



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA (PPGFMC)

Juliano Custódio Vieira Júnior

**Desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos
IgG anti-proteína de nucleocapsídeo do vírus SARS-CoV-2**

Florianópolis

2022

Universidade Federal de Santa Catarina

Mestrado em Farmacologia

Juliano Custódio Vieira Júnior

Desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-proteína de nucleocapsídeo do vírus SARS-CoV-2

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientador: Dr. Daniel Santos Mansur

Florianópolis

2022

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DA BU

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vieira Júnior, Juliano Custódio

Desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático para
detecção de anticorpos IgG anti-proteína de nucleocapsídeo do
vírus SARS-CoV-2 / Juliano Custódio Vieira Júnior ;
orientador, Daniel Santos Mansur, 2022.
59 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Imunologia. 3. SARS-CoV-2. 4.
Ensaio imunoenzimático. I. Mansur, Daniel Santos. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia. III. Título.

Juliano Custódio Vieira Júnior

Desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-proteína de nucleocapsídeo do vírus SARS-CoV-2

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 25 de maio, de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra Patrícia Hermes Stoco

UFSC

Dra Luisa Damazio Rona Pitaluga

UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em farmacologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Daniel Santos Mansur, Dr.(a) Orientador(a)

Florianópolis

2022.

Este trabalho é dedicado a todos os profissionais que atuaram na linha de frente contra a pandemia de COVID-19

Agradecimentos

Primeiramente, os meus mais profundos agradecimentos à minha mãe Lucimar e aos meus irmãos Bernardo, Manuella e Maria Eduarda. Vocês fazem parte da minha formação e tornam tudo isso mais fácil, obrigado por sempre estarem do meu lado e acreditarem em mim.

De maneira especial, quero agradecer ao meu orientador Dr. Daniel Mansur, por me acolher no laboratório e me permitir fazer parte do time, onde eu pude crescer cientificamente e pessoalmente. Obrigado por ser um orientador que acolhe e passa segurança e confiança para seus alunos.

Agradeço ao meu amigo e colega, Sérgio, por ter me acompanhado ao longo desta jornada, sendo o IC estrelinha (eu votei em ti e isso que importa). Também sou grato pelas nossas conversas sobre ciência e sobre a vida, posso dizer que cresci muito contigo ali.

Sou grato a Dra mãe Rutinha, se alguém pegou na minha mão e me ajudou igual uma mãezinha, foi ela. Sou extremamente grato por todos os ensinamentos, pela mentoria e pela pessoa que és, você torna o seu redor, um lugar gostoso de estar.

Também tenho muito a agradecer à *Master of Science and Queen of ELISA* Nicoli De Bona Heck, por todas as conversas e aprendizados sobre ELISA, você foi uma facilitadora tornando as coisas mais simples. Obrigado por discutir comigo meus resultados e ajudar a me direcionar.

Agradeço ao Dr. André, a Dra. Aline, ao Dr. Mendes e a Dra. Greicy, por sempre estarem abertos a ensinar sobre ciência e a ajudar as pessoas. Levarei muito do que aprendi com vocês na vida.

A Eduarda Munari, que foi a grande amizade que o mestrado meu trouxe. Minha dupla de fofoca (dividimos até prêmio de fofoqueiros do lab), contigo a risada é garantida. Obrigado por me fazer companhia e me ajudar tantas vezes nos

experimentos. Por dividir mainha comigo, mesmo eu sendo o filho favorito. Você é fera!

A Dai, por monitorar os casos de COVID-19 no lab e assim, proporcionar que pudéssemos trabalhar com segurança em tempos de pandemia.

Também agradeço às demais pessoas do lab, Fabi, Carol, Luci, Filho, Mah, Priscila, Tayana, Natana, Junior, Giovana, Diego, Bianca, Marick e Dina. Vocês são todas pessoas maravilhosas, pessoas acima da média, tenho muito orgulho de poder trabalhar com pessoas como vocês.

De modo geral, agradeço ao LiDi como um todo, foi aqui que me veio a certeza de continuar no meio acadêmico, de aprender a amar o que faço, de crescer cientificamente e pessoalmente. Agradeço ao LiDi, por me fazer olhar pra mim mesmo e ter orgulho do que me tornei.

E também agradeço aos meus amigos, que mesmo com a pandemia, estavam ali de alguma maneira, me apoiando, conversando, tornando mais fácil lidar com essa pandemia. Cláudia, Mariana R., Eike, Wilker, Mari F., Sophia, Brenda, Luiz, Vic e Moni, sou extremamente grato por ter tido vocês ao longo dessa jornada, mesmo que a distância, foi muito importante pra mim.

Também agradeço a Saphira e ao Sansão, esses dois pacotinhos de pelos cheios de amor, perto deles é impossível ficar triste por muito tempo.

Agradeço aos professores que contribuíram com o desenvolvimento do projeto: Professor Sérgio Costa Oliveira, por ceder gentilmente as bactérias transformadas com o gene da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎, e a Prof. Dra. Rosemeri Maurici que permitiu que tivéssemos acesso ao soro de pacientes do projeto IMUNOVIDA

Agradeço às agências de fomento CAPES e MCTIC por financiarem o projeto.

E por fim, agradeço a UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, por me proporcionarem estar num programa e numa universidade pública de ponta.

“A História está repleta de pessoas que, como resultado do medo, ou por ignorância, ou por cobiça de poder, destruíram conhecimentos de imensurável valor que, em verdade, pertenciam a todos nós. Nós não devemos deixar isso acontecer de novo.” - Carl Sagan

Resumo

Introdução: O vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2) causador da *Coronavirus Disease* (COVID-19) é responsável pela maior pandemia do século XXI até o presente momento, onde já causou a morte de mais de 6.2 milhões de pessoas no mundo todo, sendo próximo das 664 mil mortes apenas no Brasil. Os instrumentos de vigilância são essenciais para avaliar a imunidade adquirida, seja por infecção natural da doença ou por vacinação, e desta maneira servir para tomadas de decisões para a gestão da pandemia. O SARS-CoV-2 é um *sarbecovírus* pertencente à família *Coronaviridae*. Seu genoma é um RNA simples fita sentido positivo, o qual é responsável por codificar proteínas estruturais e não-estruturais. Dentre as proteínas estruturais se destacam duas proteínas altamente imunogênicas: a proteína de pico Spike (S), que é responsável por se ligar na enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) presente na membrana das células hospedeiras, permitindo assim a entrada do vírus na célula, e a proteína de nucleocapsídeo (N), responsável pela proteção do material genético viral. A proteína N pode ser um importante alvo para epidemiovigilância, pois tem as características de ser imunogênica e conservada, desta maneira, com o surgimento de novas variantes, uma resposta contra essa proteína ainda poderia ser identificada por técnicas tradicionais. Neste projeto desenvolvemos um teste de ELISA indireto para detecção de anticorpos IgG em pacientes convalescentes de COVID-19. utilizando uma proteína de nucleocapsídeo recombinante N(50-350). **Metodologia:** Como antígeno de captura para o desenvolvimento do ELISA, foi utilizado uma proteína de nucleocapsídeo recombinante N(50-350) expressa em *E. coli* BL-21 e purificada *in house* pelo por coluna de afinidade. Soros de pacientes convalescentes de COVID-19, foram utilizados para padronização do ELISA. Foram testadas variações das soluções de bloqueio, diluição do anticorpo secundário, concentração do antígeno, o tempo de reação da enzima-substrato e os tempos de incubação da solução de bloqueio e dos soros. **Resultados:** A N(50-350) foi expressa em corpos de inclusão em bactérias BL21-CodonPlus e purificada por colunas de níquel. O ELISA foi padronizado com 3 ug/mL de antígeno, bloqueio com leite 5% por 2h, incubação dos soros por 24h e reação substrato/enzima por 7 min. O ELISA apresentou uma sensibilidade e especificidade de 98,8% e 93,6% para detecção de IgG anti-proteína

N do SARS-CoV-2. **Conclusão:** O ELISA desenvolvido demonstrou ser um ensaio específico e sensível para detecção de IgG de pacientes convalescentes. Desta maneira, pode ser usado como uma ferramenta de epidemiovigilância e de ensaios de imunogenicidade em testes de vacinas.

Palavras-chaves: SARS-CoV-2, ELISA, COVID-19, Proteína recombinante.

Abstract

Introduction: The Severe Acute Respiratory Syndrome 2 virus (SARS-CoV-2) that causes the Coronavirus Disease (COVID-19) is responsible for the biggest pandemic of the 21st century to date, where it has already caused the death of more than 6.2 million people worldwide, being close to the 664 thousand deaths in Brazil alone. Surveillance instruments are essential to assess acquired immunity, either by natural infection of the disease or by vaccination, and thus serve to make decisions for the management of the pandemic. SARS-CoV-2 is a sarbecovirus belonging to the Coronaviridae family. Its genome is a positive-sense single-stranded RNA, which is responsible for encoding structural and non-structural proteins. Among the structural proteins, two highly immunogenic proteins stand out: the spike protein (S), which is responsible for binding to the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) present in the membrane of host cells, thus allowing the entry of the virus into the cell, and the nucleocapsid protein (N), responsible for protecting the viral genetic material. The N protein can be an important target for epidemiological surveillance, as it has the characteristics of being immunogenic and conserved, in this way, with the emergence of new variants, a response against this protein could still be identified by traditional techniques. In this project we developed an indirect ELISA test for detection of IgG antibodies in COVID-19 convalescent patients. using a recombinant N(50-350) nucleocapsid protein. **Methodology:** As capture antigen for the development of the ELISA, a recombinant nucleocapsid protein N(50-350) expressed in E. coli BL-21 and purified in house by affinity column was used. Sera from convalescent COVID-19 patients were used to standardize the ELISA. Variations of blocking solutions, secondary antibody dilution, antigen concentration, enzyme-substrate reaction time and incubation times of blocking solution and sera were tested. **Results:** N(50-350) was expressed in inclusion bodies in BL21-CodonPlus bacteria and purified by nickel columns. The ELISA was standardized with 3 ug/mL of antigen, blocking with 5% milk for 2h, incubation of the sera for 24h and substrate/enzyme reaction for 7 min. The ELISA had a sensitivity and specificity of 98.8% and 93.6% for detection of IgG anti-SARS-CoV-2 N protein. **Conclusion:** The ELISA developed proved to be a specific and sensitive assay for detecting IgG in convalescent patients. In this way, it can be used as an epidemiological surveillance and immunogenicity assay tool in vaccine trials.

Keywords: SARS-CoV-2, ELISA, COVID-19, Recombinant protein.

Lista de abreviações

COVID-19 - Coronavírus Disease

CTD - domínio C-Terminal

E - Proteína de Envelope

ECA2 - Enzima conversora de angiotensina 2

ELISA - Ensaio imunoenzimático

ESPII -Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional

FPLC - Cromatografia Líquida rápida de proteínas (do inglês Fast Protein Liquid Chromatography)

HisTag6x - Cauda de polihistidina

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

IgE - Imunoglobulina E

IgD - Imunoglobulina D

IgM - Imunoglobulina M

IMAC - Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados

IPTG - Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

M - Proteína de Membrana

MERS - Vírus da Síndrome Respiratório do Oriente Médio

N - Proteína de nucleocapsídeo

N₍₅₀₋₃₅₀₎ - Fragmento da Proteína de nucleocapsídeo

nsp - Proteína não-estrutural

NTD - N-Terminal

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONU - Organização das Nações Unidas

ORF- Quadros de leitura aberto

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

S - Proteína Spike

SARS-CoV - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave

SARS-CoV-2 - Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

TB - *Terrific Broth*

RBD - Domínio de Ligação ao Receptor

WHO - Organização Mundial da Saúde

Lista de Figuras

Figura 1 - Morfologia dos coronavírus

Figura 2 - Estrutura viral do SARS-CoV-2

Figura 3 - Representação da sequência de aminoácidos e os domínios da proteína N

Figura 4 - Tipos de ELISA.

Figura 5 - Mapa do vetor de expressão pET-28a com os genes de expressão da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎

Figura 6 - Princípio do teste ELISA indireto desenvolvido

Figura 7 - Teste de expressão da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ em BL21-CodonPlus e BL21-Rosetta

Figura 8 - Expressão da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ em BL21-CódonPlus.

Figura 9 - Cromatograma de eluição da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎, purificada por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC) em cromatógrafo ÄKTA

Figura 10 - Revelação das frações purificadas da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ recombinante por SDS-PAGE e *Western Blot*

Figura 11 - Padronização da detecção de Imunoglobulinas anti-proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ em humanos através da técnica de ELISA

Figura 12 - Teste de bloqueio com Leite 5% ou Leite 3% + BSA 1% por 2 horas.

Figura 13 - Otimização da detecção de anticorpos anti-proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ do SARs-CoV-2 em humanos através da técnica de ELISA

Figura 14 - Aumento da exposição dos soros para 24h de incubação

Figura 15 - Teste de especificidade e sensibilidade

Lista de Quadros

Quadro 1 - Validação de ELISA indireto para detecção sorológica de IgG

Quadro 2 - Validação do ELISA indireto para detecção sorológica de IgG anti-N

Sumário

Lista de abreviações	15
INTRODUÇÃO	20
Coronavírus e o SARS-CoV-2	22
Resposta Imune Humoral contra o SARS-CoV-2	26
Teste ELISA	27
OBJETIVOS	30
Objetivo geral	30
Objetivos específicos	30
MATERIAIS E MÉTODOS	30
Proteína N recombinantes e Sistema de expressão bacteriano	30
Expressão da Proteína N(50-350)	31
Purificação da Proteína N(50-350)	32
Eletroforese e Western Blot	32
Quantificação de proteínas	33
Amostras	33
Desenvolvimento do Teste de ELISA indireto	34
Cálculo do nível de corte (cut-off)	35
Validação do Elisa indireto	35
Análise estatística	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
Expressão heteróloga em sistema bacteriano da proteína N(50-350)	37
Purificação da proteína N(50-350) por cromatografia de afinidade por íons metálicos	39
Otimização do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgG anti-proteína N	42
Aumento do tempo de incubação da solução de bloqueio produz background mais baixo	44
Teste concentração do antígeno para análise de limite de detecção	46
Aumentar tempo de incubação das amostras para 24 horas diminui a variação da absorvância entre os testes	47
O ELISA desenvolvido para detecção de IgG Humano anti-N(50-350) é específico, sensível e preciso.	48
CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, foi identificado um novo conjunto de casos de síndrome respiratória infecciosa vinculados a um mercado de animais vivos ao ar livre na cidade de Wuhan da província de Hubei, na China, o qual se espalhou rapidamente pelo mundo. Grupos de cientistas identificaram o agente infeccioso através do sequenciamento do material genético presente em fluidos de lavagem broncoalveolar dos pacientes doentes (Zhou *et al.*, 2020). No início de janeiro de 2020, o agente etiológico foi identificado como um novo coronavírus (WHO, 2020), o qual foi denominado de Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2, do inglês: *Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2*) e a enfermidade causada por ele foi nomeada de *Coronavirus disease 2019* (COVID-19) (Gorbalenya *et al.*, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), em janeiro de 2020, declarou Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), sendo a sexta vez que este estado de emergência é declarado. Conforme o Regulamento Sanitário Internacional a ESPII representa o mais alto nível de alerta da OMS, e consiste em termos:

“Um evento extraordinário que pode constituir um risco de saúde pública para outros países devido à disseminação internacional de doenças; e potencialmente requer uma resposta internacional coordenada e imediata”. (PAHO, 2021)

Em março de 2020, o diretor-geral da OMS, Tedros Adhanom, declarou o estágio de contaminação do SARS-CoV-2 como pandêmico. Esta classificação não leva em consideração a gravidade da doença, mas sim uma disseminação mundial em um curto espaço de tempo sustentada por transmissão pessoa-pessoa (WHO, 2021).

A COVID-19 é caracterizada como uma doença respiratória, cujo a transmissão ocorre através de gotículas respiratórias ou por contato direto de pessoas contaminadas com o SARS-CoV-2. A disseminação do vírus também pode ocorrer

por pacientes assintomáticos ou pré-clínicos (Aguilar *et al.*, 2020; Arons *et al.*, 2020). A maioria das pessoas infectadas apresentam sintomas leves ou moderados, para os quais não há necessidade de hospitalização. As manifestações mais comuns dos sintomas são tosse, febre, cansaço e perda de paladar/olfato. Entretanto, a enfermidade pode evoluir para casos mais graves, podendo causar pneumonia, síndrome respiratória aguda grave, insuficiência renal e até mesmo levar à morte (WHO, 2020).

De acordo com dados do Centro de Vigilância Médica da Universidade Johns Hopkins (2022), o vírus SARS-CoV-2 infectou mais de 280 milhões de pessoas em todo o mundo desde o início da pandemia até o início de 2022, matando cerca de 5,4 milhões. Mais de 618.000 pessoas morreram só no Brasil, criando a maior epidemia do século 21 até agora.

Dentro desta realidade, há uma intensa atividade global para o desenvolvimento de ferramentas necessárias para o combate desta pandemia de COVID-19, onde o mundo criou políticas de vacinação em massa de suas populações. Entretanto, no Brasil, mesmo com a vacinação, devido a alta taxa de transmissão do vírus e o surgimento de novas variantes a taxa de contaminados ainda permanece alta, indicando a necessidade de desenvolver novas estratégias de combate ao vírus. Até o início de maio de 2022, a população brasileira vacinada é de 77,7% com duas doses de vacina e de 43,3% com dose de reforço (Ritchie H. *et al.*, 2022). Já a transmissão viral, desde o primeiro registro de COVID-19 pela variante Omicron, tem sido escalonada, passando de 180 mil casos por dia durante o mês de fevereiro, segundo a plataforma do Centro de Medicina da Universidade Johns Hopkins (2022). O achatamento da curva de contágio, segundo a ONU, depende de estratégias coordenadas como vacinação em massa, ampla testagem da população e acompanhamento da imunidade adquirida contra o vírus.

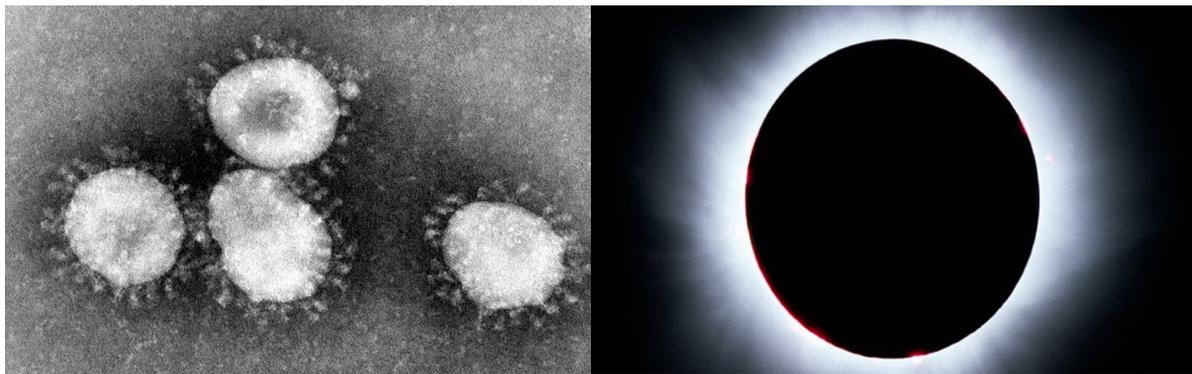
No momento, para monitoramento epidemiológico e diagnóstico no Brasil, têm sido utilizados testes sorológicos para detecção de anticorpos e antígenos, além dos testes moleculares através da técnica de RT-qPCR. A grande maioria destes testes possuem altos custos, como no caso do RT-qPCR, por ser um teste complexo ao qual demanda mão de obra altamente especializada. Os testes sorológicos utilizados são

importados de outros países (Anvisa, 2020), o que acaba elevando os preços dos kits, além da demanda destes testes para o mundo todo. Além disso, a validação destes testes ocorre em populações de outros países, o que pode levar a uma perda da eficácia destes testes quando utilizadas em outras populações (Bastos *et al.*, 2020).

Coronavírus e o SARS-CoV-2

Os coronavírus têm esse nome devido à sua morfologia em forma de coroa solar quando observado por microscopia eletrônica (Tyrrel *et al.*, 1968) (figura 1). Com o surgimento do SARS-CoV-2, até agora foram identificados um total de sete coronavírus que podem infectar seres humanos: HKU1, NL63, OC43 e 229E, estes responsáveis por causarem sintomas de resfriado leve. Também são conhecidos o coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) e o vírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS), estes responsáveis por provocarem doenças respiratórias graves com alta taxa de letalidade (Cui *et al.*, 2019).

Figura 1 - Morfologia dos coronavírus. Morfologia dos coronavírus vista através de microscopia eletrônica (à esquerda) semelhante à de uma coroa solar (à direita). **Fonte:** Centers for Disease Control and Prevention, part of the United States Department of Health and Human Services.

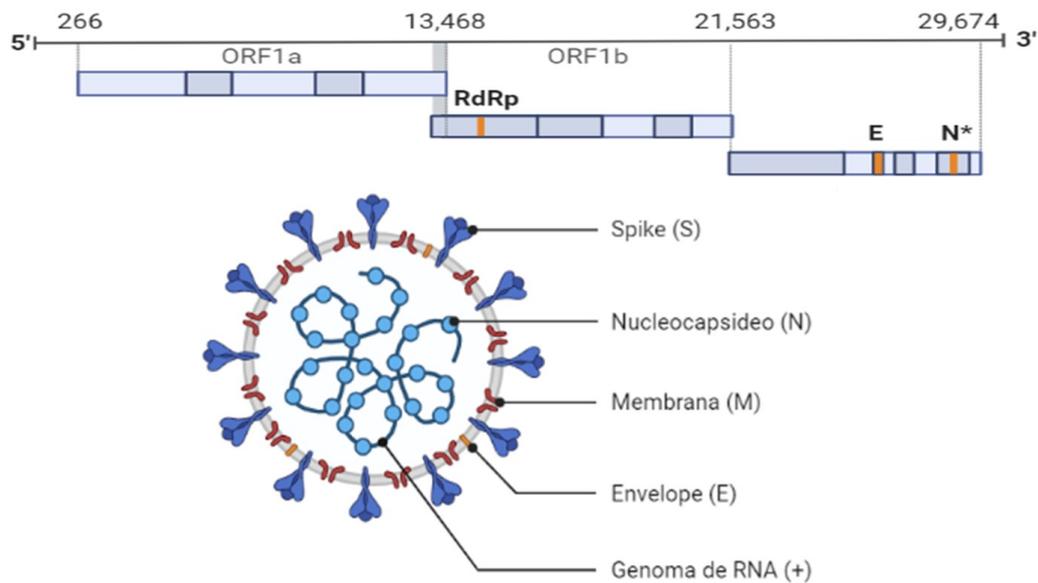


O SARS-CoV-2 faz parte do gênero betacoronavírus, pertencente à sub-família *Coronavirinae* da família *Coronaviridae*, dentro da ordem *Nidovirale* (Gorbalenya *et al.*, 2020). Sua origem é zoonótica, ainda que não elucidada, provavelmente se deu a partir de um coronavírus que circula em morcego-ferradura (*Rhinopholus sinicus*). A proximidade genética do SARS-CoV-2 com o sarbecovírus do morcego, Bat-CoVRaTG13 é de aproximadamente 96% (Zhou *et al.*, 2020) e supõe-se que o vírus

saltou diretamente para os humanos. Também é hipotetizado que o vírus pode ter saltado de maneira indireta, com a presença de um reservatório intermediário, sendo o Pangolim (*Manis javanica*) o principal candidato de ser este reservatório (Xiao *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2019). Esta hipótese ganha força uma vez que o coronavírus que infecta o pangolim possui apenas um aminoácido de diferença no domínio *Receptor Binding Domain* (RBD) da proteína Spike com o do SARS-CoV-2 (Liu e Zhang, 2020).

Os vírus da família *Coronaviridae* são caracterizados por apresentarem envelope e genoma de RNA fita simples de sentido positivo, e portam os maiores genomas de RNA dentre os vírus conhecidos, podendo chegar a aproximadamente 30 mil pares de bases. Eles possuem entre 7-10 janelas abertas de leituras (ORF, do inglês: *Open Reading Frames*), sendo as duas grandes: a ORF1a e ORF1b localizadas na região terminal 5', responsáveis por codificar as proteínas não-estruturais (nsp, do inglês: *non structural proteins*). Na porção terminal 3', estão as demais ORFs que codificam um pequeno número de proteínas acessórias e as proteínas estruturais (Pasternark *et al.*, 2006; Perlman e Netland, 2009), essas últimas, conforme ilustrado na figura 2, são: A proteína do envelope (E), a proteína de membrana (M), a glicoproteína da espícula, Spike (S) e a proteína de nucleocapsídeo (N) (Tan *et al.*, 2005).

Figura 2 - Estrutura viral do SARS-CoV-2. Em cima, a organização do genoma viral de RNA simples fita de senso positivo, do vírus SARS-CoV-2. Em baixo, desenho esquemático da estrutura partícula viral. Fonte: Li G. *et al.*, 2020



A proteína S é a responsável pela entrada do vírus na célula hospedeira, ela é composta de duas subunidades: S1, onde se encontra o RBD e S2. O RBD é a região da S responsável por se ligar ao receptor de superfície da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), o qual está distribuída amplamente em células do pulmão, coração, rim e do sistema gastrointestinal, permitindo a infecção (Lukassen *et al.*, 2020; Hoffmann *et al.*, 2020).

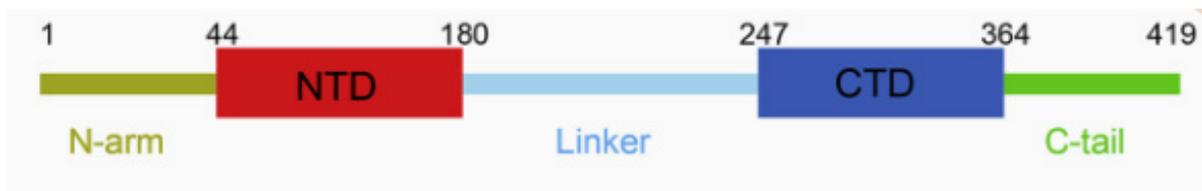
A proteína S é um dos mais importantes alvo nas estratégias de combate ao vírus, sendo um dos principais indutores de anticorpos neutralizantes (Tay *et al.*, 2020). Trabalhos vêm demonstrando que a recuperação de pacientes infectados por SARS-CoV-2 pode estar atrelada à produção de anticorpos responsáveis pela neutralização da proteína S, especificamente neutralizando a subunidade RBD da proteína (Yuan *et al.*, 2020). Também há relatos de ação anti SARS-CoV-2 através células T contra estruturas específicas do vírus em pacientes convalescentes (Ni *et al.*, 2020). Desta maneira, a proteína S vem sendo o principal antígeno viral para indução de resposta imune através de vacinas (Jeroen *et al.*, 2021). As vacinas baseadas na glicoproteína S vêm sendo utilizadas amplamente no mundo todo, como a vacina de RNA mensageiro da Pfizer-BioNTech BNT162b2 e a vacina de vetor viral de adenovírus ChAdOx 1-S (Bernal *et al.*, 2021). A proteína S também tem sido

utilizada como antígeno alvo em diferentes ferramentas de diagnóstico molecular e imunológico (Nakano *et al.*, 2021; Goh *et al.*, 2021).

Entretanto, o uso da S como instrumento único para diagnóstico e vacinas deixam algumas lacunas em aberto, como: i) Alguns pacientes não apresentaram anticorpos contra o vírus, sendo comum em pacientes com sintomas leves ou assintomáticos (Long *et al.*, 2021; Marchi *et al.*, 2021). ii) Há relatos de que células B de memória podem ter vida curta após a infecção (Channappanavar *et al.*, 2014). iii) A proteína S, possui vários *hotspots* de mutação (Ruan *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2020; Goswami *et al.*, 2020), assim como tem sido presenciado com o surgimento de novas variantes de preocupação do vírus. Nas variantes Beta, Gama e Delta, apresentaram, respectivamente, 10, 12 e 9 mudanças de aminoácidos da proteína S, enquanto na variante Omicron, apresentou 37 mudanças de aminoácidos. (Bernasconi *et al.* 2021). Desta forma, novas variantes poderiam interferir no diagnóstico e na efetividade de vacinas.

Conforme os problemas enumerados anteriormente, a proteína N surge como um importante alvo para diagnóstico, epidemiologia e postulante para futuras vacinas. A N (Figura 3) é uma proteína constituída de 419 aminoácidos (Zeng *et al.*, 2020). A sua principal função é participar do processo de montagem da partícula viral, encapsulando o genoma viral (Narayanan *et al.*, 2020). Ela é uma das proteínas mais predominantes do SARS-CoV-2, onde em cada vírion são estimadas cerca de 1000 cópias desta proteína, enquanto a proteína S possui em torno de 100 cópias (Bar-On *et al.*, 2020). A proteína N é altamente imunogênica (Tilloca *et al.*, 2020), sendo alvo de anticorpos do tipo IgG, IgM e IgA (Zeng *et al.*, 2020). Em SARS-CoV, cujo 85% do material genético é idêntico ao SARS-CoV-2, existe uma forte resposta de célula T induzida através da proteína N, o qual esta resposta pode durar muitos anos (Tang *et al.*, 2005). A proteína N tem a sequência de aminoácidos altamente conservada (Zhu *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2020), hipotetizando que ensaios de detecção molecular e imunológicas cujo o alvo seja a N, podem servir para detectar o contato de pessoas com o vírus, mesmo sendo cepas mutantes do coronavírus.

Figura 3. Representação da sequência de aminoácidos e os domínios da proteína de Nucleocapsídeo do vírus SARS-CoV-2 (Zeng *et al.*, 2020).



Resposta Imune Humoral contra o SARS-CoV-2

A resposta imune contra um agente infeccioso é de suma importância no combate do agente infeccioso e ao desenvolvimento da doença. A resposta imune de vertebrados mandibulados é didaticamente dividida em duas: A resposta imune inata e a resposta imune adaptativa. A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do organismo, consiste de mecanismos de defesas celulares e bioquímicos, sendo uma resposta de ação rápida e inespecífica contra microorganismos. A resposta imune adaptativa é exclusiva dos vertebrados mandibulados, e atua de maneira integrativa com a resposta imune inata. A resposta adaptativa é ativada através da exposição a microorganismos, e tem como características, a propriedade de distinguir diferentes moléculas, ou seja, atua de maneira específica, ela também tem a habilidade de responder de maneira mais robusta quando exposta repetidamente ao mesmo agente infeccioso, característica chamada de memória (Abbas *et al.*, 2015; Murphy, 2014).

A resposta imune adaptativa é subdividida em duas: Resposta imune adaptativa celular e resposta imune adaptativa humoral. A resposta imune celular ocorre contra microorganismos intracelulares, como algumas bactérias e vírus. A resposta celular é mediada por células linfócitos T. Já a resposta humoral, acontece através dos linfócitos B, estes ao se ligarem a um antígeno extracelular ou na superfície da célula, se diferenciam em plasmócitos liberadores de anticorpos. Os anticorpos, são divididos em 5 classes: a Imunoglobulina M (IgM), está associada a infecções recentes, podendo ser identificada nos primeiros dias de infecção, a Imunoglobulina A (IgA), que é secretada na mucosa, e é importante na resposta imune local, a Imunoglobulina D (IgD) que está presente na superfície dos linfócitos B imaturos em forma de receptor promovendo a ativação destes quando se liga num antígeno, a Imunoglobulina (IgE) que atua na defesa contra parasitas e está associada a reações alérgicas, e por fim, a Imunoglobulina G (IgG) é secretada na

corrente sanguínea e é uma resposta imune mais tardia, ligada a memória imunológica, sendo importante para avaliação da resposta imune humoral em populações vacinadas e convalescentes. A secreção do tipo de imunoglobulina depende do local e do tempo de exposição aos antígenos, elas podem ser liberadas na corrente sanguínea ou na mucosa, onde auxiliam na eliminação dos agentes infecciosos, através de diferentes mecanismos (Abbas *et al.*, 2015; Murphy, 2014).

A resposta imune humoral contra o SARS-CoV-2 ainda é pouca elucidada, porém vem sendo amplamente estudada no mundo todo. Entretanto, já vem sendo demonstrado que a resposta humoral é importante para frear o percurso da doença, como demonstrado, que pacientes convalescentes produzem anticorpos direcionados contra diferentes alvos do vírus, como a proteína M, a glicoproteína S e a N (Jorriben *et al.*, 2021; Zeng *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2020). A importância da produção de anticorpos na COVID-19 é discutida no trabalho de Lucas *et al.* (2021), onde eles observaram que o atraso na produção de anticorpos, pode estar associado com o desenvolvimento da COVID-19. A proteína N por ser uma das primeiras expressas após a infecção, pode induzir a produção de anticorpos de maneira precoce em relação às outras proteínas. Os estudos de produção IgG em pacientes de COVID-19, demonstram que inicialmente é produzido IgM contra a proteína N e entre as segunda e quarta semanas, ocorre a conversão para produção de IgG (Algaissi *et al.*, 2020). Outros trabalhos também demonstram que a proteína N produz anticorpos específicos e mais sensíveis do que os anticorpos anti-proteína S (Burbelo *et al.*, 2020; Li² *et al.*, 2021). A N também está associada a maior produção de IgG e de IgM em pacientes com sintomas graves do que em sintomas leves ou assintomáticos (Long *et al.*, 2021).

Teste ELISA

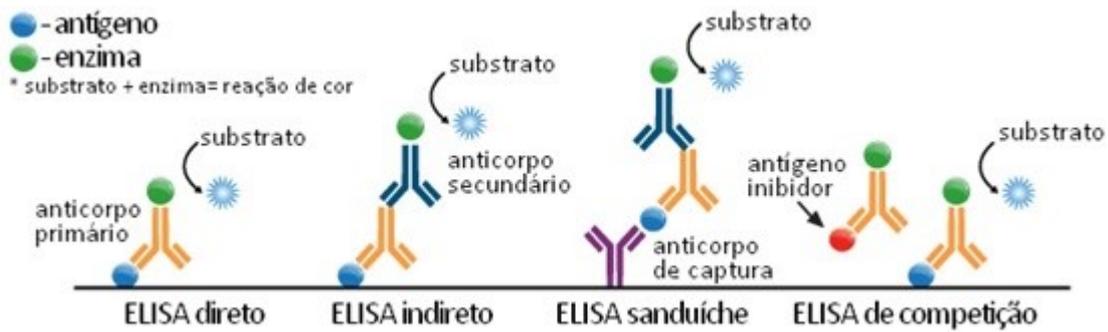
A resposta imune do indivíduo contra um agente patológico pode ser induzida através da exposição ao microorganismo infectante ou pelo uso de vacinas, o qual tem como principal função treinar o sistema imunológico do organismo produzindo anticorpos e/ou induzindo resposta através de células T (Oren e Ahmed, 2017). A resposta imune mediada por anticorpos depende do reconhecimento de antígenos

por linfócitos B de memória e estes anticorpos secretados servem de importantes marcadores de diagnóstico e de imunidade adquirida. E os testes imunoenzimáticos são utilizados como ferramentas para quantificar a presença, ou não, destes anticorpos (Abbas *et al.*, 2007; Murphy, 2014).

Os ensaios imunoenzimáticos, conhecidos como ELISA (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*), foram criados na década de 70 e são utilizados para quantificar anticorpos e antígenos (Engvall, 1971; Engvall, 1980). O princípio do teste consiste em uma relação antígeno-anticorpo, onde a quantidade de anticorpos que se ligam ao antígeno é proporcional à quantidade de antígeno presente, e a mensuração do analito se dá por espectrofotometria de conversão de um substrato claro a um produto colorido através de uma enzima acoplada. A intensidade de cor é proporcional à concentração do antígeno ou do anticorpo de interesse (Abbas *et al.*, 2015; Davis *et al.*, 1990).

O ELISA pode ser desenvolvido, conforme algumas modificações no método (Figura 4), dependendo do objetivo: a) ELISA Direto, o qual consiste num antígeno adsorvido numa placa que é detectado por um anticorpo conjugado a uma enzima. b) ELISA Indireto, o antígeno adsorvido na placa é detectado por um anticorpo primário não marcado, que por sua vez é detectado por um anticorpo secundário anti-anticorpo primário marcado com uma enzima. c) ELISA Competitivo onde o antígeno da amostra teste compete com o antígeno de captura frente ao anticorpo específico (Vaz *et al.*, 2007). Em alguns casos os resultados positivos obtidos em um ELISA podem ser confirmados por outros testes específicos como, por exemplo, o *Western blot*, que detecta proteínas do vírus, e o teste de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês: *Polimerase Chain Reaction*) que detecta ácidos nucleicos virais.

Figura 4. Tipos de ELISA. Fonte: <https://www.hhub.com.br/noticias/metodo-elisa>



Desta maneira, hipotetizamos que através do desenvolvimento de um ELISA utilizando como ferramenta uma proteína N recombinante do SARS-CoV-2, conseguiremos analisar o perfil sorológico de populações que tiveram contato com o vírus, através da produção de anticorpos do tipo IgG . Assim, a criação deste teste imunoenzimático, poderá servir de ferramenta de epidemiovigilância e de estudos de imunogenicidade para validação de vacinas

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver e padronizar um ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos do tipo Imunoglobulina G anti-proteína de nucleocapsídeo da SARS-CoV-2 utilizando como ferramenta uma proteína de nucleocapsídeo recombinante.

Objetivos específicos

1. Expressar a proteína recombinante de nucleocapsídeo da SARS-CoV-2 (N₍₅₀₋₃₅₀₎) em sistema bacteriano;
2. Purificar a proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ por Cromatografia por Afinidade de Íons Metálicos;
3. Padronização do ELISA indireto utilizando a proteína purificada *in house*;
4. Avaliar a sorologia de pacientes convalescentes para SARS-CoV-2

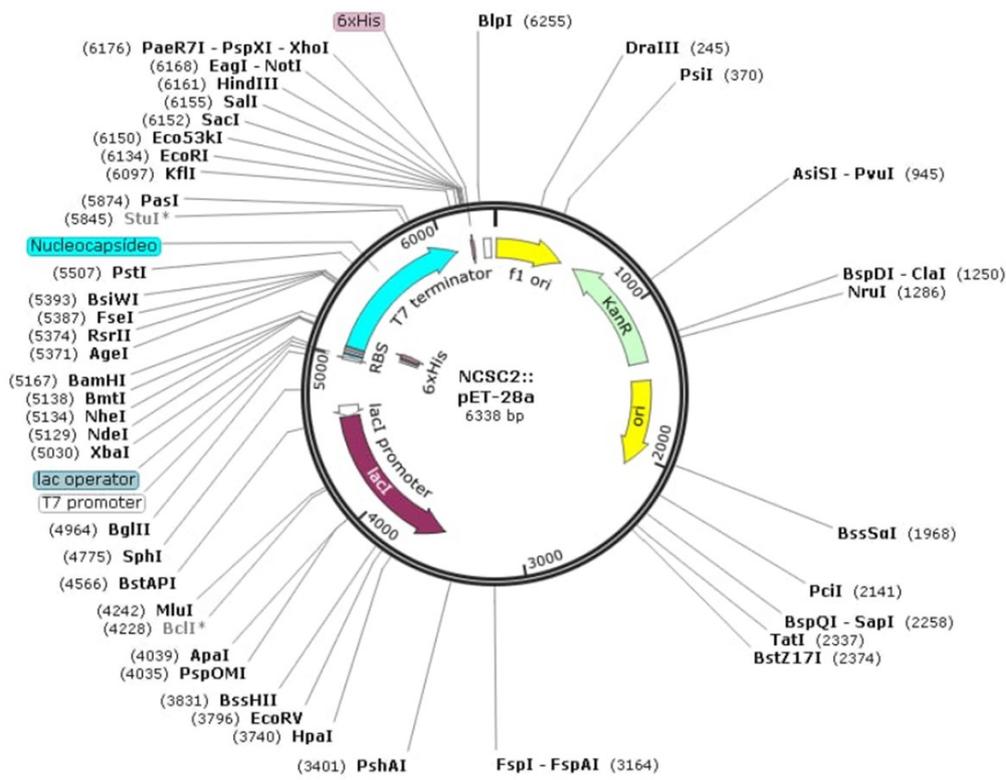
MATERIAIS E MÉTODOS

Proteína N recombinantes e Sistema de expressão bacteriano

A construção da proteína N recombinante (Figura 5) utilizada para desenvolver o ELISA deste trabalho, se refere à porção de 50-350, onde estão localizados a maioria dos epitopos preditos de células B, MHC-classe I e MHC-classe II (Oliveira *et al.*, 2020). O gene de expressão deste fragmento da proteína N foi realizada em plasmídeos pET28a resistente ao antibiótico kanamicina, também contendo uma cauda de poli-histidina 6x (6x-His Tag).

Foram utilizadas as bactérias BL21-Codon plus e BL-21 Rosetta, previamente transformadas com o plasmídeo construído, ao quais foram cedidas pelo grupo do professor Dr. Sérgio Costa Oliveira, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Essa construção foi denominada N₍₅₀₋₃₅₀₎.

Figura 5. Mapa do vetor de expressão pET-28a com o gene de expressão da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎



Expressão da Proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎

Para induzir a expressão da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎, utilizamos uma colônia isolada selecionada por resistência à canamicina e a cloranfenicol, a qual foi pré-inoculada em um total de 30mL de meio *Terrific Broth* líquido (TB) (47 g/L de TB somado a 4 ml/L de glicerol, o meio foi posteriormente autoclavado a 121°C por 15 min) suplementado com os antibióticos kanamicina (50ug/mL) e cloranfenicol (50 ug/mL). Os cultivos foram mantidos sob agitação (150 rpm) a 37 °C durante 16 horas. Deste pré-inóculo, 20 mL foram para 1 garrafas de 1000 mL com meio TB novo, suplementado com kanamicina e cloranfenicol, onde as bactérias permaneceram crescendo sob agitação (150 rpm) a 37 °C até alcançar a DO 600nm entre 0,4 e 0,8. Em seguida, a expressão da proteína foi induzida pela adição de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) de 1 mM e as bactérias foram mantidas sob agitação (150 rpm) a 26°C durante 16 horas. Após a expressão, o cultivo foi centrifugado a 12.000g por 30 minutos a 4°C e o sedimento celular foi homogeneizado com tampão de lise (tris(hidroximetil)aminometano-HCl (Tris-HCl) 50mM, NaCl 500 mM, ácido

etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM) e suplementado com inibidor de proteases (PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila) 1mM. Após a homogeneização, foi utilizado lisozima 50 mM por 30 min para auxiliar no rompimento das membranas bacterianas. As células foram rompidas por sonicação e o homogeneizados centrifugados (12.000 x g por 40 min a 4°C). Após a centrifugação, para analisar o perfil de expressão da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎, o pellet e o sobrenadante foram coletados e passaram pela técnica de Western Blot. Conforme houve formação de corpos de inclusão, o pellet bacteriano foi solubilizado em tampão de ureia 8 M por 2 horas para obtermos as frações solúveis da proteína, que posteriormente foi utilizada para a purificação.

Purificação da Proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎

A purificação da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎, foi realizada por Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos Imobilizados (IMAC, do inglês *Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography*) com leitura a 280 nm, conforme o protocolo do Upadhyay *et al.* 2014 com modificações. A proteína solubilizada foi injetada na coluna, previamente carregada com níquel (Ni⁺²), e pré-equilibrada com tampão A (Tris-HCl 50 mM, Ureia 4 M, NaCl 500 mM e Imidazol 10 mM pH 8.0). A proteína foi eluída com 3 diferentes concentrações (4.5%, 9% e 100%) do tampão B (Tris-HCl 50 mM, Uréia 2 M, NaCl 500 mM e Imidazol 300 mM pH 8.0). Para evitar que a proteína ficasse numa conformação desenovelada, o eluído foi solubilizado em tampão de *Refolding* (Tris-HCl 50mM, NaCl 250 mM, Glicerol 10%, pH 8.0) por 16 horas. Depois de recuperar a conformação proteica, a proteína foi concentrada por centrifugaça em *amicon Ultra-15 Millipore* de filtro de poro de 10kDa (3220 g até chegar em aproximadamente 2 mL).

Eletroforese e Western Blot

A confirmação da expressão e da purificação da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎, foi realizada através do ensaio de imunodeteção por *Western Blot*.

As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra 2x (Tris-HCl 50 mM pH 6.8; 2-Mercaptoethanol (BME) 2,5%; Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 2%; Glicerol 10% e Azul de Bromofenol 0,2%) e aquecidas a 99°C por 10 min. As proteínas das amostras então foram separadas por eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Amersham Protran 0.45 NC (GE Healthcare), utilizando o equipamento de transferência *XCell II™ Novex mini-Cell (Invitrogen)*, por 2h 30 min à 25V. A confirmação da transferência se deu por coloração das proteínas na membrana em solução de *Ponceau S* 1%.

Depois das proteínas serem transferidas para a membrana de nitrocelulose, a membrana foi bloqueada com solução de bloqueio (TBS 1X, Leite 5%) por 45 min em temperatura ambiente. O anticorpo primário monoclonal, Anti-HisTag 6x (1:10000) em solução de TBS-Tween-BSA 5% foi incubado após o bloqueio por 16 h à 4°C. Posteriormente, o anticorpo secundário, IgG anti-mouse (1:5000) conjugado a peroxidase (Cells Signaling) foi incubado por 1h em temperatura ambiente. Para detecção das bandas, foi utilizado o reagente de revelação da *Thermo Fisher Pierce ECL Western Blot Substrate*. A membrana foi revelada no Fotodocumentador ChemiDoc BioRad do Laboratório multiusuários (Lameb) da UFSC.

Quantificação de proteínas

A quantificação da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ purificada foi realizada pelo método o ácido bicinonínico (*BCA Protein Assay Kit*) de acordo com o protocolo do fabricante (*Thermo scientific*).

Amostras

Foram utilizadas amostras de soro de 88 pacientes convalescentes de COVID-19 com diagnóstico confirmado através da técnica de RT-qPCR nunca vacinados

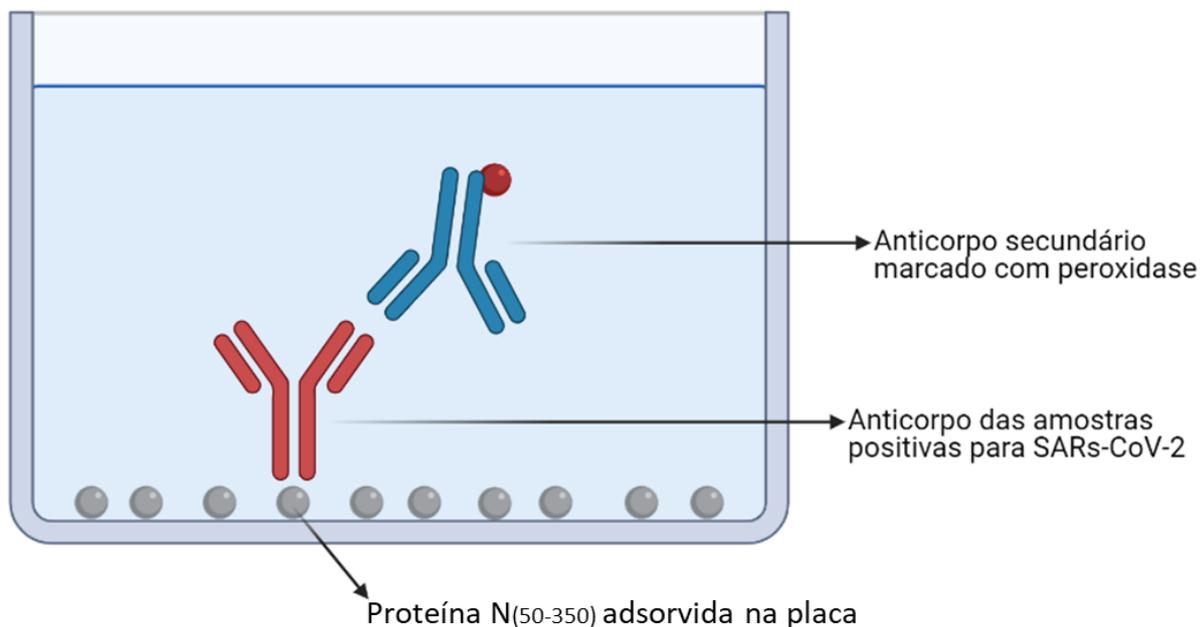
contra SARS-CoV-2, cedidas pelo projeto Imunovida, do Hospital Universitário Polydoro Ernani São Thiago. As amostras foram coletadas entre 1 ou 2 meses depois da confirmação da doença. Como controle negativo, foram utilizadas amostras pré-pandemia de doadores voluntários saudáveis.

A autorização para a coleta de sangue dos voluntários está inclusa no projeto já aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (CAAE #36944620.5.1001.0121).

Desenvolvimento do Teste de ELISA indireto

Para o desenvolvimento deste teste de ELISA indireto, foi utilizado o antígeno N₍₅₀₋₃₅₀₎ purificado. Foram utilizadas placas de múltiplos poços de alta adsorção Nunc, ao qual foram incubadas com a proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ na concentração de 3 mg/mL (posteriormente, foi testada as concentrações de 2, 1 e 0.5 ug/mL) diluída em PBS, por 16h, em câmara úmida e temperatura ambiente. Nos primeiros testes, para padronização do método, foram testadas diferentes soluções de bloqueio: Solução de bloqueio com Leite 5 % (PBS 1X, Leite 5% e Tween 0,05%), Solução de bloqueio com Leite 3 % + BSA 1% (PBS 1X, Leite 5%, BSA 1% e Tween 0,05%) e Solução de bloqueio com BSA 3% (PBS 1X, BSA 3%, Tween 0,05%). O tempo de incubação da solução de bloqueio testadas, foi de 1 ou 2 horas. A diluição dos soros testados foi na proporção 1:100 incubada por 2h e 30min ou por 24h. O anticorpo secundário utilizado foi IgG Goat anti-Human HRP, nas diluições 1:5000 ou 1:10000 por 2h. Para iniciar a reação foi utilizado o substrato cromogênico TMB e para parar a reação HCl 1N. A leitura da absorbância ocorreu no comprimento de onda de 450nm na leitora de ELISA BioTek ELX800.

Figura 6. Princípio do teste ELISA indireto desenvolvido



Cálculo do nível de corte (*cut-off*)

O controle de corte foi obtido através da média da absorbância dos controles negativos mais duas vezes o desvio padrão, onde o *cut-off* é o resultado desta leitura. Foram consideradas positivas as amostras que tiverem a absorbância acima do valor estabelecido (do *cut-off*) e negativas quando ficarem iguais ou abaixo do valor de *cut-off*.

Validação do Elisa indireto

Para validar o teste de ELISA padronizado, foram calculados os valores de especificidade, sensibilidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e a precisão do teste (Crowther, 2021) conforme demonstrado abaixo:

Quadro 1. Validação de ELISA indireto para detecção sorológica de IgG

Resultado do ELISA	Pacientes com Covid
--------------------	---------------------

	Positivos	Negativos	Total
Positivos	a	b	a+b
Negativos	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

Especificidade: $d/(b+d)*100$

Sensibilidade: $a/(a+c)*100$

Valor preditivo positivo: $a/(a+b)*100$

Valor preditivo negativo: $d/(c+d)*100$

Precisão: $(a+d)/(a+b+c+d)*100$

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad prism, versão 8. Para comparação entre as médias dos resultados que foram obtidos, foi realizado o teste t de *Student* não-pareado. Foi adotado 5% como limite de significância estatística ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios imunoenzimáticos são importantes métodos para detecção de anticorpos, podendo diagnosticar a doença ativa ou pregressa (Abbas, 2015). A análise de perfil sorológico de diferentes populações é de suma importância para a

identificação da imunidade adquirida, seja por contato direto com o vírus ou por imunidade adquirida através de vacinação. Desta maneira, o ELISA uma é importante ferramenta para tomada de decisões de gestores públicos de saúde

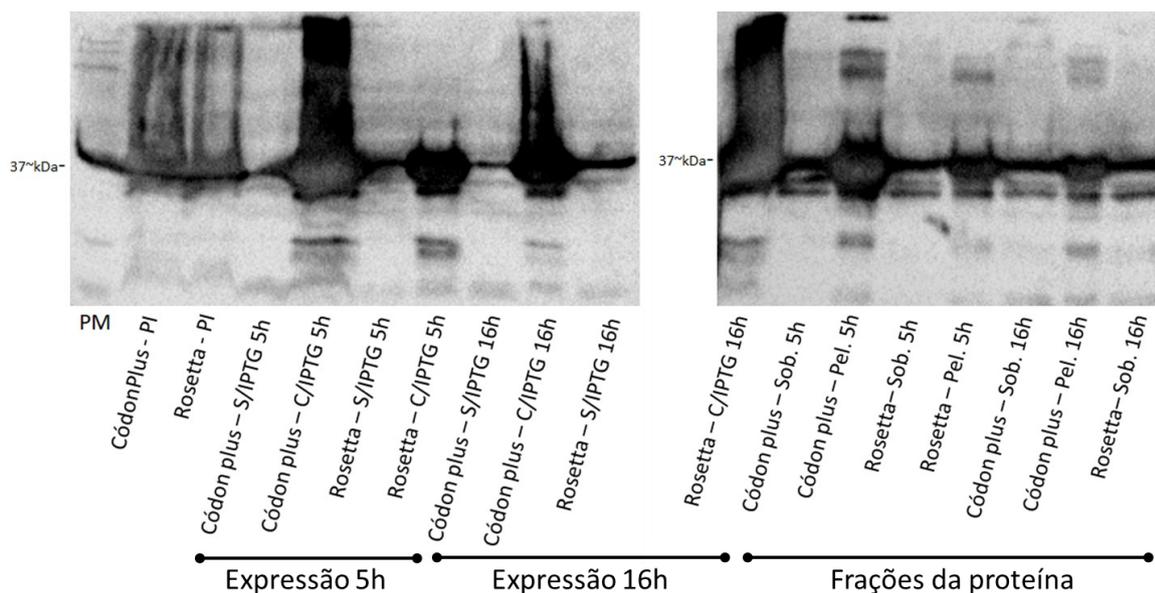
O objetivo deste trabalho foi desenvolver um ELISA para identificar a resposta imune humoral (IgG) contra a proteína de N do SARS-CoV-2. A N é a proteína estrutural mais abundante do vírus, é altamente imunogênica e conservada entre os coronavírus humanos. Devido a essas características, ela tem sido bastante empregada nos testes sorológicos (Ahmed *et al.*, 2020). Essa possui 419 aminoácidos (Zeng *et al.*, 2020) e é imunogênica (Oliveira *et al.*, 2020; Rakib *et al.*, 2020; Tilloca *et al.*, 2020).

Expressão heteróloga em sistema bacteriano da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎

Na primeira parte do desenvolvimento deste trabalho, o objetivo foi expressar a N₍₅₀₋₃₅₀₎ em sistema heterólogo bacteriano. Foram testadas duas linhagens de *Escherichia coli* (BL21) modificadas: BL21-Rosetta e BL21-CodonPlus. O uso de *E. coli* como sistema de expressão possui vantagens bastante conhecidas, como taxa de crescimento alta e rápida e baixo custo financeiro (Rosano e Ceccarelli, 2014).

Por meio da técnica de *Western blot*, podemos observar nos testes de expressão (figura 7), através da marcação nas bandas de ~35 kDa, que a linhagem BL21-CodonPlus foi a que melhor induziu a expressão da proteína, em 5 ou 16 horas de expressão após indução com IPTG 1mM. A proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ foi expressa em sua maioria no pellet bacteriano (corpos de inclusão). Desta maneira, a linhagem BL21-CodonPlus foi utilizada como sistema de expressão bacteriano para a produção da proteína em maior escala.

Figura 7. Teste de expressão da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ em BL21-CodonPlus e BL21-Rosetta. Foram utilizadas duas linhagens de BL21 para teste de expressão da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎: BL21-CodonPlus e BL21-Rosetta. A expressão foi induzida por IPTG 1mM por 5 e 16 horas. Marcação primária com Anti-His Tag (1:10000). Marcação secundária com Anti-IgG mouse HRP (1:5000). A proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ possui aproximadamente 35 kDa.

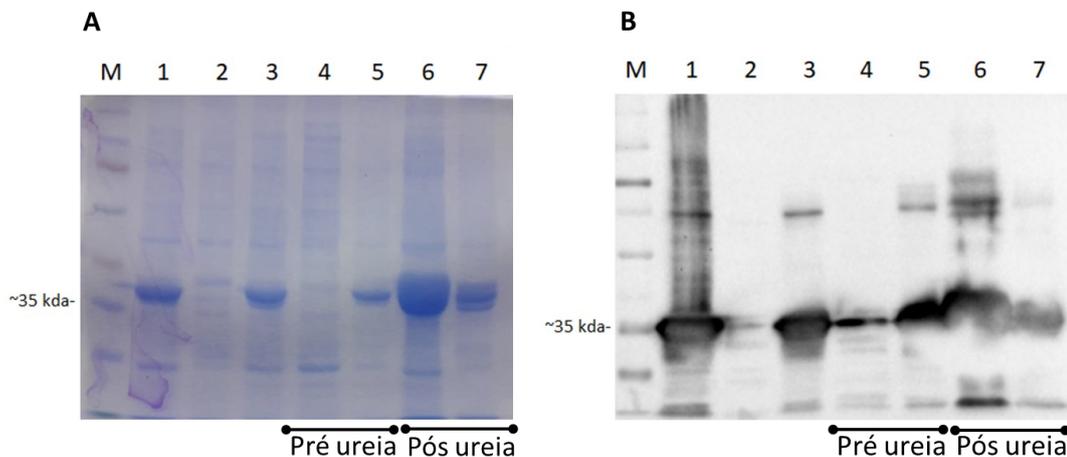


Conforme observamos anteriormente na figura 7, através das técnicas coloração por *Coomassie Brilliant Blue R 250* e de *Western Blot*, a expressão da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ nas bactérias BL21-CodonPlus ocorreu através da indução por IPTG 1 mM por 16 horas de expressão, devido a presença de uma banda da proteína alvo em aproximadamente 35 kDa. Em concordância ao teste de expressão realizado anteriormente, constatamos que a proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ expressa, permanece no pellet bacteriano em forma de corpos de inclusão.

Corpos de inclusão (IB, do inglês: *Inclusion bodies*) são agregados proteicos decorrentes de uma grande quantidade de expressão de uma proteína em *Escherichia coli*. A formação destes agregados é bastante comum em proteínas recombinantes (Williams *et al.*, 1982) e constatado em trabalhos de expressão da proteína de nucleocapsídeo recombinante do SARS-CoV-2 (Li *et al.*, 2021; Chura-Chambi *et al.*, 2021). Os IBs são formados, comumente, quando há saturação dos sistemas pós-traducionais, produzindo assim proteínas mal dobradas que se agregam, resultando em proteínas insolúveis (Carrio *et al.*, 2005). Desta maneira, para a solubilização da proteína agregada, o pellet foi tratado com 8 M de uréia durante 2 horas. O tratamento com ureia dissocia as interações proteína-proteína e desdobrando-as, fazendo com que elas fiquem com os grupamentos sulfidrilas expostos, assim a proteína fica num estado reduzido (Carrio *et al.*, 2005). Desta

maneira, demonstramos na figura 8 (colunas 6 e 7), que conseguimos a liberação da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ do pellet para o sobrenadante após o tratamento com 8 M de uréia.

Figura 8. Expressão da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ em BL21-CódonPlus. M. Padrão de Peso Molecular 1. Pré-Inóculo 2. Antes de induzir a expressão 3. Depois de induzir a expressão 4. Sobrenadante 5. Pellet 6. Sobrenadante após-uréia 7. Pellet pós-ureia. N₍₅₀₋₃₅₀₎ possui aproximadamente 35 kDa. Marcação primária com Anti-HisTag (1:10000). Marcação secundária com Anti-IgG mouse HRP (1:5000)



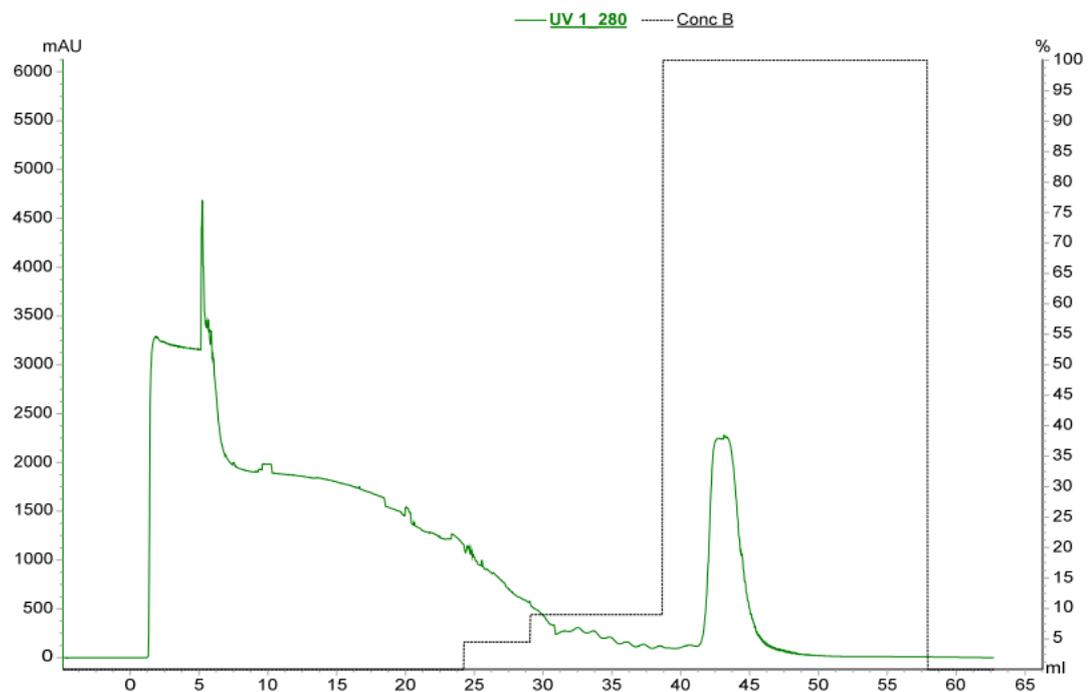
Purificação da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ por cromatografia de afinidade por íons metálicos

Para obter a proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ purificada, foi utilizado a técnica de purificação de proteína por Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos (IMAC). A IMAC consiste na interação de elétrons presentes em biomoléculas com uma superfície carregada com metais quelados (Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Al³⁺ e Ca²⁺). Estes íons metálicos são empregados na IMAC por interagirem com diferentes resíduos de aminoácidos das proteínas, como por exemplo, com o imidazol da histidina, com o enxofre dos tióis presentes nas cisteínas e o grupo indol dos triptofanos (Wong *et al.*, 1991; Jacker P., 1992)

Com advento da tecnologia de DNA recombinante, a proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ utilizada foi expressa com uma cauda de poli-histidina na porção N-Terminal. A porção solúvel do lisado bacteriano foi purificada por IMAC, em coluna HisTrap FF carregada com Ni²⁺, e eluída em concentrações crescentes de tampão B (4,5%, 9% e 100% de

Imidazol 300mM). Conforme demonstrado no cromatograma (Figura 9) a proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ foi eluída quando utilizado 100% do tampão B com Imidazol.

Figura 9. Cromatograma de eluição da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎, purificada por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC) em cromatógrafo ÄKTA. A fração solúvel do lisado bacteriano (contendo a N₍₅₀₋₃₅₀₎ recombinante com cauda de histidina N-terminal) foi aplicada à coluna HisTrap FF (carregada com níquel) e submetida a um gradiente crescente de Imidazol (tampão B). No eixo das ordenadas, está representada a absorbância a 280 nm (linha verde) de cada volume de eluição. No eixo das ordenadas direito, está representada a concentração de tampão B (mM) em cada volume de eluição (linha pontilhada). A proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ foi eluída em uma concentração de 100% de tampão B.

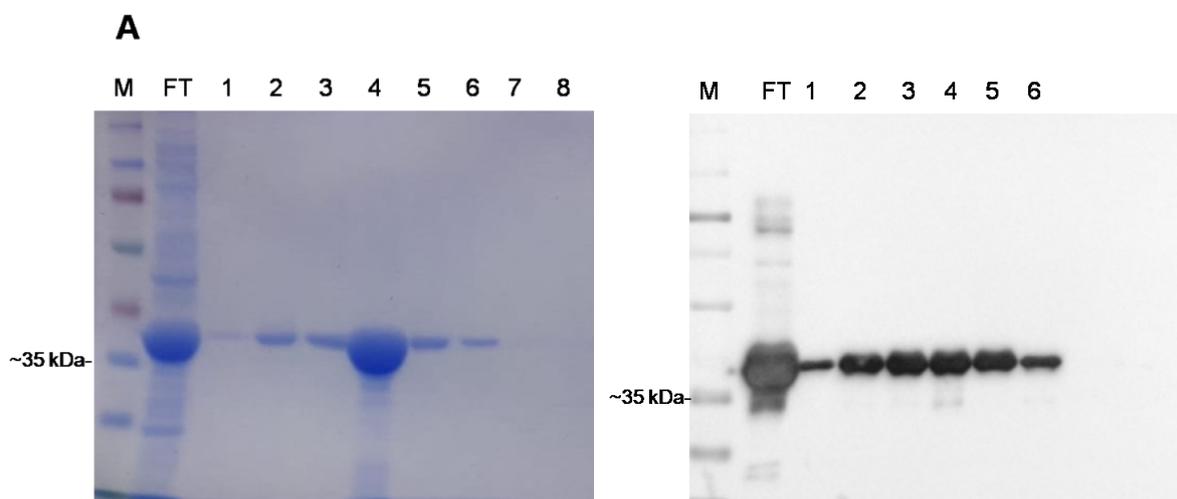


Para analisar o perfil da purificação, foram coletadas amostras das frações: correspondentes ao flow through, as frações eluídas em cada passo e a fração eluída correspondente à proteína (50-350) concentrada. As amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 10% corado por *Coomassie Brilliant Blue R 250* e por *Western Blot* incubadas com anticorpo policlonal anti-His Tag (Figura 10A e B respectivamente). Pode-se observar a presença da banda de aproximadamente 35 kDA correspondente

ao tamanho da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎, referente a fração eluída (Figura 10 A e B, colunas 3, 4 e 5), confirmando a purificação desta. Após a purificação, a proteína passou pelo processo de *refolding* em tampão com glicerol 10% para recuperar sua conformação, e então foi concentrada e quantificada por BCA para realização do ELISA.

O rendimento total de proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ purificada em 1L de cultivo foi de aproximadamente 22 mg. Trabalhos reportados anteriormente, com a expressão da proteína N em *E. coli* demonstram rendimento entre 35-55 mg/L do antígeno completo do SARS-CoV (Das e Suresh, 2006) e rendimento de 55 mg/L de proteína N recombinante (Li *et al.*, 2021). O menor rendimento na nossa purificação, pode ter ocorrido devido a saturação da coluna. Em purificações posteriores, poderá ser realizado em uma coluna de maior volume. Outra alternativa, é recolher o *flow through* e passar novamente pelo Akta.

Figura 10. Revelação das frações purificadas da proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ recombinante por SDS-PAGE e *Western Blot*. (A) Revelação por SDS-PAGE 10% com bandas visíveis da proteína corada com Coomassie Brilliant Blue R-250. (B) *Western Blot* da proteína incubada com anticorpo policlonal anti-His Tag (1:10000). M, marcador de massa molecular em kDa; FT, Flow through; 1, primeiro step 2, segundo step 3-5, terceiro step; 6, fração eluída coletada e concentrada por ultrafiltração utilizando filtro de poro 10 kDa (Amicon Ultra-15 Millipore); 7 e 8, frações coletadas após Gel filtração (Size-exclusion chromatography - SEC).



Otimização do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgG anti-proteína N

O ELISA serve como um importante método analítico confiável e barato para diagnósticos, pesquisas biomédicas e epidemiológicas (Minic e Zivkovic, 2020). Um ELISA otimizado, padronizado e validado tem papel significativo no acompanhamento de perfil sorológico de populações que tiveram infecções naturais com vírus SARS-CoV-2 durante a pandemia ou foram vacinadas. Esta compreensão da resposta imune contra o vírus é de suma importância para tomada de decisões de gestores públicos.

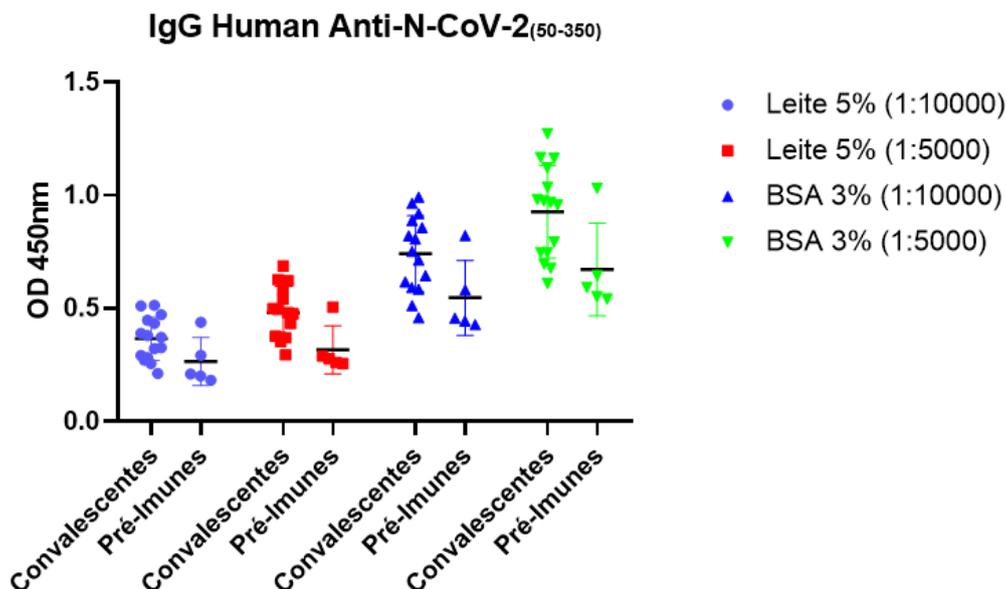
O desenvolvimento de um ELISA envolve procedimentos de diversas etapas que devem ser testadas: concentração do antígeno para revestir a placa, temperatura, duração de cada etapa, tipo do tampão, bloqueio de saturação, métodos de preparação das amostras, escolha e diluição do anticorpo secundário e método de detecção do sinal (Minic e Zivkovic, 2020).

Com o objetivo de desenvolver o ELISA indireto para detectar anticorpos do tipo IgG anti-proteína-N de pacientes convalescentes, foi utilizado o antígeno protéico N₍₅₀₋₃₅₀₎ recombinante purificado *In house* para revestir a placa de ELISA. A concentração inicial testada foi de 3 ug/mL. Esta concentração foi escolhida para começar os testes de bloqueio de saturação e diluição de anticorpos por ser um valor próximo ao observado na literatura (Algaissi *et al.*, 2020; Meirelles *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021). A proteína foi sensibilizada em placas de alta adsorção por 16 horas em câmara úmida, em temperatura ambiente. Após a sensibilização da placa com o antígeno, foram testadas duas diferentes soluções de bloqueio, com leite 5% ou com BSA 3%. O bloqueio é uma etapa importante, pois os sítios de ligação livres no fundo do poço podem formar ligações inespecíficas com a amostra e gerar alto *background* diminuindo a sensibilidade do teste (Minic e Zivkovic, 2020). Existe uma grande variedade de tampões de bloqueio, como leite desnatado, caseína e BSA, foi realizado o teste usando BSA 3% ou leite desnatado 5%, ambos diluídos em PBS-T 1X, incubados por 1 hora em câmara úmida e temperatura ambiente. Após o bloqueio, as amostras de soro de pacientes convalescentes foram incubadas na diluição 1:100 em tampão referente ao bloqueio (BSA 3% ou Leite 5%), durante 2 horas em câmara

úmida e temperatura ambiente. Após incubar o soro dos pacientes, foram testadas duas diluições de anticorpo secundário IgG *goat anti-human* conjugado à enzima HRP (1:5000 ou 1:10000), por 1 hora e 30 min de incubação. Para iniciar a reação de colorimetria, foi usado 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) como substrato para a HRP e o ácido clorídrico (HCl) 1N foi utilizado para parar a reação. O tempo de reação observado para uma melhor análise da reação, foi de aproximadamente 7 minutos.

Conforme nosso teste (Figura 11), a solução de bloqueio com BSA 3% produziu alto background independente da diluição do anticorpo secundário, enquanto que o bloqueio com leite 5% produziu background mais baixo. Na literatura, a maioria dos trabalhos com a proteína de nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 em ELISA indireto utilizam leite desnatado 5% como solução de bloqueio (Algaissi *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021; Meireles *et al.*, 2020). A diluição de 1:5000 do anticorpo secundário apresentou melhor resultado, seguindo o princípio de que a concentração ideal deve apresentar o sinal mais alto e o background mais baixo (Minic e Zivkovic, 2020).

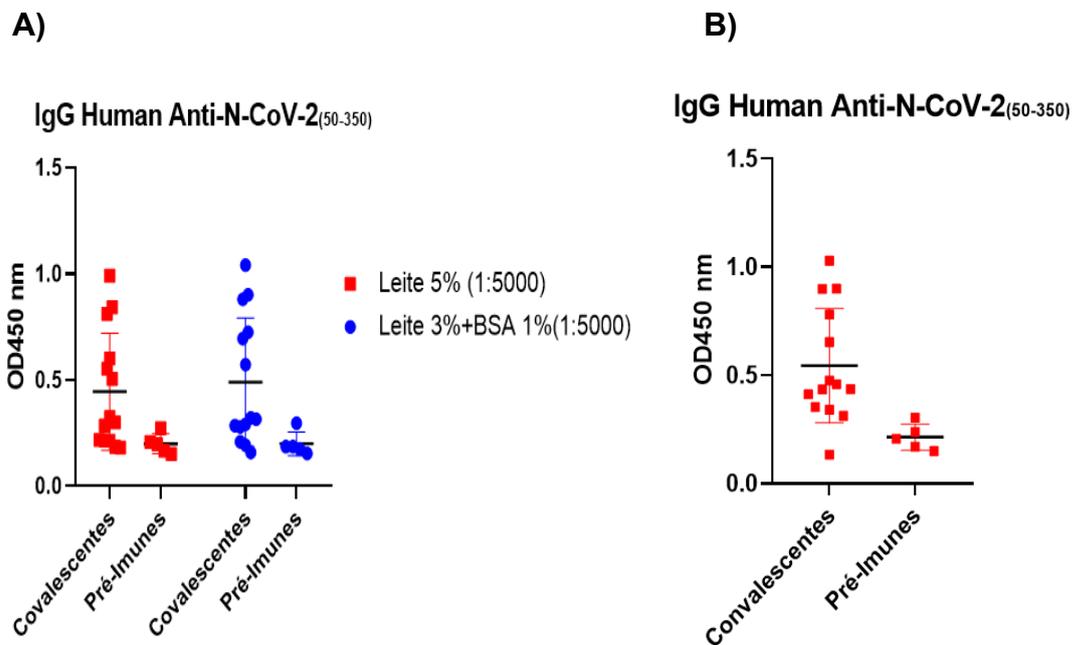
Figura 11. Padronização da detecção de Imunoglobulinas anti-proteína N(50-350) em humanos através da técnica de ELISA. Foram utilizadas placas de alta adsorção sensibilizadas com 3 ug/mL de proteína N(50-350) em câmara úmida, overnight. Foram testadas duas soluções de bloqueios com PBS 1x + Tween 0.05% + Leite 5% ou BSA 3%, por 1 hora. Foram incubadas, por 2 horas, amostras de soro (1:100) de 5 indivíduos que nunca tiveram contato com o vírus e de 15 pacientes convalescentes diagnosticados através da técnica de rtPCR. Para marcação secundária foram testadas duas diluições de anticorpo HRP anti-Human IgG, 1:5000 e 1:10000, incubadas por 1 h 30 min. Leitura da OD em 450 nm.



Aumento do tempo de incubação da solução de bloqueio produz background mais baixo

Conforme observado, o bloqueio com leite 5% e o anticorpo secundário diluído 1:5000 apresentaram resultado mais adequado, no entanto ainda tínhamos um background alto. Portanto, aumentamos o tempo de bloqueio (Figura 12 A) de 1 hora para 2 horas para aumentar a exposição da proteína de bloqueio com regiões vazias do poço. Paralelamente testamos uma nova solução de bloqueio com leite 3%+BSA 1%. Demonstramos então, que o bloqueio por 2 horas, as OD das amostras do grupo controle ficaram próximas a 0.2, considerado um background baixo. O grupo bloqueado com leite 5% não teve diferença do grupo bloqueado com leite 3%+BSA 1%, porém optamos manter o bloqueio com leite 5%, por já ter sido empregado no teste anterior. Neste ensaio, também adotamos o tempo de reação por 7 min com TMB. Na figura 12 B, replicamos o resultado usando os mesmos parâmetros testados até aqui.

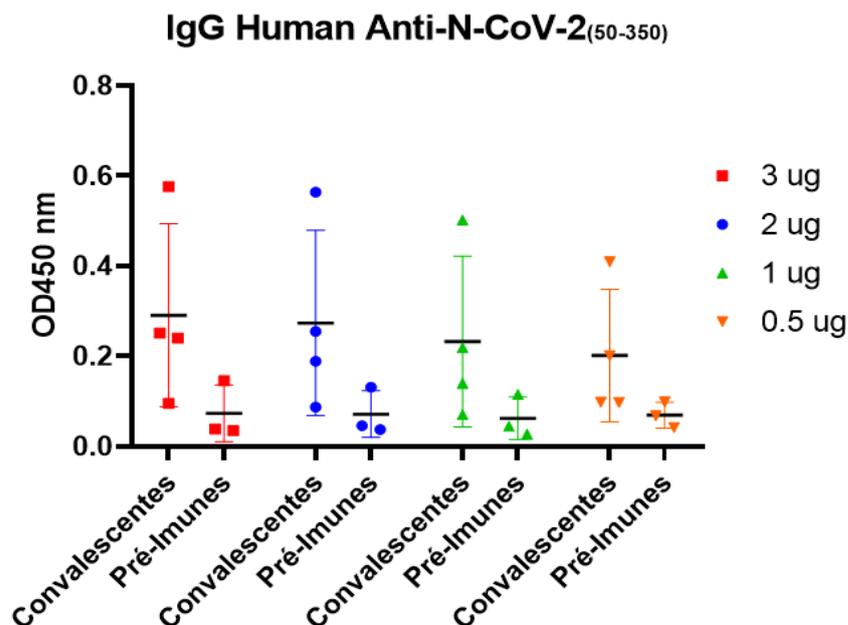
Figura 12. Teste de bloqueio com Leite 5% ou Leite 3% + BSA 1% por 2 horas. Placa adsorvida com 3 ug/mL de proteína N(50-350) em câmara úmida, overnight. Foram testadas duas soluções de bloqueios com PBS 1x + Tween 0.05% + Leite 5% ou Leite 3% + BSA 1%, por 2 horas. Foram incubadas, por 2 horas, amostras de soro (1:100) de 5 indivíduos que nunca tiveram contato com o vírus e de 14 pacientes convalescentes diagnosticados através da técnica de rt-PCR. Para marcação secundária foi utilizado anticorpo HRP anti-Human IgG (1:5000), incubado por 1h 30 min. Foi estabelecido tempo de reação com TMB por 7 min. Leitura da OD em 450 nm. Em B, foi realizada a replicação do teste utilizando bloqueio com Leite 5% por 2h.



Teste concentração do antígeno para análise de limite de detecção

A concentração do antígeno de revestimento também foi testada para analisar o limite de detecção (Figura 13). Foram testadas 4 diferentes concentrações (3 ug/mL, 2 ug/mL, 1 ug/mL e 0,5 ug/mL). A escolha da melhor concentração de antígeno para revestir a placa, consiste na qual fornece a maior absorbância no teste, de tal forma que garanta que toda a superfície do poço seja coberta por uma monocamada (Minic e Zivkovic, 2020). A concentração da N(50-350) em 3 ug/mL foi a que demonstrou melhor desempenho, com as maiores absorbâncias, enquanto na concentração de 2 ug/mL uma amostra acaba diminuindo a sensibilidade de detecção.

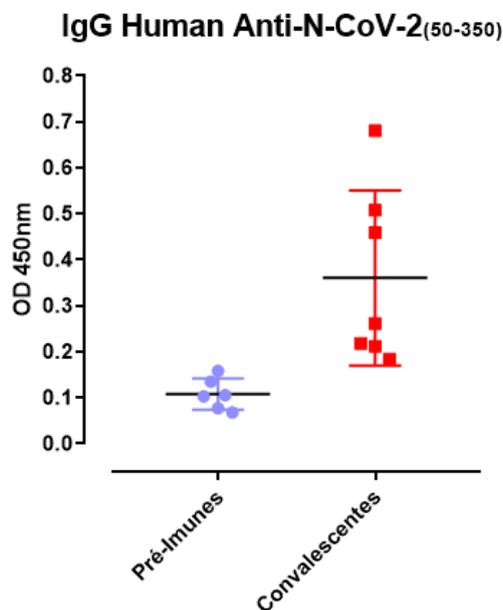
Figura 13. Otimização da detecção de anticorpos anti-proteína N(50-350) do SARs-CoV-2 em humanos através da técnica de ELISA. Foram utilizadas 3, 2, 1 e 0.5 ug/mL de proteína N(50-350) para adsorver a placa de ELISA. O bloqueio ocorreu com leite 5% por 2 horas. Posteriormente, os soros de 4 pacientes convalescentes e de 3 controles negativos pré-ímmunes na diluição 1:100 foram incubados por 2 horas., em triplicata. A marcação secundária foi realizada com anticorpo HRP Human anti-IgG (1:5000). Tempo de reação com TMB por 7 min. leitura realizada em OD450 nm.



Aumentar tempo de incubação das amostras para 24 horas diminui a variação da absorbância entre os testes

Conforme padronizamos o teste de ELISA indireto para a detecção de IgG em pacientes convalescentes, observamos que algumas amostras de soro apresentaram variabilidade na OD entre os testes. Entre os fatores que podem causar esta variabilidade analítica, estão: a temperatura de incubação instável, precipitação do leite utilizado como solução de bloqueio, lavagem entre as fases realizada manualmente e problemas na pipetagem (Oliveira e Mendes, 2011; Sumita *et al.*, 2018). Desta maneira, como alternativas, foi estendido o tempo de incubação dos soros para 24 horas, para aumentar o tempo de exposição dos anticorpos, se presente, ao antígeno e assim poder identificar os anticorpos quando estão em baixos títulos no soro ou sofrendo interferência de dinâmica molecular por diferentes fatores (Sumita *et al.* 2021). Ao aumentar o tempo de incubação dos soros para 24 horas (Figura 14), pode-se observar que o background continuou baixo. Também foi observado, que a relação das amostras convalescentes com a média das negativas, ficaram próximas dos valores testados anteriormente (resultado não mostrados) avaliando assim, que aumentar o tempo de incubação dos soros é uma alternativa para diminuir a variabilidade das absorbâncias entre os testes e assim aumentar a precisão do teste.

Figura 14. Aumento da exposição dos soro para 24h de incubação. Placa adsorvida com 3 ug/mL de proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ em câmara úmida, overnight. Foi utilizada Leite 5% como solução de bloqueios com PBS 1x + Tween 0.05% por 2 horas. Foram incubadas, por 24 horas, amostras de soro (1:100) de 6 indivíduos que nunca tiveram contato com o vírus e de 7 pacientes convalescentes diagnosticados através da técnica de rt-PCR. Para marcação secundária foi utilizado anticorpo HRP anti-Human IgG (1:5000), incubado por 1h 30 min. O tempo de reação com TMB foi de 7 min. Leitura da OD em 450 nm.



O ELISA desenvolvido para detecção de IgG Humano anti-N(50-350) é específico, sensível e preciso.

A validação de qualquer método analítico para quantificação de biomarcadores em alguma matriz biológica (como soro, por exemplo), é de bastante importância para estudos clínicos e de bancada, sendo crítico para confiabilidade dos dados e assim da segurança dos resultados (Minic e Zivkovic, 2020). A validação consiste em determinar as seguintes características de um teste: 1) Especificidade: é a probabilidade de resultado negativo nos indivíduos que não possuem a doença (verdadeiros negativos), 2) Sensibilidade: é a probabilidade de resultado positivo quando os indivíduos estão com a doença (verdadeiro positivo), 3) Valor preditivo positivo é a probabilidade de dar positivo no teste quando o indivíduo realmente está positivo para a doença, 4) Valor preditivo negativo é a probabilidade

do indivíduo testado e dado negativo, realmente ser negativo e a 5) Precisão que é o percentual correspondente a classificação correta dos indivíduos doentes ou sadios (Crowther, 2021).

Na validação do nosso ELISA (Figura 15 e Quadro 2), das 86 amostras utilizadas como controle negativo, apenas uma amostra ficou acima do ponto de *Cut-off*, indicando uma especificidade de 98,8%. Das 79 amostras convalescentes de COVID-19, confirmadas por RT-PCR, 5 apresentaram resultado falso-negativo, indicando uma sensibilidade de 93,6%. O valor preditivo positivo foi de 98,6% e o valor preditivo negativo foi de 94,4%. A precisão do teste foi de 96,3%. Estes valores de especificidade e sensibilidade do ELISA indireto desenvolvido utilizando o antígeno N(50-350) recombinante purificado *in house*, como um teste eficaz para avaliar a produção de anticorpos do tipo IgG em pacientes convalescentes da COVID-19, podendo ser um indicador de imunidade humoral adquirida.

Na literatura, encontramos trabalhos demonstrando ELISA indiretos desenvolvidos com a proteína N como antígeno de captura, com alta especificidade e sensibilidade na detecção da produção de IgG em pacientes de COVID-19 (Algaissi *et al.*, 2021; Conzentino *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021). No trabalho de Algaissi *et al.*, (2021), demonstrou-se que o ELISA tem sensibilidade de 60% para detecção de IgG nos pacientes na primeira semana dos sintomas e de 100% de sensibilidade ao longo da segunda até quarta semana. Esta sensibilidade mais baixa na primeira semana, pode ser atribuída que a resposta de anticorpos inicial frente a uma doença infecciosa, se dá por IgM. Neste mesmo estudo, eles também demonstraram que pacientes convalescentes têm uma diminuição dos níveis de IgG em relação à fase aguda da doença (que o RNA viral ainda pode ser identificado em amostras respiratórias), podendo este fator interferir na sensibilidade do teste desenvolvido. Nos ELISA do grupo do Liu (2021) e do Conzentino (2021), este último utilizando uma proteína N purificada *in house*, tiveram a especificidade de 100% e 98%, enquanto a sensibilidade foi de 97% e 90% nos testes respectivamente.

A presença de amostras positivas em grupos controles, sugere reatividade cruzada com outros coronavírus que infectam humanos. Realizamos um BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*) para comparar sequência de aminoácidos da proteína N recombinante com os demais coronavírus humanos. Foi observado, que a proteína N(50-350) tem similaridade de 89% e de 57% com a proteína N da

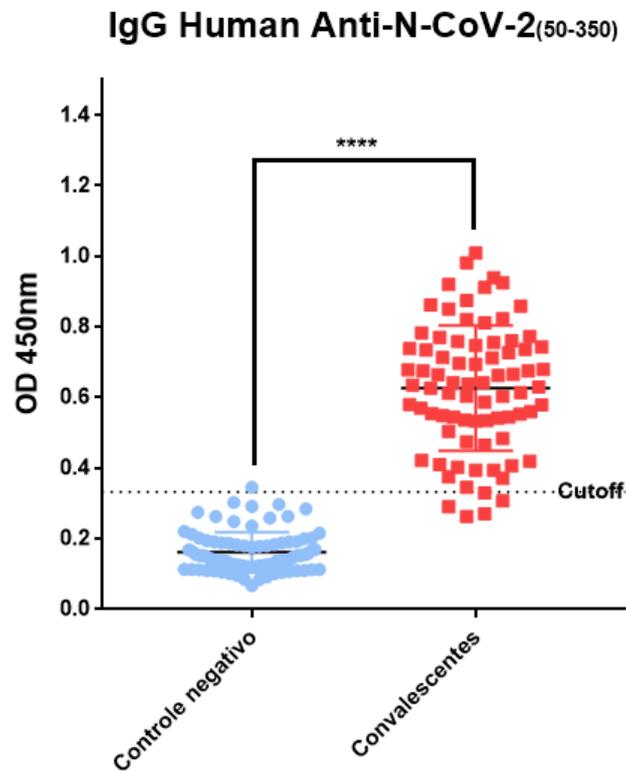
SARS-CoV e da MERS-CoV respectivamente. Entretanto, dificilmente teríamos reação cruzada com estes vírus, pois nunca tivemos registros deles no Brasil. Já a similaridade com os outros coronavírus, ficaram abaixo de 50%,.

Em vista disso, o ELISA indireto padronizado é sensível e específico para detecção sorológica de IgG anti-N em indivíduos que tiveram infecção natural do vírus, corroborando que a proteína N é um potencial alvo para epidemiologia.

Quadro 2. Validação do ELISA indireto para detecção sorológica de IgG anti-N

Resultado do ELISA	Pacientes com Covid		
	Positivos	Negativos	Total
Positivos	74	1	75
Negativos	5	85	90
Total	79	86	165

Figura 15. Teste de especificidade e sensibilidade. Placa adsorvida com 3 ug/mL de proteína N(50-350) em câmara úmida, overnight. Bloqueio de saturação realizada com PBS 1x + Tween 0.05% por 2 horas. As amostras de soros foram incubadas, por 24 horas na diluição 1:100 à 4°C. Para marcação secundária foi utilizado anticorpo HRP anti-Human IgG (1:5000), incubado por 1h 30 min. Tempo de reação com TMB por 7 min. Leitura da OD em 450 nm. Cutoff 0.383 (média das negativas +2* o desvio padrão das negativas). A especificidade foi de 98,8% e a sensibilidade foi de 93,6%. Soros controle negativo n= 89. Soros convalescentes Rt-PCR(+) n=79. Teste *t student* para estatística. $p < 0.0001$



CONCLUSÃO

Através deste trabalho demonstramos:

- A linhagem bacteriana BL21-CodonPlus é um sistema de expressão adequado para expressão da proteína recombinante de nucleocapsídeo do SARS-CoV-2.
- A proteína N₍₅₀₋₃₅₀₎ é expressa em forma de corpúsculos de inclusão que pode ser recuperada com uréia.
- N₍₅₀₋₃₅₀₎ demonstrou ser um antígeno sensível e específico para detecção de IgG em soros pacientes convalescentes

Desta maneira, o ELISA indireto N₍₅₀₋₃₅₀₎ desenvolvido neste trabalho pode servir como ferramenta para o auxílio da vigilância epidemiológica e validação de ensaios de imunogenicidade de vacinas.

REFERÊNCIAS

Abbas AK., Lichtman AH, Pillai S. 2007 Cellular and Molecular Immunology, 6a, Editora Saunders.

Aguilar, JB. *et al.* (2020). Investigating the Impact of Asymptomatic Carriers on COVID-19 Transmission. MedRxiv.

Algassi A., *et al.* (2020). SARS-CoV-2 S1 and N-based serological assays reveal rapid seroconversion and induction of specific antibody response in COVID-19 patients. Sci Rep 10, 16561

Arons, MM. *et al.* (2020). Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility. N Engl J Med. 2020;382(22):2081-2090.

Ausubel FM. *et al* (1995). Short Protocols in Molecular Biology. 3rd. John Wiley & Sons.

Bar-On YM., Flamholz A., Phillips R., Milo R. (2020). SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *eLife* 9, e57309.

Bernal JL. *et al.*, (2021). Effectiveness of the Pfizer-BioNTech and Oxford-AstraZeneca vaccines on covid-19 related symptoms, hospital admissions, and mortality in older adults in England: test negative case-control study. *BMJ Public Health Emerg. Collect.* 373: 1088.

Bernasconi A., *et al.*, (2021). Report on Omicron Spike mutations on epitopes and immunological/epidemiological/kinetics effects from literature.

Carrio MM., Villaverde A (2005). Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies. *J Bacteriol*;187:3599–601.

Channappanavar R, Fett C, Zhao J, Meyerholz DK, Perlman S. (2014). Virus-Specific Memory CD8 T Cells Provide Substantial Protection from Lethal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. *J Virol*: 88 (19): 11034–44.

Chura-Chambi RM., Prieto-da-Silva ARDB., Di Lela MM, Oliveira JE, Abreu PEA, Meireles LR, et al. (2022) High level SARS-CoV-2 nucleocapsid refolding using mild condition for inclusion bodies solubilization: Application of high pressure at pH 9.0. PLoS ONE; 17(2): 0262591.

Das D. e Surehs M. (2006). Copious production of SARS-CoV nucleocapsid protein employing codon optimized synthetic gene. *Journal of Virology Methods*; 137(2): 343-346

Davis DR., Padlan EA., Sheriff S. (1990) Antibody-antigen complexes. *Annu Rev Biochem*; 59, 439–473.

Engvall E. e Perlman P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin. *G. Immunochemistry*; 8: 871–879.

Engvall E. (1980). Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. *Meth. Enzymol* 70, 419–439.

Goh YS., et al. (2021). Sensitive detection of total anti-Spike antibodies and isotype switching in asymptomatic and symptomatic individuals with COVID-19. *Cell Reports Med.*; 2: 100193.

Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS. et al. (2020). The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 5(4), 536–544.

Cui J, Li F, Shi ZL. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 17(3), 181–192.

Gorbalenya AE, Enjuanes L., Ziebuhr J, Snijder EJ. (2006). Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome . *Virus Res.* 117 (1), 17–37.

Pratik G., Martin B., Matej L, Bohálovi N., Volná A., et al. (2021) SARS-CoV-2 hot-spot mutations are significantly enriched within inverted repeats and CpG island loci. *Briefings in Bioinformatics*, Volume 22, Issue 2, Pages 1338–1345.

Han S. (2015). Clinical vaccine development. *Clinical and experimental vaccine research*, 4(1), 46–53.

Ritchie H., Mathieu E., Rodés-Guirao L., Appel C., Giattino C., Ortiz-Ospina E., Hasell J., Macdonald B., Beltekian D., Roser M. (2020). "Coronavirus Pandemic (COVID-19)". Our World Data. Londres: Our World in Data, 2022. Disponível em <https://ourworldindata.org/coronavirus>. Acesso em 14 de maio de 2022.

Hoffmann M., Kleine-Weber H., Krüger N., Müller M., Drosten C., Pöhlmann S. (2020). The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells. bioRxiv.

Jecker P. (1992). Immobilized metal ion affinity chromatography. *Prot. Express. and Purific.* 3 (4). 236-281

Johns Hopkins (2022). Coronavirus research gate. Disponível em: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Acesso em: 10 de maio de 2022

Jorriben P., *et al.* (2021). Antibody Response to SARS-CoV-2 Membrane Protein in Patients of the Acute and Convalescent Phase of COVID-19. *Frontiers in Immunology*. 12.

Kennedy M. (2014). *Imunobiologia de Janeway*. Ed. artmed. 8 ed.

Li G., Li W., Fang X., Song X., Teng .S, Ren Z., Hu D., Zhou S., Wu G., Li K. (2021). Expression and purification of recombinant SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in inclusion bodies and its application in serological detection. *Protein Expr Purif*:186:105908

Liu, X. e Zhang, S. (2020). COVID-19: Face masks and human-to-human transmission. *Influenza Other Respir Viruses*;14(4):472-473.

Liu, PP. *et al.* (2020). Are pangolins the intermediate host of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2)? *PLoS Pathog.* 16, e1008421.

Liu PP., *et al.* (2021). Development of a Nucleocapsid Protein-Based ELISA for Detection of Human IgM and IgG Antibodies to SARS-CoV-2. *ACS Omega*. 6 (14), 9667-9671;

Lucas C, Klein J, Sundaram ME, Liu F, Wong P, Silva J, Mao T, Oh JE, Mohanty S, Huang J, Tokuyama M, Lu P, Venkataraman A, Park A, Israelow B, Vogels CBF, Muenker MC, Chang CH, Casanovas-Massana A, Moore AJ, Zell J, Fournier JB; Yale IMPACT Research Team, Wyllie AL, Campbell M, Lee AI, Chun HJ, Grubaugh ND, Schulz WL, Farhadian S, Dela Cruz C, Ring AM, Shaw AC, Wisnewski AV, Yildirim I, Ko AI, Omer SB, Iwasaki A. (2020). Delayed production of neutralizing antibodies correlates with fatal COVID-19. *Nat Med.*, 27(7):1178-1186.

Long QX., Tang XJ., Shi QL., Li Q., Deng HJ., Yuan J., *et al.* (2020). Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med* 26 (8): 1200–4.

Lukassen S. *et al.* (2020). SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO J.*, e105114.

Marchi S., *et al.* (2021). Sensitive detection of total anti-Spike antibodies and isotype switching in asymptomatic and symptomatic individuals with COVID-19. *Plos One*, 16(7): 0253977.

Meirelles LR. *et al.* (2020). Natural versus Recombinant Viral Antigens in SARS-CoV-2 Serology: Challenges in Optimizing Laboratory Diagnosis of COVID-19. *Clinics (Sao Paulo)* 75, 2290.

Minic R., e Zivkovic (2020). Optimization, Validation and Standardization of ELISA. Norovirus. Intechopen.

Nakano Y., *et al.* (2021). Time course of the sensitivity and specificity of anti-SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies for symptomatic COVID-19 in Japan. *Scientific Reports*; 11, 2776.

Narayanan K., Chen C.-J., Maeda J., Makino S. (2003). Nucleocapsid-independent-independent viral RNA packaging via viral envelope protein and viral RNA signal. *J. Virol.*; 77 : 2922–2927.

Ni L, Ye F, Cheng ML, Feng Y, Deng YQ, Zhao H, et al. (2020). Detection of humoral and cellular specific immunity of SARS-CoV-2 in convalescent individuals of COVID-19. *Immunity* 52 (6): 971–7 e3.

Oliveira, SC, Magalhães TQM, Homan EJ. (2020). Immunoinformatic Analysis of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Identification of COVID-19 Vaccine Targets. *Front Immunology*, 11: 2758

Oliveira, CA. e Mendes ME. (2011). Gestão da Fase Analítica do Laboratório: como assegurar a qualidade na prática. *Contro Lab*, 185 p.

Orenstein, WA. e Ahmed, R. (2017). Simply put: Vaccination saves lives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(16), 4031–4033.

Pan American Health Organization. (2021). História da pandemia de COVID-19.

Pasternak AO, et al. (2006). Nidovirus transcription : how to make sense...? *J. Gen. Virol.* 87, 1403–1421.

Perlman S, Netland, J. (2009). Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 439–450.

Pollet S, Wen-Hsiang C, Strych U. (2021). Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. *Adv Drug Deliv Rev.*; 170: 71–82.

Rosano GL. e Ceccarelli EA. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenge. *Front. Microbiology.*; 5.

Sumita NM. et al. (2018). Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial (SBPC/ML): Fatores pré-analíticos e interferentes em ensaios laboratoriais. *Org. Nairo Massakzu Sumita*; 1: 464.

Tang F, Quan Y, Xin ZT, Wrammert J, Ma MJ, Lv H, et al. (2011) Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study. *J Immunology*; 186(12):7264–8.

Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L., MacAry P.A., Ng L.F.P. (2020) The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.*; 20(6)

Tilocca B, Soggiu A, Sanguinetti M, Musella V, Britti D, Bonizzi L, et al. (2020) Comparative computational analysis of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein epitopes in taxonomically related coronaviruses. *Microbes Infect.*, 22(4-5):188–94.

Tyrrel DAJ., Almedia DJ., Berry DM., Cunningham CH., Hamre D., Hofstad MS., Malluci L. e McIntosh K. (1968). Coronavírus. *Nature* 220: 650.

Upadhyay *et al.*, (2014). Refolding of asparaginase from inclusion bodies. *Frontiers in microbiology*, 5.

Yuan et al. (2020). A Highly Conserved Cryptic Epitope in the Receptor-Binding Domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV.” *Science*. April.

Zhang, L., Jackson, C.B., Mou, H. *et al.* (2020). SARS-CoV-2 spike-protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nat Commun* 11, 6013.

Zeng, W., Liu, G., Ma, H., Zhao, D., Yang, Y., Liu, M., Mohammed, A., Zhao, C., Yang, Y., Xie, J., Ding, C., Ma, X., Weng, J., Gao, Y., He, H., & Jin, T. (2020). Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 527(3), 618–623.

Zhu Y, Liu M, Zhao W, Zhang J, Zhang X, Wang K, et al. (2005). Isolation of virus from a SARS patient and genome-wide analysis of genetic mutations related to pathogenesis and epidemiology from 47 SARS-CoV isolates. *Virus Genes* 30(1):93–102

Zhou P, Yang XL., Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, *et al.* (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*;579:270–273.

Wong J., Albrighth RL., Wang NHW (1991). Separation and Purification Methods. 20, 49.

Williams DC, Van Frank RM, Muth WL, Burnett JP (1982). Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. *Science*;215:687–9.

WHO (2022). COVID-19 weekly epidemiological update, 10 mai. 2022. Disponível em: < <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>>. Acesso em: 14 de maio de 2022.

Xiao, K. *et al.* (2020). Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature* 583, 286–289.