

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SERGIO PEDRO CARPEGGIANI JUNIOR

**Avaliação de um imunoenensaio ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) padronizado utilizando proteína recombinante de nucleocapsídeo<sub>(50-350)</sub> de SARS-CoV-2 como ferramenta de avaliação de resposta imune humoral em indivíduos vacinados com CoronaVac.**

Florianópolis  
2022

.UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SERGIO PEDRO CARPEGGIANI JUNIOR

**Avaliação de um imunoenensaio ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) padronizado utilizando proteína recombinante de nucleocapsídeo<sub>(50-350)</sub> de SARS-CoV-2 como ferramenta de avaliação de resposta imune humoral em indivíduos vacinados com CoronaVac.**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Santos Mansur.

Coorientador: Me. Juliano Custódio Vieira Junior.

Florianópolis  
2022

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

Pedro Carpeggiani Junior, Sergio

Avaliação de um imunoenensaio ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) padronizado utilizando proteína recombinante de nucleocapsídeo(50-350) de SARS-CoV-2 como ferramenta de avaliação de resposta imune humoral em indivíduos vacinados com CoronaVac. / Sergio Pedro Carpeggiani Junior ; orientador, Daniel Santos Mansur, coorientador, Juliano Custódio Vieira Junior, 2022.

53 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. SARS-CoV-2. 3. Imunoenensaio.  
4. CoronaVac. I. Santos Mansur, Daniel . II. Custódio Vieira Junior, Juliano . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Sergio Pedro Carpeggiani Junior

**Avaliação de um imunoenensaio ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) padronizado utilizando proteína recombinante de nucleocapsídeo<sub>(50-350)</sub> de SARS-CoV-2 como ferramenta de avaliação de resposta imune humoral em indivíduos vacinados com CoronaVac.**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Licenciado em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 08 de julho de 2022.

---

Profa . Dra. Daniela Cristina de Toni  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Daniel Santos Mansur  
Orientador  
MIP/UFSC

---

Me. Juliano Custódio Vieira Junior  
Coorientador  
MIP/UFSC

---

Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto  
Avaliador titular  
MIP/UFSC

---

Prof. Dra. Patrícia Hermes Stoco  
Avaliadora titular  
MIP/UFSC

---

Dr. Daniel de Oliveira Patrício  
Avaliador suplente  
MIP/UFSC

## AGRADECIMENTOS

De modo geral, agradecerei “oportunidades” aqui, todas que permitiram trilhar o meu caminho e que me fizeram ser quem sou hoje.

A primeira delas eu devo aos meus pais e irmãos que tanto me incentivam a estudar. Desde o meu ensino médio conto com o apoio, palavras de conforto, puxões de orelha e diversos momentos de construção da relação que temos hoje. Sem vocês, eu com toda certeza não estaria aqui.

Agradeço a oportunidade de ter colegas de trabalho tão especiais, principalmente Paula, Taciany e Vanessa que me acompanharam desde o início e sempre estiveram do meu lado quando eu precisei. Esse apoio sempre foi fundamental.

Serei eternamente grato à UFSC que me forneceu a oportunidade de uma educação pública e de qualidade. Estarei sempre em defesa do acesso à educação da mesma forma que eu tive.

Obrigado a todos meus amigos, especialmente a duas pessoas: Luiz que percorreu esses quase 5 anos juntos comigo, na amizade, dividindo laboratório, momentos de felicidades e frustrações. À Marianna, por estar do meu lado o tempo todo, me dando suporte em todos os aspectos, me dando forças quando eu não tinha mais e com certeza por colocar o Sansão na minha vida, estando presentes em todos os momentos. Amo vocês. Agradeço a oportunidade de ter vocês na minha vida e levarei vocês para sempre comigo.

Agradeço ao meu coorientador, amigo e companheiro de experimentos, Juliano, primeiramente pelo convite para ser seu IC e ter a oportunidade de fazer parte deste projeto, mas principalmente por todas as conversas, conselhos, planejamentos. Você me ensinou muito.

A minha mãe de laboratório, Ruth (mainha), serei eternamente grato à você pela sua doçura e carinho ao ensinar. Obrigado pela oportunidade de ser mais um dos seus filhos de lab e aprender uma pequena parte daquilo que você sabe. Você merece o mundo.

Ao time LIDI como um todo, Eduarda, Nika, Mendes, Carol, Greicy, Aline, Fabi, Luci, Mariana, Daniel (Filho), Dina, Dai, Bianca, Pri, Natana, Klein Giovana e Diego pela oportunidade de conhecê-los profissionalmente e pessoalmente, agradeço a paciência e oportunidade de acompanhá-los nos experimentos, mas principalmente, agradeço por vocês serem quem são, por construírem ciência de qualidade e por se apoiarem, nos momentos de

paz e de guerra. Vocês são fudas.

Agradeço aos professores André Báfica e Daniel Mansur por todas as discussões sobre ciência, conselhos, puxões de orelha, mas principalmente agradeço a oportunidade de fazer parte deste laboratório. Além disso, faço um agradecimento em especial ao Mansur por ser um orientador prestativo e que sempre disponibilizou o seu tempo para conversarmos. Vocês me ajudaram a evoluir muito como cientista.

Por fim agradeço à CAPES e MCTIC que financiaram o projeto.

## RESUMO

**Introdução:** A Covid-19 é a doença causada pelo vírus SARS-CoV-2 que foi identificado no início do ano de 2020 como o responsável por um quadro de infecção respiratória grave que primeiramente atingiu pessoas da cidade de Wuhan na China, mas que acabou se disseminando pelo restante do planeta, levando a um estado de pandemia. Dentre as proteínas estruturais do SARS-CoV-2, a proteína de nucleocapsídeo (N) que está associada ao RNA do vírus destaca-se por possuir uma alta conservação entre os diferentes vírus da família *Coronaviridae*, além de ser capaz de gerar uma resposta imune humoral, havendo a possibilidade de uso desta proteína como alvo para produção de testes de vigilância epidemiológica. Nesta mesma linha, o imunoensaio ELISA se mostra uma importante ferramenta de avaliação epidemiológica, principalmente por ser prático, possuir baixo custo e não necessitar de uma grande infraestrutura ou investimento para ser realizado. Neste trabalho, utilizamos um ELISA indireto para avaliar a presença de IgG anti proteína N padronizado utilizando um fragmento (50-350 aa) da proteína de nucleocapsídeo em uma

coorte de voluntários vacinados com CoronaVac. **Metodologia:** A proteína N<sub>(50-350)</sub> foi expressa utilizando a bactéria *Escherichia coli* BL21-Codon Plus, sendo purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC). A coorte foi recrutada durante o mês de março de 2020 dentro do Laboratório de Imunobiologia (LIM) da Universidade Federal de Santa Catarina. As amostras de soro foram analisadas utilizando o ELISA indireto utilizando como antígeno o fragmento (50-350 aa) da proteína N do

SARS-CoV-2. **Resultados:** O fragmento de proteína N<sub>(50-350)</sub> é expresso pela *E. Coli* BL21-Codon Plus, sendo purificado por uma coluna de afinidade de íons metálicos. O ELISA

indireto anti N<sub>(50-350)</sub> foi otimizado, sendo sensibilizado com 3µg/ml de proteína para sensibilizar a placa, solução de PBS + 5% de leite em pó para o bloqueio durante 2 horas, incubação com o soro diluído 1/100 em solução de bloqueio PBS + 5% de leite em pó + 0,05% de Tween20 por 16 horas seguida por incubação durante 1 hora e 30 min com anticorpo secundário IgG Goat anti-Human HRP com a diluição 1/5000 na solução de bloqueio, iniciando a reação enzimática com tetrametilbenzidina (TMB) e parando a reação com HCl 1N após 7 min. Foram recrutadas 23 pessoas para a coorte estudada, sendo 14 mulheres e 9 homens. O ELISA após a otimização apresentou uma sensibilidade de 95% para a coorte estudada para a detecção de IgG anti-proteína N do SARS-CoV-2. **Conclusão:** A vacina CoronaVac ao ser aplicada gera uma resposta imune humoral moderada para a proteína

N do SARS-CoV-2. O ELISA indireto contendo o fragmento de proteína N<sub>(50-350)</sub> é capaz de diferenciar amostras de pessoas que nunca tiveram o contato com o vírus (pré-pandêmicas) de pessoas vacinadas com CoronaVac ao se avaliar a presença de IgG. Além disso, este imunoensaio foi capaz de diferenciar as amostras de soro de pessoas vacinadas com CoronaVac que tiveram contato anterior à vacinação com o vírus SARS-CoV-2 de pessoas vacinadas com CoronaVac que não tiveram contato com este vírus.

**Palavras-chave:** SARS-CoV-2, ELISA indireto, CoronaVac, fragmento de proteína recombinante.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura do vírus SARS-CoV-2.	14
<b>Figura 2:</b> Estrutura da proteína de nucleocapsídeo (N).	15
<b>Figura 3:</b> Representação do imunoensaio ELISA ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ) indireto.	18
<b>Figura 4 :</b> Esquema simplificado de expressão e purificação da proteína recombinante N <sub>(50-350)</sub> .	23
<b>Figura 5:</b> Esquema simplificado de Western Blot da proteína recombinante N <sub>(50-350)</sub> .	26
<b>Figura 6:</b> Esquema simplificado do imunoensaio ELISA.	28
<b>Figura 7:</b> Expressão da proteína N(50-350) utilizando <i>E. Coli</i> BL21-Codon Plus.	31
<b>Figura 8:</b> Cromatograma da purificação e marcações de Western Blot e SDS-PAGE.	32
<b>Figura 9:</b> Otimização de teste ELISA para detecção de anticorpos IgG anti N.	34
<b>Figura 10:</b> Demonstração de sensibilização com proteína excedente no ELISA.	35
<b>Figura 11:</b> Análise dos dados das amostras da coorte de vacinados com CoronaVac sem contato prévio com o vírus.	40
<b>Figura 12:</b> Análise dos dados das amostras da coorte de vacinados com CoronaVac com contato prévio com o vírus.	43
<b>Figura 13:</b> Comparativo entre as médias dos timepoints de coletas.	44



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Descrição das características gerais da coorte.	29
<b>Quadro 2:</b> Apresentação dos dados obtidos a partir dos imunoensaios realizados.	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Covid-19 - Doença causada pelo vírus SARS-CoV-2

C.V. - Coeficiente de variação

D.O. - Densidade óptica

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - Ensaio imunoenzimático

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

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- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

L.B.- Meio de cultura Luria Bertani

LIM - Laboratório de Imunobiologia

MERS - Vírus da Síndrome Respiratório do Oriente Médio

mRNA - ácido ribonucleico mensageiro

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR - Reação em cadeia da Polimerase

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil

RNA - ácido ribonucleico

RT-qPCR - Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real.

SARS – Síndrome Respiratória Aguda Grave

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

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SRAG - Síndrome Respiratória Aguda Grave

TBS - Solução salina Tris-tamponada

TMB - Tetrametilbenzidina

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1 Pandemia e SARS-CoV-2	13
1.2 Caracterização da proteína N	14
1.3. Resposta imune humoral	15
1.4. Vacinas contra COVID-19	16
1.5. Descrição do imunoenensaio ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	17
1.6. Justificativa	18
1.7. Hipótese	18
<b>2.OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
2.1. Objetivo Geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
<b>3.METODOLOGIA</b>	<b>20</b>
3.1. Descrição das amostras	20
3.2. Transformação de bactérias	20
3.3. Expressão e purificação	21
3.4. Quantificação de proteína	24
3.5.Realização do Western Blot	24
3.6.Otimização do teste ELISA	26
<b>4.RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>28</b>
4.1 Características da coorte estudada	29
4.2 Expressão, purificação e quantificação da proteína recombinante N(50-350)	30
4.3. Otimização do ELISA	33
4.4. Análise da coorte	34
<b>5.CONCLUSÃO</b>	<b>44</b>
<b>PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>44</b>
<b>ANEXO A - TCLE</b>	<b>50</b>

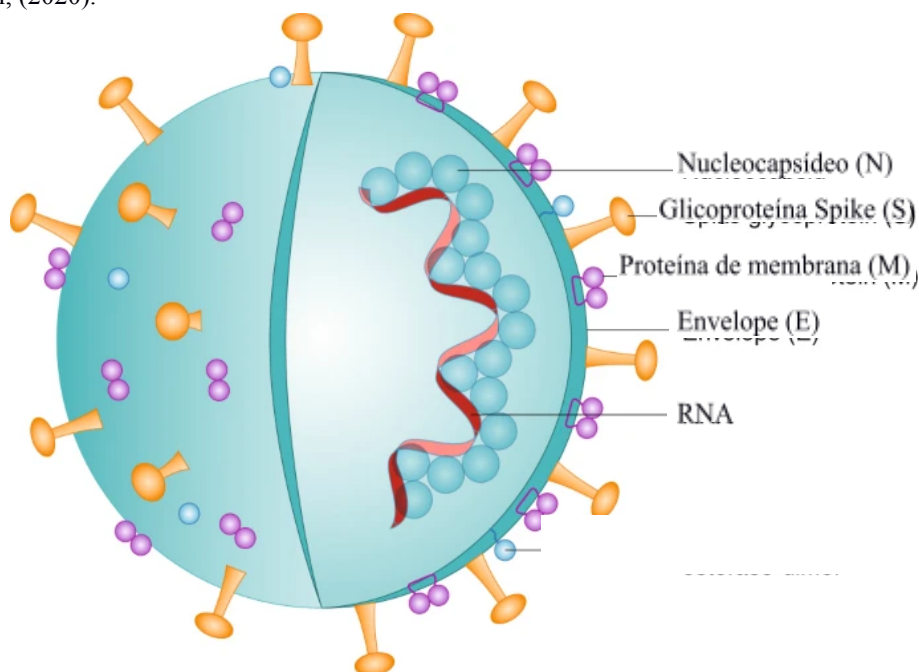
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Pandemia e SARS-CoV-2

Nos últimos anos algumas epidemias causadas por coronavírus surgiram, dentre elas MERS (*Middle East Respiratory Syndrome*) e a SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*) (FEHR, PERLMAN, 2015), e mais recentemente, entre o final de 2019 e o início de 2020, um novo tipo de coronavírus, com uma grande capacidade infecciosa surgiu e se disseminou pelo mundo, sendo denominado Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), causando a doença denominada Covid-19 (Wu et al, 2020). O SARS-CoV-2 pertencente à família dos coronavírus que possuem RNA de fita simples, sentido positivo são capazes de infectar os humanos, causando diversas complicações, como por exemplo a síndrome respiratória aguda grave (SRAG) e outras complicações (Di Wu et al, 2020).

Como demonstrado na Figura 1, o SARS-CoV-2 é formado por quatro proteínas estruturais, sendo elas: a proteína spike, conhecida como S, e que é a responsável pela interação vírus-hospedeiro, permitindo a adesão celular, além de dar o aspecto de coroa ao vírus; a proteína do nucleocapsídeo, denominada como N, que é responsável pela construção do capsídeo que envolve o material genético; proteína M, conhecida como proteína de membrana e a proteína E (envelope), responsável pelo processo de montagem do vírus (PERLMAN;NETLAND, 2009).

Figura 1: Estrutura do vírus SARS-CoV-2. Representação gráfica das 4 proteínas estruturais. Percebe-se o aspecto de coroa devido à presença da proteína Spike na sua superfície e também o destaque para a proteína de nucleocapsídeo associado ao material genético do vírus, sendo este um RNA de senso positivo. Adaptado de FLORINDO et al, (2020).

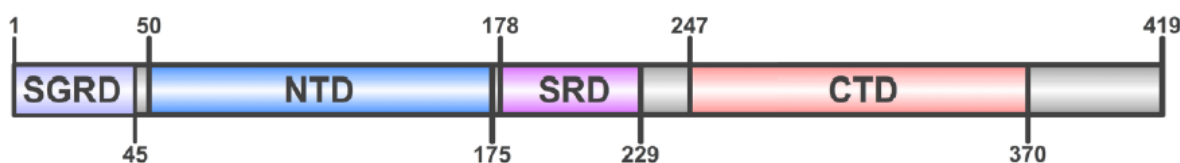


No dia 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS), declarou o estado de pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2, uma vez que a disseminação estava em processo de aceleração (BRASIL, 2020).

## 1.2 Caracterização da proteína N

O gene que codifica para a proteína de nucleocapsídeo, localiza-se na porção 3' do genoma do vírus (ZHU et al, 2005), sendo a proteína alvo deste trabalho. Possui 419 aminoácidos que formam a sua estrutura, sendo que as regiões N e C terminais não possuem interações entre si. Porém, como demonstrado na Figura 2, são ligadas por uma região central rica em serina (SRD), responsável pela oligomerização da proteína. Além disso, ligada à porção N-terminal existe uma região rica em serina, glicina e arginina (SGRD) (OLIVEIRA, MAGALHÃES, HOMAN, 2020.)

Figura 2: Estrutura da proteína de nucleocapsídeo (N). Estrutura linear, diferenciando através dos aminoácidos o início e fim de cada porção da proteína. (OLIVEIRA; MAGALHÃES; HOMAN, 2020.)



Conforme descrito por Oliveira, Magalhães, Homan (2020), através de análises computacionais, a proteína N possui a grande maioria de seus epítomos entre os aminoácidos 50-350. Embora alguns estudos mais recentes tenham demonstrado a presença de variações genéticas no gene associado à produção da proteína N entre diferentes variantes do SARS-CoV-2 (KIRYANOV et al, 2022), a proteína N apresenta uma conservação na sua sequência de aminoácidos de cerca de 90% entre os diferentes vírus da família *Coronaviridae*. A proteína de nucleocapsídeo é a mais abundante do vírus, além de ser altamente imunogênica (OLIVEIRA, MAGALHÃES, HOMAN, 2020, ZENG et al, 2020).

### 1.3. Resposta imune humoral

A resposta imune humoral, ocorre em secreções das mucosas e também no sangue, sendo mediada pelos linfócitos B através da produção de anticorpos circulantes. Esses anticorpos possuem a capacidade de impedir a infecção de novos agentes patológicos ao identificar antígenos, neutralizando-os, de modo que ocorra também uma sinalização para a eliminação destes (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2019; MURPHY, TRAVERS, WALPORT, 2010).

Os anticorpos são proteínas capazes de neutralizar estruturas consideradas estranhas ao corpo. São constituídos pela ligação de duas cadeias pesadas, onde cada cadeia desta ainda possui ligação com uma cadeia leve. As imunoglobulinas (Ig) são divididas em 5 classes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, cada uma com sua especificidade e local de ação. A IgA fica localizada preferencialmente nas mucosas, IgD assim como IgM está presente na superfície de linfócitos virgens, embora a segunda apresente uma função de defesa nos primeiros dias após uma

infecção. Enquanto isso, a IgE atua em alergias e também contra parasitas. Por fim, a IgG, objeto de estudo deste trabalho, são as mais abundantes do nosso corpo, presentes na corrente sanguínea e vinculadas a uma resposta tardia do nosso sistema imunológico (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2019; MURPHY, TRAVERS, WALPORT, 2010).

As moléculas reconhecidas pelo sistema imune acabam gerando as mais diversas respostas que são conhecidas como antígenos. Estes, por sua vez, possuem regiões específicas de ligação denominadas de epítopos, local onde ocorre a ligação do antígeno com o anticorpo. Antígenos maiores, apresentam mais epítopos, permitindo assim a ligação de mais de um anticorpo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; MURPHY, TRAVERS, WALPORT, 2010). Desta forma, ao identificar uma região do microrganismo com mais epítopos, estamos identificando o local onde há maior probabilidade do nosso sistema imune adaptativo agir.

#### **1.4. Vacinas contra COVID-19**

Assim que essa pandemia causada pelo SARS-CoV-2 se instaurou, diversas pesquisas foram iniciadas na tentativa de produzir possíveis vacinas para esse novo vírus. Até então, diversas tecnologias foram empregadas para produzir as vacinas, entre elas, pode-se citar o uso de vírus inativados, vetores virais e também vacinas de mRNA (CREECH, WALKER, SAMUELS, 2021). Dentre os objetos de estudo para o desenvolvimento das vacinas, o uso da proteína S foi o que mais se destacou, principalmente pelo fato desta ser altamente imunogênica. Entretanto, alguns pontos negativos foram identificados, como por exemplo o fato desta proteína sofrer mais mutações, além de que, em casos menos graves de infecção muitas vezes não há a apresentação de respostas de anticorpos (OLIVEIRA, MAGALHÃES, HOMAN, 2020).

Para a produção da vacina contra o vírus da Covid-19 algumas tecnologias foram utilizadas. Destaca-se aqui as vacinas com o maior uso dentro do Brasil que utilizam diferentes plataformas. Desde mais recentes, com o mRNA, caso da vacina Pfizer/BioNTech (BNT162b2), como tecnologias mais consolidadas, com o uso de vetores virais a exemplo da AstraZeneca (ChAdOx1 nCoV-19) ou de vírus inativados, como a vacina alvo deste estudo, Sinovac Biotech (CoronaVac) (FILHO, *et al.*, 2021). É importante frisar que toda tecnologia



tem suas vantagens e desvantagens, porém todas elas seguem um protocolo de segurança que é estipulado pela OMS (LIMA, MORAIS, OLIVEIRA, 2022).

O desenvolvimento de vacinas é um excelente caminho para diminuir o número de casos e conseqüentemente de mortes pela Covid-19. Sendo assim, o entendimento de como nosso sistema imune reage frente ao uso de vacinas é extremamente importante, por isso estudar pessoas vacinadas e tentar verificar se essas apresentam um aumento da resposta imune através da produção de anticorpos anti-proteína N do SARS-CoV-2, pode auxiliar na compreensão das necessidades de melhoramento das vacinas existentes ou no desenvolvimento de novas vacinas.

### **1.5. Descrição do imunoensaio ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)**

O método enzimático conhecido como ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) foi desenvolvido no início da década de 1970 por pesquisadores da Universidade de Estocolmo. Por ser um imunoensaio simples e prático, acaba sendo bastante utilizado até os dias de hoje, principalmente por apresentar diversas características atrativas, como a praticidade, baixo custo, boa sensibilidade, entre outros fatores. Esse método pode ser empregado utilizando vários insumos biológicos como sendo os alvos de pesquisa, podendo-se citar sangue, extratos de células e afins, de modo que se estude anticorpos e antígenos (MINEO et al, 2016; VAZ et al, 2018).

Este imunoensaio, de modo geral, consiste em uma prática que pode ser dividida em três etapas, que estão representadas na Figura 3: a) adsorção de estruturas em fase sólida, b) uso de conjugados ligados a enzimas, c) uso de um substrato cromogênico associado a uma solução de parada de reação. Deste modo, pode-se relacionar de forma direta a quantidade da substância alvo da pesquisa com a intensidade da coloração gerada (MINEO, *et.al*, 2016; VAZ, *et.al*, 2018).

Figura 3: Representação do imunoenensaio ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) indireto. Utilizado para a detecção de anticorpos ou antígenos. Elaborado pelo autor (2022) através do site BioRender.com.



O imunoenensaio ELISA pode ser subdividido em dois grupos: ELISA competitivo e ELISA não competitivo, esse último é subdividido em três tipos: sanduíche, direto e indireto, sendo este último a metodologia adotada neste trabalho, no qual na fase sólida é depositado o antígeno, em seguida, o anticorpo primário e por fim o anticorpo secundário associado a uma enzima (MINEO, *et.al*, 2016; VAZ, *et.al*, 2018).

## 1.6. Justificativa

Desenvolvimento de uma ferramenta de avaliação da resposta imune humoral populacional que seja prático, com baixo custo e de fácil reprodução.

## 1.7. Hipótese

Ao utilizar o imunoenensaio ELISA não competitivo indireto como ferramenta de detecção quantitativa, hipotetiza-se que este seja capaz de detectar se a população vacinada com CoronaVac apresenta uma resposta imune adaptativa humoral contra a proteína N do SARS-CoV-2, quando comparada às amostras pré-pandêmicas, onde os indivíduos não tiveram contato com o vírus, sendo possível também identificar se as pessoas tiveram contato prévio com o vírus ou não.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar se o imunoenensaio ELISA anti  $N_{(50-350)}$  é capaz de detectar a resposta imune humoral após a vacinação com CoronaVac em humanos.

### **2.2. Objetivos específicos**

- 1) Expressar e purificar a proteína de nucleocapsídeo de SARS-CoV-2;
- 2) Otimizar a padronização de um teste ELISA para indivíduos vacinados com CoronaVac;
- 3) Avaliar a produção de IgG de indivíduos vacinados com CoronaVac utilizando o ELISA anti  $N_{(50-350)}$ .

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Descrição das amostras**

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (CAAE #36944620.5.1001.0121), conforme mostra o Anexo A.

O recrutamento dos voluntários foi feito dentro do Laboratório de Imunobiologia (LIM) da Universidade Federal de Santa Catarina, local da realização desta pesquisa durante o mês de março de 2020.

Os voluntários vacinados com CoronaVac foram acompanhados durante um período de 24 semanas, a partir do dia 05 de abril de 2020, efetuando-se o acompanhamento semanal por RT-qPCR, realizados pelo LIM para a verificação de possíveis infecções pelo novo coronavírus, além disso testes de soroneutralização foram feitos para identificação de possíveis contaminações pelo SARS-CoV-2 antes no período das coletas. Todas as pessoas receberam códigos numéricos para não haver associação com os seus respectivos nomes.

#### **3.2. Transformação de bactérias**

As bactérias transformadas utilizadas para a produção da proteína de nucleocapsídeo de SARS-CoV-2 foram adquiridas por meio de parceria com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os plasmídeos utilizados para expressar a proteína foram pET-28a resistente a kanamicina.

#### **3.3. Expressão e purificação**

A proteína foi expressa pela bactéria Códon Plus transformada, onde foi selecionada uma cultura de colônia (Figura 4A) para a produção de pré-inóculo (Figura 4B) com 20 ml de meio L.B. (Luria Bertani), adicionando-se 50 µg/ml de cada antibiótico (cloranfenicol e kanamicina). Este pré-inóculo foi incubado por 16 horas à 37°C numa rotação de 150 rpm (rotações por minuto). Posteriormente foi produzido um inóculo (Figura 4C) utilizando-se

garrafas autoclavadas de 1 l, adicionando-se 250 ml de meio L.B. juntamente com 250 µl de cada antibiótico (cloranfenicol e kanamicina) e 5 ml do pré-inóculo. Nesta etapa foram separadas duas alíquotas de 1 ml cada, a primeira referente ao pré-inóculo, já a segunda foi do meio líquido L.B. para ser utilizado como branco. O inóculo foi incubado durante uma hora e meia à 37°C, em rotação de 150 rpm até atingir uma densidade ótica (D.O.) entre 0,4 e 0,8, que foi medida em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm, utilizando-se a alíquota do meio de cultura como branco.

Após o inóculo atingir a densidade ótica desejada, adicionou-se 1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) como forma de induzir a expressão de proteínas durante o tempo de 5 horas numa temperatura de 28 °C por 150 rpm, sendo retirada uma alíquota do inóculo sem IPTG. Após este tempo foram retiradas duas alíquotas, uma para ser utilizada no Western Blot e a segunda foi destinada para medir a densidade ótica, sendo que o valor obtido nesta leitura foi utilizado num cálculo que consiste em dividir o valor da D.O. sem IPTG pelo valor da D.O. com IPTG. O resultado desta divisão é utilizado como referência no volume que se deve colocar em cada poço na técnica de Western Blot, de modo que se adicione tanto no poço “sem IPTG” e no poço “com IPTG” uma quantidade parecida do extrato proteico.

O inóculo com IPTG após o tempo transcorrido de 5 horas foi centrifugado a 12.000 G numa temperatura de 4°C, durante 20 min. Foi descartado o sobrenadante após a finalização do processo, sendo que o pellet foi congelado a - 20°C até o dia seguinte.

No dia seguinte, os precipitados foram suspensos em tampão de lise (Figura 4D) Tris(hidroximetil)aminometano-HCl (Tris-HCl) 50mM, NaCl 500 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM), onde em cada tubo foi adicionado 5 ml de tampão, suspendendo-se com o auxílio de uma pipeta até a dissolução completa do precipitado presente, além disso nesta solução adicionou-se 1 mM de PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila em cada tubo, como inibidor de proteases. Finalizado esta etapa, adicionou-se 50 µl por tubo de lisozima (50 mM), deixando agir por 30 min. Após este tempo, os tubos foram levados para o processo de sonicação (Figura 4F) em cama de gelo. O sonicador foi configurado para realizar o processo numa amplificação de 60%, durante 5 min, sendo que configurou-se para que durante o tempo de sonicação, a cada 30 segundos de lise celular fosse feita uma pausa de 30 segundos, até completar o tempo total.

As amostras então foram centrifugadas por 30 min, à 12.000 G e a uma temperatura de

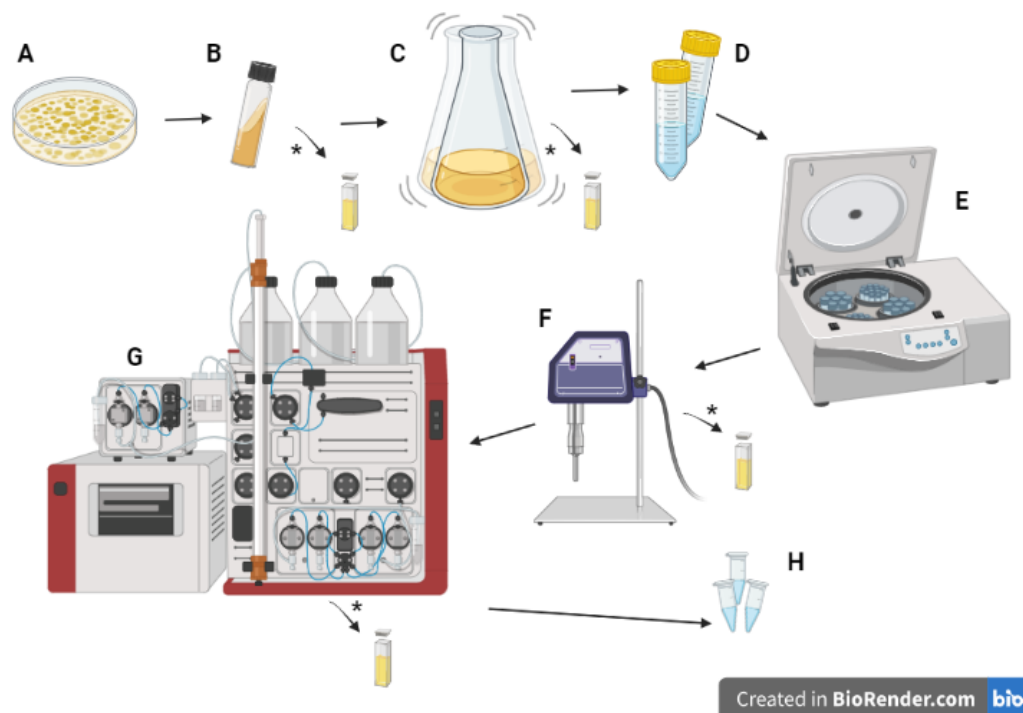
4°C, objetivando-se com isso preservar a estrutura proteica. Após isso, coletou-se duas alíquotas, uma de 1 ml do sobrenadante e uma do precipitado, para verificar-se a expressão da proteína recombinante N<sub>(50-350)</sub>.

Separou-se o sobrenadante do precipitado e realizou-se um tratamento deste último com tampão ureia 8M, durante um período de duas horas, de modo que os corpos de inclusão fossem desestruturados, obtendo-se pequenas frações da proteína, permitindo assim a sua purificação

A etapa de purificação foi realizada utilizando-se o equipamento AKTA (Figura 4G), através da técnica de afinidade por íons metálicos, conforme estabelecido por Upadhyay *et al.* 2014, realizando-se algumas adaptações, método que também foi descrito por Zuniga e colaboradores (2003). A leitura do equipamento foi ajustada para 280 nm e a coluna foi equilibrada, utilizando-se o tampão A (Tris-HCl 50 mM, Ureia 4 M, NaCl 500 mM e Imidazol 10 mM pH 8,0), além de ser carregada com Ni<sup>+2</sup>. Para a eluição da proteína foram utilizadas 3 concentrações do tampão B (Tris-HCl 50 mM, Uréia 2 M, NaCl 500 mM e Imidazol 300 mM pH 8,0), sendo elas de 3.5, 9 e 100%. Coletou-se algumas alíquotas para a realização do procedimento de Western Blot, para a verificação do perfil de purificação da proteína alvo.

Por fim, realizou-se o procedimento de *Refolding*, utilizando o tampão (Tris-HCl 50mM, NaCl 250 mM, Glicerol 10%, pH 8,0), durante um período de 16 horas. Ressalta-se que durante o tratamento com ureia algumas ligações da proteína se desfazem, devido ao estresse químico, desta forma o *Refolding* teve como objetivo tentar recuperar a conformação da proteína.

Figura 4: Esquema simplificado de expressão e purificação da proteína recombinante  $N_{(50-350)}$ . **A:** bactéria transformada. **B:** pré-inóculo. **C:** inóculo. **D:** tratamento com tampão de lise. **E:** centrifugação. **F:** sonicação. **G:** purificação utilizando o AKTA. **H:** separação do purificado em alíquotas. \*: retirada de alíquotas para a realização do Western Blot. Elaborado pelo autor (2022) através do site BioRender.com.



Por fim a proteína foi concentrada utilizando-se um concentrador de proteínas Amicon, Merck Millipore 10 kDa, onde a amostra foi submetida a uma rotação de 3220 G, numa temperatura de 4°C, até que todo o volume resultante do processo de reconformação fosse centrifugado.

### 3.4. Quantificação de proteína

Após a purificação foi realizada a quantificação da proteína  $N_{(50-350)}$  e para isso o protocolo do fabricante (Thermo Scientific®) foi utilizado. Esse método utiliza ácido bicinonínico (BCA Protein Assay Kit).

### 3.5. Realização do Western Blot

Para verificar a expressão e purificação da proteína alvo, utilizou-se a técnica de Western Blot, sendo que o protocolo seguido foi padronizado por Vieira (2022).

A primeira etapa deste método consiste na preparação das amostras coletadas durante a expressão e purificação, sendo realizada a diluição das mesmas em tampão de amostra (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%), na proporção de 20 µl de amostra para 20 µl de tampão de amostra 2X. Ressalta-se que as amostras por estarem em um precipitado foi necessário a diluição prévia das mesmas em água milliQ. Após isso, as amostras foram levadas para o termociclador, ficando por 10 min a uma temperatura de 99°C.

Para a realização da eletroforese, preparou-se dois géis 10% de poliacrilamida (Figura 5A), um para a transferência das proteínas para uma membrana e outro para a coloração das proteínas utilizando Coomassie R-250. As amostras foram submetidas a um “short spin” de 7 segundos e em seguida pipetaram-se as mesmas dentro dos poços dos géis, adicionando-se até o limite da cuba o tampão de corrida SDS-PAGE Tris 1M, SDS 1M, Glicina 1M (Figura 5B), iniciando-se a eletroforese à 70 volts e quando as amostras atingiram a porção separadora do gel, aumentou-se a voltagem para 120 volts, deixando o experimento ocorrer até que as amostras chegassem próximas ao final do gel, como demonstrado pela ilustração da Figura 5C.

Em seguida os géis foram retirados do sistema de eletroforese, sendo que para um deles realizou-se o preparo da solução Coomassie, deixando o mesmo sob agitação com esta solução durante 16 horas e o outro foi colocado no sistema de transferência.

Utilizou-se a membrana de nitrocelulose Amersham Protran 0.45 NC (GE Healthcare) com tampão de transferência para a realização desta etapa. O sistema de transferência (Figura 5D) foi montado conforme a seguinte sequência de baixo para cima: quatro mantas no fundo, dois papéis filtros em seguida, o gel, a membrana de nitrocelulose, dois papéis filtros, e por fim mais quatro mantas, ressaltando-se que as mantas e os papéis filtros estavam molhados com o tampão de transferência e que após cada adição de uma camada era realizado o procedimento de retirada de bolhas do sistema, pressionando-se a camada com o auxílio de um pequeno rolo ou espátula. Após a montagem do sistema, adicionou-se na parte interna do sistema o tampão de transferência e na parte externa água. A transferência ocorreu durante 2 horas e 30 minutos, à 25 volts, confirmando-se que a membrana havia recebido as proteínas através da marcação com Ponceau 1% (Figura 5E) sob agitação por 5 minutos, enxaguando-se

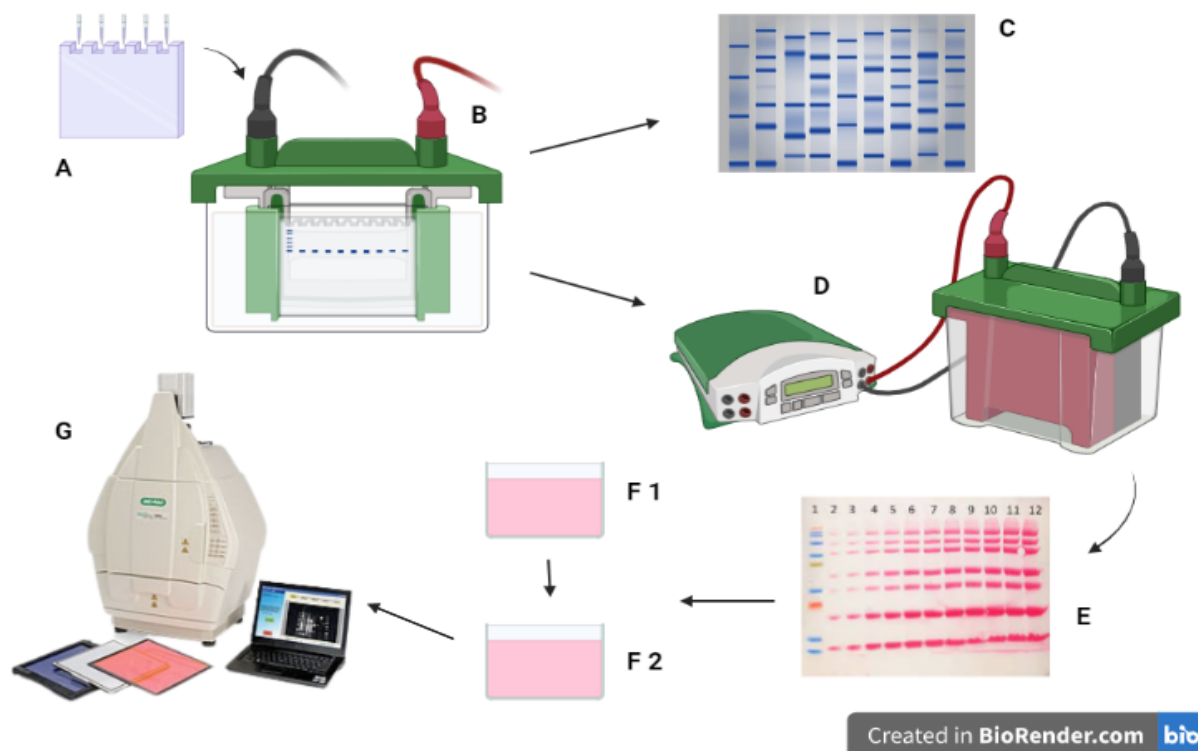


as membranas com água destilada até o surgimento das marcações das proteínas.

Em relação a membrana de nitrocelulose que passou pela transferência, elaborou-se uma solução de bloqueio contendo TBS (solução salina Tris-tamponada), Leite em pó 5%, de modo que a membrana ficou envolvida nessa solução por 45 minutos sob agitação. Após este tempo, lavou-se a membrana com TBS Tween 20 (TBST), por cinco minutos sob agitação, repetindo esse procedimento durante três vezes. Logo após a realização da lavagem a membrana foi incubada durante 16 horas à 4°C com anticorpo monoclonal primário Anti-HisTag 6x (1:10000), que foi diluído em uma solução de TBST + BSA 5%, como demonstrado na Figura 5F1.

No outro dia, realizou-se a lavagem da membrana novamente com TBST por 5 minutos, repetindo o procedimento 3 vezes para em seguida incubar a mesma com o anticorpo secundário (Figura 5F2) anti-mouse IgG HRP-1 (1:5000) diluído em solução de TBST + BSA 5% durante o período de 1 hora sob agitação à temperatura ambiente. Transcorrido este tempo, lavou-se a membrana 3 vezes por cinco minutos com TBST e mais duas vezes, também por cinco minutos com TBS para então, realizar-se a revelação da membrana, que ocorreu no Laboratório multiusuários (LAMEB) do Centro de Ciências Biológicas (CCB), utilizando-se o kit de revelação Thermo Fisher Pierce ECL Western Blot Substrate e o Fotodocumentador ChemiDoc BioRad, conforme a Figura 5G.

Figura 5: Esquema simplificado de Western Blot da proteína recombinante  $N_{(50-350)}$ . **A:** Pipetagem das amostras no gel. **B:** Eletroforese das amostras **C:** Gel de poliacrilamida marcado por solução de Comassie. **D:** Etapa de transferência para a membrana de nitrocelulose. **E:** Membrana de nitrocelulose marcada com Ponceau. **F1:** Bloqueio da membrana com solução (TBS 1X, Leite 5%). **F2:** Incubação da membrana com anticorpo secundário. **G:** Revelação de membrana. Elaborado pelo autor (2022) através do site BioRender.com.



### 3.6.Otimização do teste ELISA

Foi utilizado o modelo descrito por Martins et al. (2005) como modelo para a produção e otimização do teste ELISA, levando em consideração os trabalhos feitos por Heck (2021) e Vieira (2022).

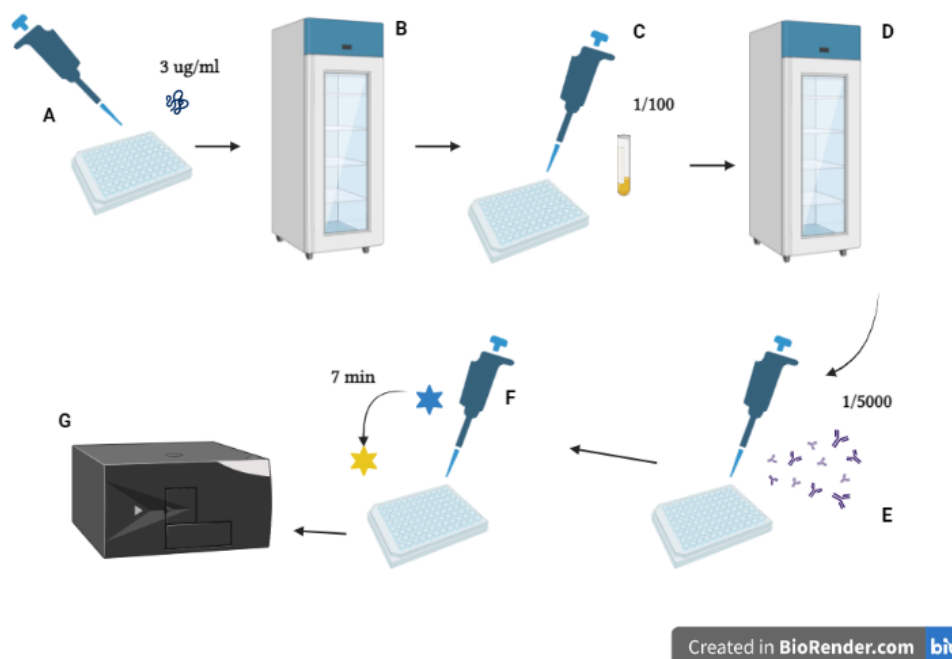
Utilizou-se uma placa de fundo “U” de alta adsorção para a sensibilização com a proteína  $N_{(50-350)}$  na concentração de 3  $\mu\text{g/ml}$ , utilizando como diluente a solução de PBS (tampão fosfato-salino), como apresentado pela Figura 6A. Adicionou-se 50  $\mu\text{l}$  por poço, retirando-se as bolhas quando presentes, após isso a placa foi vedada e incubada por 16 horas, em uma câmara úmida, à 4°C (Figura 6B). Passado esse tempo, a placa foi lavada por uma solução PBS + 0,05% de Tween20, essa lavagem foi repetida três vezes, onde os poços foram cobertos pela solução de lavagem deixando agir por 1 minuto agindo, sendo que entre as lavagens as placas foram batidas manualmente para a retirada do excesso de líquido dos

poços. Após essa etapa verificou-se a presença de bolhas, retirando-as quando presentes sendo adicionado em seguida a solução de bloqueio contendo PBS + Leite em pó 5% + 0,05 % de Tween 20, sendo incubada durante 2 horas à 4°C.

Durante esse período de tempo, as amostras de soro do grupo de indivíduos vacinados com CoronaVac foram preparadas numa placa de diluição, onde foram adicionadas na diluição de 1/100 de amostra e solução PBS + Leite em pó 5% + 0,05 % de Tween 20, respectivamente (Figura 6C), sendo preparadas em triplicata. Passado as duas horas de bloqueio, a placa foi então lavada novamente com solução PBS + 0,05% de Tween20, realizando o procedimento em 4 ciclos (adição da solução e retirada da solução com batidas na placa) por 1 minuto da solução de lavagem na placa e um ciclo de 5 min. Após as etapas de lavagem, passaram-se 50 µl da placa de diluição contendo as amostras para a placa sensibilizada, lacrando-se novamente com o plástico de cobertura, deixando a amostra durante 16 horas à 4°C.

Decorrido esse tempo, a placa foi novamente lavada com PBS + 0,05% de Tween20, por 4 vezes, deixando a solução agir por 1 minuto e mais uma vez por 5 minutos, realizando-se batidas para a retirada do excesso de líquido entre cada etapa de lavagem. Após isso, adicionaram-se 50 µl de anticorpo secundário, na diluição de 1/5000 de anticorpo IgG Goat anti-Human HRP e solução PBS + Leite em pó 5% + 0,05 % de Tween 20, respectivamente (Figura 6E), em cada poço, incubando durante 1 hora e meia. Em seguida, lavou-se a placa novamente com 4 lavagens onde a solução agiu por 1 minuto seguidas de uma lavagem onde a solução agiu por de 5 minutos conforme descrito anteriormente. Adicionou-se 150 µl de tetrametilbenzidina (TMB), em cada poço, deixando agir por 7 minutos e então bloqueou-se a reação adicionando 150 µl de ácido clorídrico 1N em cada poço (Figura 6F). Por fim, a placa de ELISA foi levada até a leitora de placas, ajustando-se a leitura para a frequência de 450 nm, como demonstrado na Figura 6G.

Figura 6: Esquema simplificado do imunoenensaio ELISA. **A:** sensibilização da placa. **B:** incubação overnight na geladeira. **C:** adição do soro das amostras na concentração 1/100. **D:** incubação por 24 horas na geladeira. **E:** Adição do anticorpo secundário IgG Goat anti-Human HRP na proporção 1/5000. **F:** Adição de TMB com 7 min para a viragem e interrupção com HCl 1 N. **G:** Leitura da placa em 450 nm. Elaborado pelo autor (2022) através do site BioRender.com.



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos de expressão e purificação foram produzidos em colaboração com o trabalho de Vieira (2022), por este motivo compartilhamos os mesmos resultados.

##### 4.1 Características da coorte estudada

Conforme é demonstrado no Quadro 1, a coorte é composta por 23 pessoas, sendo 14 do sexo feminino e 9 do sexo masculino, sendo que a distribuição de idade é : 3 pessoas (20-24 anos), 7 pessoas (25-29 anos), 3 pessoas (30-34 anos), 6 pessoas (35-39 anos) e 4 pessoas (40-45 anos), de modo que apenas um homem que possui entre 35-39 anos possui comorbidade, sendo esta relatada como asma. Além disso, dos medicamentos contínuos utilizados por essas pessoas, tem-se que todas as pessoas do sexo feminino usam algum tipo

de contraceptivo hormonal ou DIU, sendo que uma delas ainda faz uso dos medicamentos venovase 45mg e desvenlafaxina 100mg. Entre as pessoas do sexo masculino há duas pessoas que usam medicamentos de forma constante, sendo que uma delas está na faixa etária de 24-29, utilizando PrEP e Sertralina, enquanto outro utiliza de forma constante lamotrigina.

Quadro 1: Descrição das características gerais da coorte.: O “n” representa o número de pessoas atribuídas à característica em questão. Os dados aqui apresentados foram disponibilizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Imunobiologia (LIM) da UFSC. Elaborado pelo autor (2022)

Característica	Participantes		Comorbidades		Uso de medicamentos	
	n	%	n	%	n	%
<b>Total</b>	23	100	1	4,35	6	26,1
<b>Sexo biológico</b>						
Feminino	14	60,87	0		4	17,4
Masculino	9	39,13	1	4,35	2	8,7
<b>Anos</b>						
20-24	3	13,04	0		2	8,7
25-29	7	30,42	0		2	8,7
30-34	3	13,04	0		1	4,35
35-39	6	26,1	1	4,35	0	0
40-45	4	17,4	0		1	4,35

A data da primeira dose da vacina CoronaVac foi aplicada entre os dias 05 e 06 de abril de 2021, sendo o dia 05 a data que corresponde também a primeira coleta de Swab nasal para a realização do teste qPCR e também neste dia foi realizada a primeira coleta de sangue, que foi intitulada de T<sub>0</sub>. A segunda dose foi administrada 21 dias após a primeira, ocorrendo no dia 26 de abril de 2020, com exceção para as duas pessoas, com os códigos 19 e 20 que tiveram a segunda dose administradas nos dias 04 e 13 de maio de 2021, respectivamente.

Como descrito anteriormente, as coletas para o teste qPCR foram realizadas semanalmente enquanto que a coleta de sangue foi realizada semanalmente até o dia 4 de maio de 2021 (T4), em seguida o T5 foi coletado quinze dias após o T4. As coletas T6 e T7 foram com intervalos de três semanas entre si e finalmente a coleta T8, sendo realizada no dia 21 de setembro de 2021 (aproximadamente 5 meses e meio após a vacinação).

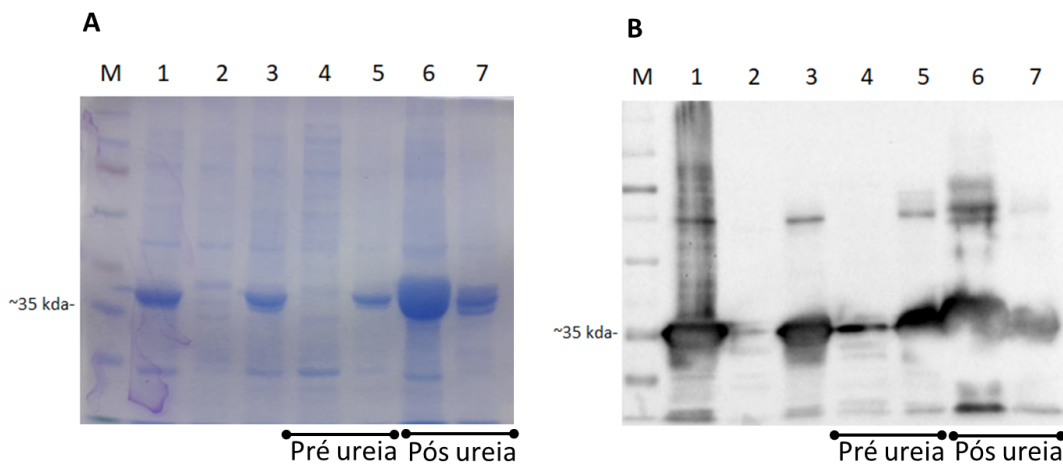
#### 4.2 Expressão, purificação e quantificação da proteína recombinante N<sub>(50-350)</sub>

Para expressão do fragmento proteína recombinante N de SARS-CoV-2 utilizou-se a linhagem de *Escherichia coli*, BL21-Codon Plus, conforme descrito por Vieira (2022). Após a expressão e coletas das alíquotas, percebeu-se uma banda próxima a marca de 35 kDa, como é apresentado na Figura 7, principalmente nas canaletas 1, 3, 6 e 7, podendo ser visualizado tanto com o gel corado por Comassie, como na membrana de nitrocelulose após ser marcada e revelada.

Através dos dados obtidos, pode-se perceber uma diferença significativa entre as canaletas 2 e 3 devido a ação do IPTG, sendo que a proteína de interesse ficou em sua grande maioria concentrada no precipitado, em estruturas conhecidas como corpos de inclusão. Essas estruturas eram esperadas e são comuns em sistemas onde há uma indução à expressão de proteínas, uma vez que há uma sobrecarga do sistema, resultando num mal dobramento das proteínas, fazendo com essas acabam se agregando, tornando-as insolúveis (Carrio, *et al*, 2005).

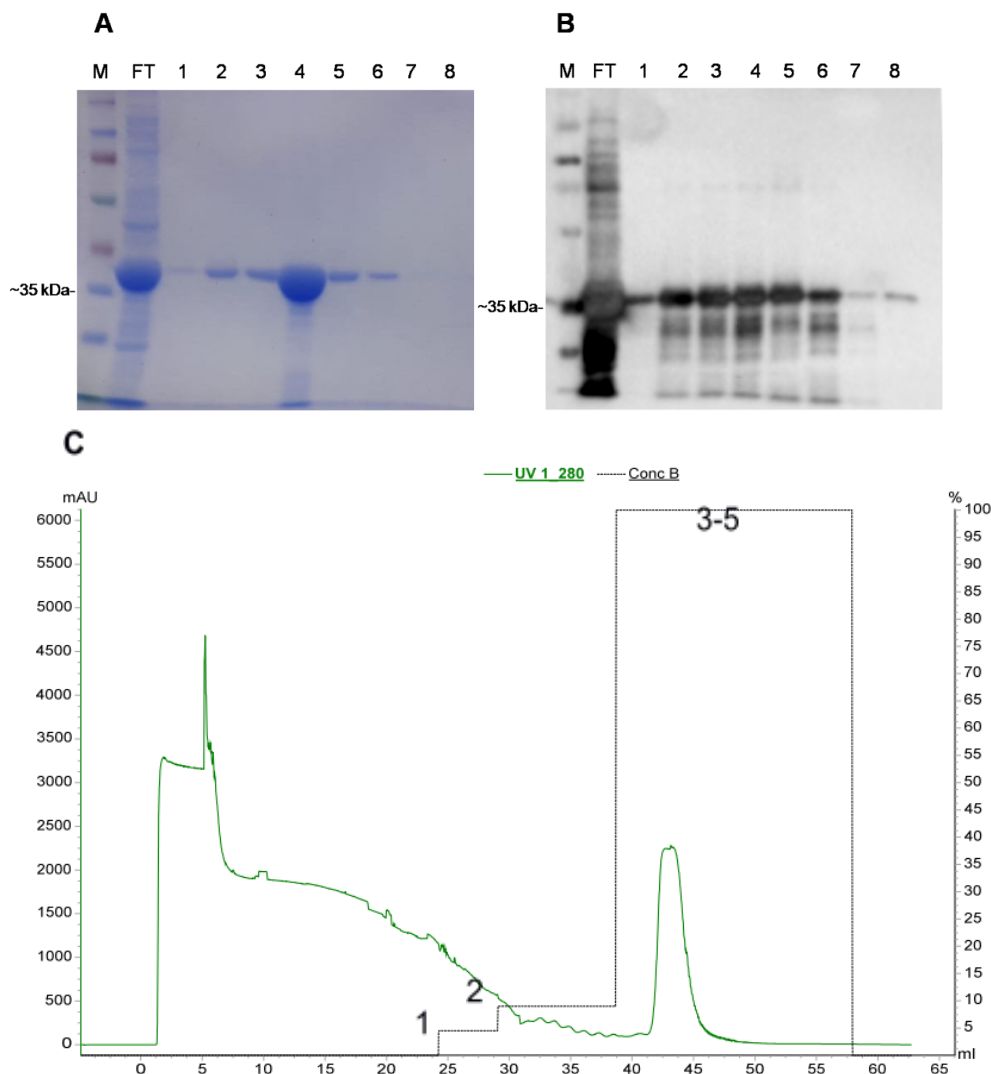
Utilizou-se o tratamento com uréia 8M para desestruturação desses agregados, para que as proteínas se tornassem solúveis, concentrando-se no sobrenadante. Situação que de fato foi observada ao analisarmos a Figura 7, onde nas canaletas 4 e 5, sem o tratamento de ureia vemos a proteína concentrada no precipitado, enquanto que ao analisar-se as canaletas 6 e 7, já com o tratamento de ureia, percebe-se um grande aumento na concentração das proteínas do sobrenadante.

Figura 7: Expressão da proteína N(50-350) utilizando *E. Coli* BL21-Codon Plus. **M:** Peso molecular. **1:** Pré-inóculo. **2:** Inóculo sem indução com IPTG. **3:** Inóculo com indução com IPTG. **4:** Sobrenadante após sonicação. **5:** Pellet após sonicação. **6:** Sobrenadante após tratamento com ureia. **7:** Precipitado após tratamento com ureia. **A:** Gel 10% poliacrilamida corado por Comassie. **B:** membrana de nitrocelulose revelada com marcação primária com Anti-HisTag (1:10000) e secundária com Anti-IgG mouse HRP (1:5000). VIEIRA, 2022.



Após a verificação de que a proteína  $N_{(50-350)}$  havia sido expressa, a purificação foi realizada por IMAC (Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos), também utilizada por Djukic et al. (2021), sendo que a proteína foi eluída da coluna a partir de concentrações crescentes de Imidazol 300mM, que começaram em 4,5%, passando em um segundo momento para 9% e por fim chegando em 100%, podendo ser visualizado na Figura 8C, através da linha tracejada que representa a concentração do tampão de Imidazol.

Figura 8: Cromatograma da purificação e marcações de Western Blot e SDS-PAGE. **M**: Peso molecular. **FT**: Flow through. 1: primeiro ponto de coleta. 2: segundo ponto de coleta. 3-5: terceiro ponto de coleta. 6: pós concentração 7-8: pós Size-exclusion chromatography - SEC. **A**: Gel de poliacrilamida marcado com Comassie. **B**: Western Blot utilizando anticorpo primário anti-His Tag (1:10000). **C**: Resultado da purificação utilizando a técnica **IMAC**; a linha verde refere-se a leitura de absorbância realizada pelo equipamento a 280 nm, enquanto a linha tracejada descreve a concentração de imidazol na solução que foi injetada no sistema. VIEIRA, 2022.



Amostras em diferentes volumes de eluição foram coletadas e analisadas através de Western Blot, como pode ser visualizado nas imagens A e B da Figura 8. Percebe-se que no *flow through* (FT) há uma grande presença de proteína e outras estruturas que são marcadas ao longo de quase todo gel. As canaletas entre 1 e 5 mostram diferentes coletas do material purificado, apresentando o mesmo peso molecular demonstrado na Figura 8.

Após a purificação, realizou-se o processo de recuperação da conformação da proteína durante 16 horas, para que a proteína recuperasse sua estrutura tridimensional, uma vez que



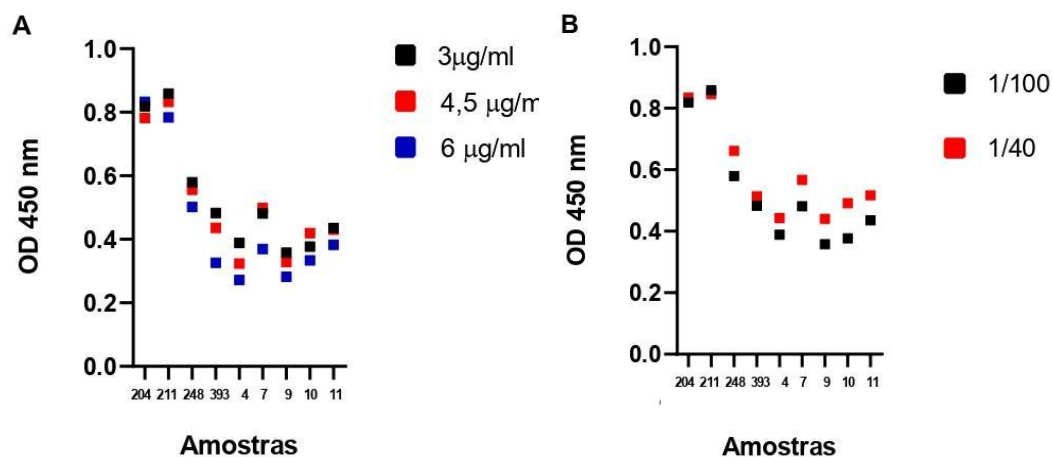
esta passou por um processo de estresse químico ao ser realizado o tratamento com uréia 8M (CARRIO, *et al*, 2005). Em seguida a proteína foi concentrada e quantificada, obtendo-se 22 mg de proteína N<sub>(50-350)</sub> para um litro de inóculo produzido. Ao compararmos com outros trabalhos que utilizaram a mesma técnica, percebe-se que a quantidade de proteína obtida chegou a representar mais do que o dobro do que nós purificamos (LI, Guang *et al.*, 2021), embora seja importante ressaltar que são proteínas recombinantes diferentes. Especula-se algumas situações que podem ter contribuído para isso, como por exemplo o fato de que o tamanho da coluna utilizada para a purificação pode ter influenciado, como também a questão de que como demonstrado na Figura 8 (imagens A e B) o *flow through* ainda possuía uma quantidade expressiva de proteína recombinante, sendo que esta coleta não foi purificada novamente, representando assim perdas.

### 4.3. Otimização do ELISA

Para o desenvolvimento do ELISA primeiramente passamos pela etapa de otimização da metodologia. Para isso testamos a quantidade de proteína (3, 4.5 e 6 nanogramas por mililitro), que foi utilizada para sensibilizar a placa e a diluição do anticorpo primário, que foi adicionado, sendo elas 1/40 e 1/100, de soro em solução de diluição PBS + Leite em pó 5% + 0,05 % de Tween 20.

Ressalta-se que para a realização desta etapa, utilizou-se a mesma coorte de voluntários do projeto IMUNOVIDA que foram utilizados para o desenvolvimento e padronização do ELISA indireto por Vieira (2022). Das amostras utilizadas para a otimização, as positivas são identificadas pelos números: 204, 211, 248 e 393, enquanto as negativas estão identificadas pelos números: 4, 7, 9, 10 e 11.

Figura 9: Otimização de teste ELISA para detecção de anticorpos IgG anti N. **A:** representação das diferentes concentrações de  $N_{(50-350)}$  utilizada para sensibilizar as placas. **B:** concentrações de anticorpo primário diluído em solução de amostra. **Amostras positivas:** 204, 211, 248 e 393. **Amostras negativas:** 4, 7, 9, 10 e 11 Elaborado pelo autor (2022).

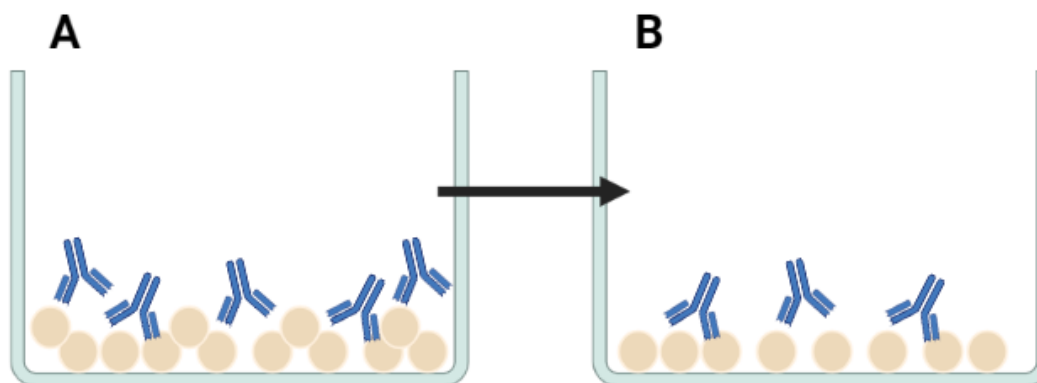


Na Figura 9A, percebe-se que ao aumentarmos a concentração de proteína na etapa de sensibilização da placa, mantendo todas as outras etapas do teste iguais ocorreu uma diminuição da D.O. em quase todas as amostras utilizadas. Isso se explica, pois ao aumentar-se a quantidade da proteína ocorreu uma sobreposição, criando camadas da mesma, desta forma ao adicionarmos o anticorpo primário este interagiu com a camada mais exposta, como mostrado na Figura 10 e ao realizar-se a lavagem da placa esta camada foi retirada, restando apenas a camada que está de fato retida na fase sólida, diminuindo assim a resposta (ZIVKOVIC; MINIC, 2020).

Já na Figura 9B, percebe-se que ao diminuirmos a diluição do soro (anticorpo primário), utilizando 3µg/ml de proteína para sensibilizar a placa e mantendo todas as outras etapas sem alterações há um aumento da D.O. na maioria das amostras, com exceção das amostras positivas 204 e 211.

Sendo assim, ao terminarmos de realizar os testes para a otimização do ELISA, optou-se por manter a sensibilização da placa com 3µg/ml de proteína para evitarmos o problema de sobreposição de camadas relatado acima e demonstrado na Figura 10. Já em relação à diluição do soro como o aumento da D.O foi percebido em todas as amostras negativas, enquanto nem todas as amostras positivas apresentaram essa característica optou-se por manter a diluição em 1/100, levando em consideração ainda o uso do recurso e a sua disponibilidade, uma vez que diluindo mais o soro, o uso do mesmo diminui.

Figura 10: Demonstração de sensibilização com proteína excedente no ELISA. **A:** Poço onde percebe-se duas camadas de proteína (representadas pelos círculos rosas) com anticorpo primário ligado. **B:** Após a etapa de lavagem as proteínas da segunda camada acabam sendo eliminadas pela solução de lavagem e com elas os anticorpos que estavam associados a elas, fazendo assim que ocorra uma diminuição da D.O. final. Elaborado pelo autor (2022) através do site BioRender.com.



#### 4.4. Análise da coorte

Todas as amostras sorológicas usadas neste trabalho foram testadas em triplicata, de modo que possíveis erros na homogeneidade das amostras e erros de pipetagem em diferentes etapas do experimento fossem minimizados, além de que, podemos levar em consideração a própria natureza das amostras analisadas, que possuem por si próprias variações.

Como apresentado no Quadro 2, nota-se que de modo geral, não há altos valores de variação entre as triplicatas das amostras e os valores do coeficiente de variação, utilizado para avaliar a reprodutibilidade do teste ELISA de modo geral são baixos. Por outro lado os três maiores valores de C.V. (34,77%, 27,67% e 24,87%) estão associados a amostras que apresentaram uma menor D.O.. Deste modo, erros, como pipetar volumes a mais de amostras, mesmo que pequenos, podem representar um impacto muito maior do que em outras amostras que naturalmente possuem uma D.O. maior.

As lacunas marcadas pelo símbolo “-” na tabela estão descrevendo eventos que impossibilitaram a coleta de dados da coorte naquele momento em específico e que por isso não houve como fazer a análise. Das 23 pessoas analisadas, 16 delas tiveram amostras coletadas em todas as semanas, enquanto apenas 7 apresentaram algum problema, variando entre si a quantidade de semanas faltantes, tendo amostras sem apenas uma coleta, como é o caso das amostras 8, 11 e 22 e casos onde várias amostras não foram coletadas, chegando ao

extremo da amostra 15, onde há apenas uma coleta, referente ao T<sub>5</sub>.

Ao analisar-se individualmente as amostras, pode-se inferir que ao realizar este imunoenensaio ELISA padronizado, utilizando os mesmos insumos e equipamentos, a replicação dos dados se mostra eficaz dando assim uma maior segurança ao resultado em si e também as interpretações que derivam dele, uma vez que estão baseados em dados que apresentam, de modo geral uma baixa variação.

Quadro 2: Apresentação dos dados obtidos a partir dos imunoenensaos realizados. O coeficiente de variação foi calculado levando em consideração os dados amostrais e não os populacionais. CV; coeficiente de variação. “-”: representação gráfica para a falta de dados em relação à amostra e tempo de coleta. A primeira coluna da esquerda apresenta o número que cada voluntário recebeu. A primeira linha apresenta os tempos de coleta e abaixo delas os valores das triplicatas. Elaborado pelo autor (2022)

Amostra	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
<b>1</b>	0,24	0,206	0,205	0,181	0,197	0,215	0,2	0,215	0,176
	0,17	0,189	0,174	0,172	0,186	0,198	0,173	0,195	0,193
	0,184	0,207	0,193	0,193	0,169	0,182	0,187	0,186	0,197
<b>C.V.</b>	<b>15,27%</b>	<b>4,12%</b>	<b>6,69%</b>	<b>4,73%</b>	<b>6,26%</b>	<b>6,79%</b>	<b>5,91%</b>	<b>6,10%</b>	<b>4,83%</b>
<b>2</b>	0,329	0,423	0,382	0,472	0,454	0,477	0,516	0,482	0,477
	0,278	0,289	0,403	0,368	0,513	0,45	0,456	0,481	0,429
	0,285	0,353	0,48	0,375	0,581	0,474	0,463	0,483	0,437
<b>C.V.</b>	<b>7,59%</b>	<b>15,42%</b>	<b>9,99%</b>	<b>11,72%</b>	<b>10,06%</b>	<b>2,59%</b>	<b>5,60%</b>	<b>0,17%</b>	<b>4,69%</b>
<b>3</b>	0,143	0,171	0,136	0,147	0,207	0,241	0,199	0,203	0,159
	0,129	0,127	0,126	0,129	0,159	0,248	0,19	0,234	0,16
	0,128	0,139	0,152	0,134	0,156	0,245	0,185	0,183	0,14
<b>C.V.</b>	<b>5,14%</b>	<b>12,75%</b>	<b>7,76%</b>	<b>5,55%</b>	<b>13,43%</b>	<b>1,17%</b>	<b>3,03%</b>	<b>10,15%</b>	<b>6,01%</b>
<b>4</b>	0,137	0,155	0,134	0,129	0,193	0,161	0,2	0,201	0,162
	0,13	0,146	0,134	0,145	0,161	0,16	0,158	0,18	0,172
	0,143	0,141	0,144	0,136	0,154	0,172	0,149	0,196	0,149
<b>C.V.</b>	<b>3,89%</b>	<b>3,93%</b>	<b>3,43%</b>	<b>4,79%</b>	<b>10,03%</b>	<b>3,31%</b>	<b>13,15%</b>	<b>4,66%</b>	<b>5,85%</b>
<b>5</b>	0,109	0,107	0,099	0,099	0,154	0,161	0,157	0,122	0,166
	0,102	0,103	0,101	0,104	0,151	0,169	0,154	0,141	0,166
	0,1	0,102	0,103	0,104	0,157	0,152	0,159	0,103	0,176
<b>C.V.</b>	<b>3,72%</b>	<b>2,08%</b>	<b>1,62%</b>	<b>2,30%</b>	<b>1,59%</b>	<b>4,32%</b>	<b>1,31%</b>	<b>12,72%</b>	<b>2,78%</b>
<b>6</b>	0,137	0,134	0,134	0,129	0,158	0,211	0,159	0,208	0,161
	0,136	0,134	0,14	0,133	0,157	0,163	0,129	0,176	0,157
	0,131	0,122	0,115	0,145	0,159	0,155	0,144	0,185	0,161
<b>C.V.</b>	<b>1,95%</b>	<b>4,35%</b>	<b>8,22%</b>	<b>5,01%</b>	<b>0,52%</b>	<b>14,02%</b>	<b>8,51%</b>	<b>7,10%</b>	<b>1,18%</b>
<b>7</b>	0,097	0,106	0,154	0,182	0,139	0,187	0,127	0,117	0,088
	0,082	0,11	0,143	0,125	0,108	0,137	0,112	0,089	0,081
	0,079	0,098	0,159	0,132	0,135	0,127	0,127	0,084	0,047
<b>C.V.</b>	<b>9,16%</b>	<b>4,77%</b>	<b>4,40%</b>	<b>17,35%</b>	<b>10,81%</b>	<b>17,46%</b>	<b>5,80%</b>	<b>15,02%</b>	<b>24,87%</b>

<b>8</b>	-	0,117	0,13	0,148	0,223	0,285	0,151	0,144	0,152
	-	0,105	0,144	0,143	0,258	0,311	0,151	0,138	0,165
	-	0,116	0,109	0,148	0,233	0,198	0,147	0,139	0,163
<b>C.V.</b>	-	<b>4,83%</b>	<b>11,27%</b>	<b>1,61%</b>	<b>6,18%</b>	<b>18,26%</b>	<b>1,26%</b>	<b>1,87%</b>	<b>3,57%</b>
<b>9</b>	0,098	0,12	0,186	0,153	0,27	0,141	-	-	0,148
	0,106	0,146	0,168	0,138	0,136	0,103	-	-	0,095
	0,102	0,152	0,156	0,13	0,137	0,124	-	-	0,125
<b>C.V.</b>	<b>3,20%</b>	<b>9,97%</b>	<b>7,25%</b>	<b>6,79%</b>	<b>34,77%</b>	<b>12,67%</b>	-	-	<b>17,69%</b>
<b>10</b>	0,124	0,131	0,137	0,134	0,122	0,162	0,151	0,124	0,128
	0,124	0,12	0,115	0,124	0,127	0,133	0,136	0,145	0,141
	0,127	0,122	0,117	0,123	0,123	0,141	0,125	0,143	0,142
<b>C.V.</b>	<b>1,13%</b>	<b>3,85%</b>	<b>8,08%</b>	<b>3,91%</b>	<b>1,74%</b>	<b>8,41%</b>	<b>7,76%</b>	<b>6,89%</b>	<b>4,65%</b>
<b>11</b>	-	0,088	0,084	0,077	0,09	0,085	0,091	0,053	0,093
	-	0,08	0,082	0,078	0,086	0,081	0,101	0,1	0,073
	-	0,078	0,077	0,087	0,082	0,081	0,094	0,107	0,083
<b>C.V.</b>	-	<b>5,27%</b>	<b>3,63%</b>	<b>5,57%</b>	<b>3,80%</b>	<b>2,29%</b>	<b>4,40%</b>	<b>27,67%</b>	<b>9,84%</b>
<b>12</b>	0,095	0,101	0,098	0,1	0,172	0,169	0,189	0,186	0,134
	0,087	0,101	0,098	0,092	0,152	0,137	0,144	0,131	0,114
	0,092	0,094	0,102	0,09	0,159	0,144	0,143	0,132	0,105
<b>C.V.</b>	<b>3,61%</b>	<b>3,34%</b>	<b>1,90%</b>	<b>4,60%</b>	<b>5,15%</b>	<b>9,16%</b>	<b>13,52%</b>	<b>17,17%</b>	<b>10,30%</b>
<b>13</b>	-	-	-	0,196	-	0,169	0,155	0,159	0,157
	-	-	-	0,148	-	0,169	0,165	0,15	0,143
	-	-	-	0,168	-	0,21	0,179	0,203	0,178
<b>C.V.</b>	-	-	-	<b>11,54%</b>	-	<b>10,58%</b>	<b>5,92%</b>	<b>13,57%</b>	<b>9,03%</b>
<b>14</b>	0,121	0,128	0,13	0,131	0,128	0,152	0,155	0,168	0,142
	0,13	0,127	0,143	0,119	0,131	0,168	0,155	0,155	0,155
	0,137	0,137	0,149	0,139	0,145	0,161	0,163	0,172	0,151
<b>C.V.</b>	<b>5,06%</b>	<b>3,44%</b>	<b>5,64%</b>	<b>6,34%</b>	<b>5,50%</b>	<b>4,08%</b>	<b>2,39%</b>	<b>4,40%</b>	<b>3,64%</b>
<b>15</b>	-	-	-	-	-	0,256	-	-	-
	-	-	-	-	-	0,274	-	-	-
	-	-	-	-	-	0,236	-	-	-
<b>C.V.</b>	-	-	-	-	-	<b>6,08%</b>	-	-	-
<b>16</b>	0,304	0,24	0,263	0,267	0,345	0,461	0,439	0,479	0,512
	0,314	0,298	0,27	0,275	0,368	0,453	0,444	0,506	0,529
	0,323	0,282	0,278	0,263	0,312	0,424	0,429	0,502	0,482
<b>C.V.</b>	<b>2,47%</b>	<b>8,95%</b>	<b>2,27%</b>	<b>1,86%</b>	<b>6,73%</b>	<b>3,56%</b>	<b>1,43%</b>	<b>2,40%</b>	<b>3,83%</b>
<b>17</b>	0,367	0,461	0,413	0,426	0,492	0,587	0,51	0,464	0,333
	0,374	0,411	0,434	0,399	0,477	0,51	0,511	0,442	0,44

	0,339	0,375	0,43	0,412	0,523	0,557	0,48	0,442	0,41
<b>C.V.</b>	<b>4,20%</b>	<b>8,48%</b>	<b>2,14%</b>	<b>2,67%</b>	<b>3,85%</b>	<b>5,75%</b>	<b>2,87%</b>	<b>2,31%</b>	<b>11,43%</b>
<b>18</b>	0,115	0,135	0,152	0,121	0,159	0,193	0,139	0,169	0,281
	0,134	0,134	0,128	0,13	0,153	0,157	0,145	0,16	0,206
	0,129	0,144	0,152	0,137	0,151	0,151	0,139	0,185	0,212
<b>C.V.</b>	<b>6,38%</b>	<b>3,27%</b>	<b>7,86%</b>	<b>5,06%</b>	<b>2,20%</b>	<b>11,11%</b>	<b>2,01%</b>	<b>6,03%</b>	<b>14,60%</b>
<b>19</b>	0,094	0,101	0,096	0,109	0,109	0,289	0,261	0,232	0,147
	0,089	0,099	0,1	0,11	0,098	0,342	0,288	0,227	0,202
	0,102	0,101	0,09	0,101	0,109	0,314	0,314	0,23	0,155
<b>C.V.</b>	<b>5,64%</b>	<b>0,94%</b>	<b>4,31%</b>	<b>3,78%</b>	<b>4,92%</b>	<b>6,87%</b>	<b>7,52%</b>	<b>0,89%</b>	<b>14,44%</b>
<b>20</b>	0,225	0,236	0,284	0,341	0,248	0,332	0,55	0,472	0,301
	0,235	0,265	0,277	0,281	0,263	0,323	0,456	0,448	0,242
	0,236	0,251	0,255	0,319	0,298	0,248	0,42	0,458	0,261
<b>C.V.</b>	<b>2,14%</b>	<b>4,72%</b>	<b>4,54%</b>	<b>7,90%</b>	<b>7,77%</b>	<b>12,51%</b>	<b>11,53%</b>	<b>2,14%</b>	<b>9,18%</b>
<b>21</b>	0,126	0,136	0,145	0,145	0,162	0,208	0,152	0,19	0,14
	0,144	0,14	0,139	0,137	0,145	0,182	0,17	0,171	0,157
	0,147	0,151	0,137	0,136	0,151	0,237	0,164	0,162	0,167
<b>C.V.</b>	<b>6,67%</b>	<b>4,46%</b>	<b>2,42%</b>	<b>2,89%</b>	<b>4,61%</b>	<b>10,75%</b>	<b>4,62%</b>	<b>6,69%</b>	<b>7,21%</b>
<b>22</b>	0,094	0,104	0,091	0,098	0,121	0,14	0,109	0,138	-
	0,1	0,101	0,1	0,102	0,107	0,136	0,121	0,111	-
	0,099	0,096	0,094	0,1	0,117	0,121	0,115	0,141	-
<b>C.V.</b>	<b>2,69%</b>	<b>3,29%</b>	<b>3,94%</b>	<b>1,63%</b>	<b>5,12%</b>	<b>6,18%</b>	<b>4,26%</b>	<b>10,38%</b>	<b>-</b>
<b>31</b>	-	-	-	-	-	0,09	0,089	0,097	0,083
	-	-	-	-	-	0,084	0,086	0,095	0,088
	-	-	-	-	-	0,077	0,084	0,092	0,085
<b>C.V.</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>6,35%</b>	<b>2,38%</b>	<b>2,17%</b>	<b>2,41%</b>

Outro dado interessante é que das 23 amostras estudadas, 5 delas (amostras 2, 9, 16, 17 e 20) apresentaram antes do estudo, soroneutralização ou teste PCR positivo, enquanto as outras 18 não, fazendo assim com que com que imagina-se que a após a aplicação da vacina a resposta imunológica seria diferente. Ao analisarmos os dados separando esses dois grupos percebe-se que em apenas das amostras ocorreu divergência dos valores da D.O. em relação com o que era esperado levando em consideração a separação entre os grupos previamente, onde uma amostra com soroneutralização apresentou uma resposta imune humoral equivalente às pessoas que não haviam sido contaminadas previamente. Em termos absolutos, pode-se inferir então que 22 de 23 amostras (95%) analisadas pelo ELISA padronizado corresponderam ao que era esperado, estando de acordo com o que foi demonstrado por Vieira

(2022) durante a padronização do teste em relação a sua sensibilidade e especificidade.

Os gráficos foram obtidos utilizando a média aritmética das triplicatas de cada ponto de coleta de soro das 23 pessoas da coorte. Para a análise desses gráficos, optou-se por dividi-los em dois grupos, sendo que o primeiro deles corresponde às pessoas que não tiveram PCR positivo antes do início do estudo ou que não apresentaram soroneutralização e o segundo grupo como sendo as pessoas que tiveram contato com o vírus, comprovado a partir de testes de PCR ou soroneutralização.

Como controle negativo, utilizou-se amostras de soro de projetos do Laboratório de Imunobiologia (LIM) da UFSC que eram anteriores à pandemia, sendo que essas amostras estão apontadas no gráfico como “pré-pandêmicas”, ilustradas através de círculos vermelhos. Já o “Branco” se refere aos poços de controle do teste que passaram por todas as etapas, com exceção da adição do soro primário, sendo ilustrados no gráfico pela linha tracejada que representa a média dos valores.

Levando em consideração o momento das aplicações das duas doses da vacina (primeira dose em T0 e a segunda dose em T3) percebe-se de modo geral um leve aumento da D.O. entre a primeira e a segunda semana pós primeira dose, seguidos de um declínio da resposta entre a segunda e a terceira semana, sendo essas variações mais perceptíveis nos gráficos que apresentam as amostras 3, 4 e 7 e menos perceptíveis nos gráficos que demonstram a resposta das amostras 5, 10 e 19, por exemplo.

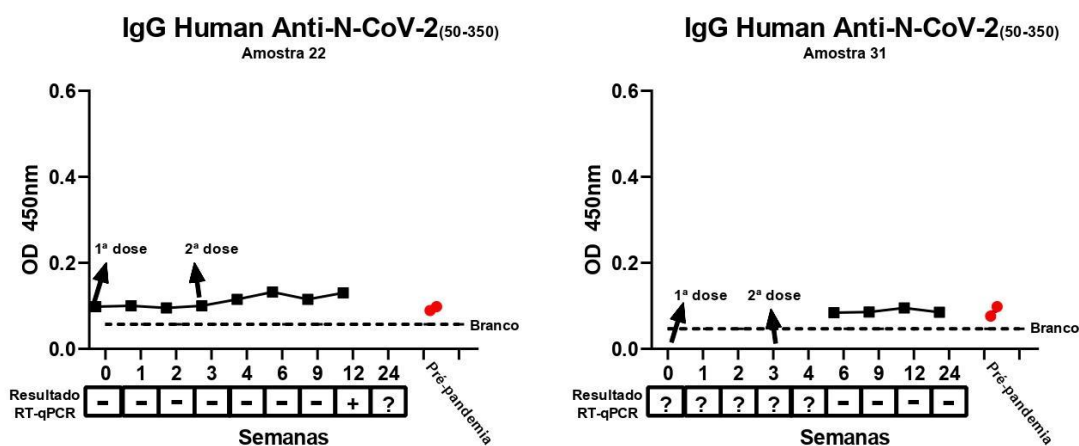
Nesta mesma linha, a partir da administração da segunda dose, percebe-se novamente um aumento da D.O. observada, entretanto aqui fica mais evidente o evento do aumento da resposta imune, ocorrendo novamente no mesmo período de uma a duas semanas após a aplicação da vacina. Uma tendência observada é que as pessoas tiveram um aumento da D.O. com a aplicação da segunda dose, que não foi observado após a aplicação da primeira, como pode-se perceber ao analisar-se os gráficos das amostras 3, 4, 5, 8, 12, 19, 21 e 22. Por outro lado, algumas pessoas apresentaram um pequeno aumento aparente após a aplicação da segunda dose, como é o caso das amostras 1, 10 e 12.

Além disso, aumentos da D.O observados em tempos de coleta onde teoricamente não deveriam existir, podem representar um contato com o vírus, como pode ser observado no gráfico da amostra 22, onde entre a nona e a décima segunda semana após a administração da primeira dose há um aumento repentino da resposta, neste caso a pessoa em questão testou positivo pelo método RT-qPCR entre as duas coletas. Por outro lado, a amostra 18 também





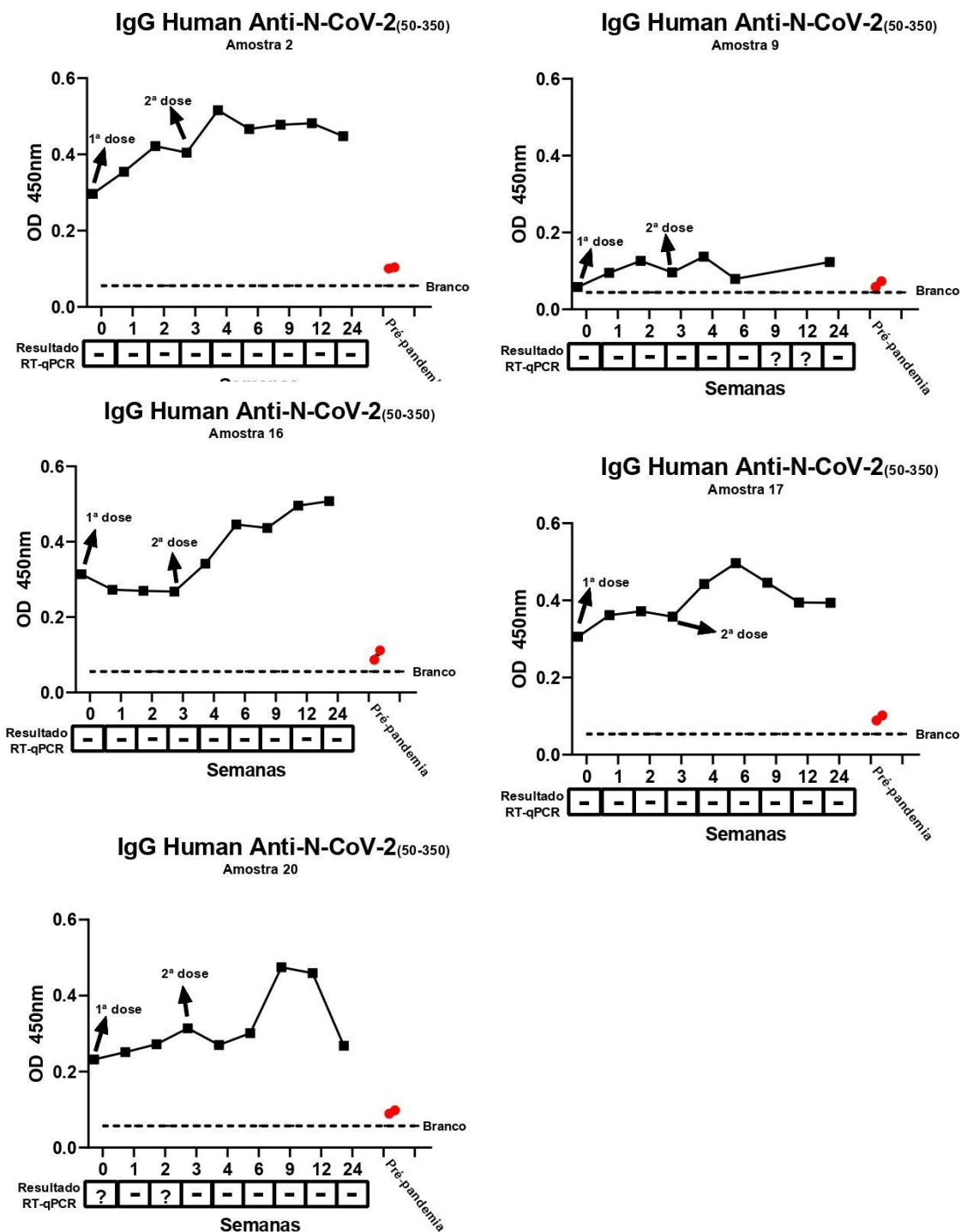




O perfil da resposta imune humoral apresentado aqui está de acordo com o que já foi relatado na literatura (BUENO et al, 2021), onde a resposta imune humoral após a vacinação com vírus inativado apresenta uma resposta moderada. Esse perfil não é relatado apenas para SARS-CoV-2, tendo em vista que em estudos envolvendo o vírus Influenza, vacinas que utilizam a tecnologia baseada em vírus inativados também apresentam uma resposta com menor eficácia (GRESSET-BOURGEOIS et al, 2017).

Por outro lado, ao analisar-se os gráficos das pessoas que tiveram um contato prévio com vírus confirmado por testes, fica claro uma resposta logo nas primeiras duas semanas após a primeira dose com uma alta D.O, onde em quase todas as amostras há valores acima de 0,2. Após a aplicação da segunda dose, ocorre um aumento ainda maior em relação às pessoas que não tiveram o contato prévio com o vírus, havendo a presença de D.O. acima de 0,5. Percebe-se também que a amostra 9 apresentou um perfil de resposta olhando apenas para os valores das D.O. muito mais condizente com as outras pessoas que não tiveram contato prévio com o vírus, onde o aumento da resposta, tanto após a primeira, como a segunda dose, não são percebidos de modo tão intenso como as pessoas que tiveram contato prévio com o vírus.

Figura 12: Análise dos dados das amostras da coorte de vacinados com CoronaVac com contato prévio com o vírus. Amostras apresentaram teste PCR positivo ou soroneutralização antes da vacinação e das coletas. “?”: simbologia utilizada para demonstrar que não houve coleta de Swab nasal, sendo assim não há dados para o determinado momento. Elaborado pelo autor (2022).

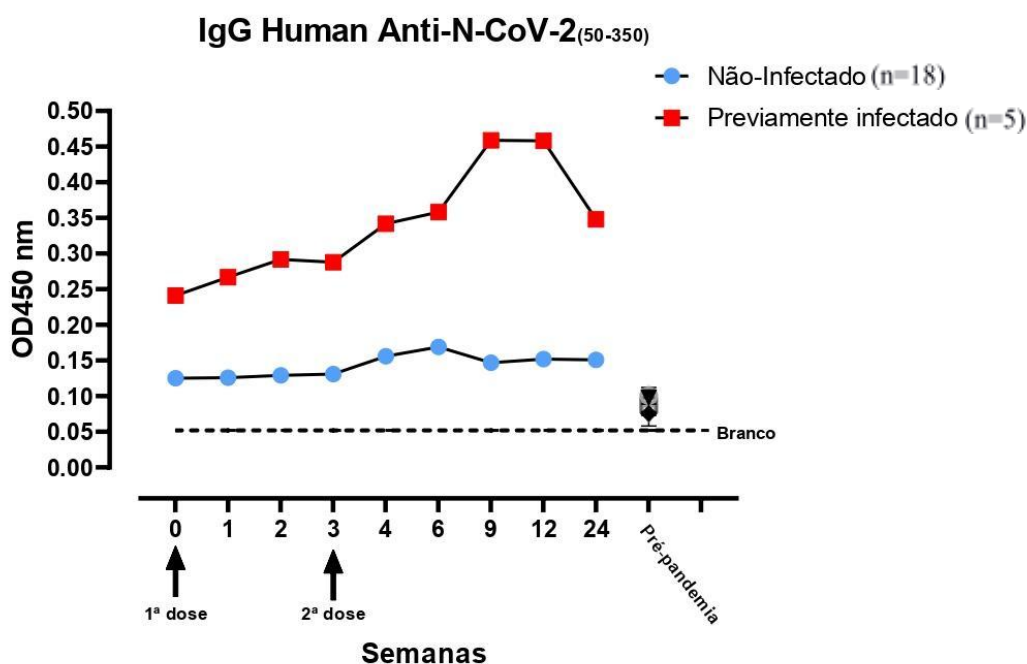


Novamente os dados apresentados aqui estão de acordo com o que já está publicado na literatura por BUENO et al (2021), onde o grupo que teve o contato prévio com o vírus

apresentou uma resposta imune humoral mais acentuada quando comparado com o grupo da coorte que não teve este contato, sendo esses grupos analisados sob a mesma ótica.

Por fim, ao analisar-se em um único gráfico todas as amostras, dividindo nos dois grupos (previamente infectados e sem contato prévio com vírus) pode-se perceber de maneira mais clara a diferença da resposta imune humoral entre os dois grupos, ficando evidente a interferência positiva nessa resposta com a aplicação da vacina utilizando vírus inativado, principalmente com a aplicação da segunda dose. Esses dados estão de acordo com o que também foi identificado por Heck (2022), com a mesma coorte, entretanto analisando os dados para IgG anti-spike.

Figura 13: Comparativo entre as médias dos timepoints de coletas. Comparação entre os dois grupos da coorte (não infectados e previamente infectados). “n”: número de pessoas. Teste t student não pareado.  $p < 0.0001$ .



A partir de análise estatística, utilizando o teste *T student*, não pareado com o valor de  $p < 0,0001$ , tem-se que os dois grupos são diferentes entre si, e que o grupo “não-infectado” também apresenta diferença significativa em relação às amostras pré-pandêmicas. Desta forma, o teste ELISA utilizando a proteína recombinante  $N_{(50-350)}$  é sensível de modo que

percebe uma diferença entre vacinados não infectados e vacinados previamente infectados, e também em relação à amostras que nunca tiveram contato com o SARS-CoV-2, indo ao encontro do que foi estruturado pelo estudo de Vieira (2022).

De acordo com Bueno et al (2021), ainda se espera que a qualidade da resposta imune humoral para a proteína de nucleocapsídeo possa ser diretamente relacionada com a resposta anti-spike, ou seja, quanto maior a resposta de uma, também será assim para a outra.

## 5. CONCLUSÃO

A vacina CoronaVac ao ser aplicada em seres humanos gera uma resposta imune humoral anti proteína N do SARS-CoV-2 moderada. Como ferramenta de detecção, o ELISA indireto anti N<sub>(50-350)</sub> mostrou ser capaz de diferenciar pessoas vacinadas de não vacinas ou sem contato anterior com o vírus, além disso também conseguiu diferenciar vacinados previamente infectados de vacinados que não tiveram contato anterior com o SARS-CoV-2.

## 6. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Ao pensar-se que a maioria das vacinas disponíveis no mercado possuem como alvo a proteína Spike e que a resposta para a proteína de nucleocapsídeo é moderada para pessoas que apenas tomaram a CoronaVac, presume-se que mediante a realização de outras pesquisas seja possível utilizar este imunoenensaio como uma forma de estipular a quantidade de pessoas que foram de fato contaminadas no nosso país, uma vez que como demonstrado aqui, essas pessoas apresentaram uma resposta imune humoral mais intensa referente a proteína N ao serem infectadas pelo vírus.

## 7. REFERÊNCIAS

AHLÉN, Gustaf et al. The SARS-CoV-2 N protein is a good component in a vaccine. **Journal of Virology**, v. 94, n. 18, p. e01279-20, 2020.

BRASIL. Organização Mundial de Saúde declara pandemia do novo Coronavírus. **UNA-SUS**. 11 de março de 2020. Disponível em:

<<https://www.unasus.gov.br/noticia/organizacao-mundial-de-saude-declara-pandemia-de-coronavirus>>. Acesso em: 05 de junho de 2022.

BOCHNIA-BUENO, Lucas et al. Dynamic of humoral response to SARS-CoV-2 anti-Nucleocapsid and Spike proteins after CoronaVac vaccination. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 102, n. 3, p. 115597, 2022.

CARRIÓ, M. Mar; VILLAVARDE, Antonio. Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 10, p. 3599-3601, 2005.

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

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

DA PAZ SILVA FILHO, Paulo Sérgio et al. Vacinas contra Coronavírus (COVID-19; SARS-COV-2) no Brasil: um panorama geral. **Research, society and development**, v. 10, n. 8, p. e26310817189-e26310817189, 2021.

DJUKIC, Teodora et al. Expression, purification and immunological characterization of recombinant nucleocapsid protein fragment from SARS-CoV-2. **Virology**, v. 557, p. 15-22, 2021.

FEHR, Anthony R.; PERLMAN, Stanley. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. **Coronaviruses**, p. 1-23, 2015.

FLORINDO, Helena F. et al. Immune-mediated approaches against COVID-19. **Nature nanotechnology**, v. 15, n. 8, p. 630-645, 2020.

FRANCA, L.V. **Produção biotecnológica de proteínas: um guia prático para iniciantes**. Blog do Profissão Biotec, v.9, mar. 2021.

GRESSET-BOURGEOIS, Viviane et al. Quadrivalent inactivated influenza vaccine (VaxigripTetra™). **Expert Review of Vaccines**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2018.

HECK, Nicoli De Bona. **Desenvolvimento de um método imunoenzimático para detecção de IgG anti-RBD de SARS-CoV-2**. Dissertação (Mestrado) 2022. 55 p. Mestrado profissional em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/234676>>. Acesso em: jun. 2022.

KIRYANOV, Sergei A. et al. Identification of Hotspot Mutations in the N Gene of SARS-CoV-2 in Russian Clinical Samples That May Affect the Detection by Reverse Transcription-PCR. **Diagnostics**, v. 12, n. 1, p. 147, 2022.

LEICO Technologies, Inc. **Indirect ELISA Protocol**. Disponível em: <<https://www.leinco.com/indirect-elisa-protocol/>>. Acesso em: 12 abr, 2022.

LI, Geng et al. Coronavirus infections and immune responses. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 4, p. 424-432, 2020.

LI, Guang et al. Expression and purification of recombinant SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in inclusion bodies and its application in serological detection. **Protein expression and purification**, v. 186, p. 105908, 2021.

DE LIMA, Jackellyne Fernandes; DE MORAIS, Sandra Ribeiro; OLIVEIRA, Thiago Levi Silva. TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE VACINAS: UMA REVISÃO. **RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar-ISSN 2675-6218**, v. 3, n. 1, p. e311097-e311097, 2022

LIU, Pan-pan et al. Development of a nucleocapsid protein-based ELISA for detection of human IgM and IgG antibodies to SARS-CoV-2. **ACS omega**, v. 6, n. 14, p. 9667-9671, 2021.

MARTINS, Carla Braga et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Rhodococcus equi* in foals. **Ciência Rural**, v. 35, p. 618-624, 2005.

MICROBENotes. **Western Blot- Definition, Principle, Steps, Results, Applications**. Disponível em <<https://microbenotes.com/western-blot/>> Acesso em: 14 abr, 2022.

MINEO, José Roberto. Manual ilustrado de práticas laboratoriais em imunologia. 2016. EDUFU, Uberlândia. p. 89-94.

MINIC, Rajna; ZIVKOVIC, Irena. Optimization, validation and standardization of ELISA. **Norovirus**, p. 9-28, 2020.

NETO, Benício Barros; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Como Fazer Experimentos-: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Bookman Editora - São Paulo. p. 10-24. 2010.

OLIVEIRA, Sergio C.; DE MAGALHAES, Mariana TQ; HOMAN, E. Jane. Immunoinformatic analysis of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and identification of COVID-19 vaccine targets. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 587615, 2020.

PEREIRA, Larissa Miranda. **Clonagem, expressão, purificação e caracterização estrutural da proteína ribossomal L10 humana recombinante**. 2009. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo. São Paulo. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-22092011-101810/en.php>> . Acesso em: jun. 2022.



PENG, Ya et al. Structures of the SARS-CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design. **The EMBO journal**, v. 39, n. 20, p. e105938, 2020.

PERLMAN, Stanley; NETLAND, Jason. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. **Nature reviews microbiology**, v. 7, n. 6, p. 439-450, 2009.

SOUSA, Ricardo Augusto Leoni de. **Manual técnico e de operação do Western Blot**. Diamantina: UFVJM, 2021. 43 p. Disponível em: <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/2597>. Acesso em: 12 abr 2022.

VAZ, Adelaide J.; et al. **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2 ed. p. 104-123. 2018.

VIEIRA, Juliano Custódio Júnior. **Desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos IgG anti-proteína de nucleocapsídeo do vírus SARS-CoV-2**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Farmacologia. UFSC, Florianópolis, 2022.

WU, Fan et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265-269, 2020.

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

ZHANG, Pingping et al. Evaluation of recombinant nucleocapsid and spike proteins for serological diagnosis of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19). **MedRxiv**, 2020.

ZHU, Ying et al. 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**, v. 30, n. 1, p. 93-102, 2005.

ZUÑIGA, ABRAHAM DAMIAN GIRALDO et al. Revisão: Técnicas usadas no processo de purificação de Biomoléculas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 61-82, 2003.

## ANEXO A - TCLE



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia  
Centro de Ciências Biológicas - Divisão de Imunologia  
88049-900, Campus Universitário, Florianópolis, SC, Brasil

### AVALIAÇÃO DO IMPACTO NO APARELHO RESPIRATÓRIO A LONGO PRAZO NO ÂMBITO DA COVID-19: UM ESTUDO DE COORTE

A Universidade Federal de Santa Catarina está empenhada em investigar as repercussões da COVID19 no organismo a curto e longo prazo, envolvendo as questões inflamatórias e para tanto necessitamos de voluntários saudáveis para obter amostras de sangue para comparação.

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a) saudável, em uma pesquisa que tem como objetivo avaliar o estado de saúde de pessoas após a COVID-19 e as possíveis consequências respiratórias decorrentes desta infecção que podem ser hiper-reatividade brônquica, bronquiolite e fibrose pulmonar. No período de dois anos, pacientes com COVID-19 serão recrutados no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC) e acompanhados através de exames incluindo de sangue para avaliação da presença de inflamação. Paralelamente, voluntários saudáveis serão recrutados no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP/UFSC) para coleta de sangue, apenas.

Ao ingressar no estudo, o(a) senhor(a) doará sangue para exames de inflamação nas células e plasma. Os benefícios e as vantagens em participar dessa pesquisa serão que, com os dados coletados por meio das avaliações do estudo, os profissionais da saúde poderão analisar os marcadores inflamatórios presentes nas células e plasma. Se desejar, o(a) senhor(a) terá acesso a resultados das avaliações. A coleta de sangue poderá causar algum desconforto ou dor no local de introdução da agulha, porém de caráter transitório, e será realizada por profissional habilitado para tal. O(a) senhor(a) poderá recusar a coleta de sangue ou retirar-se do estudo a qualquer momento.

Esta pesquisa está pautada na resolução 466/12, de acordo com o Conselho Nacional de Saúde (CNS). Durante todo o período da pesquisa, os participantes terão direito a esclarecimento de dúvidas, bastando para isso entrar em contato com os pesquisadores ou com o Conselho de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH). Os convidados terão garantido seu direito de não aceitar participar ou de retirar sua permissão a qualquer momento, sem nenhum tipo de penalização por sua decisão. Além disso, participantes e acompanhantes estarão isentos de despesas decorrentes da participação na pesquisa. Eventuais despesas decorrentes exclusivamente da participação no projeto de pesquisa serão ressarcidas mediante comprovação. Participantes que sofrerem danos decorrentes das avaliações do estudo terão direito a assistência integral que será prestada pelo Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas e pelo HU/UFSC. Ao assinar este termos, o Sr.(a) não estnao renunciando ao direito de indenização adquirido por vias legais. As informações desta pesquisa são confidenciais, sendo divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos participantes (a não ser entre os pesquisadores) e sendo assegurado o sigilo sobre sua participação.

#### População de estudo

Nós recrutaremos 30 indivíduos adultos saudáveis entre 18 e 50 anos. Se você concordar em participar no estudo, nós utilizaremos os glóbulos brancos que serão separados do sangue doado.

O sangue que você está doando servirá para a obtenção de leucócitos e plasma. Se você for elegível, coletaremos **10mL de sangue venoso** e seus os glóbulos brancos serão utilizados para experimentos no laboratório. As células serão colocadas no tubo de ensaio e serão expostas a vírus e bactérias ou produtos patogênicos. Assim, podemos estudar os aspectos relacionados a defesa contra o coronavírus. Nós pedimos também sua permissão para mantermos suas células e plasma em condições apropriadas para uso no futuro.

Essas amostras serão armazenadas por 10 anos.

\_\_\_ SIM, você pode armazenar minhas amostras para a pesquisa futura.

\_\_\_ NÃO, você não pode armazenar minhas amostras para a pesquisa futura.

As amostras biológicas (soro, células e sobrenadantes de células) serão estocadas num freezer -80°C localizado no laboratório do Coordenador do projeto por 10 anos. Apenas o coordenador terá acesso a estas amostras. Nós mediremos os mediadores inflamatórios nestas amostras para estudar a resposta imune humana durante a COVID19. Entretanto, nenhuma pesquisa com as amostras estocadas será realizada sem antes ter a aprovação pelo comitê de ética em pesquisas com seres humanos da UFSC.

#### Riscos/Desconfortos:

A retirada de sangue é um procedimento padrão rotineiro com riscos mínimos envolvidos. Você pode experimentar algum desconforto ligeiro no local da entrada da agulha e pode haver alguma lesão. Além disso, há um risco muito pequeno de você desmaiar ou ter infecção no local da entrada da agulha. Você tem a garantia de plena liberdade de recusar-se a participar, ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma. **A participação no estudo não é obrigatória e caso não deseje participar ou se quiser abandonar o estudo, receberá a mesma atenção da nossa equipe.** Sempre existe a possibilidade remota da quebra de sigilo, mesmo que involuntário e não intencional, cujas consequências serão tratadas nos termos da lei.

#### Garantia de sigilo e confidencialidade:

Seus registros médicos na UFSC são confidenciais. O sigilo e a privacidade dos participantes da pesquisa estão garantidos durante todas as fases desta pesquisa. Quando os resultados de um estudo da UFSC são relatados em jornais médicos ou em reuniões científicas, as pessoas que fazem parte do exame não são identificadas. Na maioria dos casos a UFSC não liberará nenhuma informação sobre sua participação na pesquisa sem sua permissão escrita. Entretanto, você deve saber que nós podemos liberar alguma informação de seu registro médico sem sua permissão, por exemplo, se for requerido por oficiais da lei ou outras pessoas autorizadas.

Agradecemos a sua participação e colaboração,

#### **Profa. Dra. Rosemeri Maurici**

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), HU/UFSC, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina (SC) – CEP 88040-970.

Telefones: +55 (48) 3721-9014; +55 (48) 98805-4510.

#### **Prof. Dr. André Báfica,**

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), MIP/UFSC, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina (SC) – CEP 88040-970.

Telefones: +55 (48) 3721-2950; +55 (48) 99696-0079.

Se o(a) senhor(a) tiver alguma dúvida ou consideração sobre a ética desta pesquisa, entre em contato com o CEPESH da UFSC.

Endereço: Rua Desembargador Vítor Lima, nº 222, Prédio da Reitoria II, 4º andar, sala 401, Trindade, Florianópolis, SC. Telefone: +55 (48) 3721-6094.

### CONSENTIMENTO EM PARTICIPAR

Declaro que fui informado(a) sobre todos os procedimentos da pesquisa, que recebi de forma clara e objetiva todas as explicações pertinentes ao estudo e que todos os meus dados coletados serão sigilosos. Tive tempo para tomar a decisão, bem como chance de fazer questionamentos sobre o estudo. Minhas dúvidas foram esclarecidas. Estou ciente de que posso interromper a participação no estudo em qualquer momento.

Nome do(a) Participante por Extenso	
Assinatura do(a) Participante	Data
Assinatura do(a) Pesquisador(a)	Data

Nota: O presente Termo terá duas vias, uma ficará à guarda dos pesquisadores e a outra via será de posse do(a) próprio(a) participante da pesquisa.