



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**ANÁLISE DA ESTRUTURA E FUNÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE  
CAPSÍDEO OBTIDA POR EVOLUÇÃO ARTIFICIAL GUIADA**

**FABIANE STOFFEL**

Florianópolis  
Março/2022

**Fabiane Stoffel**

**ANÁLISE DA ESTRUTURA E FUNÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE  
CAPSÍDEO OBTIDA POR EVOLUÇÃO ARTIFICIAL GUIADA**

Relatório apresentado ao Departamento de Química  
da Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial da disciplina de  
Estágio II (QMC 5512)

---

**Prof. Dr. Ricardo Ferreira Affeldt**

---

**Prof. Dr. Daniel Santos Mansur**

---

**Dra. Aline Melro Murad**

Florianópolis  
Março/2022

## Agradecimentos

À toda minha família por todo incentivo desde o início da graduação, em especial aos meus pais Renice e Jonei, que nunca mediram esforços para me ajudar com o grande desafio de residir em uma nova cidade e buscar os meus objetivos. Agradeço também à minha irmã Francieli, que sempre esteve do meu lado, disposta a me ouvir e ajudar. Obrigada por sempre acreditarem em mim!

Ao meu namorado Klaivert, companheiro que vivenciou e acompanhou de perto todas as fases Fabiane na graduação. Você com certeza foi um dos mais importantes para que eu não desistisse, ter você comigo durante os cinco anos foi fundamental. Você me inspira, é meu corretor oficial de português e me ensina muito sobre o mundo. É incrível o quanto você entende de muitas áreas do conhecimento, inclusive sobre o meu trabalho. Agradecer também à minha segunda família que sempre me acolheu muito bem: Ereni, Valdir, Emily, Jenifer e Nathalia.

Agradecer imensamente ao meu orientador Daniel, por em meio à uma pandemia me aceitar no laboratório e fornecer condições seguras para que eu tivesse o privilégio de desenvolver esse trabalho. Obrigada pela oportunidade, confiança, ensinamentos e conversas. Acredito que nunca terei um orientador igual a você, que considero um amigo e que sempre esteve tão disposto a ajudar (até com a mão na massa). Já estou começando a entender até os olhares e o “Fabi, me passa aquilo” no meio do experimento. Você é incrível e uma inspiração pra mim Mansur!

À minha companheira de trabalho diário, Aline, que me ensinou muito nesse período juntas e se tornou uma grande amiga. Não existem palavras para descrever o quanto você foi importante para o meu desenvolvimento durante esse trabalho. Nunca mediu esforços para me ajudar e aconselhar, em diversos ramos da pesquisa e da vida. Você é uma grande cientista, rainha das proteínas e minha inspiração!

Ao meu orientador do departamento de química, Prof. Ricardo, que sempre esteve disponível para me ajudar nesse trabalho e me deu ótimos conselhos. Também teve influência para minha trajetória como professora, muito obrigada!

Ao Edgar, que realizou a parte computacional desse projeto sensacional.

Ao Prof. André e também aos colegas e amigos do Lidi: Bianca, Carol, Daniel M., Daniel P., Dai, Dina, Eduarda, Giovana, Greicy, Juliano, Junior, Luci, Mari, Marick, Natana, Nicoli, Pri, Ruth, Sérgio, Thay e Yonne. Aqui, especialmente a Daniel M. pela inoculação dos camundongos e a Dai, Greicy e Nicoli pela realização dos testes semanais para Covid-19. Sou muito grata por ter conhecido pessoas e cientistas tão incríveis, admiro vocês!

À Beatriz e a Lia da Fiocruz/PR, pelas análises de MET, DLS e nanoDSF utilizadas nesse trabalho.

À equipe do LAMEB/UFSC pela disponibilidade da ultracentrífuga e do fotodocumentador, muito utilizados durante o projeto.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação e trajetória acadêmica, dedicando seu tempo para um ensino de qualidade na universidade pública, meu muito obrigada! Muitos me influenciaram a ser pesquisadora e também professora. Em especial, agradecer ao Prof. Luís Otávio, que foi um dos primeiros a acreditar em

mim e me levou para a físico-química. Especialmente também agradecer às mulheres cientistas e professoras do departamento que passaram pela minha graduação: Adriana, Christiane H., Cristiane J., Daniela, Rosely, Tatiane e Vera. Também, gostaria de deixar aqui meu agradecimento ao Prof. Alexandre por me ajudar com a interpretação dos meus dados de DLS.

Ao Prof. Hernán, que me orientou por 2 anos na iniciação científica, me ensinou muito e sempre me apoiou na minha carreira de pesquisadora. Aqui também deixo meu carinho e agradecimento ao pessoal do CEBIME, grandes pesquisadores e amigos.

Aos grandes amigos que eu fiz na graduação: Bea, Gabi, Rafa e Jona. Vocês foram extremamente importantes para as jornadas de provas, estudos, laboratórios e relatórios. Eterno grupo de lab, que aprontou algumas ao longo do caminho. Agradecimento especial também aos meus amigos e professores de química incríveis, Ange e Victor, que me ensinaram muito sobre essa profissão. Todos vocês deixaram minha graduação mais leve e divertida. Obrigada por sempre acreditarem em mim e no meu potencial, assim como eu acredito no de vocês. Da UFSC pra vida!

À UFSC, universidade pública e de excelência.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro durante minha graduação.

À banca avaliadora pela disponibilidade de avaliar e contribuir com o trabalho.

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>13</b>
2.1	Sobemovírus	13
2.2	Rinovírus	14
2.3	Proteína de capsídeo picorna-like	15
2.4	Evolução natural	17
2.5	Evolução artificial guiada	18
2.6	Expressão heteróloga de proteínas em bactérias	20
2.7	Aplicações	21
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
3.1	Objetivo geral	23
3.2	Objetivos específicos	23
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
4.1	Equipamentos e reagentes	24
4.2	Bioinformática	26
4.3	Clonagem dos genes wild-SBMV e LDI-CP em vetor de expressão	27
4.4	Transformação de bactérias quimiocompetentes	27
4.5	Expressão da proteína LDI-CP	28
4.6	Lise celular e isolamento dos corpos de inclusão (CI)	28
4.7	Purificação da proteína LDI-CP	28
4.7.1	Colchão de sacarose	28
4.7.2	Gradiente de sacarose	29
4.7.3	Cromatografia de exclusão molecular	29
4.8	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	30
4.9	<i>Western Blot</i>	30
4.10	Quantificação proteína total	31
4.11	Caracterização físico-química	32
4.12	Microscopia Eletrônica de Transmissão	33
4.13	Inoculação de camundongos	34
4.14	Segurança no laboratório e tratamento de resíduos	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>

5.1	Expressão, purificação e quantificação da proteína LDI-CP .....	36
5.2	Inoculação de camundongos.....	40
5.3	Caracterização físico-química .....	42
5.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	45
5.5	Comparação com a proteína wildSBMV .....	47
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>
	<b>ANEXO A – VLPs de LDI-CP produzidas em bactérias <i>E. coli</i> BL21 (DE3) observadas por meio de microscopia eletrônica de transmissão. As partículas possuem cerca de 20 nm. ....</b>	<b>i</b>
	<b>APÊNDICE A – Mapa do vetor de expressão pET14b contendo os genes das proteínas selvagens wildSBMV (esquerda) e LDI-CP (direita). ....</b>	<b>ii</b>
	<b>APÊNDICE B – Estruturas e reações relevantes. ....</b>	<b>iii</b>
	<b>APÊNDICE C– Reagentes químicos e pictogramas de perigo GHS. ....</b>	<b>iv</b>
	<b>APÊNDICE D – Perfil proteico da purificação da wildSBMV por colchão de sacarose (CS) e gradiente de sacarose (GS). A) SDS-PAGE 12.5%, coloração por nitrato de prata e B) Western Blot, anticorpo primário: anticorpo monoclonal anti poli-Histidina (1:10000). M: Marcador de peso molecular; 1: Fração superior; 2: colchão 30%; 3: Pellet CS; 4-7: 20-50% frações GS; 8: Pellet GS. Caixa preta tracejada indica a posição da wildSBMV (30526,23 Da). ....</b>	<b>v</b>
	<b>APÊNDICE E – Licenças Elsevier. ....</b>	<b>vi</b>

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Organização genômica do SBMV e formação da proteína CP. o RNA genômico é formado por 4 ORFs e possui na extremidade 5' uma pequena proteína viral covalentemente ligada (VPg)..... 13
- FIGURA 2:** Capsídeo de sobemovírus. (A) Simetria icosaédrica T=3 do capsídeo de sobemovírus. as posições A1 (azul), B1 (vermelho) e C1 (verde) correspondem ao arranjo espacial das subunidades idênticas (homotrímero) da proteína CP. (B) Organização da unidade icosaédrica T=3 da proteína CP do *Southern Bean Mosaic Virus* (PDB ID 4sbv). ..... 14
- FIGURA 3:** Organização genômica do rinovírus e formação das proteínas. O RNA genômico é formado por uma única ORF, flanqueada por regiões não traduzidas (5'UTR e 3'UTR). A extremidade 5' do RNA está covalentemente ligada a uma pequena proteína viral (VPg). As proteínas estruturais VP1-VP4 são formadas a partir de uma poliproteína..... 15
- FIGURA 4:** Capsídeo de rinovírus. (A) Simetria icosaédrica pseudo T=3 do capsídeo de rinovírus. (B) Organização da unidade icosaédrica pseudo T=3 das proteínas CPs do vírus *Human rhinovirus B14* (PDB ID 4rhv). As posições VP1 (azul), VP2 (verde), VP3 (vermelho) e VP4 interna (preto) correspondem ao arranjo espacial da proteína VP composta por subunidades com sequências de aminoácidos diferentes (heterotetrâmero). ..... 15
- FIGURA 5:** Topologia da dobra *jelly-roll*. Dobra observada em muitas proteínas de capsídeos com 8 fitas  $\beta$  antiparalelas formando duas folhas (esquerda) e diagrama da estrutura terciária da dobra *jelly-roll* (direita). ..... 17
- FIGURA 6:** Estratégia geral da evolução artificial guiada utilizada para a obtenção da sequência da proteína LDI-CP. .... 19
- FIGURA 7:** Esquema do protocolo de imunização. Camundongos C57BL/6 foram imunizados (dia 0) com o antígeno LDI-CP e submetidos a um novo desafio sete e 21 dias após. O sangue foi coletado semanalmente após a 1ª inoculação.....34
- FIGURA 8:** Perfil proteico da expressão de LDI-CP em ArcticExpress (DE3). A) SDS-PAGE 12,5%, coloração por Coomassie Brilliant Blue e B) Western Blot, anticorpo primário: anticorpo monoclonal anti poli-Histidina (1:10000). M: Marcador de peso molecular; bi: antes da indução com IPTG; S: sobrenadante após lise celular e P: Pellet contendo CI. Caixa preta tracejada indica a LDI-CP. .... 36
- FIGURA 9:** Perfil proteico da purificação da LDI-CP por colchão de sacarose (CS) e gradiente de sacarose (GS). A) SDS-PAGE 12,5%, coloração por nitrato de prata e B) Western Blot, anticorpo primário: anticorpo monoclonal anti poli-Histidina (1:10000). M: Marcador de peso molecular; 1: Fração superior; 2: colchão 30%; 3: Pellet CS; 4-7: 20-50% frações GS; 8: Pellet GS. Caixa preta tracejada indica a posição da LDI-CP. .... 37
- FIGURA 10:** Perfil proteico da purificação da LDI-CP por cromatografia de exclusão molecular. A) SDS-PAGE 12,5%, coloração por nitrato de prata e B) Western Blot,

anticorpo primário: anticorpo monoclonal anti poli-Histidina (1:10000). M: Marcador de peso molecular; 1: fração não retida (100 kDa); 2: Fração injetada; 3-6: Frações coletadas da SEC. Caixa preta tracejada indica a posição da LDI-CP. ....	38
<b>FIGURA 11:</b> Cromatografia de exclusão molecular da fração 30 % resultante do gradiente de sacarose. No eixo Y do cromatograma temos a absorvância medida em 280 nm (mAU) e no eixo X o volume de eluição (ml). Foi observada uma única fração retida em um volume de aproximadamente 8 ml com uma absorvância de 420 mAU. ....	39
<b>FIGURA 12:</b> Curva padrão para quantificação da proteína LDI-CP.....	40
<b>FIGURA 13:</b> Western blot da proteína LDI-CP purificada (1 µg/poço) utilizando soro de camundongos imunizados na diluição de 1:500. M: Marcador molecular (kDa); D-0: Soro pré-imune; D-7/28: Soro 7-28 dias após a imunização com LDI-CP; Anti-His: anticorpo anti poli-Histidina (controle +); BSA: Albumina de soro bovino 1 µg/poço (Controle -); PBS: Solução salina (Controle -). Caixa preta tracejada indica a posição da LDI-CP.....	41
<b>FIGURA 14:</b> Western blot da proteína LDI-CP purificada em diferentes concentrações (0,03 -1 µg) utilizando soro de camundongos pré-imune e soro 28 dias após a imunização com LDI-CP nas diluições de 1:1000 e 1:2000. D28: soro 28 dias após a imunização com LDI-CP; Anticorpo anti poli-Histidina (controle +); BSA: Albumina de soro bovino 1 µg/poço (Controle -); PBS: Solução salina (Controle -).....	42
<b>FIGURA 15:</b> Espalhamento dinâmico de luz de LDI-CP purificada em pH 7,5. ....	43
<b>FIGURA 16:</b> Análises de nanoDSF de LDI-CP em pH 7,5.....	45
<b>FIGURA 17:</b> Micrografias eletrônicas de transmissão com coloração negativa em diferentes amplitudes de tamanho. ....	46



## **LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1:</b> Lista de equipamentos utilizados.....	24
<b>TABELA 2:</b> Tampões, soluções, meios e consumíveis utilizados. ....	25

## LISTA DE ABREVIATURAS

(+)ssRNA – RNA de cadeia simples e senso positivo  
APS – Persulfato de amônio  
BCA – Ácido bicinconínico  
BSA – Albumina de soro bovino (do inglês, Bovine Serum Albumine)  
CCD – Dispositivo de carga acoplada  
CCMV - *Cowpea chlorotic mottle virus*  
CI – Corpos de inclusão  
CP – Proteína de capsídeo  
DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz  
DO – Densidade óptica  
dsDNA – Ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla  
*E. coli* – *Escherichia coli*  
EPI's – Equipamentos de proteção individual  
FD – Fator de diluição  
GHS – Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals  
HBV – Vírus da Hepatite B  
HEV – Vírus da Hepatite E  
HPV – Papiloma Vírus Humano  
ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus  
IgG – Imunoglobulina G  
IPTG – isopropil- $\beta$ D-tiogalactopiranosídeo  
kb – Quilobase  
kDa – Quilodalton  
m/v – Massa por volume  
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão  
MW – Massa molecular  
nanoDSF – Fluorimetria Diferencial de Varredura em nanoescala  
nm – Nanômetro  
ORF – Janela aberta de leitura  
PBS - Tampão fosfato salino  
PDB – *Protein Data Bank*  
PDI – Índice de polidispersidade

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil  
RdRp – RNA polimerase dependente de RNA  
RNA – Ácido ribonucleico  
RNAi – RNAs interferentes  
mRNA – RNA mensageiro  
SBMV – *Southern bean mosaic virus*  
SDS – Dodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio  
SEC – Cromatografia de exclusão molecular  
T – Número de triangulação  
TA – Temperatura ambiente  
TBS – Solução Salina Tamponada com Tris  
TBST – Solução Salina Tamponada com Tris e Tween 20 a 0,1%  
TEMED – N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina  
UTR – Regiões não traduzidas  
v/v – Volume por volume  
VLP – Partícula semelhante a vírus  
VP – Proteína viral  
VPg – Proteína viral covalentemente ligada  
WB – *Western Blot*

## RESUMO

A utilização de ferramentas *in silico* para o desenvolvimento de proteínas artificiais, aliadas com técnicas de produção, purificação e caracterização, é uma estratégia poderosa para a produção de partículas com propriedades semelhantes aos capsídeos icosaédricos virais. Essa sequência de métodos auxilia no entendimento de como a estrutura conservada das proteínas de capsídeo se relaciona com sua função, além da produção de novas nanopartículas multifuncionais. Nesse contexto, o trabalho em questão visou a produção, purificação e caracterização de uma proteína gerada *in silico* por evolução artificial guiada com potencial para formação de uma nanopartícula proteica. A proteína, denominada LDI-CP, foi expressa em sistema procarioto e purificada parcialmente através de ultracentrifugação utilizando colchão/gradiente de sacarose e cromatografia. Observações por meio de microscopia eletrônica de transmissão mostraram que a LDI-CP apresentou formas achatadas e com diâmetro de 20 nm. Análises físico-químicas demonstraram a formação de nanopartículas com raio hidrodinâmico de 30 nm estáveis em temperatura ambiente, indicando uma autoassociação da proteína em solução. Além disso, foi produzido soro imunorreativo em camundongos anti-LDI-CP, podendo ser utilizado para sua detecção em futuros trabalhos. Os resultados deste trabalho contribuirão para a produção de uma VLP artificial com potenciais aplicações como nanoencapsulação de vacinas ou como possíveis carreadores de drogas para entrega direcionada.

*Palavras-chave: Evolução artificial guiada. Partícula semelhante a vírus. Proteína de capsídeo.*

## 1 INTRODUÇÃO

Os vírus *Southern bean mosaic virus* e *Rhinovirus* são vírus icosaédricos com um genoma de (+)ssRNA, que infectam plantas e animais. Embora os organismos hospedeiros sejam filogeneticamente distantes, os dois vírus compartilham a organização estrutural *jelly-roll* da proteína de capsídeo e possuem simetrias icosaédricas semelhantes. Essa conservação da estrutura das proteínas de capsídeo e seu arranjo no espaço é um forte indício de homologia e ancestralidade comum.

Portanto, investigações evolutivas podem auxiliar para que seja possível propor a estrutura de um provável ancestral entre os vírus de (+)ssRNA que infectam diferentes hospedeiros eucariontes. O entendimento da evolução viral é importante tanto para a classificação quanto para a compreensão do surgimento de novos vírus e suas doenças relacionadas. Além dos indícios evolutivos, a utilização de metodologias computacionais aliadas à produção e purificação dos produtos gênicos em laboratório, pode ser uma ferramenta útil para o projeto de novas partículas semelhantes a vírus (VLPs) funcionais e geneticamente modificadas. Essas nanoestruturas com propriedades estruturais e químicas interessantes podem ser aplicadas na nanotecnologia, biotecnologia, medicina e áreas afins.

Com o intuito de compreender essas conexões evolutivas e desenvolver novas VLPs, foi realizado previamente no Laboratório de Imunobiologia, UFSC, um estudo *in silico* de evolução artificial guiada. A partir de diversos ciclos de mutação e seleção na proteína de capsídeo do *Southern bean mosaic virus* e buscando uma aproximação estrutural com proteínas de capsídeo de vírus que infectam animais (como o *Rhinovirus*), obteve-se como produto um gene hipotético que foi sintetizado. O presente trabalho visa continuar o trabalho citado e tem como objetivos a expressão do gene em bactérias, a purificação da proteína recombinante, a visualização da VLP artificial e algumas caracterizações físico-químicas e imunológicas da proteína estudada. Para isso, foram utilizadas técnicas biofísicas e bioquímicas, tais como eletroforese em gel, cromatografia líquida de proteína rápida, ultracentrifugação, fluorimetria diferencial de varredura em nanoescala, espalhamento dinâmico de luz, *western blot*, microscopia eletrônica de transmissão, dentre outras.

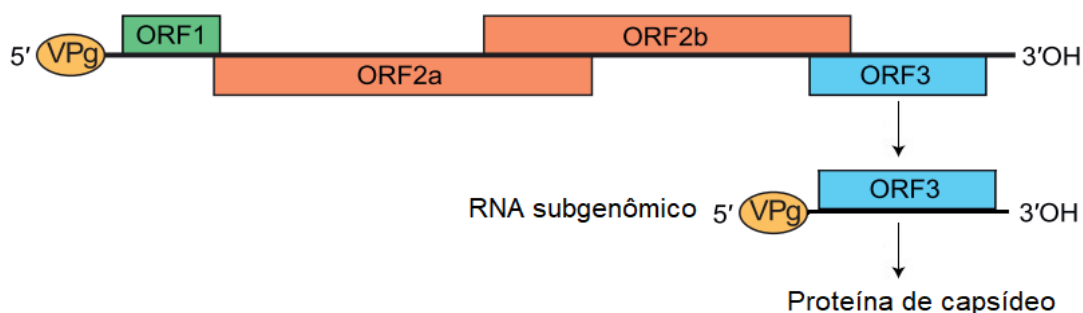
## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Sobemovírus

Sobemovírus são vírus de RNA que infectam espécies de plantas de pelo menos 15 famílias. O primeiro sobemovírus da espécie *Southern bean mosaic virus* (SBMV) foi isolado em 1942, dando origem ao nome do gênero *Sobemovirus*<sup>1</sup>. Essa espécie é um dos agentes causadores de doenças do mosaico no feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), provocando sintomas como distorção foliar, manchas necróticas circulares nas folhas, deformação da vagem e redução de tamanho e quantidade de sementes<sup>2</sup>. Em 1995, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) reconheceu o grupo como um gênero não atribuído a nenhuma família<sup>3</sup>. Sõmera e colaboradores, com base em análises filogenéticas, propuseram a criação de uma nova família denominada Sobemoviridae, em que o gênero *Sobemovirus* seria incluído<sup>4</sup>. Finalmente, em 2017, o ICTV reconheceu a criação da família Solemoviridae a qual englobou vinte espécies de vírus e dois gêneros, o *Polemovirus* e *Sobemovirus*.

Os vírus do gênero *Sobemovirus* possuem partículas icosaédricas com diâmetro variando entre 26 a 34 nm e um genoma composto de RNA fita simples de sentido positivo - (+)ssRNA - de tamanho entre 4 a 4,6 kb. A organização do genoma viral inclui de 4 a 5 janelas abertas de leitura (*Open Reading Frames – ORFs*), em que as *ORFs* 5' proximais são expressas a partir do RNA genômico e a *ORF* 3' proximal, que codifica a proteína de capsídeo, é traduzida a partir do RNA subgenômico (Figura 1)<sup>4, 5-8</sup>.

Figura 1: Organização genômica do SBMV e formação da proteína CP. O RNA genômico é formado por 4 ORFs e possui na extremidade 5' uma pequena proteína viral covalentemente ligada (VPg).

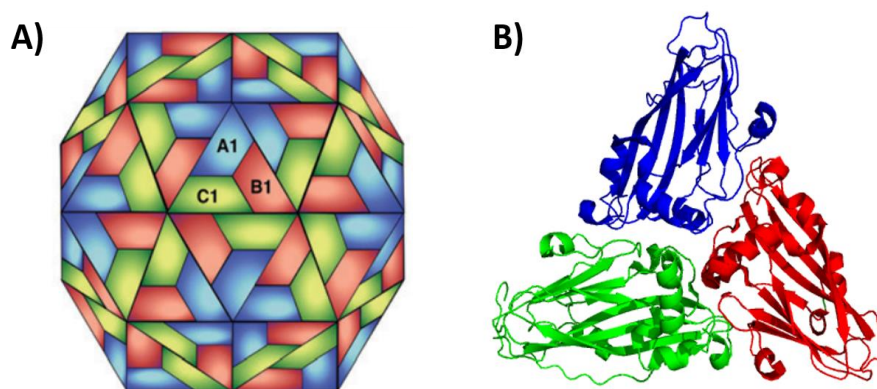


Fonte: Adaptado da referência 9, com autorização da Elsevier ©.

Os vírions desse grupo não possuem um envelope lipídico e são construídos com uma simetria icosaédrica com número de triangulação (T) igual a 3. O capsídeo desses vírus é formado por 180 moléculas de uma única proteína (*Capsid Protein* ou CP) com massa molecular variando de 26 a 34 kDa. Portanto, para cada partícula do

sobemovírus existem 60 unidades icosaédricas  $T=3$ <sup>4,8</sup>. Os monômeros CP são quimicamente idênticos, variando apenas em seu arranjo espacial, denominadas como subunidades A1 (azul), B1 (vermelho) e C1 (verde), conforme a Figura 2A e B. As subunidades A agrupam-se em vértices quádruplos para formar 12 pentâmeros, ao passo que conjuntos de três subunidades B e três C agrupam-se em vértices sêxtuplos para formar 20 hexâmeros e essa combinação geométrica resulta na forma característica da partícula viral<sup>3,4</sup>.

Figura 2: Capsídeo de sobemovírus. (A) Simetria icosaédrica  $T=3$  do capsídeo de sobemovírus. As posições A1 (azul), B1 (vermelho) e C1 (verde) correspondem ao arranjo espacial das subunidades idênticas (homotrímero) da proteína CP. (B) Organização da unidade icosaédrica  $T=3$  da proteína CP do *Southern Bean Mosaic Virus* (PBD ID 4sbv).



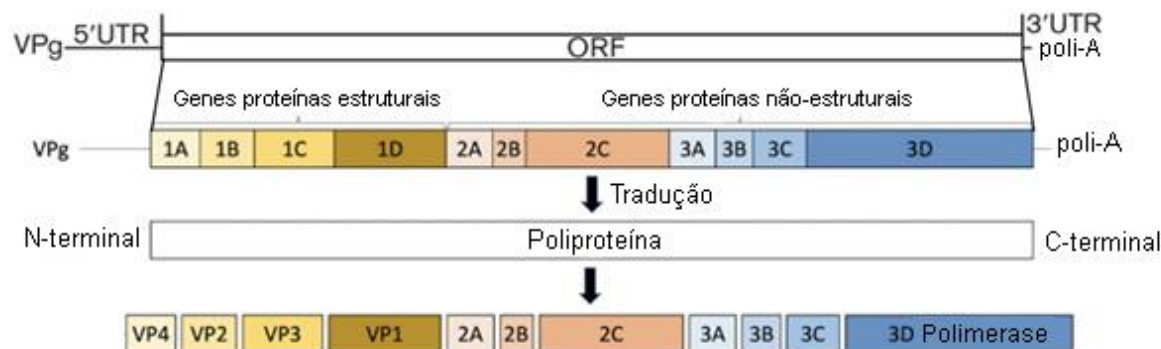
Fonte: (A) Retirado da referência 9, com autorização da Elsevier ©. (B) elaborada pela autora, 2021 utilizando o software PyMOL(TM) Molecular Graphics System, Version 2.6.0a0. Schrodinger, LLC.

## 2.2 Rinovírus

Pertencentes ao gênero *Enterovirus* da família Picornaviridae, os rinovírus são comumente responsáveis por doenças do trato respiratório superior e inferior (“resfriados comuns”, por exemplo), além de estarem associados a doenças como otite média, sinusite e pneumonia<sup>10,11</sup>. A distribuição em diferentes grupos dos rinovírus baseava-se, inicialmente, quanto ao uso de seu receptor ou sensibilidade à antivirais. Atualmente, são classificados no gênero *Enterovirus* nas espécies *Rhinovirus A*, *Rhinovirus B* e *Rhinovirus C*<sup>12</sup>, em que cada espécie possui diversos sorotipos geneticamente distintos totalizando mais de 150 sorotipos identificados<sup>13</sup>.

Os vírions dos rinovírus consistem em um capsídeo sem envelope com aproximadamente 30 nm de diâmetro e um genoma (+)ssRNA com tamanho de 7,2 kb. O genoma viral é constituído de uma única *ORF* codificando uma poliproteína que é subsequentemente clivada para formar quatro proteínas estruturais e pelo menos sete proteínas não estruturais (Figura 3)<sup>14,15</sup>.

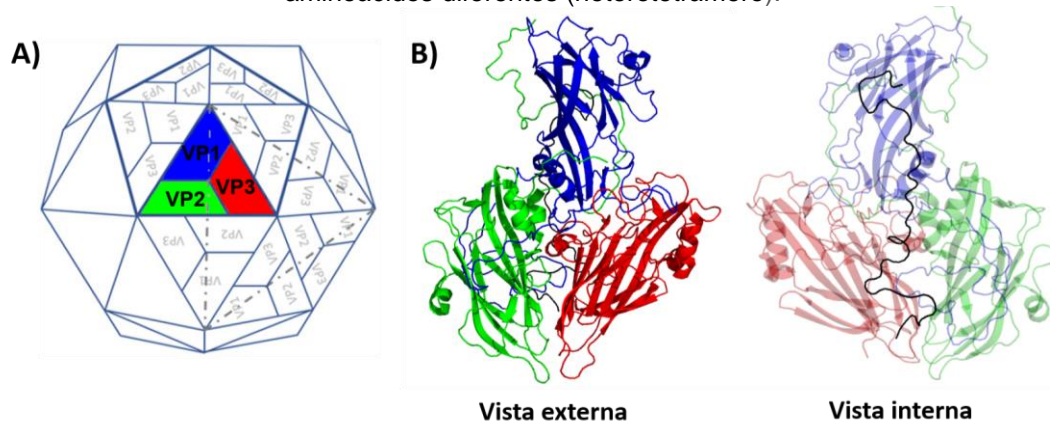
Figura 3: Organização genômica do rinovírus e formação das proteínas. O RNA genômico é formado por uma única ORF, flanqueada por regiões não traduzidas (5'UTR e 3'UTR). A extremidade 5' do RNA está covalentemente ligada a uma pequena proteína viral (VPg). As proteínas estruturais VP1-VP4 são formadas a partir de uma poliproteína.



Fonte: Adaptado das referências 15 e 16 (com autorização da Elsevier ©).

O capsídeo dos rinovírus é formado por 60 unidades idênticas (protômeros), em que cada protômero consiste de três proteínas de superfície (VP1 - 3) e uma proteína interna (VP4). Cinco desses protômeros interagem entre si para formar um pentâmero e a interação de doze pentâmeros, consequentemente, formam o capsídeo com 180 proteínas (60 cópias de cada VP1, VP2, VP3). A camada externa do capsídeo possui uma simetria icosaédrica considerada como pseudo  $T=3$ , pois a unidade básica icosaédrica é composta por três proteínas diferentes (Figura 4) <sup>14,17</sup>.

Figura 4: Capsídeo de rinovírus. (A) Simetria icosaédrica pseudo  $T=3$  do capsídeo de rinovírus. (B) Organização da unidade icosaédrica pseudo  $T=3$  das proteínas CPs do vírus *Human rhinovirus B14* (PDB ID 4rhv). As posições VP1 (azul), VP2 (verde), VP3 (vermelho) e VP4 interna (preto) correspondem ao arranjo espacial da proteína VP composta por subunidades com sequências de aminoácidos diferentes (heterotetrâmero).



Fonte: (A) Adaptado da referência 16, com autorização da Elsevier ©. (B) elaborada pela autora, 2021 utilizando o software PyMOL<sup>(TM)</sup> Molecular Graphics System, Version 2.6.0a0. Schrodinger, LLC.

### 2.3 Proteína de capsídeo picorna-like

Na década de 1980 foram determinadas por cristalografia de raios X a estrutura de alta resolução do *Southern Bean Mosaic Virus* (PBD ID 4sbv) e a estrutura do

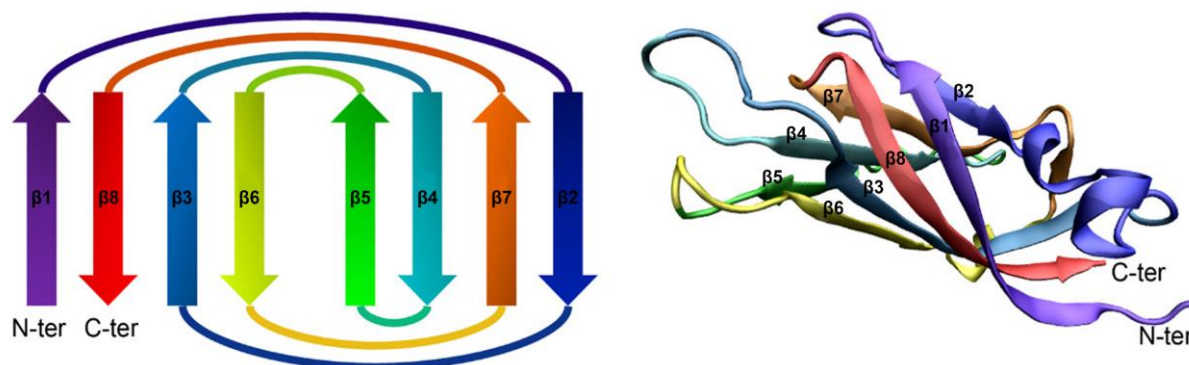


primeiro rinovírus humano, o *Rhinovirus 14* (PDB ID 4rhv) <sup>18-21</sup>. Ao comparar as proteínas do capsídeo desses dois vírus observou-se que ambos possuíam uma organização quaternária e dobras terciárias semelhantes, conhecida como *jelly-roll* (do tipo barril- $\beta$ ). Desde então, diversas estruturas de vírus como, por exemplo, vírus (+)ssRNA que infectam plantas (comovírus), insetos (nodavírus, dicistrovírus), bovinos (aftovírus) e humanos (enterovírus) revelaram que a dobra *jelly-roll* é uma organização comum dos capsídeos de vírus icosaédricos <sup>22</sup>.

Posteriormente, por meio de análises filogenéticas das sequências de proteínas conservadas e comparações da organização do genoma, os vírus (+)ssRNA foram agrupados em superfamílias. A superfamília dos vírus picorna-like que infectam hospedeiros taxonomicamente diversos, em especial, é caracterizada por um conjunto de genes parcialmente conservados sendo considerados, dessa maneira, como uma assinatura dessa superfamília. Além disso, a maioria dos vírus presentes nesta superfamília possuem virions icosaédricos compostos de proteínas do capsídeo com a característica dobra *jelly-roll*. Uma árvore filogenética para os vírus picorna-like foi proposta com base nos alinhamentos da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), proteína conservada entre as espécies, onde o gênero *Sobemovirus* e a família Picornaviridae foram agrupados em clados distintos <sup>23</sup>.

A dobra *jelly-roll*, típica dos vírus picorna-like, consiste em oito fitas  $\beta$  antiparalelas organizadas em duas folhas que formam os lados opostos do barril <sup>22</sup>. Conforme a topologia da dobra (Figura 5) existe uma única alça fechada entre as fitas  $\beta_4$  e  $\beta_5$ , que induz o pareamento por ligações de hidrogênio das fitas  $\beta_3$ - $\beta_6$  e  $\beta_1$ - $\beta_8$  para formar a folha  $\beta_1$ - $\beta_8$ - $\beta_3$ - $\beta_6$ . De maneira similar, os pares  $\beta_2$ - $\beta_7$  e  $\beta_4$ - $\beta_5$  também emparelham-se para formar a folha  $\beta_5$ - $\beta_4$ - $\beta_7$ - $\beta_2$  <sup>24</sup>. Nos vírus picorna-like o barril- $\beta$  é orientado de modo que todas as fitas sejam aproximadamente paralelas à superfície do capsídeo <sup>22</sup>. Em diferentes vírus ocorre uma maior diversidade nas regiões de *loop* que conectam as fitas  $\beta$ , com variações tanto no comprimento quanto nos elementos estruturais secundários <sup>25</sup>. Além disso, as proteínas de capsídeo com essas dobras frequentemente possuem segmentos em seus N- e C-terminais parcialmente desordenados, podendo ser importantes para a interação com a molécula de ácido nucleico <sup>24</sup>.

Figura 5: Topologia da dobra *jelly-roll*. Dobra observada em muitas proteínas de capsídeos com 8 fitas  $\beta$  antiparalelas formando duas folhas (esquerda) e diagrama da estrutura terciária da dobra *jelly-roll* (direita).



Fonte: Adaptado da referência 25.

## 2.4 Evolução natural

Em meados de 1960, Emile Zuckerkandl e Linus Pauling introduziram o uso de sequências de nucleotídeos e proteínas para investigar a evolução <sup>26</sup>. Entretanto, devido a intensa troca de material genético entre diferentes vírus e/ou entre seus hospedeiros, a filogenia viral com base na sequência genômica ou proteômica é limitada para vírus relativamente próximos na escala evolutiva. Uma vez que a estrutura terciária de proteínas demonstra ser mais conservada em comparação à sequência dos resíduos de aminoácidos, a similaridade estrutural pode fornecer informações evolutivas para vírus que se divergiram ainda mais no passado <sup>24,27</sup>. Com essas informações, vínculos evolutivos mais antigos entre vírus podem ser revelados e níveis superiores de classificação estabelecidos <sup>28</sup>. Nesse contexto, foi proposta uma origem evolutiva comum para dois vírus de dsDNA (bacteriófago PRD1 e o adenovírus humano -HAdV) que possuem proteínas de capsídeo com uma dobra *jelly-roll* dupla. Embora existam quatro maneiras diferentes das dobras *jelly-roll* de oito fitas se arranjam, apenas uma única forma é observada nesses vírus esféricos icosaédricos, indicando uma divergência evolutiva com uma ancestralidade comum <sup>29</sup>.

Como comentado anteriormente, os pequenos vírus (+)ssRNA infectam hospedeiros eucariotos filogeneticamente muito distantes, possuem uma arquitetura do capsídeo semelhante e suas proteínas de capsídeo compartilham a dobra *jelly-roll*. Essa semelhança estrutural pode ser considerada como evidência de homologia, motivando a ideia de que esses vírus podem compartilhar uma ancestralidade comum. Os indicativos de homologia incluem similaridades de estrutura secundária,

topológica, comprimento de loop, entre outros <sup>30</sup>. Uma hipótese evolutiva seria que o gene que codifica um domínio *jelly-roll* em um vírus T=3 triplicou e os três genes evoluíram independentemente para dar origem aos capsídeos de picornavírus com uma simetria pseudo T=3 <sup>31</sup>. Estruturas de alta resolução do *Bean Pod Mottle Virus* (Gênero: *Comovirus*) e do *Tobacco Ringspot Virus* (Gênero: *Nepovirus*), ambos pertencentes à superfamília dos vírus picorna-like, forneceram indícios de que essa hipótese pode estar correta <sup>32,33</sup>. O capsídeo dos comovírus é formado por duas proteínas, sendo uma composta por duas dobras *jelly-roll* e a outra composta por uma dobra *jelly-roll*, já o capsídeo dos nepovírus é composto por uma única proteína com três domínios *jelly-roll* ligados covalentemente. Uma vez que o capsídeo dos picornavírus é formado por três proteínas com um domínio de *jelly-roll* cada uma, os vírus dos gêneros *Comovirus* e *Nepovirus* podem ser grupos mais basais da evolução de picornavírus <sup>32</sup>. Com isso, é provável que os diversos grupos de vírus picorna-like evoluíram em uma etapa anterior à divergência dos cinco supergrupos eucarióticos, infectando hospedeiros que eram suscetíveis e depois coevoluiram com seus hospedeiros <sup>23</sup>.

## 2.5 Evolução artificial guiada

Proteínas que surgiram na natureza e evoluíram de forma natural levaram a inúmeras aplicações de sucesso na biotecnologia. Entretanto, características obtidas somente pela seleção natural apenas eventualmente são aquelas de organismos e biomoléculas procuradas pelos humanos para pesquisas e aplicações <sup>34</sup>. Nas últimas décadas, com a utilização de técnicas da biologia molecular em conjunto com ferramentas computacionais, explorou-se o desenvolvimento de proteínas com novas propriedades estruturais e químicas. A estratégia de manipulação de proteínas naturais com a finalidade de produzir versões melhoradas para uma aplicação específica é conhecida como evolução dirigida ou guiada <sup>35</sup>.

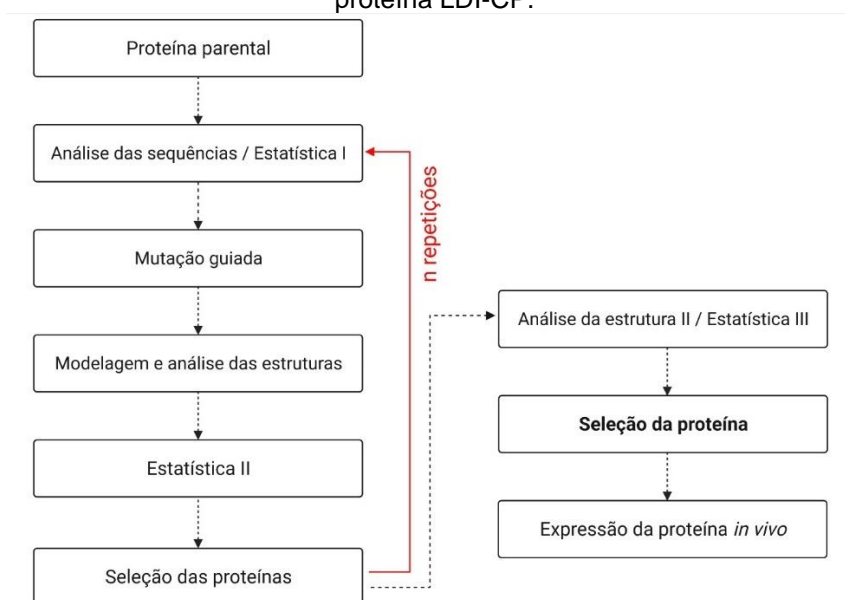
A evolução dirigida inicia com uma proteína nativa funcional e, por meio de sucessivas rodadas de mutação, são selecionadas as proteínas com as melhores características previamente definidas. Nessa metodologia, o gene parental é submetido a mutações de ponto, inserções e deleções. Após cada rodada de mutação, centenas a milhares de variantes serão testadas quanto às propriedades desejadas e, por conseguinte, uma biblioteca de variantes de proteínas que possuem mutações de interesse pode ser construída. As variantes selecionadas serão

utilizadas para próximas rodadas de evolução descartando-se as outras que não se enquadram nos parâmetros pré-determinados <sup>36,37</sup>. Essa diversificação da sequência e triagem são repetidas várias vezes para que mutações benéficas se acumulem e forneçam uma proteína com função mais próxima da desejada <sup>38</sup>. Ao final, as melhores proteínas, julgadas por vários parâmetros energéticos e geométricos são produzidas experimentalmente e testadas para a atividade em questão <sup>39</sup>.

A abordagem da seleção dirigida permite ir além das funções e propriedades naturais das proteínas adquiridas por meio da evolução e seleção natural, otimizando ou alterando as atividades de genes individuais e seus produtos gênicos. Essa estratégia, por exemplo, possibilita melhoramentos na atividade catalítica (incluindo aumento na estabilidade e especificidade), além de obtenção de novas atividades não aparentes na molécula parental <sup>34,36</sup>. Dessa forma, as biomoléculas obtidas por intermédio da evolução guiada podem ser projetadas para adquirir propriedades úteis para aplicações tecnológicas, científicas ou médicas <sup>38</sup>.

Para exemplificar as etapas envolvidas em um processo de evolução artificial guiada, a Figura 6 representa o esquema geral da evolução artificial guiada utilizada pelo Dr. Edgar Gonzalez-Kozlova para obtenção da sequência da proteína de capsídeo que será estudada neste trabalho.

Figura 6: Estratégia geral da evolução artificial guiada utilizada para a obtenção da sequência da proteína LDI-CP.



Fonte: Kozlova & Mansur (não publicado) e elaborada pela autora, 2021.

## 2.6 Expressão heteróloga de proteínas em bactérias

Atualmente, existem diversos sistemas para a expressão de proteínas heterólogas, incluindo bactérias, leveduras, células de insetos e linhagens de células de mamíferos cultivadas. Dentro desses, o sistema de expressão baseado em bactéria *Escherichia coli* K12 (*E.coli*) é o mais empregado laboratorialmente para a produção de proteínas recombinantes. Isso se deve ao fato dessa bactéria ser facilmente manipulada geneticamente e otimizada para a expressão em larga escala. Além disso, o crescimento de *E.coli* é rápido, faz uso de meios de cultivo baratos e equipamentos de fermentação acessíveis <sup>40</sup>.

O principal objetivo da expressão na célula bacteriana é a obtenção da proteína alvo em grandes quantidades. Entretanto, a expressão de uma proteína recombinante confere uma carga metabólica elevada na célula e a produção forçada de grandes quantidades de proteína pode resultar em proteínas dobradas incorretamente. Com isso, problemas frequentemente encontrados na expressão heteróloga com bactérias são o crescimento deficitário devido a toxicidade da proteína alvo dentro da célula hospedeira, degradação enzimática e a formação de corpos de inclusão (CI) <sup>41</sup>.

Os corpos de inclusão são normalmente agregados proteicos insolúveis, cuja formação geralmente resulta de interações entre regiões hidrofóbicas de intermediários do dobramento proteico. Além disso, no caso de proteínas conhecidas por sofrer polimerização (p.ex. proteínas de capsídeo), sua expressão em *E.coli* pode resultar na polimerização e montagem das partículas em vários graus de complexidade, levando a formação de CI insolúveis ou na partição das proteínas nas fases solúvel e insolúvel <sup>40,41</sup>.

A formação de CI às vezes pode ser evitada ou reduzida pela alteração do promotor, cepa hospedeira, condições de cultura e pela diminuição da taxa de produção da proteína recombinante. A produção mais lenta das proteínas em baixas temperaturas, por exemplo, permite o seu enovelamento adequado e, conseqüentemente, melhora o rendimento e/ou a solubilidade da proteína <sup>40,41</sup>. Um exemplo recente desse caso foi a produção da proteína de capsídeo do *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV). No trabalho de Willits *et al.*, <sup>42</sup>, a expressão foi realizada a 37 °C induzida com 1 mM de IPTG e, como resultado, a proteína recombinante foi obtida totalmente na fração insolúvel (CI). Em comparação, no estudo realizado por Díaz-valle *et al.*, <sup>43</sup>, ao diminuir a temperatura para 20 °C e a concentração de indutor para 0,5 mM de IPTG, a proteína foi obtida de maneira solúvel e, após etapas

de purificação, em uma pureza maior que o trabalho anterior. Dessa forma, as condições otimizadas permitiram que os polipeptídeos recém-formados se dobrassem corretamente na conformação nativa, mantendo a solubilidade e aumentando o rendimento após purificação.

Uma vez que o dobramento de proteínas *in vivo* é auxiliado por chaperonas, proteínas que previnem a agregação por interagirem transitoriamente com regiões hidrofóbicas em proteínas desdobradas, a utilização de cepas de bactérias que co-expressam chaperonas juntamente com a proteína alvo também é outro fator que pode aumentar a recuperação da proteína solúvel. Para algumas proteínas também pode ocorrer que as vias de dobramento que levam à conformação estável e corretamente dobrada requerem cofatores específicos no meio de crescimento, como íons metálicos, que podem ser adicionados à cultura <sup>40,41</sup>.

## 2.7 Aplicações

As partículas semelhantes a vírus (VLPs, do inglês *virus-like particles*) são capsídeos virais sem os materiais genéticos encapsulados. Essas nanoestruturas possuem diversas propriedades que as tornam úteis e interessantes para aplicações na área biomédica e nanotecnológica. Entre essas características podem ser citadas a estrutura com dimensões em nanoescala, alto grau de simetria, presença de uma cavidade interna, habilidade de automontagem, capacidade de resposta às condições ambientais, susceptibilidade às modificações químicas e genéticas, entre outras <sup>44-46</sup>.

As VLPs têm sido amplamente aplicadas no desenvolvimento de vacinas por serem capazes de estimular fortemente a imunidade com segurança e eficiência <sup>44</sup>. Exemplos de vacinas VLPs comerciais incluem as vacinas contra o Papiloma Vírus Humano (HPV) <sup>47,48</sup>, o vírus da Hepatite B (HBV) <sup>49,50</sup> e o vírus da Hepatite E (HEV) <sup>51,52</sup>. Recentemente, vários candidatos vacinais à base de VLP também foram propostos contra o vírus Zika <sup>53</sup>, o vírus Chikungunya <sup>54</sup> e multivalente contra quatro arbovírus <sup>55</sup>, além de vacinas para imunoterapia contra o câncer baseadas em VLPs de vírus de plantas <sup>56,57</sup>.

Essas nanoestruturas também são muito exploradas como carreadores para entrega direcionada de cargas terapêuticas <sup>50</sup>. Diversas moléculas já foram carreadas e entregues com sucesso às células-alvo por VLPs, incluindo drogas para o tratamento de câncer como Paclitaxel <sup>58</sup> e Doxorubicin <sup>59</sup> e pequenos RNAs de interferência (RNAi) para terapia gênica <sup>60</sup>. Além disso, as VLPs também podem ser

utilizadas para a encapsulação de enzimas ativas, promovendo reações catalíticas mais protetoras e estáveis <sup>61,62</sup> ou serem covalentemente conjugados a diversos agentes de imagem e usadas como reagentes para técnicas de imagem não invasivas, como ressonância magnética <sup>63</sup>.

Como as VLPs possuem superfícies interna e externa quimicamente distintas é possível conferir, simultaneamente e de forma simétrica, diferentes funcionalidades às partículas. Diversas modificações genéticas e químicas de VLPs foram desenvolvidas para inúmeras finalidades, sendo que apenas algumas aplicações foram aqui citadas. Existem poucas outras nanoplataformas que oferecem concomitantemente as propriedades das partículas semelhantes a vírus e essa capacidade de alteração da funcionalidade por meios químicos e genéticos <sup>44,64,65</sup>.

Portanto, a produção e purificação de proteínas sintéticas de capsídeo que podem se rearranjar em partículas semelhantes a vírus estáveis é de grande interesse tanto para diversas aplicações quanto para o entendimento da evolução dos vírus. Nesse contexto, nosso trabalho visa investigar se a expressão de um gene produzido *in silico* gera uma proteína sintética com a capacidade de se rearranjar e produzir uma VLP com as propriedades observadas nas partículas naturais.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Expressar, purificar e analisar a funcionalidade de uma proteína de capsídeo artificial cujo gene foi obtido *in silico* por evolução artificial guiada.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Expressar em cepas de *ArcticExpress* (DE3) a proteína mutante LDI-CP;
- Purificar a proteína LDI-CP utilizando ultracentrifugação em gradientes de densidade e cromatografia de exclusão molecular;
- Verificar o grau de homogeneidade estrutural e o tamanho das partículas por espalhamento dinâmico de luz (DLS);
- Avaliar a estabilidade térmica da proteína LDI-CP por nanoDSF;
- Analisar a estrutura do capsídeo artificial LDI-CP por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- Observar a resposta imunológica humoral dos camundongos imunizados, através de um ensaio de Western Blot.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Equipamentos e reagentes

Tabela 1: Lista de equipamentos utilizados.

<b>Incubadora</b>	Incubadora modelo TE-420 (Tecnal)
<b>Espectrofotômetro</b>	Espectrofotômetro UV-visível (mono-feixe) modelo UV-M51 (BEL Engineering)
<b>pHmetro</b>	pHmetro DM-22 (Digimed)
<b>SDS-PAGE</b>	SureCast Gel Handcast System (Thermo Fischer Scientific) Mini Gel Tank (Thermo Fischer Scientific) PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad)
<b>Módulo de transferência</b>	XCell II™ Novex mini-Cell (Invitrogen)
<b>Sistema de fotodocumentação</b>	Fotodocumentador Chemidoc MP (Bio-Rad) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB).
<b>Sonicador ultrassônico</b>	Fisherbrand™ Q125 (Fisher Scientific) com ponteira modelo CL-18. Bransonic® ultrasonic cleaner 2210 (Branson)
<b>Centrífugas</b>	Centrífuga Eppendorf MiniSpin® não refrigerada. Rotor: F-45-12-11. Centrífuga Eppendorf 5810 R. Rotor: Swinging-bucket A-4-62. Ultracentrífuga OPTIMA XE-100 do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB). Rotor: Swinging-bucket SW 41 Ti.
<b>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</b>	Microscópio modelo JEOL-JEM-1400Plus do Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz Paraná).
<b>Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e Fluorimetria Diferencial de Varredura em nanoescala (nanoDSF)</b>	Prometheus Panta (Nanotemper) do Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz Paraná).
<b>Leitor de placas</b>	Leitor de microplacas BioTek ELX 800

Fonte: elaborada pela autora, 2022.

Tabela 2: Tampões, soluções, meios e consumíveis utilizados.

<b>Meios de cultura:</b>	
Luria Bertani, Lennox (LB)	10 g/L triptona, 5 g/L NaCl, 5 g/L extrato de levedura
LB/Ágar	1,5 % (m/v) ágar em LB
Terrific Broth (TB)	#22711022 (Thermo Fischer Scientific)
<b>Antibióticos:</b>	
Ampicilina	Ampicilina sódica (Sigma-Aldrich) Estoque: 100 mg/mL em 50% etanol (v/v) Trabalho: 100 µg/mL
Streptomicina	Sulfato de streptomicina (Sigma-Aldrich) Estoque: 50 mg/mL em água MilliQ Trabalho: 75 µg/mL
<b>Lise Celular:</b>	
Tampão de lise	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 0,1 mg/mL lisozima (#89833, Thermo Fischer Scientific); Pierce Universal nuclease para lise celular (#88702, Thermo Fischer Scientific).
<b>SDS-PAGE:</b>	
Tampão gel separador	1,5 M Tris-HCl, pH 8.8
Tampão gel concentrador	0,5 M Tris-HCl, pH 6.8
Solução persulfato de amônio (APS)	10 % (m/v) em água ultrapura
Solução dodecil sulfato de sódio (SDS)	10 % (m/v) em água ultrapura
TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina)	~99 % (Sigma Aldrich)
Tampão de corrida (1X)	25 mM Tris base; 192 mM glicina; 1% SDS
Tampão de amostra (2X)	100 mM Tris-Cl pH 6.8; 5% 2-Mercaptoethanol; 4% SDS; 20% Glicerol; 0,4% Azul de Bromofenol
Marcador	Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder #26623, Faixa de tamanho 10-260 kDa (Thermo Fisher Scientific)
<b>Coloração por nitrato de prata:</b>	Solução N1 e N6: 40% etanol; 10% ácido acético

Solução N2: 30% Etanol  
 Solução N3: 0,02% Tiosulfato de sódio  
 Solução N4: 0,2% Nitrato de prata; 0,075%  
 Formaldeído (36-38%)  
 Solução N5: 6% Carbonato de sódio; 0,05%  
 Formaldeído (36-38%); 0,0004% Tiosulfato  
 de sódio

### Western Blot:

Tampão de transferência	25 mM Tris Base; 192 mM Glicina; 20% de metanol
Membrana de nitrocelulose	Amersham Protran 0.45 NC (GE Healthcare)
Solução corante Ponceau S	1% (m/v) Ponceau S em 10% HCl
Solução Salina Tamponada com Tris (TBS)	20 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl
Solução Salina Tamponada com Tris e Tween 20 a 0,1% (TBST)	20 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,1% Tween-20
Anticorpo primário	Anticorpo monoclonal anti poli-Histidina produzido em camundongo (#H1029, Sigma Aldrich).
Anticorpo secundário	Anti-IgG de camundongo conjugado com a enzima peroxidase (#7076S, Cell Signaling)
Kit para revelação membrana	Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (#32106, Thermo Scientific™)

### Cromatografia de exclusão molecular:

Tampão SEC	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 10% glicerol
------------	--

---

Fonte: elaborada pela autora, 2022.

## 4.2 Bioinformática

As análises de bioinformática e a evolução artificial guiada foram realizadas pelo Dr. Edgar Gonzalez-Kozlova, cuja metodologia resumida consta na Figura 6. Brevemente, foram comparadas todas as proteínas de capsídeo disponíveis no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) <sup>66</sup> até janeiro/2017. Com base em: 1) proteínas de capsídeo com baixo grau de identidade em suas sequências primárias; 2) estruturas

terciárias semelhantes; 3) estruturas que se auto-organizam e 4) composição de no máximo três subunidades proteicas, foram selecionadas cinco proteínas de capsídeos de vírus animais (Gêneros: *Rhinovirus*, *Aphthovirus*, *Astrovirus*, *Hepatovirus* e *Iflavirus*) e uma de vírus de planta (*Sobemovirus*). As 6 proteínas foram mutadas baseando-se em padrões de mutação conhecidos (PAM) e, após cada ciclo (~10% de mutações na sequência primária), a sequência mutante de cada proteína foi selecionada de modo que fosse a mais próxima das outras 5 proteínas e com condições de enovelamento e dinâmica com probabilidade de serem viáveis. Em cada ciclo de mutação e seleção aproxima-se de uma sequência primária mantendo as características das 6 proteínas originais. O ciclo foi repetido até a obtenção de uma sequência com as características pré-determinadas para posteriores estudos de dinâmica molecular, previsão estrutural, entre outros. Neste trabalho especificamente foi estudada a proteína obtida a partir da proteína parental do *Southern Bean Mosaic Virus* (gênero *Sobemovirus*).

#### **4.3 Clonagem dos genes wild-SBMV e LDI-CP em vetor de expressão**

Após as análises de bioinformática, as sequências de DNA dos genes das proteínas selvagem (wildSBMV) e mutante (LDI-CP) foram códon otimizadas para expressão em sistema bacteriano, sintetizados e clonados no vetor de expressão pET14b nos sítios de restrição NdeI/BamHI pela empresa GenScript. Na construção do mapa do vetor de expressão (Apêndice A) foi adicionado na extremidade N-terminal da proteína uma cauda contendo 6 resíduos de histidina (His-Tag) e um sítio de clivagem para a protease trombina.

#### **4.4 Transformação de bactérias quimiocompetentes**

A cepa de bactéria de expressão quimiocompetente *ArcticExpress* (DE3) foi transformada por meio da técnica de choque térmico. Para a transformação, foi adicionado 1 µl do vetor de expressão pET14b-LDI-CP (50 ng/µl) em 50 µl da bactéria quimiocompetente e incubada no gelo durante 20 minutos. Em seguida, as células sofreram um choque térmico: 45 segundos a 42 °C e 2 min no gelo. Após isso, adicionou-se 1 ml de meio LB às bactérias seguida de incubação a 37 °C por 60 minutos. As bactérias foram selecionadas em meio sólido LB/Ágar suplementado com ampicilina e streptomicina como antibióticos de seleção. As placas foram deixadas em estufa a 37 °C por 16 h. Após, uma única colônia foi coletada e um pré-inóculo foi feito utilizando-se 10 ml de meio LB suplementado com ampicilina/streptomicina em uma

incubadora com agitação (37 °C, 16h, 150 rpm). Esse pré-inóculo foi estocado em temperatura de -80°C contendo 20% de glicerol (v/v).

#### **4.5 Expressão da proteína LDI-CP**

Para 1 litro de meio TB novo suplementado com ampicilina foi transferido 2% do pré-inóculo e o cultivo foi mantido sob agitação à 37°C até que a densidade óptica (DO) medida em um comprimento de onda de 600 nm estivesse entre 0,6 - 0,8. A expressão das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de isopropil-βD-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 1 mM e o cultivo mantido sob agitação (25 °C, 4h, 150 rpm). Alíquotas de antes e depois da indução com IPTG foram retiradas e centrifugadas a 12100 x g durante 5 min em TA, ressuspensas em tampão de amostra 2X e armazenadas a -20 °C para posterior análise proteômica.

#### **4.6 Lise celular e isolamento dos corpos de inclusão (CI)**

Após a expressão, as células cultivadas a partir de 1 litro de expressão foram sedimentadas por centrifugação (3200 x g; 23 °C; 30 minutos) e ressuspensas em 20 ml do tampão de lise. Seguida de incubação em gelo por 30 min, a lise celular foi realizada por meio de sonicação durante 10 minutos (10 ciclos de 30 segundos com intervalos de 30 segundo e amplitude de 60%) em gelo utilizando sonicador de ponteira. Após, os corpos de inclusão (CI) foram isolados por centrifugação a 3200 x g por 60 minutos à 4 °C. Uma alíquota do sobrenadante e do pellet foi coletada, ressuspensa em tampão de amostra para SDS-PAGE e armazenada à -20 °C para posterior análise. O restante do pellet, contendo os CI, será lavado 2X com 50 mM Tris-HCl pH 7,5 contendo 1 mM de PMSF, e então armazenado em -20°C até a utilização nas próximas etapas de purificação da proteína recombinante.

#### **4.7 Purificação da proteína LDI-CP**

##### **4.7.1 Colchão de sacarose**

As etapas de purificação foram realizadas de acordo com Lokesh *et al.*,<sup>67</sup>, com modificações. A primeira etapa de purificação foi realizada utilizando um colchão de sacarose com concentração de sacarose igual a 30% (m/v) diluída em 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM de PMSF (concentração final) e filtrada em membrana de 0,45 µm. Para o colchão, 2,0 ml dos corpos de inclusão isolados na etapa anterior foram ajustados para um volume final de 8 ml utilizando o mesmo tampão citado anteriormente. Nos tubos de ultracentrífuga foram adicionados os 2 ml da solução do

colchão de sacarose 30 % seguida dos 8,0 ml dos CI e submetidos a ultracentrifugação (200000 x g; 4 °C; 3 horas) com desaceleração mínima. As frações foram coletadas e o pellet resultante foi ressuspendido em 2,0 ml de tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,5 e utilizado na próxima etapa de purificação por gradiente de sacarose.

#### **4.7.2 Gradiente de sacarose**

Todas as soluções de sacarose (20, 30, 40 e 50%) utilizadas no gradiente foram preparadas em tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM de PMSF (concentração final) e filtradas em membranas de 0,45 µm. Em tubos de ultracentrífuga foram adicionados lentamente 2 ml de cada solução de sacarose (de 20% a 50%), no topo do gradiente os 2,0 ml do pellet resultante do colchão de sacarose e então ultracentrifugados (150000 x g; 4 °C; 3 horas) com desaceleração mínima. As frações foram coletadas individualmente e o pellet resultante foi ressuspendido em 1,0 ml de tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,5.

A fração mais pura contendo a VPL foi concentrada por ultrafiltração utilizando um filtro de poro 100 kDa (Amicon Ultra Millipore) e então submetida à última etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC, do inglês *Size Exclusion Chromatography*).

#### **4.7.3 Cromatografia de exclusão molecular**

Na SEC, a separação de proteínas e outros compostos é com base no tamanho (ou mais especificamente nos raios de Stokes), que possui correlação com a massa molecular dos analitos. As maiores proteínas não penetram nos poros e eluem primeiro e as proteínas subsequentes são eluídas em ordem decrescente de tamanho<sup>68</sup>.

Para essa etapa utilizou-se coluna Superdex<sup>®</sup> 200 10/300 GL (diâmetro: 1 cm; altura: 30 cm; volume: ~24 ml) com limite de pressão de 1,5 MPa, acoplada ao sistema ÄKTA avant 25 (Cytiva, antiga GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 10% glicerol) e fluxo de 0,5 ml/min. A eluição foi isocrática e com fluxo constante de 0,5 ml/min. A purificação foi monitorada no comprimento de onda 280 nm e as frações de interesse foram coletadas, concentradas por ultrafiltração utilizando um filtro de poro 10 kDa (Amicon Ultra-15 Millipore) e analisadas através de SDS-PAGE 12,5 %.

#### 4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) é uma técnica em que ocorre a separação de proteínas em um campo elétrico com base na massa molecular. O uso do detergente aniônico SDS elimina em grande parte a influência da carga intrínseca das proteínas, pois o SDS liga-se nas regiões hidrofóbicas e fornece carga negativa proporcional ao comprimento da cadeia polipeptídica, fazendo com que as moléculas migrem em direção ao ânodo (polo positivo). Além disso, o SDS é associado a outro agente desnaturante que reduz as ligações dissulfeto intra e intermoleculares, fazendo com que as proteínas se desdobrem em cadeias lineares e sejam separadas apenas com base no tamanho molecular <sup>69</sup>.

As amostras coletadas em cada passo do processo de expressão e purificação das proteínas de capsídeo foram desnaturadas por fervura (96 °C, 10 min) em tampão de amostra desnaturante para eletroforese. As amostras e um padrão de massa molecular foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida 12,5% segundo Laemmli <sup>70</sup> com amperagem de 25-30 mA por gel. Após a eletroforese, as bandas proteicas foram visualizadas por coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Apêndice B) ou por coloração com nitrato de prata, de acordo com Lawrence e Besir <sup>71</sup> e Blum, Beier e Gross <sup>72</sup> modificado (Tabela 2), respectivamente.

Para a coloração por nitrato de prata, após a eletroforese o gel foi fixado com a solução N1 por 16h, seguida de lavagens de 3 × 20 min com a solução N2 e sensibilizado com a solução N3 por exatamente 1 min. Na sequência, o gel foi lavado 3 × 20 segundos com água ultrapura e impregnado com nitrato de prata (solução N4) por 20 min. Após lavagens com água ultrapura (3 × 20s), as bandas proteicas do gel foram reveladas com a solução N5. O excesso da solução foi retirado com 2 lavagens de 2 min com água ultrapura e a revelação foi parada com a solução N6 por 10 min.

#### 4.9 *Western Blot*

*Western Blot* (WB) é uma técnica de imunodeteção de proteínas utilizando anticorpos específicos para a proteína desejada em um suporte sólido (membrana). A transferência das proteínas do gel para a membrana (p.ex. nitrocelulose) ocorre com a aplicação de um campo elétrico orientado perpendicularmente à superfície do gel e a visualização das proteínas por meio de anticorpos. O anticorpo específico (anticorpo primário) reconhece um epítipo da proteína, podendo este ser do tipo policlonal

(identifica mais de um epítopo da proteína de interesse) ou monoclonal (reconhece apenas um epítopo). Para a detecção do sinal geralmente utiliza-se um anticorpo secundário anti-IgG do organismo no qual foi produzido o anticorpo primário, que é conjugado com uma enzima reveladora (p.ex. Horseradish peroxidase - HRP). Na revelação da membrana adiciona-se o substrato da enzima, que na presença de luminol gera um sinal detectável devido à reação de quimioluminescência (Apêndice B) <sup>73,74</sup>.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando o módulo de transferência por 2 horas à 25V em tampão de transferência. A qualidade da transferência foi verificada usando o corante Ponceau S. Em seguida, a membrana foi bloqueada para evitar que os anticorpos se liguem à membrana de forma inespecífica com uma solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó desnatado em tampão TBST durante 45 min, TA. A membrana foi lavada 3x de 5 min com TBST seguida de incubação com anticorpo primário na proporção de 1:10000 em solução de TBST contendo 5% de albumina de soro bovino (BSA) por 16 h à 4 °C. Após esse tempo, a membrana foi lavada 3x de 5 min com TBST e incubada com o anticorpo secundário na proporção de 1:5000 em solução de TBST- 5% de BSA durante 1h, TA. Após lavagens de 3x 5 min com TBST e 2x 5 min com TBS, a membrana foi incubada por 1 min com solução de revelação preparada de acordo com protocolo do fabricante do kit comercial Pierce™ ECL Western Blotting Substrate. A detecção das bandas foi realizada utilizando o Fotodocumentador Chemidoc (BioRad).

#### **4.10 Quantificação proteína total**

A quantificação de proteína total foi realizada pelo método de quantificação colorimétrica utilizando ácido bicinconínico (BCA). O princípio do método baseia-se na redução de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  pela proteína em meio alcalino, formando um quelato roxo quando  $\text{Cu}^{1+}$  complexa com BCA, que é quantificado por meio de absorbância (Apêndice B) <sup>75</sup>.

Para a quantificação foi utilizando o kit Pierce *BCA Protein Assay* kit (Thermo Scientific), de acordo com o instruções do fabricante. Para elaboração a curva padrão foram realizadas diluições seriadas de uma proteína padrão (BSA) para as seguintes concentrações: 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,03125 mg/ml. Após incubação à 37 °C por 30 min., a detecção foi realizada em leitor de placas no comprimento de



onda 540 nm, os dados foram plotados utilizando o software GraphPad Prism versão 5.01 e a concentração foi obtida com a equação da reta da curva padrão de BSA.

#### 4.11 Caracterização físico-química

As análises para a caracterização físico-química da LDI-CP foram realizadas no Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz Paraná) em parceria com a *Dr<sup>a</sup>* Beatriz G. Guimarães.

A técnica de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) utiliza a dispersão da luz por partículas em um fluido para medir seus coeficientes de difusão e raio hidrodinâmico ( $R_h$ ). As flutuações na intensidade da luz espalhada são consequência do movimento browniano aleatório das partículas, no qual partículas maiores se movem mais lentamente. O coeficiente de difusão e as informações de tamanho de partícula (pela equação de Stokes-Einstein) podem ser obtidos à partir da análise dessas flutuações<sup>76,77</sup>.

A técnica de Fluorimetria Diferencial de Varredura em nanoescala (nanoDSF) é utilizada para o estudo da estabilidade térmica de proteínas em diferentes condições, triagem de ligantes e estimativa de suas afinidades. A fluorescência intrínseca de uma proteína ocorre devido à presença de resíduos de aminoácidos aromáticos, sendo o triptofano (Trp) o aminoácido que mais contribui para o sinal. A fluorescência intrínseca do triptofano é fortemente influenciada por mudanças no microambiente da proteína. Após excitação em comprimento de onda 280 nm, o máximo de emissão de fluorescência do Trp em um ambiente apolar é em torno de 330 nm. Já em um ambiente polar, a intensidade de emissão de Trp geralmente diminui e o pico de emissão sofre um desvio para o vermelho para cerca de 350 nm. Isso normalmente ocorre quando os resíduos de Trp do núcleo hidrofóbico de uma proteína ficam expostos à água após desnaturação/desdobramento. No nanoDSF são determinados alguns parâmetros, onde a temperatura de fusão ou temperatura de desnaturação térmica ( $T_m$ ) indica o desdobramento de 50% de uma proteína. A  $T_m$  é experimentalmente determinada pelo ponto de inflexão da curva sigmoideal característica do plote da razão das emissões nos comprimentos de onda de 330 nm e 350 nm, quando uma rampa de temperatura linear é aplicada para desdobrar as proteínas<sup>78-80</sup>.

A amostra purificada e quantificada da LDI-CP foi previamente centrifugada a 10000 x g por 1 h, TA, inserida em capilares (*Prometheus NT.48 capillaries nanoDSF*

*grade standard*) e analisadas no equipamento *Prometheus Panta* (NanoTemper) ajustando no software as correções da viscosidade do tampão. As medidas de raio hidrodinâmico foram realizadas em duplicata em temperatura de 20 °C seguida dos parâmetros térmicos em uma faixa de temperatura de 20 °C à 90 °C com incremento de 1 °C/min para o desdobraimento e redobraimento proteico. Os dados de DLS e nanoDSF foram analisados utilizando o software do equipamento.

#### **4.12 Microscopia Eletrônica de Transmissão**

As análises de microscopia eletrônica de transmissão da amostra purificada e quantificada da LDI-CP foram realizadas no Instituto Carlos Chagas (*ICC/Fiocruz Paraná*) pela Dr<sup>a</sup> Lia Carolina Medeiros.

Na microscopia eletrônica de transmissão (MET) a formação da imagem baseia-se na interação de uma amostra ultrafina com um feixe de elétrons de alta voltagem (10 – 120 kV). Ao atravessar o material, o feixe de elétrons interage com a matéria e os elétrons transmitidos são projetados em uma placa fotográfica ou são detectados por um sensor como uma câmera CCD. Uma técnica de coloração amplamente utilizada para amostras biológicas é a coloração negativa com a utilização de sais de metais pesados, tais como urânio e molibdênio. A coloração negativa baseia-se na diferença de massa e espessura entre o material biológico e a coloração circundante, o que aumenta o contraste da imagem e permite a observação da superfície e da forma de uma molécula biológica ou outra partícula sem solvente. As amostras preparadas com essa técnica de coloração podem ser visualizadas imediatamente no microscópio, permitindo a avaliação rápida da qualidade da estrutura biológica. Além disso, muitas vezes a MET é utilizada como uma técnica de triagem e otimização para outros estudos estruturais que são mais demorados e dispendiosos, como microscopia crioeletrônica e cristalografia de raios X<sup>81,82</sup>.

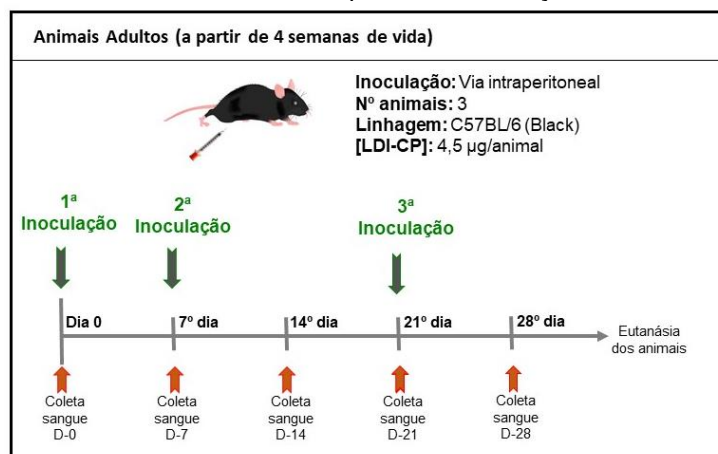
Para a análise de MET, foram utilizadas grades de cobre de malha 300 revestidas com 0,5% de Formvar e reforçadas com revestimento de carbono. Em seguida, a amostra LDI-CP diluída (FD=10) foi depositada na grade, o excesso cuidadosamente retirado com auxílio de papel filtro e coradas com acetato de uranila 2%, removendo o excesso de corante. Após secagem em temperatura ambiente, as grades foram analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão (JEOL-JEM-1400Plus) operando a 80 keV.

#### 4.13 Inoculação de camundongos

Para os estudos de imunogenicidade da proteína LDI-CP, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Santa Catarina. A manipulação, inoculação e coleta de sangue dos animais foram realizadas pelo Dr. Daniel Mendes do Laboratório de Imunobiologia-UFSC. A autorização para o uso dos animais utilizados para as imunizações e coletas de sangue está inclusa no projeto já aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o número 8278290818.

Os camundongos foram expostos, via intraperitoneal, a uma dose de 4,5 µg da proteína LDI-CP na presença de 50 µl do adjuvante incompleto de Freund (Sigma) e 150 µl de solução salina. O protocolo de imunização (Figura 7) foi repetido 7 e 21 dias após a 1ª inoculação seguidas de coletas de sangue para a retirada do soro. A eutanásia dos três animais ocorreu 35 dias após a 1ª inoculação seguida da remoção do sangue por meio de punção cardíaca para a separação do soro contendo os anticorpos anti-LDI. Além disso, foram coletadas amostras de sangue antes da inoculação com a proteína (soro pré-imune) e semanalmente após a primeira inoculação. O sangue coletado foi mantido em TA por 30 min e em seguida, mantido a 4 °C por 30 min para formação e retenção do coágulo, facilitando assim a coleta do soro. Após, para a separação da fração correspondente ao soro, o sangue foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos. O soro dos animais foi armazenado em -20 °C e posteriormente utilizado como anticorpo primário em WB, nas diluições 1:500, 1:1000 e 1:2000.

Figura 7: Esquema do protocolo de imunização. Camundongos C57BL/6 foram imunizados (dia 0) com o antígeno LDI-CP e submetidos a um novo desafio sete e 21 dias após. O sangue foi coletado semanalmente após a 1ª inoculação.



Fonte: elaborada pela autora, 2022.

#### **4.14 Segurança no laboratório e tratamento de resíduos**

Todos os integrantes do Laboratório de Imunobiologia participam de um curso de biossegurança para orientações de boas práticas e segurança no laboratório. Neste curso são tratadas questões referentes aos níveis de biossegurança do laboratório, equipamentos de proteção individual e coletiva, risco e manipulação correta de reagentes frequentemente utilizados no laboratório, uso correto dos equipamentos, descarte dos resíduos perigosos, entre outros.

As bactérias são manipuladas em capelas de fluxo laminar e reagentes químicos voláteis ou tóxicos são manipulados em capelas de exaustão. Os resíduos das atividades realizadas no laboratório são, na maioria, de natureza biológica, sendo descartados em sacos brancos identificados e em alguns casos esterilizados em autoclave e descartados como lixo comum. Resíduos químicos são segregados, identificados e encaminhados para o descarte. Materiais perfurocortantes são descartados no coletor de perfurocortantes imediatamente após o uso. Tubos e vidrarias que foram utilizadas para o cultivo de bactérias passam por desinfecção com solução de hipoclorito de sódio 2%. Equipamentos de proteção individual (EPI's) são fornecidos e estão disponíveis, entre eles óculos de proteção, luvas e jalecos.

No Apêndice C estão relacionados os reagentes químicos utilizados nesse trabalho que possuem pictogramas de perigo segundo a classificação da *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals* (GHS).

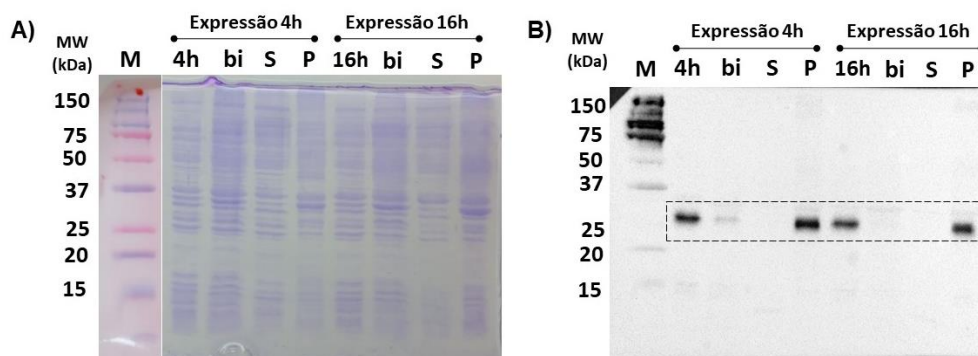
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína LDI-CP com a cauda de histidina e o sítio de trombina possui 281 aminoácidos (261 aminoácidos somente a LDI) com massa molecular e ponto isoelétrico teóricos de 29840,82 Da e 9,11, respectivamente, de acordo com o programa ExPASy ProtParam<sup>83</sup>. Através da massa molecular do monômero pode-se identificar a proteína com as técnicas de SDS-PAGE e *Western Blot*. Com base no *pI* teórico, as etapas de purificação foram realizadas em tampão Tris-HCl pH 7.5, ou seja, pelo menos uma unidade abaixo do *pI* para evitar precipitações da proteína alvo e minimizar a formação de agregados proteicos.

### 5.1 Expressão, purificação e quantificação da proteína LDI-CP

Inicialmente, testes de expressão da proteína LDI-CP foram realizados utilizando a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) em temperatura de 30 °C por 16h. Após a lise celular, o teste de solubilidade demonstrou que a proteína se encontrava insolúvel nos corpos de inclusão (dados não mostrados). Com a finalidade de melhorar a solubilidade da LDI-CP, a cepa *ArcticExpress* (DE3) foi transformada com o vetor pET14b-LDI-CP e novos testes de expressão e solubilização foram realizados em meio TB, 25 °C nos tempos de 4h e 16h de expressão após indução com 1 mM de IPTG. O resultados do WB (Figura 8) demonstra que a proteína LDI-CP foi expressa em *ArcticExpress* (DE3) no tamanho esperado (~30 kDa) e, como observado para a cepa BL21 (DE3), a proteína está presente na fração insolúvel (CI). No entanto, a expressão em *ArcticExpress* (DE3) da proteína LDI-CP necessitou de menos tempo em comparação com a cepa utilizada anteriormente, dessa forma, a melhor condição escolhida para a expressão da LDI-CP foi em bactéria *ArcticExpress* (DE3) à 25 °C por 4h.

Figura 8: Perfil proteico da expressão de LDI-CP em *ArcticExpress* (DE3). A) SDS-PAGE 12,5%, coloração por Coomassie Brilliant Blue e B) Western Blot, anticorpo primário: anticorpo monoclonal anti poli-Histidina (1:10000). M: Marcador de peso molecular; bi: antes da indução com IPTG; S: sobrenadante após lise celular e P: Pellet contendo CI. Caixa preta tracejada indica a LDI-CP.



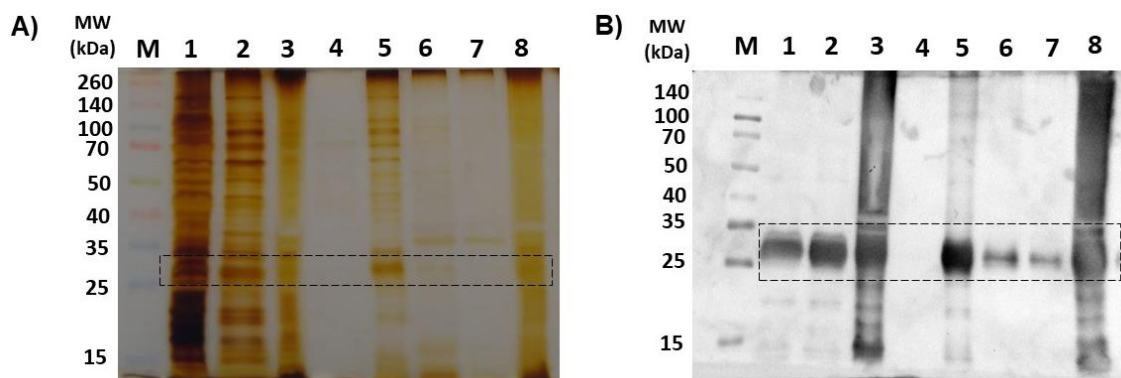
Fonte: elaborada pela autora, 2022.

A expressão heteróloga de proteínas que formam VLPs já foi relatada em diversos sistemas de expressão, como bactérias<sup>42,43,67,84,85</sup>, leveduras<sup>86</sup>, células de insetos<sup>87,88</sup> e células de mamíferos<sup>54,87</sup>. Dentro disso, existem relatos de expressão de proteínas solúveis<sup>43,67,88</sup> e insolúveis<sup>42,84,85</sup> quando lise celular foi aplicada.

A purificação da proteína mutante LDI-CP dos CI foi realizada por meio de fracionamento em gradiente de densidade utilizando diferentes concentrações de sacarose. Partículas com densidades diferentes se deslocam dentro de um gradiente, por meio de ultracentrifugação, até atingirem um equilíbrio de densidade.

Para melhorar a eficiência do isolamento da LDI-CP, foi realizada uma primeira etapa de purificação utilizando um colchão de sacarose (CS) com uma concentração igual a 30% (m/v). Outros trabalhos que fazem uso de uma etapa de colchão de sacarose para a purificação ou concentração de VLPs empregaram uma metodologia semelhante à utilizada para a purificação de LDI-CP. Podem ser citados a purificação da VLP de *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) com um colchão sacarose de 20% e um colchão de 30% para a VLP de poliomavírus murino<sup>88,89</sup>. A metodologia utilizando o colchão de sacarose demonstrou ser eficiente para tornar a proteína LDI-CP solúvel e remover uma quantidade considerável de impurezas, como pode ser observado ao comparar as canaletas 1 com as canaletas 2 e 3 da Figura 9. Em seguida, o pellet resultante do colchão de sacarose foi submetido à uma segunda etapa de purificação em um gradiente de sacarose (GS) de 20 a 50%. Com essa etapa, a proteína de interesse ficou concentrada majoritariamente em uma única fração do gradiente (30% – canaleta 5 da Figura 9) e houve um aumento da pureza.

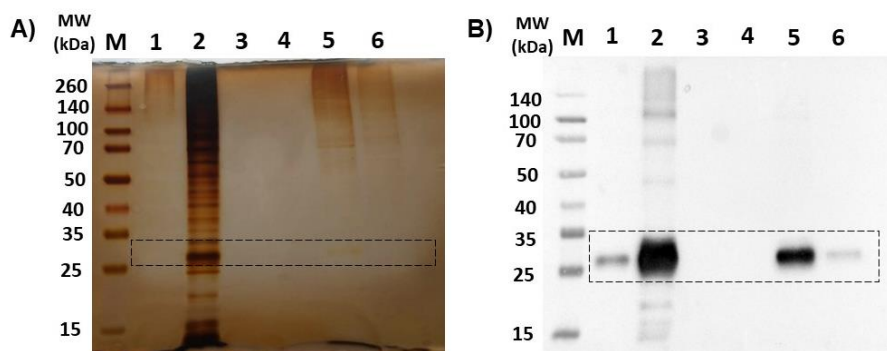
Figura 9: Perfil proteico da purificação da LDI-CP por colchão de sacarose (CS) e gradiente de sacarose (GS). A) SDS-PAGE 12.5%, coloração por nitrato de prata e B) Western Blot, anticorpo primário: anticorpo monoclonal anti poli-Histidina (1:10000). M: Marcador de peso molecular; 1: Fração superior; 2: colchão 30%; 3: Pellet CS; 4-7: 20-50% frações GS; 8: Pellet GS. Caixa preta tracejada indica a posição da LDI-CP.



Fonte: elaborada pela autora, 2022.

Com base nesses resultados, assim como estudos anteriores realizados pelo Dr. Edgar, em que foi observado a formação de nanopartículas montadas dentro de células (Anexo A), a proteína LDI-CP purificada poderia também se apresentar em uma forma homo-oligomérica em solução com massa molecular maior que 100 kDa. Com isso em mente, submeteu-se a fração 30% oriunda do gradiente de sacarose à ultrafiltração com filtro de poro 100 kDa na tentativa de remover contaminantes menores e concentrar a proteína alvo. Apesar da solução contendo a LDI-CP ainda apresentar contaminantes, a proteína se concentrava majoritariamente na fração retida, indicando que possivelmente estão presentes oligômeros maiores que 100 kDa. Dessa forma, esse resultado demonstra um indício da capacidade de autoassociação e formação de VLP da proteína sintética LDI-CP em solução (Figura 10 canaletas 1 e 2).

Figura 10: Perfil proteico da purificação da LDI-CP por cromatografia de exclusão molecular. A) SDS-PAGE 12.5%, coloração por nitrato de prata e B) Western Blot, anticorpo primário: anticorpo monoclonal anti poli-Histidina (1:10000). M: Marcador de peso molecular; 1: fração não retida (100 kDa); 2: Fração injetada; 3-6: Frações coletadas da SEC. Caixa preta tracejada indica a posição da LDI-CP.

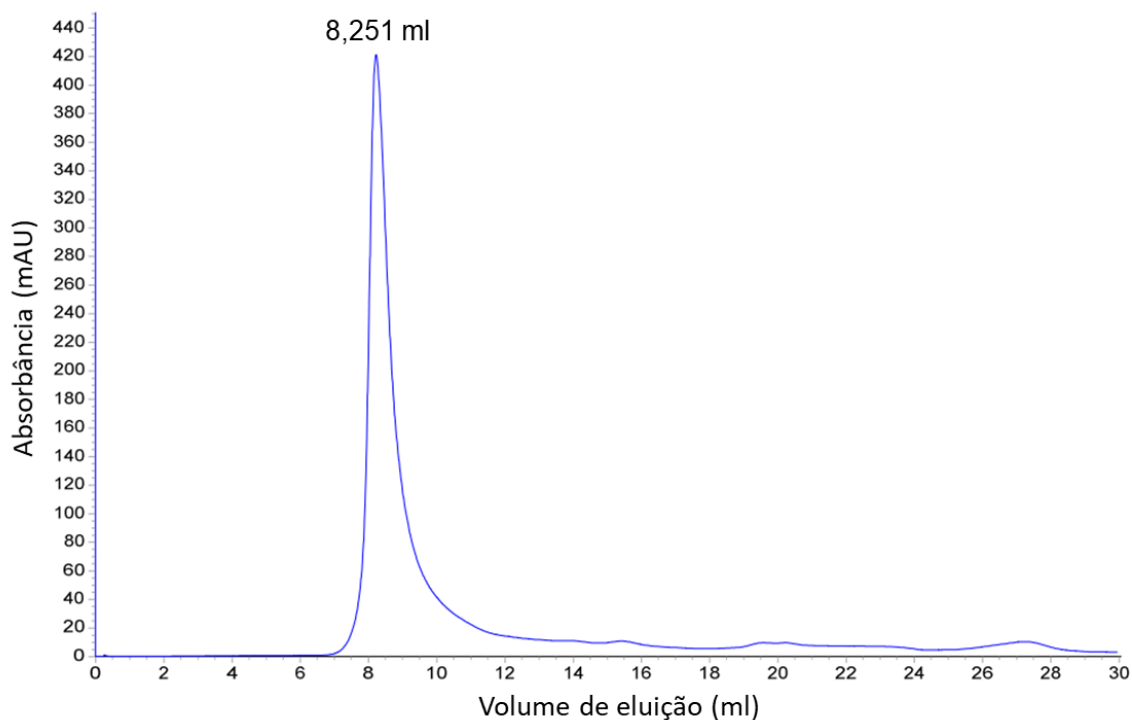


Fonte: elaborada pela autora, 2022.

Com o intuito de remover os contaminantes ainda restantes, foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular. A Figura 11 demonstra o resultado da purificação da LDI-CP por SEC, onde observou-se um pico majoritário de intensidade de absorvância ( $A_{280}$ ) de 420 mAU. Após análises em WB, ficou confirmado a presença da proteína LDI-CP nas frações coletadas no centro do pico (canaletas 5 e 6, Figura 10) no tamanho esperado (~30 kDa). Embora o grau de pureza da amostra aumentou quando utilizada a SEC, ainda existem contaminantes com massas moleculares entre 70 a 100 kDa sendo purificados juntamente com a LDI-CP. Em virtude dos vários passos de purificação realizados e também como os contaminantes foram eluídos juntamente com a proteína LDI-CP, foi levantada a hipótese de que as

proteínas contaminantes oriundas da bactéria interagem muito fortemente com a proteína alvo.

Figura 11: Cromatografia de exclusão molecular da fração 30 % resultante do gradiente de sacarose. No eixo Y do cromatograma temos a absorvância medida em 280 nm (mAU) e no eixo X o volume de eluição (ml). Foi observada uma fração retida majoritária em um volume de aproximadamente 8 ml com uma absorvância de 420 mAU.

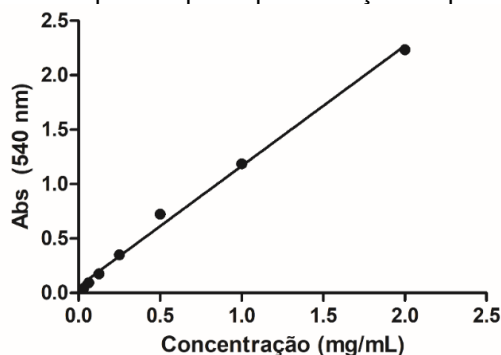


Fonte: gráfico gerado pelo software Unicorn7 do ÄKTA avant e editada pela autora, 2022.

Para a quantificação de proteína total na fração do pico da proteína (canaletas 5 e 6, Figura 10) foi utilizado o kit comercial *BCA Protein Assay* com detecção por absorvância em 540 nm e para a curva de calibração utilizou-se uma solução de concentração conhecida de BSA em diferentes diluições. A curva padrão obtida se encontra na Figura 12, em que se observa que o ajuste linear foi satisfatório ( $R^2 = 0,995$ ), sugerindo seguridade quanto à técnica de quantificação. A concentração da proteína utilizando a equação da reta foi de 0,278 mg/ml ou 278 ng/ $\mu$ l.



Figura 12: Curva padrão para quantificação da proteína LDI-CP.



$$Y = 1,105X + 0,06058 \quad (R^2 = 0,995)$$

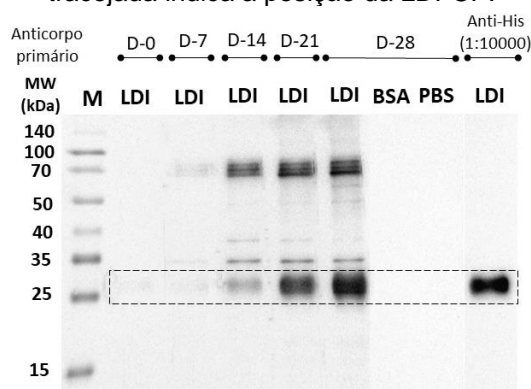
Fonte: elaborada pela autora, 2022.

## 5.2 Inoculação de camundongos

Com o intuito de produzir ferramentas para posteriores análises, camundongos C57BL/6 foram inoculados com a proteína LDI-CP purificada e a especificidade dos soros imunes e pré-imunes foram analisadas pela técnica de *Western Blot*. Esses resultados foram obtidos por meio de uma colaboração com o Dr. Daniel Mendes (Laboratório de Imunobiologia-UFSC).

O soro pré-imune (D-0), ou seja, de animais não imunizados com a proteína, não demonstrou reatividade na presença da proteína LDI-CP, confirmando a ausência de anticorpos anti-LDI nos animais antes da primeira inoculação (Figura 13). Em relação aos soros imunes, foi possível observar a presença de bandas correspondentes ao peso molecular da proteína LDI-CP (~30 kDa), demonstrando a eficiência das inoculações com LDI-CP para a geração de uma resposta imune nos camundongos e produção de anticorpos policlonais anti-LDI. Conforme esperado, o soro imune (D-28) não foi reativo contra os controles negativos utilizados (a proteína BSA e o tampão utilizado para a inoculação - PBS).

Figura 13: Western blot da proteína LDI-CP purificada (1 µg/poço) utilizando soro de camundongos imunizados na diluição de 1:500. M: Marcador molecular (kDa); D-0: Soro pré-imune; D-7/28: Soro 7-28 dias após a imunização com LDI-CP; Anti-His: anticorpo anti poli-Histidina (controle +); BSA: Albumina de soro bovino 1 µg/poço (Controle -); PBS: Solução salina (Controle -). Caixa preta tracejada indica a posição da LDI-CP.

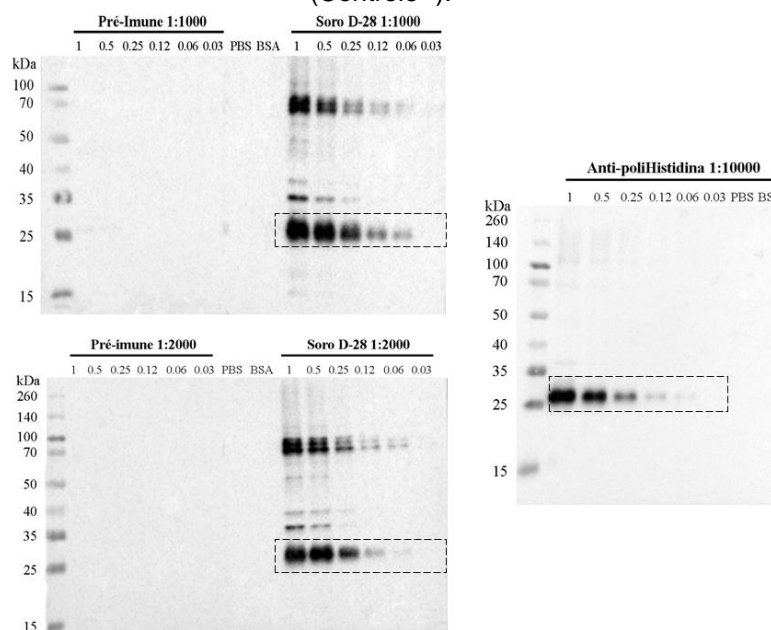


Fonte: elaborada pela autora, 2022.

Apesar do sucesso na produção de anticorpos anti-LDI, a amostra contendo a proteína LDI-CP não se apresentava totalmente purificada. Por conseguinte, também ocorreu a produção de anticorpos contra proteínas contaminantes desconhecidas oriundas da bactéria, conforme previamente observado no gel de poli-acrilamida corado com nitrato de prata (canaletas 5 e 6, Figura 10). Para utilização futura, como anticorpo primário para detecção da proteína LDI-CP por WB, o soro deve passar por processos de purificação cromatográfica.

Uma vez observada detecção da LDI-CP na diluição 1:500, outras diluições do soro D-28 foram feitas para averiguar o limite de detecção dos anticorpos na presença da proteína em diferentes concentrações (0,03 - 1 µg) por WB. Conforme resultado da Figura 14, nas diluições 1:1000 e 1:2000, o soro foi eficiente para detecção da proteína LDI-CP pela técnica de WB, pois foi possível observar a banda referente à LDI-CP. Em ambas diluições, a proteína foi detectada até uma concentração de 0,06 µg, sendo esse o limite de detecção para essas diluições de soro. Além disso, pode-se observar um limite de detecção semelhante entre o anticorpo monoclonal anti-poliHistidina, (diluição 1:10000) e o observado para o soro policlonal. Com isso, o soro D-28 produzido em camundongos pode ser utilizado de forma satisfatória para detecções futuras da proteína alvo sem a necessidade da His-Tag da proteína.

Figura 14: Western blot da proteína LDI-CP purificada em diferentes concentrações (0,03 -1  $\mu\text{g}$ ) utilizando soro de camundongos pré-imune e soro 28 dias após a imunização com LDI-CP nas diluições de 1:1000 e 1:2000. D28: soro 28 dias após a imunização com LDI-CP; Anticorpo anti poli-Histidina (controle +); BSA: Albumina de soro bovino 1  $\mu\text{g}/\text{poço}$  (Controle -); PBS: Solução salina (Controle -).

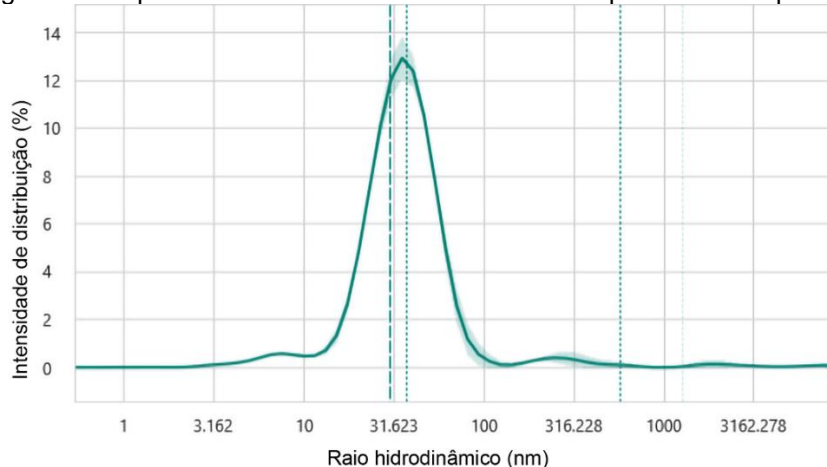


Fonte: elaborada pela autora, 2022.

### 5.3 Caracterização físico-química

A proteína purificada e com concentração determinada (0,278 mg/ml) foi analisada utilizando espalhamento dinâmico de luz. Esses resultados foram obtidos por meio de uma colaboração com a *Dr<sup>a</sup>* Beatriz G. Guimarães (*ICC/Fiocruz Paraná*). Antes das medições, a amostra foi centrifugada para a remoção de quaisquer agregados proteicos não estruturados que podem estar presentes e prejudicar a análise. Como mostrado na Figura 15, o DLS mostrou três populações, sendo que a população majoritária possui um raio hidrodinâmico de aproximadamente 30 nm na condição de tampão e aditivos utilizados, em pH 7,5.

Figura 15: Espalhamento dinâmico de luz de LDI-CP purificada em pH 7,5.



Fonte: gráfico gerado pelo software *Prometheus Panta* e editado pela autora, 2022.

A polidispersão em DLS é usada para descrever a largura da distribuição do tamanho das partículas. O índice de polidispersão (PDI) fornecido pela maioria dos softwares de instrumentos é um parâmetro calculado a partir de uma análise de cumulantes da função de autocorrelação de intensidade medida por DLS <sup>76</sup>. Normalmente, para uma distribuição de tamanho de partícula monodispersa o valor de PDI é menor que 0,2 <sup>77</sup>. O valor de PDI para a amostra de LDI-CP analisada em pH 7,5 e 20 °C foi de 0,31. Portanto, embora a intensidade de distribuição das populações de maior tamanho tenha sido baixa, essa amostra de LDI-CP não pode ser considerada como monodispersa. O alto valor de PDI pode estar relacionado à pureza parcial da amostra, extrema sensibilidade do DLS à presença de agregados e também ao erro inerente de 10-15% da própria técnica (espalhamento de banda aparente) <sup>90,91</sup>. Além disso, já foi relatado que em baixas concentrações de partículas tanto o tamanho como o valor de PDI podem ser superestimados <sup>77</sup>. Sendo assim, outro fator que pode ter contribuído para esse resultado seria a baixa concentração da proteína analisada.

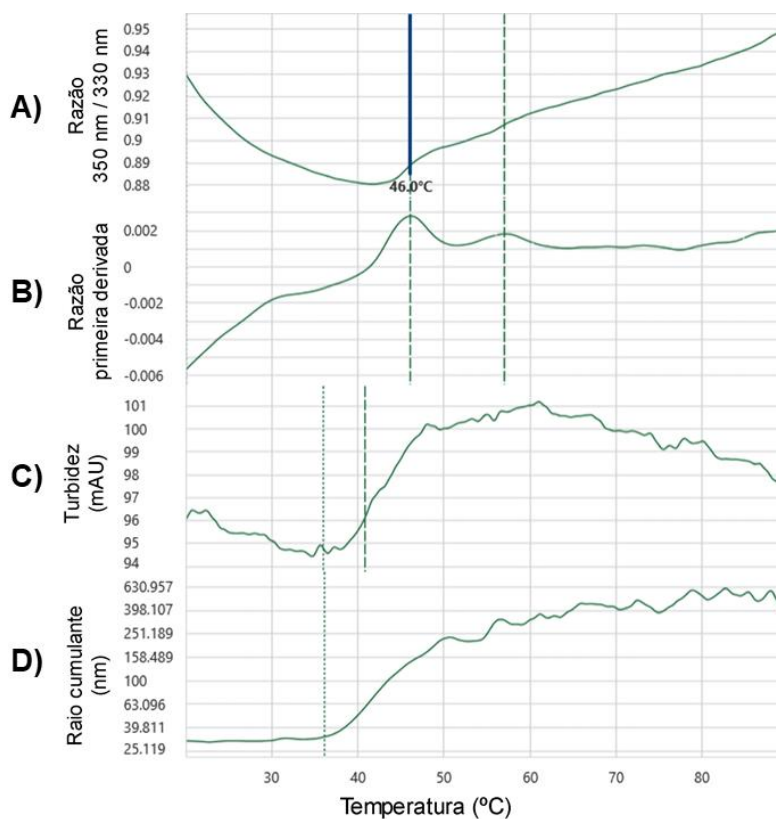
Tendo em vista que processos de produção, transporte e armazenagem podem causar estresse térmico em proteínas, é de extrema importância o conhecimento do efeito da temperatura sobre a indução de agregados proteicos <sup>92</sup>, especialmente para produtos biotecnológicos baseados em proteínas (como vacinas e entrega direcionada). Portanto, a estabilidade térmica de proteínas, dentre outras, é uma característica desejável, pois diminui a probabilidade de formação de agregados e geralmente está associada a uma melhor tolerância contra agentes desestabilizadores

Para o estudo da estabilidade térmica da proteína LDI-CP, foi analisada a mudança na fluorescência intrínseca do triptofano com o aumento da temperatura em um dispositivo nanoDSF. Como comentado anteriormente, a desnaturação proteica causa uma alteração no microambiente dos resíduos de Trp, revelada pela mudança na razão das emissões de fluorescência em 350 e 330 nm, sendo o ponto de inflexão a  $T_m$ . O resultado de nanoDSF mostra que a  $T_m$  da proteína LDI-CP foi de 46 °C, correspondendo à uma porcentagem de desnaturação proteica de 50% (Figura 16 A). Essa temperatura foi determinada com maior precisão pelo máximo da primeira derivada da razão 350nm/330nm (Figura 16 B). A  $T_m$  de LDI-CP está de acordo com as temperaturas de desnaturação térmica geralmente observadas para proteínas, que se encontram na faixa 40 °C - 80 °C <sup>92</sup>. A determinação da  $T_m$  é importante pois o armazenamento da proteína deve ser feito bem abaixo dessa temperatura, o que é essencial para futura logística de produtos.

A turbidez de soluções aquosas de proteínas depende da concentração, da presença de partículas não dissolvidas e do tamanho das partículas e tem sido usada para a detecção de agregados, pois um aumento pronunciado na turbidez de uma solução proteica é indício de agregação <sup>92</sup>. O gráfico que indica a variação da turbidez com o aumento da temperatura demonstra que o aumento da temperatura causou o aumento na turbidez da solução, devido à formação de agregados, principalmente a partir de 40,5 °C (Figura 16 C). De forma correlata, o gráfico que indica a variação do raio cumulante com o aumento da temperatura demonstra um aumento significativo no tamanho médio das partículas a partir de uma temperatura de 37 °C (Figura 16 D), novamente devido à formação de agregados proteicos.

Assim, em conjunto esses resultados indicam que a proteína LDI-CP demonstra estabilidade térmica em temperatura ambiente até uma temperatura máxima de 37 °C no sistema tampão e força iônica utilizados. Embora a proteína LDI-CP tenha boa estabilidade térmica nas condições de trabalho (temperatura de 20 °C) foi observado que a desnaturação é irreversível, pois a proteína não foi capaz de se renovar com a reversão da temperatura para 20°C após a formação de agregados induzidos pelo aumento da temperatura.

Figura 16: Análises de nanoDSF de LDI-CP em pH 7,5.



Fonte: Gráfico gerado pelo software *Prometheus Panta* e editado pela autora, 2022.

#### 5.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

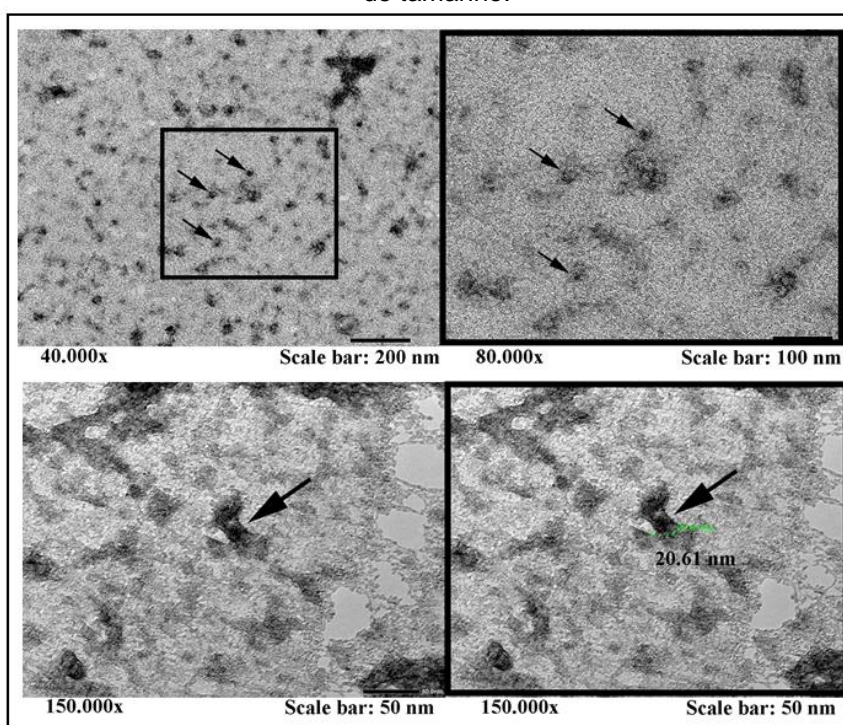
As análises da amostra em microscopia eletrônica de transmissão com coloração negativa foram realizadas por meio de uma colaboração com a Dr<sup>a</sup> Lia Carolina Medeiros (ICC/Fiocruz Paraná). O urânio do acetato de uranila utilizado em coloração negativa reage com grupos fosfato e amino, corando proteínas, ácidos nucleicos e membranas lipídicas<sup>94</sup>.

As micrografias eletrônicas de transmissão de LDI-CP demonstraram a presença de partículas com tamanhos de 20 nm (setas pretas) (Figura 17). Os resultados apontam para a capacidade da LDI-CP de formar uma estrutura quaternária pela autoassociação espontânea dos monômeros em solução. O diâmetro medido através do software do microscópio para a amostra purificada foi o mesmo para aquele observado dentro da célula (20 nm). Entretanto, não foram observadas partículas esféricas e simétricas características para essas partículas no ambiente celular (Anexo A). A observação de partículas achatadas pode estar relacionada à uma condição subótima para a formação da VLP (tampão, pH, força iônica, etc), presença da His-Tag que pode influenciar na topologia da partícula, ausência de cofatores

(como íons metálicos) e processos preliminares de concentração da amostra. Além disso, VLPs sem uma estrutura de suporte interna (pela encapsulação de material genético, por exemplo) são mais propensas a ter sua forma distorcida durante a preparação da amostra para MET<sup>88</sup>. Portanto, a presença de partículas achatadas, artefatos de imagem e ruído de fundo podem ter dificultado uma caracterização mais detalhada da VLP-LDI através de MET com coloração negativa.

Novas análises de MET em diferentes condições (por exemplo, solução tamponante, pH) precisam ser realizadas após a padronização da purificação da proteína. MET servirá como uma técnica de triagem e otimização para crio-EM, que tem papel fundamental na confirmação do sucesso do projeto de VLPs artificiais de LDI-CP e também para destacar quaisquer desvios da estrutura prevista pelo modelo gerado *in silico*.

Figura 17: Micrografias eletrônicas de transmissão com coloração negativa em diferentes amplitudes de tamanho.



Fonte: imagens geradas por câmera digital com CCD de 8 megapixels acoplada ao equipamento JEOL JEM-1400Plus

O desenvolvimento de VLPs artificiais, como no presente trabalho, é uma área relativamente nova de pesquisa em nanopartículas de proteína. No entanto, estudos na literatura demonstram o potencial dessas abordagens na área da nanobiotecnologia. Hsia et al.,<sup>95</sup> projetaram computacionalmente uma nanopartícula icosaédrica de 25 nm que se autoassocia a partir de blocos de construção de proteínas

triméricas, cuja estrutura foi confirmada por crio-EM e demonstrou-se semelhante a pequenos capsídeos virais. Em outro estudo, Bale *et al.*,<sup>96</sup>, também utilizando abordagens computacionais, desenharam vários complexos de proteínas icosaédricas de dois componentes formados a partir de blocos de construção diméricos, triméricos ou pentaméricos. As estruturas de algumas nanopartículas de proteínas produzidas por Bale *et al.*,<sup>96</sup>, foram determinadas por microscopia eletrônica/cristalografia de raios X e correspondiam às arquiteturas previstas *in silico*. Posteriormente, modificações nessas nanopartículas possibilitaram o empacotamento de seu próprio RNA mensageiro (mRNA)<sup>97</sup> e ancoragem/apresentação na superfície externa de uma variante de glicoproteína do vírus sincicial respiratório, mostrando também seu potencial promissor como uma vacina baseada em estrutura<sup>98</sup>.

## 5.5 Comparação com a proteína wildSBMV

Atualmente, a maneira mais comumente utilizada para a purificação de partículas virais da proteína selvagem de SBMV (wildSBMV) ocorre pela extração de folhas de plantas infectadas, como no trabalho de Mariutti *et al.*,<sup>99</sup>. Esse tipo de metodologia envolve longos tempos para a produção da proteína pura e possui algumas limitações moleculares relacionadas à modificações genéticas. A expressão heteróloga em bactérias como a utilizada neste trabalho surge como uma alternativa interessante, já que a fácil produção e manipulação genética de VLPs possui grandes implicações em ciência e tecnologia<sup>43</sup>.

Assim como para LDI-CP, a proteína wildSBMV também foi expressa em *E. coli* BL21 (DE3) e foi realizada uma tentativa de purificação empregando a mesma metodologia. Esse resultado (Apêndice D) demonstrou que, de forma semelhante à LDI-CP, a wildSBMV também se torna solúvel e concentrada majoritariamente na fração 30% do gradiente de sacarose. Embora outros experimentos utilizando a proteína selvagem não tenham sido realizados, pode-se concluir que as proteínas LDI-CP e wildSBMV apresentam comportamento similar quando submetidas à ultracentrifugação em colchão e gradiente de sacarose.

As VLPs observadas para LDI-CP possuem um diâmetro externo semelhante ao de uma partícula viral nativa de SBMV (~28 nm)<sup>100</sup>. Desde a resolução estrutural de SBMV, sabe-se que a integridade estrutural das partículas desse vírus (vírions) depende de íons divalentes ( $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ ) e que o pH influencia na montagem das partículas<sup>101</sup>. Portanto, é plausível a sugestão anterior que as diferenças observadas



para o tamanho e a morfologia das partículas advém das condições não otimizadas do meio.

Embora a identidade entre as sequências das proteínas LDI-CP e wildSBMV seja abaixo de 17,5%, a LDI-CP apresenta propriedades físico-químicas e capacidade funcional de autoassociação semelhantes à proteína selvagem utilizada como ponto de partida para a evolução artificial guiada. Apesar da plasticidade da sequência de aminoácidos é plausível sugerir que o arranjo estrutural natural seja mantido. Por isso, é importante entender como essa nova proteína se dobra, o que governa a montagem/interação consistente das subunidades e formação de nanopartículas proteicas e como a organização estrutural se correlaciona com a função. Conforme aumenta o conhecimento científico a respeito de VLPs artificiais, aumentam também as ferramentas que possibilitam otimizar e modificar essas estruturas tão versáteis para aplicações como sistemas de entrega de medicamentos ou vacinas artificiais.

## 6 CONCLUSÕES

Os recentes avanços em técnicas computacionais e experimentais resultaram no desenvolvimento de várias proteínas de capsídeo artificiais, que foram produzidas, caracterizadas e aplicadas em diversas áreas. Visando produzir uma VLP artificial, esse trabalho continuou um estudo *in silico* no qual foi produzida, via evolução artificial guiada, uma proteína artificial com potencial para formar uma nanopartícula.

A proteína LDI-CP foi expressa de forma heteróloga em sistema procarioto, apresentando-se na fração insolúvel nas duas cepas utilizadas. Após as purificações, a proteína recombinante foi obtida de forma solúvel e parcialmente pura, pois proteínas contaminantes oriundas da bactéria foram eluídas juntamente com a proteína alvo, provavelmente devido à uma forte interação.

Com a caracterização físico-química da proteína LDI-CP foram obtidos indícios de sua capacidade funcional de autoassociação espontânea e formação de uma nanopartícula proteica. Apesar de que a amostra parcialmente purificada de LDI-CP não se encontrava monodispersa, a população majoritária observada apresentou um tamanho similar de capsídeos de pequenos vírus icosaédricos. Determinou-se também que a proteína LDI-CP é estável em temperatura ambiente e o aumento da temperatura provoca a formação irreversível de agregados proteicos.

Além disso, foram produzidos anticorpos policlonais anti-LDI em camundongos, que podem ser uma ferramenta para posterior detecção da proteína.

A purificação total da proteína foi dificultada principalmente devido à formação de corpos de inclusão com a proteína, o que acabou influenciando outras análises. Ademais, não foram observadas partículas esféricas e simétricas de VLP-LDI em virtude de uma condição subótima para a formação da VLP artificial, já que uma única condição foi aqui testada.

Esse trabalho representa um avanço nos processos de expressão e purificação da proteína inédita LDI-CP, mas otimizações adicionais são necessárias. Foi possível obter indicativos de que a proteína mutante exerce a função pela qual foi proposta, sendo que os dados aqui apresentados revelaram que a VLP-LDI apresenta propriedades físico-químicas e tamanho semelhante à VLP selvagem, apesar da baixa identidade de sequência entre as proteínas.

## 7 PERSPECTIVAS

Dentre as perspectivas desse trabalho está a expressão da proteína LDI-CP em cepas de ArcticExpress (DE3) e em temperatura mais baixas (entre 10-13 °C se possível), fazendo uso de uma incubadora de baixa temperatura. Isso porque, como comentado anteriormente, uma temperatura mais baixa pode representar uma estratégia para aumentar a produção de proteína solúvel e com isso métodos de purificação da proteína a partir da fração solúvel podem ser adotados. Outra estratégia interessante é a mudança do sistema de expressão para células de mamífero HEK293T, com adição de um peptídeo sinal ao N-terminal da proteína LDI-CP. Com isso, a proteína será processada e endereçada para o exterior da célula, tornando a lise celular desnecessária e, conseqüentemente, diminuindo a interação de contaminantes proteicos provindos da célula com a LDI-CP.

Após a padronização da purificação de LDI-CP, novas análises estruturais da proteína LDI-CP, envolvendo MET, Crio-microscopia eletrônica e dicroísmo circular serão importantes. Com isso, será possível retornar ao ponto de evolução artificial guiada, comparar os resultados experimentais com os computacionais e buscar novas relações estruturais das proteínas de capsídeo que resultam em sua função.

Por fim, espera-se explorar as potenciais aplicações de VLPs artificiais com a nanopartícula produzida por LDI-CP, como para vacinas e nanocarreadores para entrega direcionada.

## 8 REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> ZAUMEYER, W. J. & HARTER, L. L. (1942). A new virus disease of bean. (Phytopath.Note) Phyto-pathology 32: 438-439 apud ZAUMEYER, W. J. & HARTER, L. L. (1943). Inheritance of symptom expression of bean mosaic virus 4. *Journal of Agricultural Research*, 67(7), 295–300.
- <sup>2</sup> GARCÉS FIALLOS, F. R. (2010). Doenças causadas por vírus na cultura de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ciencia y Tecnología*, 3(2), 1–6.
- <sup>3</sup> TAMM, T., & TRUVE, E. (2000). Sobemoviruses. *Journal of Virology*, 74(14), 6231–6241.
- <sup>4</sup> SÖMERA, M., SARMIENTO, C., & TRUVE, E. (2015). Overview on sobemoviruses and a proposal for the creation of the family Sobemoviridae. *Viruses*, 7(6), 3076–3115.
- <sup>5</sup> LEONARD, B. R., *et al.* (1953). An x-ray investigation of the sizes and hydrations of three spherical virus macromolecules in solution. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 12, 499-507.
- <sup>6</sup> GHABRIAL, S. A., SHEPHERD, R. J., & GROGAN, R. G. (1967). Chemical properties of three strains of Southern bean mosaic virus. *Virology*, 33(1), 17–25.
- <sup>7</sup> WU, S., RINEHART, C. A., & KAESBERG, P. (1987). Sequence and organization of southern bean mosaic virus genomic RNA. *Virology*, 161(1), 73–80.
- <sup>8</sup> SÖMERA, M., *et al.* (2021). ICTV Virus Taxonomy Profile: Solemoviridae 2021. *Journal of General Virology*, 102(12), 1–2.
- <sup>9</sup> TRUVE, E. & FARGETTE, D. (2012). Genus – Sobemovirus. In: King, Andrew; Adams, Michael; Carstens, Eric & Lefkowitz, Elliot. *Virus Taxonomy - Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, 2012, Pages 1185-1189.
- <sup>10</sup> ARDEN, K. E., & MACKAY, I. M. (2009). Human rhinoviruses: Coming in from the cold. *Genome Medicine*, 1(4), 1–5.
- <sup>11</sup> DRYSDALE, S. B., MEJIAS, A., & RAMILO, O. (2017). Rhinovirus – not just the common cold. *Journal of Infection*, 74, S41–S46.
- <sup>12</sup> SIMMONDS, P., *et al.* (2020). Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses. *Archives of Virology*, 165(3), 793–797.
- <sup>13</sup> STEPANOVA, E., ISAKOVA-SIVAK, I., & RUDENKO, L. (2019). Overview of human rhinovirus immunogenic epitopes for rational vaccine design. *Expert Review of Vaccines*, 18(9), 877–880.
- <sup>14</sup> TO, K. K. W., YIP, C. C. Y., & YUEN, K. Y. (2017). Rhinovirus – From bench to bedside. *Journal of the Formosan Medical Association*, 116(7), 496–504.
- <sup>15</sup> ZELL, R., *et al.* (2017). ICTV virus taxonomy profile: Picornaviridae. *Journal of General Virology*, 98(10), 2421–2422.
- <sup>16</sup> WARIS, Matti & RUUSKANEN, Olli (2021). Rhinoviruses (Picornaviridae). In: Bamford, D.H. and Zuckerman, M. (eds.) *Encyclopedia of Virology*, 4th Edition, vol. 2, pp. 757–764. Oxford: Academic Press.

- <sup>17</sup> PAYNE, S. (2017). Family Picornaviridae. *Viruses*, 107–114.
- <sup>18</sup> ABAD-ZAPATERO, C., *et al.* (1980). Structure of southern bean mosaic virus at 2.8 Å resolution. *Nature*, 286(5768), 33–39.
- <sup>19</sup> SILVA, A. M., & ROSSMANN, M. G. (1985). The refinement of southern bean mosaic virus in reciprocal space. *Acta Crystallographica Section B*, 41(2), 147–157.
- <sup>20</sup> ROSSMANN, M. G., *et al.* (1985). Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature*, 317(6033), 145–153.
- <sup>21</sup> ARNOLD, E., & ROSSMANN, M. G. (1988). The use of molecular-replacement phases for the refinement of the human rhinovirus 14 structure. *Acta Crystallographica Section A*, 44(3), 270–283.
- <sup>22</sup> SAN MARTÍN, C., & VAN RAAIJ, M. J. (2018). The so far farthest reaches of the double jelly roll capsid protein fold. *Virology Journal*, 15(1), 1–6.
- <sup>23</sup> KOONIN, E. V., *et al.* (2008). The Big Bang of picorna-like virus evolution antedates the radiation of eukaryotic supergroups. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 925–939.
- <sup>24</sup> CHAPMAN, M. S., & LILJAS, L. (2003). Structural folds of viral proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 64, 125–196.
- <sup>25</sup> CHENG, S., & BROOKS, C. L. (2013). Viral Capsid Proteins Are Segregated in Structural Fold Space. *PLoS Computational Biology*, 9(2).
- <sup>26</sup> ZUCKERKANDL, E., & PAULING, L. (1965). Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins. *Evolving Genes and Proteins*, 97–166.
- <sup>27</sup> BAMFORD, D. H., BURNETT, R. M., & STUART, D. I. (2002). Evolution of Viral Structure. *Theoretical Population Biology*, 61(4), 461–470.
- <sup>28</sup> KRUPOVIČ, M., & BAMFORD, D. H. (2008). Virus evolution: How far does the double β-barrel viral lineage extend? *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 941–948.
- <sup>29</sup> BENSON, S. D., *et al.* (1999). Viral evolution revealed by bacteriophage PRD1 and human adenovirus coat protein structures. *Cell*, 98(6), 825–833.
- <sup>30</sup> ABRESCIA, N. G. A., *et al.* (2012). Structure unifies the viral universe. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 795–822.
- <sup>31</sup> KHAYAT, R., & JOHNSON, J. E. (2011). Pass the jelly rolls. *Structure*, 19(7), 904–906.
- <sup>32</sup> CHANDRASEKAR, V., & JOHNSON, J. E. (1998). The structure of tobacco ringspot virus: A link in the evolution of icosahedral capsids in the picornavirus superfamily. *Structure*, 6(2), 157–171.
- <sup>33</sup> CHEN, Z., *et al.* (1989). Protein-RNA interactions in an icosahedral virus at 3.0 Å resolution. *Science*, 245(4914), 154–159.
- <sup>34</sup> PACKER, M. S., & LIU, D. R. (2015). Methods for the directed evolution of proteins. *Nature Reviews Genetics*, 16(7), 379–394.

- <sup>35</sup> BRUSTAD, E. M., & ARNOLD, F. H. (2011). Optimizing non-natural protein function with directed evolution. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(2), 201–210.
- <sup>36</sup> ARNOLD, F. H. (2009). How proteins adapt: Lessons from directed evolution. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 74, 41–46.
- <sup>37</sup> WU, Z., et al. (2020). Machine learning-assisted directed protein evolution with combinatorial libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(1), 788–789.
- <sup>38</sup> ENGQVIST, M. K. M., & RABE, K. S. (2019). Applications of protein engineering and directed evolution in plant research. *Plant Physiology*, 179(3), 907–917.
- <sup>39</sup> ZEYMER, C., & HILVERT, D. (2018). Directed Evolution of Protein Catalysts. *Annual Review of Biochemistry*, 87(February), 131–157.
- <sup>40</sup> WINGFIELD, P. T. (2015). Overview of the purification of recombinant proteins. In *Current Protocols in Protein Science* (Vol. 2015, Issue April).
- <sup>41</sup> ROSANO, G. L., & CECCARELLI, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), 1–17.
- <sup>42</sup> WILLITS, D., et al. (2003). Effects of the cowpea chlorotic mottle bromovirus beta-hexamer structure on virion assembly. *Virology*, 306, 280–288.
- <sup>43</sup> DÍAZ-VALLE, A., et al. (2015). Highly efficient strategy for the heterologous expression and purification of soluble Cowpea chlorotic mottle virus capsid protein and in vitro pH-dependent assembly of virus-like particles. *Journal of Virological Methods*, 225, 23–29.
- <sup>44</sup> DING, X., et al. (2018). Virus-Like Particle Engineering: From Rational Design to Versatile Applications. *Biotechnology Journal*, 13(5), 1–7.
- <sup>45</sup> SCHOONEN, L., & VAN HEST, J. C. M. (2014). Functionalization of protein-based nanocages for drug delivery applications. *Nanoscale*, 6(13), 7124–7141.
- <sup>46</sup> STRUGAŁA, A., et al. (2021). Virus-like particles produced using the brome mosaic virus recombinant capsid protein expressed in a bacterial system. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 1–15.
- <sup>47</sup> JOURA, E. A., et al. (2015). A 9-Valent HPV Vaccine against Infection and Intraepithelial Neoplasia in Women. *New England Journal of Medicine*, 372(8), 711–723.
- <sup>48</sup> VESIKARI, T., et al. (2015). A Randomized, Double-Blind, Phase III Study of the Immunogenicity and Safety of a 9-Valent Human Papillomavirus L1 Virus-Like Particle Vaccine (V503) Versus Gardasil(R) in 9-15-Year-Old Girls. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 34(9), 992–998.
- <sup>49</sup> LACSON, E., et al. (2005). Antibody response to Engerix-B® and Recombivax-HB® hepatitis B vaccination in end-stage renal disease. *Hemodialysis International*, 9(4), 367–375.
- <sup>50</sup> NOORAEI, S., et al. (2021). Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 1–27.

- <sup>51</sup> ZHU, F. C., *et al.* (2010). Efficacy and safety of a recombinant hepatitis e vaccine in healthy adults: A large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, 376(9744), 895–902.
- <sup>52</sup> PROFFITT, A. First HEV vaccine approved. *Nature Biotechnology*, 30, 300 (2012).
- <sup>53</sup> GARG, H., *et al.* (2019). Capsid containing virus like particle vaccine against Zika virus made from a stable cell line. *Vaccine*, 37(48), 7123–7131.
- <sup>54</sup> AKAHATA, W., *et al.* (2010). A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. *Nature Medicine*, 16(3), 334–338.
- <sup>55</sup> GARG, H., MEHMETOGLU-GURBUZ, T., & JOSHI, A. (2020). Virus Like Particles (VLP) as multivalent vaccine candidate against Chikungunya, Japanese Encephalitis, Yellow Fever and Zika Virus. *Scientific Reports*, 10(1), 1–13.
- <sup>56</sup> SHUKLA, S. *et al.* (2020). The unique potency of Cowpea mosaic virus (CPMV): In situ cancer vaccine. *Biomaterials Science*, 8(19), 5489–5503.
- <sup>57</sup> MOHSEN, M. O., *et al.* (2019). Vaccination with nanoparticles combined with micro-adjuvants protects against cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), 1–12.
- <sup>58</sup> SHAN, L., *et al.* (2012). A paclitaxel-conjugated adenovirus vector for targeted drug delivery for tumor therapy. *Biomaterials*, 33(1), 146–162.
- <sup>59</sup> ALJABALI, A. A. A., *et al.* (2013). CPMV-DOX delivers. *Molecular Pharmaceutics*, 10(1), 3–10.
- <sup>60</sup> CHOI, K. M., (2013). Systemic delivery of siRNA by chimeric capsid protein: Tumor targeting and RNAi activity in vivo. *Molecular Pharmaceutics*, 10(1), 18–25.
- <sup>61</sup> JORDAN, P. C., *et al.* (2015). Self-assembling biomolecular catalysts for hydrogen production. *Nature Chemistry*, 8(2), 179–185.
- <sup>62</sup> FIEDLER, J. D., *et al.* (2010). RNA-directed packaging of enzymes within virus-like particles. *Angewandte Chemie - International Edition*, 49(50), 9648–9651.
- <sup>63</sup> ANDERSON, E. A., *et al.* (2006). Viral nanoparticles donning a paramagnetic coat: Conjugation of MRI contrast agents to the MS2 capsid. *Nano Letters*, 6(6), 1160–1164.
- <sup>64</sup> UCHIDA, M., *et al.* (2007). Biological containers: Protein cages as multifunctional nanoplatfoms. *Advanced Materials*, 19(8), 1025–1042.
- <sup>65</sup> WEN, A. M., & STEINMETZ, N. F. (2016). Design of virus-based nanomaterials for medicine, biotechnology, and energy. *Chemical Society Reviews*, 45(15), 4074–4126.
- <sup>66</sup> Protein Data Bank. Disponível em: <[rcsb.org](http://rcsb.org)>. H. M. Berman, *et al.* (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28: 235-242.
- <sup>67</sup> LOKESH, G. L., *et al.* (2002). A molecular switch in the capsid protein controls the particle polymorphism in an icosahedral virus. *Virology*, 292(2), 211–223.
- <sup>68</sup> HONG, P., KOZA, S., & BOUVIER, E. S. P. (2012). A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 35(20), 2923–2950.

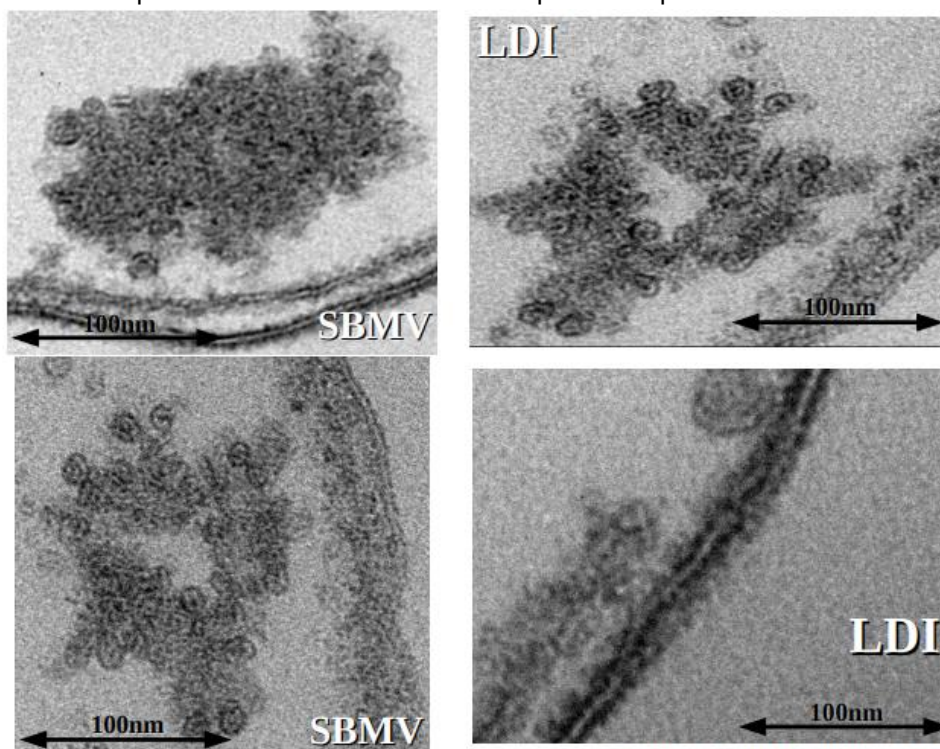
- <sup>69</sup> The principle and method of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. Disponível em: <<https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/sds-page.html>>. Acesso em: janeiro, 2022.
- <sup>70</sup> LAEMMLI, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- <sup>71</sup> LAWRENCE, A. M. & BESIR, H. (2009). Staining of proteins in gels with Coomassie G-250 without organic solvent and acetic acid. *J. Vis. Exp.* 2–4. doi:10.3791/1350
- <sup>72</sup> BLUM, H., BEIER, H., & GROSS, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins. *Electrophoresis*, 8, 93–99.
- <sup>73</sup> ThermoScientific. (2014). Thermo Scientific Pierce Western Blotting Handbook and Troubleshooting Guide. *ThermoScientific*, 1–88.
- <sup>74</sup> MAHMOOD, T., & YANG, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434.
- <sup>75</sup> CORTÉS-RÍOS, J., *et al.* (2020). Protein quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay follows complex kinetics and can be performed at short incubation times. *Analytical Biochemistry*, 608(August).
- <sup>76</sup> WEI, Y. P., *et al.* (2013). Effect of marchantin C derivative F41 on apoptosis of human cervical cancer HeLa cells. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 27(3), 346–351.
- <sup>77</sup> PANCHAL, J., *et al.* (2014). Analyzing subvisible particles in protein drug products: A comparison of Dynamic Light Scattering (DLS) and Resonant Mass Measurement (RMM). *AAPS Journal*, 16(3), 440–451.
- <sup>78</sup> MAGNUSSON, A. O., *et al.* (2019). nanoDSF as screening tool for enzyme libraries and biotechnology development. *FEBS Journal*, 286(1), 184–204.
- <sup>79</sup> ALEXANDER, C. G., *et al.* (2014). Novel microscale approaches for easy, rapid determination of protein stability in academic and commercial settings. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1844(12), 2241–2250.
- <sup>80</sup> REAL-HOHN, A., *et al.* (2020). nanoDSF: In vitro Label-Free Method to Monitor Picornavirus Uncoating and Test Compounds Affecting Particle Stability. *Frontiers in Microbiology*, 11(June), 1–12.
- <sup>81</sup> DE CARLO, S., & HARRIS, J. R. (2011). Negative staining and cryo-negative staining of macromolecules and viruses for TEM. *Micron*, 42(2), 117–131.
- <sup>82</sup> WINEY, M., *et al.* (2014). Conventional transmission electron microscopy. *Molecular Biology of the Cell*, 25(3), 319–323.
- <sup>83</sup> Disponível em <<http://us.expasy.org/>>. Acesso em: janeiro, 2021. DUVAUD, S., *et al.* (2021). ExPASy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. *Nucleic Acids Research*, 49, 216-227.



- <sup>84</sup> LE, D. T., RADUKIC, M. T., & MÜLLER, K. M. (2019). Adeno-associated virus capsid protein expression in *Escherichia coli* and chemically defined capsid assembly. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10.
- <sup>85</sup> BURKERT, O., et al. (2014). Biophysical characterization of polyomavirus minor capsid proteins. *Biological Chemistry*, 395(7–8), 871–880.
- <sup>86</sup> HERNANDEZ-GARCIA, A., et al. (2014). Design and self-assembly of simple coat proteins for artificial viruses. *Nature Nanotechnology*, 9(9), 698–702.
- <sup>87</sup> THOMPSON, C. M., et al. (2015). Critical assessment of influenza VLP production in Sf9 and HEK293 expression systems. *BMC Biotechnology*, 15(1), 1–12.
- <sup>88</sup> LIPIN, D. I., et al. (2008). Encapsulation of DNA and non-viral protein changes the structure of murine polyomavirus virus-like particles. *Archives of Virology*, 153(11), 2027–2039.
- <sup>89</sup> ALI, A., & ROOSSINCK, M. J. (2007). Rapid and efficient purification of Cowpea chlorotic mottle virus by sucrose cushion ultracentrifugation. *Journal of Virological Methods*, 141(1), 84–86.
- <sup>90</sup> MALVERN. Calculating Volume Distributions From Dynamic Light Scattering Data. Technical Note, 1([www.malvern.com](http://www.malvern.com)), 1–4.
- <sup>91</sup> LORBER, B., et al. (2012). Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 40(6), 372–382.
- <sup>92</sup> H.C. MAHLER, et al. (2009). Protein aggregation: pathways, induction factors, and analysis. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 98 (9), 2909-2934.
- <sup>93</sup> MAGNUSSON, A. O., et al. (2019). nanoDSF as screening tool for enzyme libraries and biotechnology development. *FEBS Journal*, 286(1), 184–204.
- <sup>94</sup> GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, I., et al. (2020). Quality assessment of virus-like particles at single particle level: A comparative study. *Viruses*, 12(2), 1–24.
- <sup>95</sup> HSIA, Y., et al. (2016). Design of a hyperstable 60-subunit protein icosahedron. *Nature*, 535(7610), 136–139.
- <sup>96</sup> BALE, J. B., et al. (2016). Accurate design of megadalton-scale two-component icosahedral protein complexes. *Science*, 353 (6297), 389-394.
- <sup>97</sup> BUTTERFIELD, G. L., et al. (2017). Evolution of a designed protein assembly encapsulating its own RNA genome. *Nature*, 552(7685), 415–420.
- <sup>98</sup> MARCANDALLI, J., et al. (2019). Induction of Potent Neutralizing Antibody Responses by a Designed Protein Nanoparticle Vaccine for Respiratory Syncytial Virus. *Cell*, 177, 1420-1431.
- <sup>99</sup> MARIUTTI, R. B., et al. (2016). Functional expression, monodispersity and conformational changes in the SBMV virus viral VPg on binding TFE. *International Journal of Biological Macromolecules*, 83, 178–184.
- <sup>100</sup> JOHNSON, J. E., et al. (1974). Single crystal X-ray diffraction studies of *Southern bean mosaic virus*. *Journal of Ultrastructure Research*, 46(3), 441–451.

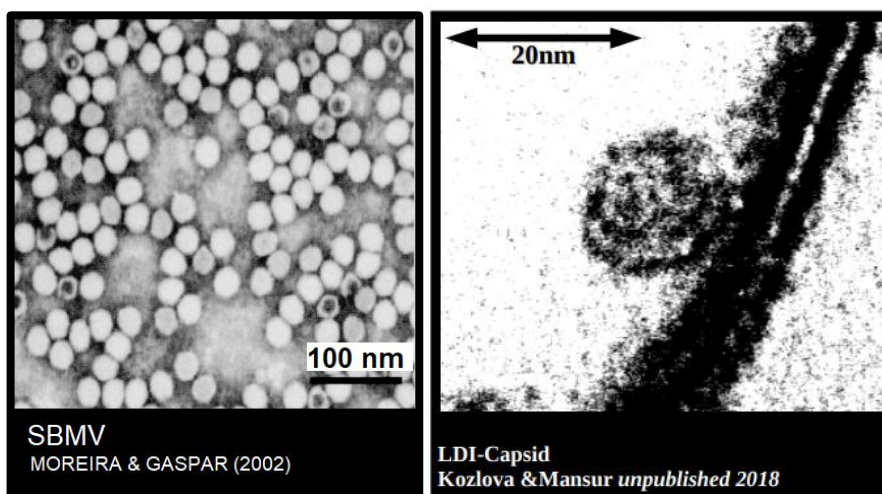
<sup>101</sup> SAVITHRI, H. S., & ERICKSON, J. W. (1983). The self-assembly of the cowpea strain of southern bean mosaic virus: Formation of T = 1 and T = 3 nucleoprotein particles. *Virology*, 126(1), 328–335.

**ANEXO A** – VLPs de LDI-CP produzidas em bactérias *E. coli* BL21 (DE3) observadas por meio de microscopia eletrônica de transmissão. As partículas possuem cerca de 20 nm.



Edgar Kozlova. & Daniel Mansur (unpublished - 2018)

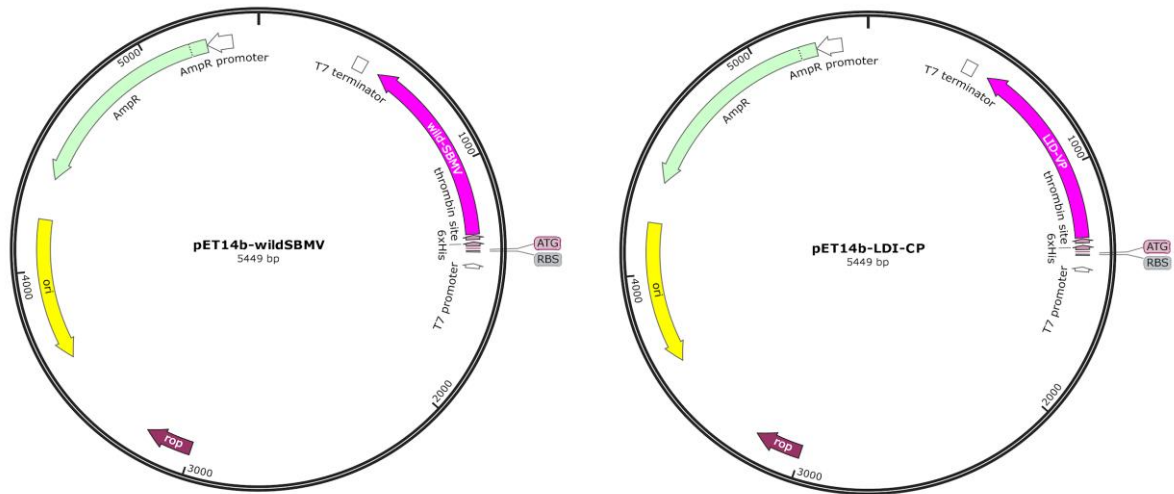
Fonte: Kozlova & Mansur (não publicado)



Fonte: Kozlova & Mansur (não publicado) e Moreira & Gaspar, 2002.

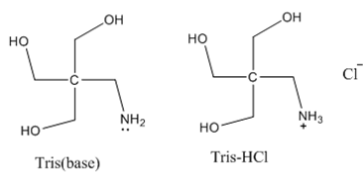
MOREIRA, A. E., & GASPAR, J. O. (2002). Propriedades moleculares de um isolado brasileiro do Southern bean mosaic virus. *Fitopatologia Brasileira*, 27(3), 292–297.

**APÊNDICE A** – Mapa do vetor de expressão pET14b contendo os genes das proteínas selvagens wildSBMV (esquerda) e LDI-CP (direita).

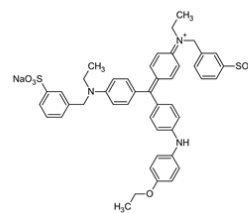


## APÊNDICE B – Estruturas e reações relevantes.

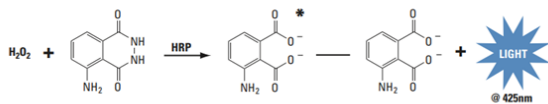
### A) Tampão Tris-HCl



### B) Coomassie Brilliant Blue R -250

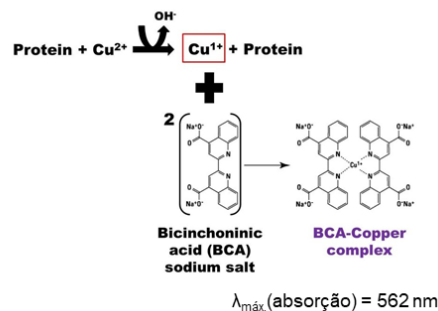


### C) Reação de quimioluminescência HRP- $\text{H}_2\text{O}_2$ -luminol

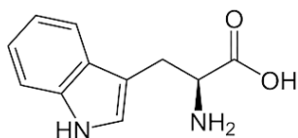


O luminol é oxidado pelo peróxido de hidrogênio, formando um produto de estado excitado chamado 3-aminofalato. O 3-aminofalato emite luz a 425 nm à medida que decai para o estado fundamental.

### D) Princípio método BCA



### E) Aminoácido Triptofano (Trp)



$\lambda_{\text{m\acute{a}x}}(\text{absor\c{c}\~{a}o}) = 280 \text{ nm}$   
 $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}(\text{emiss\~{a}o}) = 340 \text{ nm}$   
 $\epsilon = 5600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

**APÊNDICE C**– Reagentes químicos e pictogramas de perigo GHS.

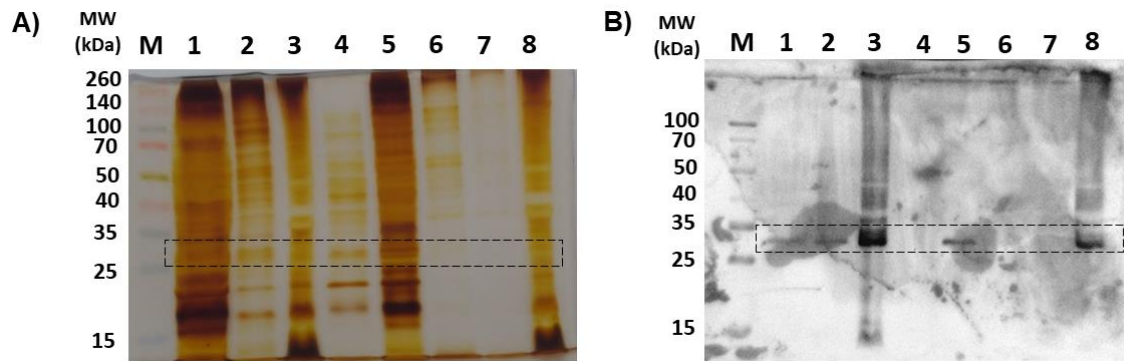
<b>Composto</b>	<b>Pictograma de perigo GHS</b>
Acrilamida 30%	GHS06; GHS08
Ampicilina sódica	GHS08
Sulfato de streptomicina	GHS07; GHS08
Ácido acético glacial	GHS02; GHS05; GHS07
Etanol absoluto	GHS02
APS	GHS03; GHS07; GHS08
EDTA	GHS07
Ácido clorídrico >25%	GHS05; GHS07
2-Mercaptoetanol	GHS06; GHS09
PMSF	GHS06; GHS05
SDS	GHS02; GHS06
TEMED	GHS02; GHS05; GHS07
Tris Base	GHS07

Fonte: elaborada pela autora, 2022.



Fonte: Disponível em: <<https://www.osha.gov/dsg/hazcom/pictograms/index.html>>. Acesso em: março, 2021.

**APÊNDICE D** – Perfil proteico da purificação da wildSBMV por colchão de sacarose (CS) e gradiente de sacarose (GS). A) SDS-PAGE 12.5%, coloração por nitrato de prata e B) Western Blot, anticorpo primário: anticorpo monoclonal anti poli-Histidina (1:10000). M: Marcador de peso molecular; 1: Fração superior; 2: colchão 30%; 3: Pellet CS; 4-7: 20-50% frações GS; 8: Pellet GS. Caixa preta tracejada indica a posição da wildSBMV (30526,23 Da).



**APÊNDICE E – Licenças Elsevier****Thank you for your order!**

Dear Fabiane Stoffel,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

**Order Summary**

Licensee:	UFSC
Order Date:	Mar 21, 2022
Order Number:	5273800207250
Publication:	Elsevier Books
Title:	Virus Taxonomy
Type of Use:	reuse in a thesis/dissertation
Order Total:	0.00 USD

View or print complete [details](#) of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center

**Thank you for your order!**

Dear Fabiane Stoffel,

Thank you for placing your order through Copyright Clearance Center's RightsLink® service.

**Order Summary**

Licensee:	UFSC
Order Date:	Mar 21, 2022
Order Number:	5273830538599
Publication:	Elsevier Books
Title:	Encyclopedia of Virology
Type of Use:	reuse in a thesis/dissertation
Order Total:	0.00 USD

View or print complete [details](#) of your order and the publisher's terms and conditions.

Sincerely,

Copyright Clearance Center