

PRODUÇÃO DE VARIANTES DA PROTEÍNA SPIKE DO SARS-COV-2 E VALIDAÇÃO POR ELISA

Mariana Evangelista Bandeira¹; Bruna Aparecida Souza Machado²; Vinicius Pinto Costa Rocha³

¹Graduanda em Farmácia na Universidade Federal da Bahia; Bolsista de Iniciação Tecnológica no SENAI CIMATEC - CNPQ; mariana.bandeira@fbter.org.br

²Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; brunam@fieb.org.br

³Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; vinicius.rocha@fieb.org.br

RESUMO

A pandemia da COVID-19 levou a sistemas de saúde bem estruturados ao colapso devido ao aumento exponencial das hospitalizações, em decorrência do alto potencial de transmissibilidade do vírus. Devido a inespecificidade de sintomas de muitos pacientes com COVID-19, o desenvolvimento de diagnósticos, e sua aplicação em larga escala é uma ferramenta essencial na contenção da pandemia e de surtos como a COVID-19. Recentemente, foi padronizado no laboratório de saúde do SENAI CIMATEC, a expressão da proteína Spike e suas variantes e a sua purificação por afinidade. Essa proteína serviu de base para a padronização e a validação de um teste de ELISA, e para constituir colaborações com outros laboratórios, contribuindo para o desenvolvimento de outros testes sorológicos.

PALAVRAS-CHAVE: Proteína Spike; COVID-19; Proteína recombinante; Imunodiagnóstico.

1. INTRODUÇÃO

Devido a inespecificidade de sintomas de muitos pacientes com COVID-19, o desenvolvimento de diagnósticos, e sua aplicação em larga escala é uma ferramenta essencial na contenção da pandemia e de surtos como a COVID-19.^{1, 2, 3} Os diagnósticos podem ser divididos em dois grandes grupos: o diagnóstico direto do vírus a através da detecção do ácido nucleico (RNA) ou de uma proteína (antígeno) viral; e o indireto que consiste na detecção de anticorpos.

O principal componente de um kit de teste sorológico é o alvo para reconhecimento de anticorpos durante o ensaio, geralmente sendo uma proteína recombinante ou fragmentos do polipeptídeo completo. A proteína Spike ou proteína S é uma proteína estrutural do coronavírus e possui funções essenciais na infecção viral e na patogênese, uma vez que reconhece e se liga aos receptores do hospedeiro, permitindo que a membrana viral se funda com a membrana da célula hospedeira.⁴ Diante do surgimento de novas variantes do vírus, diretamente ligados à proteína spike, são necessários estudos para avaliação da continuidade da resposta imunológica frente a essas mutações, ocasionadas por infecção natural ou vacinação e a pesquisa de anticorpos para essas alterações.⁵ Para isso, a expressão recombinante de proteínas é uma técnica amplamente difundida em laboratórios de pesquisa, e para a produção da proteína spike, linhagens de células eucarióticas, como a HEK293F tem se mostrado eficientes.

Dessa forma, ela é amplamente utilizada em testes imunológicos, como ELISA e fluxo lateral, para a determinação dos níveis de imunoglobulinas, como IgM, IgG e IgA. Portanto, a expressão recombinante da proteína Spike é útil para o desenvolvimento de tais testes no laboratório.

Recentemente, protocolos têm sido padronizados para a expressão recombinante da proteína S e a sua purificação por afinidade, no laboratório do Instituto de Tecnologia de Saúde do SENAI CIMATEC. Essa proteína servirá de base para a padronização e a validação de um teste de ELISA, assim como para constituir colaborações com outros laboratórios, contribuindo para o desenvolvimento de outros testes sorológicos. Com isso, o objetivo desse projeto de pesquisa é expressar a proteína S recombinante de diferentes variantes do SARS-CoV-2, com importância clínico-epidemiológica e padronizar testes de ELISA usando essas proteínas, para o diagnóstico da COVID-19.

2. METODOLOGIA

O estudo experimental foi desenvolvido no Laboratório de Saúde do SENAI CIMATEC no período de janeiro de 2022 a dezembro de 2022. Bactérias *Escherichia coli* (DE3)pRARE2 foram transformadas por choque térmico com os plasmídeos recombinante contendo o gene otimizado da proteína Spike de SARS-Cov-2 (a proteína recombinante foi produzida ligada a uma cauda de histidina C-terminal (6-his)).

Transformantes selecionados foram induzidos ao crescimento e seu DNA foi extraído e purificado e posteriormente transfectado em células HEK293F. A expressão da proteína foi induzida com a adição de lipofectamina. As variantes da Spike de SARS-CoV-2 foram purificadas por cromatografia líquida por afinidade, utilizando microesferas de agarose contendo níquel e eluição com imidazol. As amostras coletadas na purificação foram analisadas por SDS-PAGE e por *Western Blot* utilizando anticorpos monoclonais anti-6-his que detectaram a presença da proteína e a cauda de histidina. Para validar a proteína purificada, ensaios de ELISA foram padronizados usando a proteína Spike D614G recombinante e solúvel (0,1ug por poço) com base na necessidade de desenvolver um ensaio imunológico altamente específico e sensível para detectar anticorpos o mais cedo possível no soro do paciente. Um limite rigoroso foi derivado da média mais três desvios padrão dos valores de densidade óptica (DO) detectada nas amostras de soro provenientes de indivíduos RT-qPCR negativo para o SARS-CoV-2.

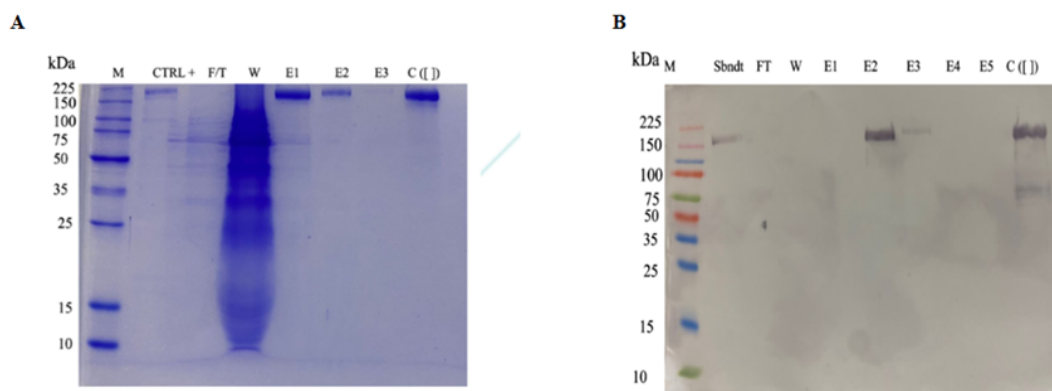
O estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes da Declaração de Helsinque e aprovado pelo Comitê de Ética do campus integrado de fabricação e tecnologia (CIMATEC – Salvador, BA, Brasil) (número de aprovação 4.334.505). Esta pesquisa recebeu financiamento do Departamento Nacional do SENAI (SENAI DN – Bolsa nº 329266).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1A mostra o SDS-PAGE contendo as frações solúveis obtidas da purificação da proteína Spike da variante D614G. A primeira incubação (E1) das microesferas com a solução de imidazol 300 mM elui boa quantidade de proteína recombinante em torno de 180-200 kDa. No entanto, uma significativa quantidade da proteína foi eluída na segunda lavagem com solução de imidazol 300 mM (E2). A eluição 3 (E3) removeu a proteína remanescente ainda aderida à superfície das microesferas de agarose. Ao final, todas as alíquotas referentes as eluições foram reunidas e submetidas à concentração e troca de tampão (C (I)), seguida de armazenamento a -80° C. A troca de tampão é fundamental para a estabilização da proteína em solução, uma vez que congelar e descongelar na ausência de glicerol tornou a proteína de baixa qualidade, com base no imunoenensaio realizado (dados não mostrados).

Para confirmar a presença de uma proteína recombinante ligada a 6-his, foi realizado um western blotting utilizando o anticorpo anti cauda de histidina direcionado ao marcador de histidina na extremidade C-terminal. Conforme mostrado na Figura 1B, as amostras eluídas foram detectadas em torno de 180-200 kDa.

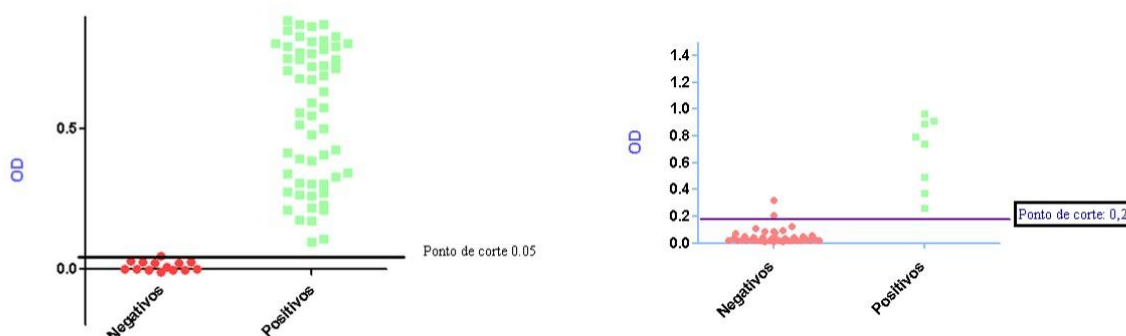
Figura 1. Amostras da proteína Spike D614G de SARS-CoV-2 em SDS-PAGE e Western Blotting



Para validar a proteína purificada, ensaios de ELISA foram padronizados usando a proteína Spike D614G recombinante e solúvel, com base na necessidade de desenvolver um ensaio imunológico altamente específico e sensível para detectar anticorpos o mais cedo possível no soro do paciente. Um limite rigoroso foi derivado da média mais três desvios padrão dos valores de densidade óptica (DO) detectada nas amostras de soro provenientes de indivíduos RT-qPCR negativo para o SARS-CoV-2. Os valores de DO de amostras de soro provenientes de pessoas com diagnóstico positivo para SARS-CoV-2 foram significativamente maiores do que DO de amostras negativas (Figura 2). Usando o ponto de corte de 0,05 foi possível detectar IgG em 70 das 70 amostras positivas selecionadas para o primeiro ensaio, resultando em uma sensibilidade de 100%, assim como no segundo ensaio, em que houve distinção em todas as 8 amostras positivas. Em relação à especificidade dos ensaios, o primeiro, que contou com 14 amostras negativas, alcançou 92%, enquanto o segundo ensaio obteve 94% de especificidade, contando com 39 amostras negativas. Esses dados demonstram a possibilidade de produção e aplicação de variantes da

proteína spike em métodos diagnóstico, através de metodologia simples, além de servir de base para futuras pesquisas, e para a produção de outras proteínas de interesse, com diversas aplicações.

Figura 2. Ensaios ELISA com amostras positivas e negativas para SARS-CoV-2 para determinar especificidade e sensibilidade do teste utilizando a proteína Spike D614G para a detecção de anticorpos específicos em amostras soropositivas.



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico indireto por detecção de anticorpos é importante para compreender a resposta imunológica contra o patógeno e a disseminação de COVID-19. Desta forma, são necessários desenvolvimentos de diagnósticos capazes de identificar indivíduos positivos e negativos para a COVID-19 e que sejam acessíveis para a população. As proteínas purificadas demonstraram grande potencial para aplicação em testes sorológicos, e outras técnicas que podem auxiliar na luta contra COVID-19. Diante dos resultados, é possível perceber que o sistema de expressão utilizando células HEK293F é efetivo para a produção da proteína Spike de SARS-CoV-2 recombinante, entretanto, algumas dificuldades devem ser contornadas para a produção de algumas variantes desta proteína, uma vez que são de grande importância para imunodiagnóstico e na identificação destas variantes e consequente controle da disseminação da doença.

5. REFERÊNCIAS

- ¹WEISSLEDER R, LEE H, KO J, PITTET MJ. COVID-19 diagnostics in context. *Sci Transl Med*. 2020 3;12(546).
- ²UMAKANTHAN S, SAHU P, RANADE AV, BUKELO MM, RAO JS, ABRAHAO-MACHADO LF, DAHAL S, KUMAR H, KV D. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (covid-19). *Postgrad Med J*. 2020. 96(1142):753-758. DOI: 10.1136/POSTGRADMEDJ-2020-138234. EPUB 2020 JUN 20. PMID: 32563999.
- ³SEYED HOSSEINI, E. et al. The novel coronavirus Disease-2019 (COVID-19): Mechanism of action, detection and recent therapeutic strategies. *Virology*, v. 551, p.1–9, 2020.
- ⁴Du, Lanying et al. "The spike protein of SARS-CoV--a target for vaccine and therapeutic development." *Nature reviews. Microbiology* vol. 7,3 (2009): 226-36
- ⁵ELHADAD, Mahmoud et al. A survey on blockchain technology for cyber physical systems: Challenges and opportunities. *Journal of Network and Computer Applications*, v. 164, p. 102806, 2020.