccines*, v. 9, n. 9, p. 986, 2021.

GORKHALI, Ritesh et al. Structure and function of major SARS-CoV-2 and SARS-CoV proteins. *Bioinformatics and biology insights*, v. 15, p. 11779322211025876, 2021.

GUIRAKHOO, Farshad et al. A Novel SARS-CoV-2 Multitope Protein/Peptide Vaccine Candidate is Highly Immunogenic and Prevents Lung Infection in an AAV hACE2 Mouse Model and non-human primates. *BioRxiv*, p. 2020.11. 30.399154, 2020.

GUPTA, Chhote Lal Prasad; GAUR, Shashank; SONI, Manish Kumar. A Review On Homology And Thread Modelling Of Protein Sequence Using Protein Similarity Search And AlphaFold2 Colab. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, p. 1110-1116, 2022.

HARTENIAN, Ella et al. The molecular virology of coronaviruses. *Journal of Biological Chemistry*, v. 295, n. 37, p. 12910-12934, 2020.

HOFMANN, Natalie et al. Evaluation of a commercial ELISA as alternative to plaque reduction neutralization test to detect neutralizing antibodies against SARS-CoV-2. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 3549, 2022.

HU, Ben et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, n. 3, p. 141-154, 2021.

HUMER, Diana; SPADIUT, Oliver. Desired: More monitoring and control during inclusion body processing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* , v. 34, p. 1-9, 2018.

JAMWAL, Sumit et al. An updated insight into the molecular pathogenesis, secondary complications and potential therapeutics of COVID-19 pandemic. *Life sciences*, v. 257, p. 118105, 2020.

JAVADI, Mahtab Moshref et al. Evaluating the immunogenicity of gold nanoparticles conjugated RBD with Freund's adjuvant as a potential vaccine against SARS-CoV-2. *Microbial Pathogenesis*, v. 170, p. 105687, 2022.

JÖRRIßEN, Philipp et al. Antibody response to SARS-CoV-2 membrane protein in patients of the acute and convalescent phase of COVID-19. *Frontiers in immunology*, v. 12, p. 679841, 2021.

KACHHAWAHA, Kajal et al. Bioprocessing of recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies: insights from structure-function relationship for novel applications. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, p. 1-25, 2022.

KASUGA, Yusuke et al. Innate immune sensing of coronavirus and viral evasion strategies. *Experimental & molecular medicine*, v. 53, n. 5, p. 723-736, 2021.

KEVADIYA, Bhavesh D. et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nature materials*, v. 20, n. 5, p. 593-605, 2021.

KRAMMER, Florian. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*, v. 586, n. 7830, p. 516-527, 2020.

KNOOPS, Kèvin et al. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS biology*, v. 6, n. 9, p. e226, 2008.

KUMAR, Dilip et al. VLP-ELISA for the Detection of IgG Antibodies against Spike, Envelope, and Membrane Antigens of SARS-CoV-2 in Indian Population. *Vaccines*, v. 11, n. 4, p. 743, 2023.

KUNG, Yu-An et al. Molecular virology of SARS-CoV-2 and related coronaviruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 86, n. 2, p. e00026-21, 2022.

LAM, Su Datt et al. Structural and energetic analyses of SARS-CoV-2 N-terminal domain characterise sugar binding pockets and suggest putative impacts of variants on COVID-19 transmission. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 20, p. 6302-6316, 2022.

LAMERS, Mart M.; HAAGMANS, Bart L. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature reviews microbiology*, v. 20, n. 5, p. 270-284, 2022.

LAKOWICZ, JR. *Princípios de espectroscopia de fluorescência*. 3ª edição. Springer Science, 2006.

LIMONTA-FERNÁNDEZ, Miladys et al. An engineered SARS-CoV-2 receptor-binding domain produced in *Pichia pastoris* as a candidate vaccine antigen. *New Biotechnology*, v. 72, p. 11-21, 2022.

LIU, Haolin et al. The basis of a more contagious 501Y. V1 variant of SARS-CoV-2. *Cell Research*, v. 31, n. 6, p. 720-722, 2021.

LIU, Haolin et al. SARS-CoV-2 variants of concern and variants of interest receptor binding domain mutations and virus infectivity. *Frontiers in immunology*, v. 13, p. 50, 2022.

LIU, Hejun; WILSON, Ian A. Protective neutralizing epitopes in SARS-CoV-2. *Immunological Reviews*, v. 310, n. 1, p. 76-92, 2022.

LIU, Liqin et al. A bacterially expressed SARS-CoV-2 receptor binding domain fused with cross-reacting material 197 a-domain elicits high level of neutralizing antibodies in mice. *Frontiers in microbiology*, v. 13, 2022.

LU, Roujian et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The lancet*, v. 395, n. 10224, p. 565-574, 2020.

MACÊDO, Iara. Produção de uma proteína quimérica multiepítipo de SARS-CoV-2 para fins de diagnóstico e imunização. 2022. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2022.

MALIK, Jonaid Ahmad et al. As mutações do SARS-CoV-2 versus eficácia da vacina: Novas oportunidades para novos desafios. *Revista de infecção e saúde pública*, v. 15, n. 2, pág. 228-240, 2022.

MALONE, Brandon et al. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 23, n. 1, p. 21-39, 2022.

MALTONI, Giulia et al. High-yield production in *Escherichia coli* and convenient purification of a candidate vaccine against SARS-CoV-2. *Biotechnology Letters*, v. 44, n. 11, p. 1313-1322, 2022.

MARQUES-PEREIRA, Catarina et al. SARS-CoV-2 membrane protein: from genomic data to structural new insights. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 6, p. 2986, 2022.

MARTIN, Sophie et al. SARS-CoV-2 integral membrane proteins shape the serological responses of patients with COVID-19. *Iscience*, v. 24, n. 10, p. 103185, 2021.

MERAD, Miriam et al. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science*, v. 375, n. 6585, p. 1122-1127, 2022.

MESEL-LEMOINE, Mariana et al. A human coronavirus responsible for the common cold massively kills dendritic cells but not monocytes. *Journal of virology*, v. 86, n. 14, p. 7577-7587, 2012.

MISTRY, Priyal et al. SARS-CoV-2 variants, vaccines, and host immunity. *Frontiers in immunology*, v. 12, p. 5400, 2022.

MORTAZ, Esmail et al. The immune response and immunopathology of COVID-19. *Frontiers in immunology*, v. 11, p. 2037, 2020.

MOURA, Andrew D. et al. Assessment of avidity related to IgG subclasses in SARS-CoV-2 Brazilian infected patients. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 17642, 2021.

MUNHOZ, Danielle D. et al. Recombinant PilS: cloning, expression and biochemical characterization of a Pil-Fimbriae subunit. *Microorganisms*, v. 10, n. 6, p. 1174, 2022.

NAQVI, Ahmad Abu Turab et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1866, n. 10, p. 165878, 2020.

NEXTSTRAIN. Nextstrain Clade. Disponível em: <https://covariants.org/>. Acesso em: 05 fev. 2023.

PLANTE, Jessica A. et al. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature*, v. 592, n. 7852, p. 116-121, 2021.

PENG, Xue-Liang et al. Advances in the design and development of SARS-CoV-2 vaccines. *Military Medical Research*, v. 8, n. 1, p. 1-31, 2021.

POGGIO, Elena et al. Perturbation of the host cell Ca²⁺ homeostasis and ER-mitochondria contact sites by the SARS-CoV-2 structural proteins E and M. *Cell Death & Disease*, v. 14, n. 4, p. 297, 2023.

POLLET, Jeroen et al. SARS-CoV-2 RBD219-N1C1: A yeast-expressed SARS-CoV-2 recombinant receptor-binding domain candidate vaccine stimulates virus neutralizing antibodies and T-cell immunity in mice. *Human vaccines & immunotherapeutics*, v. 17, n. 8, p. 2356-2366, 2021.

QIAO, Shuyuan et al. The spike glycoprotein of highly pathogenic human coronaviruses: structural insights for understanding infection, evolution and inhibition. *FEBS Open bio*, v. 12, n. 9, p. 1602-1622, 2022.

RAMOS, Fernanda F. et al. B-Cell Epitopes-Based Chimeric Protein from SARS-CoV-2 N and S Proteins Is Recognized by Specific Antibodies in Serum and Urine Samples from Patients. *Viruses*, v. 15, n. 9, p. 1877, 2023.

RAHIMI, Azadeh; MIRZAZADEH, Azin; TAVAKOLPOUR, Soheil. Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection. *Genomics*, v. 113, n. 1, p. 1221-1232, 2021.

RAVI, V.; SAXENA, Sonal; PANDA, Pragyan Swagatika. Basic virology of SARS-CoV 2. *Indian journal of medical microbiology*, 2022.

RÖDER, M. et al. Evaluation of an ELISA and four on-farm tests to estimate colostrum quality for dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2023.

REDONDO, Natalia et al. SARS-CoV-2 accessory proteins in viral pathogenesis: knowns and unknowns. *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 708264, 2021.

RUÍZ, Ingrid; GÓMEZ, Jose A.; GARCÍA, Laura. Use of Circular Dichroism in the characterization of the fusion protein SARS-CoV-2 S protein (RBD)-hFc. *Pure and Applied Chemistry*, v. 94, n. 7, p. 829-838, 2022.

SAHAY, Archana; PIPRODHE, Anil; PISE, Mashitha. In silico analysis and homology modeling of strictosidine synthase involved in alkaloid biosynthesis in *catharanthus roseus*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 18, p. 1-6, 2020.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS-MENDOZA, Teresa. The Envelope (E) Protein of SARS-CoV-2 as a Pharmacological Target. *Viruses*, v. 15, n. 4, p. 1000, 2023.

SATARKER, Sairaj; NAMPOOTHIRI, Madhavan. Structural proteins in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2. *Archives of medical research*, v. 51, n. 6, p. 482-491, 2020.

SAWICKI, Stanley G.; SAWICKI, Dorothea L.; SIDDELL, Stuart G. A contemporary view of coronavirus transcription. *Journal of virology*, v. 81, n. 1, p. 20-29, 2007.

SETHURAMAN, Nandini; JEREMIAH, Sundararaj Stanleyraj; RYO, Akihide. Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. *Jama*, v. 323, n. 22, p. 2249-2251, 2020.

SHANMUGARAJ, Balamurugan et al. Immunogenicity and efficacy of recombinant subunit SARS-CoV-2 vaccine candidate in the Syrian hamster model. *Biotechnology Reports*, v. 37, p. e00779, 2023.

SCHENTEN, Dominik; BHATTACHARYA, Deepta. Immunology of SARS-CoV-2 infections and vaccines. *Advances in immunology*, v. 151, p. 49-97, 2021.

SETTE, Alessandro; CROTTY, Shane. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, v. 184, n. 4, p. 861-880, 2021.

SHARMA, Aarjoo et al. COVID-19 Diagnosis: Current and Future Techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 193, p. 1835-1844, 2021.

SINGH, Anupam et al. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial cell factories*, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2015.

SOUSA, Caciane Portela; BRITES, Carlos. Immune response in SARS-CoV-2 infection: the role of interferons type I and type III. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 24, p. 428-433, 2020.

TAHA, Bakr Ahmed et al. Next-generation nanophotonic-enabled biosensors for intelligent diagnosis of SARS-CoV-2 variants. *Science of The Total Environment*, v. 880, p. 163333, 2023.

TAN, Li Yin; KOMARASAMY, Thamil Vaani; RMT BALASUBRAMANIAM, Vinod. Hyperinflammatory immune response and COVID-19: a double edged sword. *Frontiers in immunology*, v. 12, p. 742941, 2021.

TANTIWIWAT, Termsak et al. Utilization of Receptor-Binding Domain of SARS-CoV-2 Spike Protein Expressed in *Escherichia coli* for the Development of Neutralizing Antibody Assay. *Molecular Biotechnology*, p. 1-14, 2022.

TAY, Matthew Zirui et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews Immunology*, v. 20, n. 6, p. 363-374, 2020.

THAKUR, Suresh et al. SARS-CoV-2 mutations and their impact on diagnostics, therapeutics and vaccines. *Frontiers in medicine*, v. 9, 2022.G

THOMAS, Sunil. Towards determining the epitopes of the structural proteins of SARS-CoV-2. *Vaccine Design: Methods and Protocols, Volume 1. Vaccines for Human Diseases*, p. 265-272, 2022.

TOOR, Salman M. et al. T-cell responses and therapies against SARS-CoV-2 infection. *Immunology*, v. 162, n. 1, p. 30-43, 2021.

V'KOVSKI, Philip et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, n. 3, p. 155-170, 2021.

VIDARSSON, Gestur; DEKKERS, Gillian; RISPENS, Theo. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*, v. 5, p. 520, 2014.

WANG, Jiangshan et al. Based Biosensors for the Detection of Nucleic Acids from Pathogens. *Biosensors*, v. 12, n. 12, p. 1094, 2022.

WARTECKI, Adrian; RZYMSKI, Piotr. On the coronaviruses and their associations with the aquatic environment and wastewater. *Water*, v. 12, n. 6, p. 1598, 2020.

WAQAS, Muhammad et al. Determine the potential epitope based peptide vaccine against novel SARS-CoV-2 targeting structural proteins using immunoinformatics approaches. *Frontiers in molecular biosciences*, v. 7, p. 227, 2020.

WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) COVID-19 Vaccines with WHO Emergency Use Listing. Disponível em: <https://extranet.who.int/pqweb/vaccines/vaccinescovid-19-vaccine-eul-issued>. Acesso em: 15 fevereiro de 2023

WU, Wenbing et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: its role in the viral life cycle, structure and functions, and use as a potential target in the development of vaccines and diagnostics. *Virology Journal*, v. 20, n. 1, p. 1-16, 2023.

XU, Shuang-yong et al. Expression of human ACE2 N-terminal domain, part of the receptor for SARS-CoV-2, in fusion with maltose-binding protein, E. coli ribonuclease I and human RNase A. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 660149, 2021.

YAGHOOBIZADEH, Fatemeh et al. Expression, purification, and study on the efficiency of a new potent recombinant scFv antibody against the SARS-CoV-2 spike RBD in E. coli BL21. *Protein Expression and Purification*, v. 203, p. 106210, 2023.

YADAV, Rohitash et al. Role of structural and non-structural proteins and therapeutic targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells*, v. 10, n. 4, p. 821, 2021.

YEO, Kee Thai et al. Neutralizing activity and SARS-CoV-2 vaccine mRNA persistence in serum and breastmilk after BNT162b2 vaccination in lactating women. *Frontiers in immunology*, v. 12, p. 783975, 2022.

ZABIDI, Nur Zawanah et al. Evolution of SARS-CoV-2 variants: implications on immune escape, vaccination, therapeutic and diagnostic strategies. *Viruses*, v. 15, n. 4, p. 944, 2023.

ZENG, Weihong et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 527, n. 3, p. 618-623, 2020.

ZHANG, Qianqian et al. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Signal transduction and targeted therapy*, v. 6, n. 1, p. 233, 2021.

ZHU, Yuanshou et al. Nucleic acid testing of SARS-CoV-2: A review of current methods, challenges, and prospects. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 5004, 2022.

APÊNDICE A

RBD

Sequência de nucleotídeos

CCATGGGGCAATATTACAAACTTGTGCCCTTTTGGTGAAGTTTTTAACGCCACCAGATTTGCATCTGTTT
 ATGCTTGGAACAGGAAGAGAATCAGCAACTGTGTTGCTGATTATTCTGTCCTATATAATTCCGCATCAT
 TTTCCACTTTTAAGTGTTATGGAGTGTCTCCTACTAAATTAATGATCTCTGCTTTACTAATGTCTATGC
 AGATTCATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGGCAAACCTGGAAAGATTGCT
 GATTATAATTATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAGCTTGGAAATTCTAACAATCTTGATT
 CTAAGGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATAGATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGA
 GAGATATTTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAATGGTGTGGAAGGTTTTAATTGTT
 ACTTTCCCTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTGTGGTTACCAACCATACAGAGTAGTAG
 TACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTACTAATTTGGTTA
 AAAACAAATGTGTCAATTTCAACTTCAATGGTTAACAGGCACAGGTGTTCTTACTGAGTCTAACAA
 AAAGTTTCTGCCTTTCCAACAATTTGGCAGAGACATTGCTGACACTACTGATGCTGTCCGTGATCCAC
 AGACACTTGAGGAAAACCTGTACTTTCAAGGT**GTCGACA**AAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCAC
CACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAA

Sequência de aminoácidos

PWNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRISNCVADYSVLNSASFSTFK
 CYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDD
 FTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFFERDISTEIQAGSTP
 CNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGPKK
 STNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDP
 QTLEENLY**FQGV**DKLAAALE**HHHHHH**

Legenda: Em cinza Sequência do RBD; em negrito sítio da TEV-protease; grifado em amarelo fragmento oriundo do plasmídeo; sublinhado a sequência de histidinas

RBD-E**Sequência de nucleotídeos**

CCATGGGCAATATTACAAACTTGTGCCCTTTTGGTGAAGTTTTTAACGCCACCAGATTTGCATCTGTTT
 ATGCTTGGAACAGGAAGAGAATCAGCAACTGTGTTGCTGATTATTCTGTCCTATATAATCCGCATCAT
 TTTCCACTTTTAAGTGTTATGGAGTGTCTCCTACTAAATTAATGATCTCTGCTTTACTAATGTCTATGC
 AGATTCATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGGCAAACCTGGAAAGATTGCT
 GATTATAATTATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAGCTTGAATTCTAACAACTTTGATT
 CTAAGGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATAGATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGA
 GAGATATTTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGAATGGTGTGGAAGGTTTTAATTGTT
 ACTTTCTTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTGTGGTTACCAACCATACAGAGTAGTAG
 TACTTTCTTTTGAAGTTCTACATGCACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTACTAATTTGGTTA
 AAAACAAATGTGTCAATTTCAACTTCAATGGTTAACAGGCACAGGTGTTCTTACTGAGTCTAACAA
 AAAGTTTCTGCCTTTCCAACAATTTGGCAGAGACATTGCTGACACTACTGATGCTGTCCGTGATCCAC
 AGACACTTGAGGGTGGTGGTGGTTCTCTGACTGCTCTGAGACTGTGTGCTTACGAAAACCTGTACT
 TTCAAGGTGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTG
 CTAA

Sequência de aminoácidos

PWNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFK
 CYGVSPTKLNLDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDD
 FTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTP
 CNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPVRVVVLSFELLHAPATVCGPKK
 STNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDP
 QTLEGGGGSLTALRLCAYENLYFQGVDKLAAALEHHHHHH

Legenda: Em cinza Sequência do RBD; sublinhado linker; grifado em azul epítipo E; em
 negrito sítio da TEV-protease; grifado em amarelo fragmento oriundo do plasmídeo
 sublinhado em negrito a sequência de histidinas

RBD-M

Sequência de nucleotídeos

CCATGGGCAATATTACAAACTTGTGCCCTTTTGGTGAAGTTTTTAACGCCACCAGATTTGCATCTGTTT
 ATGCTTGGAACAGGAAGAGAATCAGCAACTGTGTTGCTGATTATTCTGTCCTATATAATCCGCATCAT
 TTTCCACTTTTAAGTGTTATGGAGTGTCTCCTACTAAATTAATGATCTCTGCTTTACTAATGTCTATGC
 AGATTCATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGGCAAACCTGGAAAGATTGCT
 GATTATAATTATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAGCTTGGAAATTCTAACAACTTTGATT
 CTAAGGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATAGATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGA
 GAGATATTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAAATGGTGTGGAAGGTTTTAATTGTT
 ACTTTCCCTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTGTGGTTACCAACCATACAGAGTAGTAG
 TACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTACTAATTTGGTTA
 AAAACAAATGTGTCAATTTCAACTCAATGGTTAACAGGCACAGGTGTTCTTACTGAGTCTAACAA
 AAAGTTTCTGCCTTTCCAACAATTTGGCAGAGACATTGCTGACACTACTGATGCTGTCCGTGATCCAC
 AGACACTTGAGGGTGGTGGTGGTTCTGCTACTTCTAGAACTCTGTCTTACTACGGTGGTGGTGGTT
 CTCTTCTGATAACATTGCTCTGCTGGTTGAAAACCTGTACTTTCAAGGTGTCGACAAGCTTGCG
 GCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAA

Sequência de aminoácidos

PWNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFK
 CYGVSPTKLNLDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDD
 FTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTP
 CNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKK
 STNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQFGRDIADTTDAVRDP
 QTLEGGGGS **ATSRTL**SYYG **GGGGS** **SSDNIAL**LVENLYFQG **VDKLAAALE** **H**
HHHH

Legenda: Em cinza sequência do RBD; sublinhado linker; grifado em roxo epítomos M; em negrito sítio da TEV-protease; grifado em amarelo fragmento oriundo do plasmídeo; sublinhado em negrito a sequência de histidinas

E-RBD-E**Sequência de nucleotídeos**

CCATGGGC **ATGTACTCTTTTGTCTGAAGAACTGGTACTCTGATTGTAACTCTGGTGGTGG**
TGGTTCTAAATATTACAACTTGTGCCCTTTTGGTGAAGTTTTTAACGCCACCAGATTTGCATCTGTTA
TGCTTGGAACAGGAAGAGAATCAGCAACTGTGTTGCTGATTATTCTGTCCTATATAATTCCGCATCATT
TTCCACTTTTAAAGTGTTATGGAGTGTCTCCTACTAAATTAATGATCTCTGCTTTACTAATGTCTATGCA
GATTCATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGGCAAACCTGGAAAGATTGCTG
ATTATAATTATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAGCTTGGAATTCTAACAATCTTGATTC
TAAGGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATAGATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGAG
AGATATTTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAATGGTGTGGAAGTTTTAATTGTTA
CTTTCTTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTGTGTTACCAACCATACAGAGTAGTAGT
ACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTACTAATTTGGTTA
AAAACAAATGTGTCAATTTCAACTTCAATGGTTAACAGGCACAGGTGTTCTTACTGAGTCTAACAA
AAAGTTTCTGCCTTTCCAACAATTTGGCAGAGACATTGCTGACACTACTGATGCTGTCCGTGATCCAC
AGACACTTGAG**GGTGGTGGTGGTCTCTGACTGCTCTGAGACTGTGTGCTTAC**GAAAACCTGT
ACTTTCAAGGTGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
CTGCTAA

Sequência de aminoácidos

PW **MYSFVSEETGTLIVNS** **GGGGS**NITNLC PFGEVFNATRFASVYAWNRK
RISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPKLNLDLCFTNVYADSFVIRGDEV
RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFR
KSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPY
RVVVLSELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKK
FLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLE**GGGGS** **LTALRLCAYENLYFQG** **VDKL**
AAALE **HHHHH**

Legenda: Em laranja fragmentos proteína E; Em cinza sequência do RBD; sublinhado linker; grifado em azul epítipo E; em negrito sítio da TEV-protease; grifado em amarelo fragmento oriundo do plasmídeo; sublinhado em negrito a sequência de histidinas.

E-RBD**Sequência de nucleotídeos**

CCATGGGC**ATGTACTCTTTTGTTC****TTCTGAAGAACTGGTACTCTGATTGT****TAACTC**TGGTGGTGGT
GGTTCTAATATTACAACTTGTGCCCTTTTGGTGAAGTTTTTAACGCCACCAGATTTGCATCTGTTTAT
GCTTGGAACAGGAAGAGAATCAGCAACTGTGTTGCTGATTATTCTGTCCTATATAATTCCGCATCATT
TCCACTTTTAAGTGTTATGGAGTGTCTCCTACTAAATTAATGATCTCTGCTTTACTAATGTCTATGCAG
ATTCATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGGCAAACCTGGAAAGATTGCTGAT
TATAATTATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAGCTTGGAATTCTAACAATCTTGATTCTA
AGGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATAGATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGAGAG
ATATTTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAATGGTGTGGAAGGTTTTAATTGTTACT
TTCCTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTGTGGTTACCAACCATACAGAGTAGTAGTAC
TTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTACTAATTTGGTTAAA
AACAAATGTGTCAATTTCAACTTCAATGGTTAACAGGCACAGGTGTTCTTACTGAGTCTAACAAAA
AGTTTCTGCCTTTCCAACAATTTGGCAGAGACATTGCTGACACTACTGATGCTGTCCGTGATCCACAG
ACACTTGAG**GAAAACCTGTACTTTCAAGGTGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCA**
CCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAA

Sequência de aminoácidos

P W **MYSFVSEETGTLIVNS**GGGGSNITNLC PFGEVFNATRFASVYAWNRK
RISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSP TKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV
RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFR
KSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPY
RVVVLSELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKK
FLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLE**ENLYFQGVDKLA**AAALE**HHHHHH**

Legenda: Em laranja fragmentos proteína E; Em cinza sequência do RBD; sublinhado linker; em negrito sítio da TEV-protease; grifado em amarelo fragmento oriundo do plasmídeo; sublinhado em negrito a sequência de histidinas.

E-RBD-M**Sequência de nucleotídeos**

CCATGGGC **ATGTACTCTTTTGTCTGAAGAACTGGTACTCTGATTGTAACTCTGGTGGTGG**
TGGTTCT AATATTACAACTTGTGCCCTTTTGGTGAAGTTTTAACGCCACCAGATTTGCATCTGTTA
 TGCTTGAACAGGAAGAGAATCAGCAACTGTGTTGCTGATTATTCTGTCCTATATAATTCCGCATCATT
 TTCCACTTTTAAGTGTTATGGAGTGTCTCTACTAAATTAATGATCTCTGCTTTACTAATGTCTATGCA
 GATTCATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGGCAAACCTGGAAAGATTGCTG
 ATTATAATTATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAGCTTGAATTCTAACAACTTTGATTC
 TAAGGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATAGATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACCTTTTGAGAG
 AGATATTTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGAATGGTGTGAAGGTTTTAATTGTTA
 CTTTCCTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTGTGGTTACCAACCATACAGAGTAGTAGT
 ACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTACTAATTTGGTTA
 AAAACAAATGTGTCAATTTCAACTCAATGGTTAACAGGCACAGGTGTTCTTACTGAGTCTAACAA
 AAAGTTTCTGCCTTTCCAACAATTTGGCAGAGACATTGCTGACACTACTGATGCTGTCCGTGATCCAC
 AGACACTTGAG**GGTGGTGGTGGTCT** **GCTACTTCTAGA** **ACTCTGTCTTACTACGGTGGTGGTGG**
TTCTTCTTCTGATAACATTGCTCTGCTGGTT **GAAAACCTGTACTTTCAAGGTGTGCACAAGCTTG**
CGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACC **ACTGAGATCCGGCTGCTAA**

Sequência de aminoácidos

PW **MYSFVSEETGTLIVNS** **GGGGS** NITNLC PFGEVFNATRFASVYAWNKR
 RISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV
 RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFR
 KSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPY
 RVVVLSELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKK
 FLFPQQFGRDIADTTDAVRDPQTLE**GGGGS** **ATSRTL** **SY** **GGGGS** **SSDNIA**
LLV **ENLYFQG** **VDKLA** **AALE** **HHHHHH**

Legenda: Em laranja fragmentos proteína E; Em cinza sequência do RBD; sublinhado linker; grifado em roxo epítomos M; em negrito sítio da TEV-protease; grifado em amarelo fragmento oriundo do plasmídeo; sublinhado em negrito a sequência de histidinas.

M-RBD-M**Sequência de nucleotídeos**

CCATGGGCATGGCTGATTCTAACGGTACTATTACTGTTGAAGAAGCTGAAGAAGCTGCTGGAACA
AGGTGGTGGTGGTTCTAATATTACAACTTGTGCCCTTTTGGTGAAGTTTTTAACGCCACCAGATTT
 GCATCTGTTTATGCTTGGAACAGGAAGAGAATCAGCAACTGTGTTGCTGATTATTCTGTCCTATATAAT
 TCCGCATCATTTCCTACTTTTAAGTGTATGGAGTGTCTCCTACTAAATTAATGATCTCTGCTTTACTA
 ATGTCTATGCAGATTCATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGGCAAAGCTGGA
 AAGATTGCTGATTATAATTATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAGCTTGGAATTCTAACA
 ATCTTGATTCTAAGGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATAGATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACC
 TTTTGAGAGAGATATTTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAATGGTGTGAAGGTT
 TTAATTGTTACTTTCCTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTGTGGTTACCAACCATACAG
 AGTAGTAGTACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTACTA
 ATTTGGTTAAAAACAAATGTGTCAATTTCAACTTCAATGGTTAACAGGCACAGGTGTTCTTACTGAG
 TCTAACAAAAAGTTTCTGCCTTTCCAACAATTTGGCAGAGACATTGCTGACACTACTGATGCTGTCCG
 TGATCCACAGACACTTGAG**GGTGGTGGTGGTTCTGCTACTTCTAGAACTCTGTCTTACTACGGT**
GGTGGTGGTTCTTCTTCTGATAACATTGCTCTGCTGGTTGAAAACCTGTACTTTCAAGGTGTCG
ACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAA

Sequência de aminoácidos

P W **M A D S N G T I T V E E L K K L L E Q** **G G G G S** N I T N L C P F G E V F N A T R F A S V Y A W
 N R K R I S N C V A D Y S V L Y N S A S F S T F K C Y G V S P T K L N D L C F T N V Y A D S F V I R G
 D E V R Q I A P G Q T G K I A D Y N Y K L P D D F T G C V I A W N S N N L D S K V G G N Y N Y L Y
 R L F R K S N L K P F E R D I S T E I Y Q A G S T P C N G V E G F N C Y F P L Q S Y G F Q P T N G V G
 Y Q P Y R V V V L S F E L L H A P A T V C G P K K S T N L V K N K C V N F N F N G L T G T G V L T E
 S N K K F L P F Q Q F G R D I A D T T D A V R D P Q T L E **G G G G S** **A T S R T L S Y Y** **G G G G S S S**
D N I A L L V E N L Y F Q G **V D K L A A A L E** **H H H H H H**

Legenda: Em azul fragmentos proteína M; Em cinza sequência do RBD; sublinhado linker; grifado em roxo epítomos M; em negrito sítio da TEV-protease; grifado em amarelo fragmento oriundo do plasmídeo; sublinhado em negrito a sequência de histidinas.

M-RBD**Sequência de nucleotídeos**

CCATGGGCATGGCTGATTCTAACGGTACTATTACTGTTGAAGAACTGAAGAAGCTGCTGGAACA
 AGGTGGTGGTGGTTCTAATATTACAACTTGTGCCCTTTTGGTGAAGTTTTAACGCCACCAGATTT
 GCATCTGTTTATGCTTGGAACAGGAAGAGAATCAGCAACTGTGTTGCTGATTATTCTGTCCTATATAAT
 TCCGCATCATTTCCTACTTTTAAGTGTTATGGAGTGTCTCCTACTAAATTAATGATCTCTGCTTTACTA
 ATGTCTATGCAGATTCATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGGCAAACCTGGA
 AAGATTGCTGATTATAATTATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAGCTTGGAATTCTAACA
 ATCTTGATTCTAAGGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATAGATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACC
 TTTTGAGAGAGATATTTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAATGGTGTGGAAGGTT
 TTAATTGTTACTTTCCTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTGTGTTACCAACCATACAG
 AGTAGTAGTACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTACTA
 ATTTGGTTAAAAACAAATGTGTCAATTTCAACTTCAATGGTTAACAGGCACAGGTGTTCTTACTGAG
 TCTAACAAAAAGTTTCTGCCTTTCCAACAATTTGGCAGAGACATTGCTGACACTACTGATGCTGTCCG
 TGATCCACAGACACTTGAGGAAAACCTGTACTTTCAAGGTGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCG
 AGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAA

Sequência de aminoácidos

PW **MADSNGTITVEELKLLLEQ**GGGGSNITNLCPFGEVFNATRFASVYAW
 NRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRG
 DEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLY
 RLFKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVG
 YQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTE
 SNKKFLPFQFGRDIADTTDAVRDPQTLEENLYFQGVDKLAAALE**HHHH**
HH

Legenda: Em azul fragmentos proteína M; em cinza sequência do RBD em negrito sítio da TEV-protease; grifado em amarelo fragmento oriundo do plasmídeo; sublinhado em negrito a sequência de histidinas.

M-RBD-E**Sequência de nucleotídeos**

CCATGGGCATGGCTGATTCTAACGGTACTATTACTGTTGAAGAACTGAAGAAGCTGCTGGAACA
AGGTGGTGGTGGTTCTAATATTACAACTTGTGCCCTTTTGGTGAAGTTTTTAACGCCACCAGATTT
 GCATCTGTTTATGCTTGGAACAGGAAGAGAATCAGCAACTGTGTTGCTGATTATTCTGTCCTATATAAT
 TCCGCATCATTTCCACTTTTAAGTGTATGGAGTGTCTCCTACTAAATTAATGATCTCTGCTTTACTA
 ATGTCTATGCAGATTCATTTGTAATTAGAGGTGATGAAGTCAGACAAATCGCTCCAGGGCAAACCTGGA
 AAGATTGCTGATTATAATTATAAATTACCAGATGATTTTACAGGCTGCGTTATAGCTTGGAAATTCTAACA
 ATCTTGATTCTAAGGTTGGTGGTAATTATAATTACCTGTATAGATTGTTTAGGAAGTCTAATCTCAAACC
 TTTTGAGAGAGATATTTCAACTGAAATCTATCAGGCCGGTAGCACACCTTGTAATGGTGTGAAGGTT
 TTAATTGTTACTTTCCTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTAATGGTGTGGTTACCAACCATACAG
 AGTAGTAGTACTTTCTTTTGAACCTTCTACATGCACCAGCAACTGTTTGTGGACCTAAAAAGTCTACTA
 ATTTGGTTAAAAACAAATGTGTCAATTTCAACTTCAATGGTTAACAGGCACAGGTGTTCTTACTGAG
 TCTAACAAAAAGTTTCTGCCTTTCCAACAATTTGGCAGAGACATTGCTGACACTACTGATGCTGTCCG
 TGATCCACAGACACTTGAG**GGTGGTGGTGGTTCT**CTGACTGCTCTGAGACTGTGTGCTTAC**GAAAA**
CCTGTACTTTCAAGGTGTCGACAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAG
ATCCGGCTGCTAA

Sequência de aminoácidos

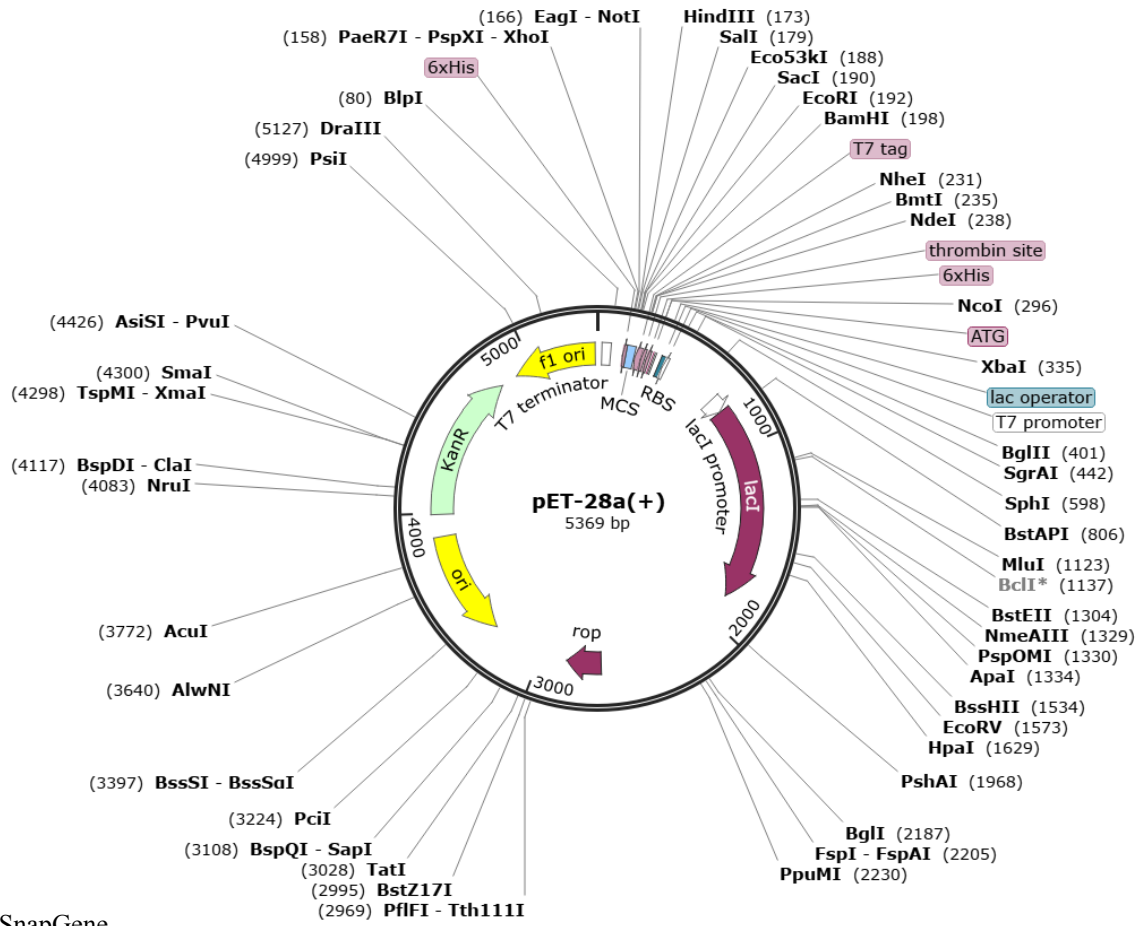
P W **MADSNGTITVEELKLLLEQ**GGGGSNITNLC PFGEVFNATRFASVYAW
 NRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSP TKLNDLCFTNVYADSFVIRG
 DEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVG GNYNYLY
 R LFRKSNLKP FERDISTE IYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVG
 YQP YRVV VLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTE
 SNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLE**GGGGSLTALRLCAYENLYFQ**
GVDK_LAAALEHHHHHH

Legenda: Em azul fragmentos proteína M; em cinza sequência do RBD; sublinhado linker; em azul escuro epítipo E; em negrito sítio da TEV-protease; grifado em amarelo fragmento oriundo do plasmídeo; sublinhado em negrito a sequência de histidinas.

ANEXO 1

Mapa do pET-28a

Created with SnapGene®



Fonte: SnapGene