

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI – UFSJ CAMPUS
CENTRO-OESTE DONA LINDU – CCO PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

JONATAS OLIVEIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE PROTEÍNAS PARA KITS DE
DIAGNÓSTICO DE RUBÉOLA VISANDO TRANSFERÊNCIA DE
TECNOLOGIA**

DIVINÓPOLIS-MG
FEVEREIRO-2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI – UFSJ CAMPUS
CENTRO-OESTE DONA LINDU – CCO PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

JONATAS OLIVEIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE PROTEÍNAS PARA KITS DE
DIAGNÓSTICO DE RUBÉOLA VISANDO TRANSFERÊNCIA DE
TECNOLOGIA**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São João Del Rei, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Alexsandro Sobreira Galdino

DIVINÓPOLIS-MG
FEVEREIRO-2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que permitiu que eu chegasse até aqui, por ter me dado saúde e proteção nessa caminhada que não foi fácil. Gratidão pelo amparo nas horas mais difíceis e pela força quando tudo parecia dar errado. Obrigado meu Deus por ter feito das escolhas certas o meu caminho e iluminado meus passos até aqui!

Ao meu marido Claudenir, pelo apoio incondicional em todos os momentos, pela paciência, pelo carinho, pelo amor recíproco, pela compreensão, por ser a pessoa com quem eu quero estar. Se hoje eu cheguei até aqui foi porque você sempre esteve ao meu lado. Essa conquista também é sua!

À Universidade Federal de São João del-Rei, pela oportunidade e conhecimentos adquiridos.

Ao Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos, LABIOM, pela oportunidade em efetuar este curso.

Ao Laboratório de Processos Biotecnológicos e Purificação de Macromoléculas, ProBiotecMacro, pelo suporte e equipamentos emprestados.

Ao CNPq, Capes e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

À empresa Bioclin-Quibasa, pelo suporte de reagentes e kits comerciais.

Ao professor Alexsandro Sobreira Galdino, pela orientação eficiente e precisa, pela minha formação profissional nesta pós-graduação e pelo exemplo diário de determinação, de humildade, de trabalho dedicado, de ética, de competência e de sucesso. Por ter sido, durante esses quatro anos de convivência, minha referência profissional.

À professora Dra. Mariana Campos da Paz, pelo suporte nos experimentos e contribuir para a melhora substancial do trabalho.

À professora Dra. Juliana Martins Machado, pelo auxílio em grande parte dos experimentos. Obrigado por estar sempre disposta a me ajudar quando eu precisei, por todo o conhecimento passado e pela paciência durante esta caminhada.

Ao professor Daniel Bonoto Gonçalves pelos ensinamentos e pela atenção a mim dedicada.

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586d Silva, Jonatas Oliveira da.
DESENVOLVIMENTO DE PROTEÍNAS PARA KITS DE
DIAGNÓSTICO DE RUBÉOLA VISANDO TRANSFERÊNCIA DE
TECNOLOGIA / Jonatas Oliveira da Silva ; orientador
Alexandro Sobreira Galdino. -- Divinópolis, 2023.
131 p.

Tese (Doutorado - Programa Multicêntrico de Pós
Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular -
Doutorado) -- Universidade Federal de São João del
Rei, 2023.

1. Rubéola. 2. Proteínas recombinantes. 3.
metodologia de superfície de resposta. I. Galdino,
Alexandro Sobreira, orient. II. Título.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

ATA DE DEFESA DE TESE Nº 2 / 2023 - PMBqBM (13.26)

Nº do Protocolo: 23122.016105/2023-02

Divinópolis-MG, 02 de maio de 2023.

Ata de Defesa de Tese do doutorando

Jonatas Oliveira da Silva

No dia 12 de Abril de 2023, às 08h30min, reuniu-se, por meio de videoconferência - plataforma Google Meet, a banca examinadora da Defesa de Tese do discente Jonatas Oliveira da Silva, regularmente matriculado no Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, nível Doutorado. A banca examinadora foi constituída pelos doutores: Alexsandro Sobreira Galdino (UFSJ), orientador e presidente da banca, Danyelle Romana Alves Rios (UFSJ), Leticia Fernandes de Oliveira (UFSJ), Maria de Lourdes Borba Magalhães (UDESC) e Rodolfo Cordeiro Giunchetti (UFMG). Após apresentação, durante 60 minutos, do trabalho intitulado "Desenvolvimento de proteínas para kits de diagnóstico de rubéola visando transferência de tecnologia", o doutorando foi arguido pelos examinadores. Reunidos em sessão secreta, às 13:00h a banca considerou o doutorando APROVADO. Sem mais a relatar, assinam a presente ata os participantes da banca.

(Assinado digitalmente em 22/05/2023 08:25)

ALEXSANDRO SOBREIRA GALDINO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CCO (10.02)
Matrícula: 1367304

(Assinado digitalmente em 18/05/2023 17:08)

DANYELLE ROMANA ALVES RIOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CCO (10.02)
Matrícula: 1581667

(Assinado digitalmente em 18/05/2023 15:48)

LETICIA FERNANDES DE OLIVEIRA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CCO (10.02)
Matrícula: 1889198

(Assinado digitalmente em 23/05/2023 08:51)

RODOLFO CORDEIRO GIUNCHETTI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 277.054.508-60

(Assinado digitalmente em 18/05/2023 18:25)

MARIA DE LOURDES BORBA MAGALHÃES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 961.716.770-00

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sipac.ufsj.edu.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **2**, ano:
2023, tipo: **ATA DE DEFESA DE TESE**, data de emissão: **02/05/2023** e o código de verificação:
34c0c5fee9

Às professoras Telma Porcina Vilas Boas Dias e Marina Quádrio Raposo Branco Rodrigues, pelas orientações no decorrer deste trabalho, pela sabedoria e pelo carinho.

Às professoras Danyelle Romana Alves Rios, Letícia Fernandes de Oliveira, Maria de Lourdes Borba Magalhães e Soraya dos Santos Pereira, pela participação na banca de defesa da tese e pela contribuição com o trabalho.

Aos professores Vinícius Silva Belo, Ronaldo Nagem e Rodolfo Cordeiro Giunchetti, pelo aceite em participação como membros suplentes da banca de defesa de tese.

A todos os técnicos de laboratório, em especial, Adriano Parreira Guimarães pela atenção, pela amizade e ajuda nos experimentos.

Às minhas amigas de todas as horas Tuânia, Michelli, Juliana, Rita, Mariana e Isadora pelo companheirismo e imprescindível ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos, pelos momentos de convivência.

Aos meus familiares, minha Mãe Simone Pregnoatto Oliveira da Silva e meu Pai José Benedito da Silva, que muitas vezes se sacrificaram para que eu e meus irmãos Tiago Oliveira da Silva, Karina Oliveira da Silva e Bianca de Oliveira Andrade Batista, pudéssemos realizar os nossos sonhos. Aos meus avós Ageu e Aparecida, que auxiliaram ativamente na minha criação. À minha tia Fania que me incentivou a iniciar um curso de graduação. Essa conquista também é de vocês!!!

*Dedico está à pessoa que me apoiou e
fez com que esse sonho tornasse realidade!
Muito obrigado Claudenir, te amo muito...*

RESUMO

A rubéola é uma doença de importância epidemiológica, causada pela infecção com o vírus da rubéola (RV). Muitos casos de anomalias congênitas ou mortes fetais foram relatados após infecções por RV durante as primeiras 16 semanas de gestação. As anomalias congênitas são características da síndrome da rubéola congênita e incluem surdez, distúrbios oculares e doenças cardíacas, além de outras sequelas tardias, como o autismo, diabetes mellitus e disfunção tireoidiana. Um dos maiores desafios no controle da Rubéola é o desenvolvimento de estratégias diagnósticas que permitam sua identificação com alta precisão e, ao mesmo tempo, possam ser aplicadas em países pobres ou em desenvolvimento. Nesse contexto, desenvolver antígenos nacionais com alta sensibilidade e especificidade a um baixo custo pode ser uma alternativa promissora em relação aos custos de antígenos importados. O objetivo deste estudo foi desenvolver tecnologia para a produção de quimeras recombinantes para serem incorporadas como insumos para o diagnóstico de Rubéola por imunoenensaio. Desse modo, reativamos uma cepa de *Escherichia coli* contendo o vetor MERUB::pET21a para expressar uma proteína quimérica (rMERUB) e o rendimento proteico foi estudado por Metodologia de Superfície de Resposta. Além disso, propomos dois peptídeos sintéticos (rP1 e rP2) como candidatos para o imunodiagnóstico da rubéola. Por fim, comparamos o desempenho dos ensaios sorológicos utilizando rMERUB, rP1 e rP2 com o kit comercial BIOLISA IgG Rubéola. De acordo com o modelo, a melhor condição de cultivo foi de 0,05 mM de IPTG, 7,5 h a uma densidade celular inicial de 0,5, que previu 2,8 g/L de rMERUB e 2,4 nm de densidade celular da biomassa. Essas condições foram validadas e produziram 2,5 (DO_{600nm}) para biomassa e 2,7 g/L de rMERUB. Os ensaios de ELISA utilizando rMERUB, rP1 e rP2 demonstraram uma taxa de concordância de 96,97%, 78,79% e 84,85%, o coeficiente *Kappa* foi de 0,930, 0,571 e 0,681, respectivamente. A especificidade foi de 90,91% para os três antígenos, enquanto a sensibilidade variou de 100%, 72,73% e 81,83% para rMERUB, rP1 e rP2 respectivamente. Portanto, o presente trabalho apresenta três antígenos promissores, candidatos ao diagnóstico da rubéola.

Palavras-chave: Rubéola, diagnóstico da rubéola, peptídeos sintéticos, metodologia de superfície de resposta.

ABSTRACT

Rubella is a disease of epidemiological importance, caused by infection with the rubella virus (RV). Many cases of congenital anomalies or fetal deaths have been reported after RV infections during the first 16 weeks of gestation. Congenital anomalies are characteristic of congenital rubella syndrome and include deafness, eye disorders and heart disease, in addition to other late sequelae such as autism, diabetes mellitus and thyroid dysfunction. One of the biggest challenges in controlling Rubella is the development of diagnostic strategies that allow its identification with high precision and, at the same time, can be applied in poor or developing countries. In this context, developing national antigens with high sensitivity and specificity at a low cost can be a promising alternative to the cost of imported antigens. This study aimed to develop technology to produce recombinant chimeras to be incorporated as inputs for the diagnosis of Rubella by immunoassay. Thus, we reactivated an *Escherichia coli* strain containing the MERUB::pET21a vector to express a chimeric protein (rMERUB) and the protein yield was studied by Response Surface Methodology. Furthermore, we propose two synthetic peptides (rP1 and rP2) as candidates for rubella immunodiagnosis. Finally, we compared the performance of serological assays using rMERUB, rP1 and rP2 with the commercial BIOLISA IgG Rubella kit. According to the model, the best culture condition was 0.05 mM IPTG, 7.5 h at an initial cell density of 0.5, which predicted 2.8 g/L rMERUB and 2.4 nm density biomass cell. These conditions were validated and produced 2.5 (OD600nm) for biomass and 2.7 g/L of rMERUB. ELISA assays using rMERUB, rP1 and rP2 demonstrated a concordance rate of 96.97%, 78.79% and 84.85%, the *Kappa* coefficient was 0.930, 0.571 and 0.681, respectively. Specificity was 90.91% for the three antigens, while sensitivity ranged from 100%, 72.73% and 81.83% for rMERUB, rP1 and rP2 respectively. Therefore, the present work presents three promising antigens that are candidates for the immunodiagnostic of rubella.

Keywords: Rubella, rubella diagnosis, synthetic peptides, response surface methodology.