

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Microbiologia

**Produção de proteínas recombinantes de SARS-CoV-2 e utilização para
detecção de anticorpos em pacientes convalescentes**

Ana Paula Barbosa

**São Paulo
2023**

Ana Paula Barbosa

**Produção de proteínas recombinantes de SARS-CoV-2 e utilização para
detecção de anticorpos em pacientes convalescentes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Versão corrigida)

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristiane R. Guzzo Carvalho

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Barbosa, Ana Paula
Produção de Proteínas Recombinantes de SARS-CoV-2 e
Utilização para Detecção de Anticorpos em Pacientes Convalescentes /
Ana Paula Barbosa; orientadora Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho.
-- São Paulo, 2023.

160 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de
Ciências Biomédicas.

1. Sars-cov-2. 2. Proteínas Recombinantes. 3. Elisa. 4.
Western Blotting. 5. Cultura Celular. I. Rodrigues Guzzo
Carvalho, Cristiane, orientadora. II. Título.



Declaro, para os devidos fins, que

Ana Paula Barbosa

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos", realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 14 de outubro de 2023
(Declaração válida por 5 anos)

Profa. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva
Presidente da Comissão de Segurança Química

Profa. Dra. Patricia Gama
Diretora do ICB

Introdução ao curso de Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos

Módulo 1

Classificação e Propriedades físico-químicas dos agentes químicos
Rotulagem e Ficha de Informação de Segurança de produto Químico (FISPQ)
Comunicação de perigo - GHS e Diamante de Hommel
Equipamentos de proteção

Módulo 2

Plataforma Mendeleev
Produtos químicos controlados
Descarte e Gerenciamento de resíduos químicos

Módulo 3

Manuseio de nitrogênio líquido
Acidentes Químicos
Vistorias dos Laboratórios do ICB pela CSQ e Considerações finais



DEPARTAMENTO DE
MICROBiologia
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

USP

Certificamos que **Ana Paula Barbosa**
participou do treinamento de
Biossegurança em Laboratórios de Pesquisa.
realizado pelo Departamento de Microbiologia – ICB/USP, nos
dias 28 e 29 de setembro de 2021 com carga horária total de 8 horas.

Prof. Dr. Enrique Mario Boccardo Pierulivo
Vice Chefe do Departamento
de Microbiologia ICB/USP

Dra. Tatiana Alves dos Reis
Responsável pelo treinamento

Dra. Veridiana Munford
Responsável pelo treinamento



**Uso de animais
para experimentação**



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que

Ana Paula Barbosa

participou do Curso “Uso de Animais em Experimentação” com carga horária total de 10 horas, em formato ensino a distância, realizado pela Comissão de Biotérios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 14 de junho de 2023
(Declaração válida por 5 anos)

Comissão de Biotérios
ICB USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comitê de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of. CEPSH.007.2021

São Paulo, 14 de maio de 2021.

Assunto: Autorização para Biorrepositório - CAAE: 33459120.8.0000.5467

A Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos **aprovou** o Cadastro do Biorrepositório de amostras **de material biológico humano (sangue-soro)**, de acordo com a proposta de armazenamento enviada em 10/06/2020, e aprovada em 19/06/2020, no projeto intitulado: "**Validação de teste sorológico baseado em plataforma de ELISA para o diagnóstico da Covid-19**", CAAE: 33459120.8.0000.5467.

Todas as amostras somente serão coletadas e armazenadas após o consentimento por escrito do participante de pesquisa, após assinatura em TCLE específico, autorizando a guarda e uso do material. Lembramos ainda que, *a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, o participante da pesquisa, ou seu representante legal, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado em Biobanco ou Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, pelo participante da pesquisa ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes (Res. 441/10, art. 10).*

Cabe ao pesquisador responsável o gerenciamento do material biológico humano armazenado em Biorrepositório. Qualquer alteração na composição do biorrepositório (tanto por inclusão de novas amostras ou exclusão de amostras) deve ser informada a este Comitê para readequação do cadastro.

Informo ainda, que o material poderá ser utilizado em novas pesquisas desde que estas sejam previamente aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa deste Instituto.

Esta autorização tem validade de 10 anos a partir da aprovação (19/06/2020), podendo ser renovada conforme determina o artigo 12 da Resolução nº 441/10, mediante justificativa e relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o material durante o período.

Atenciosamente,

Prof. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisas em Seres Humanos - ICB /USP

Sr.

Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biomédicas da USP



DEPARTAMENTO DE
MICroBiologia
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP -- Av. Professor Lineu Prestes, 1374 - ICB II- 05508 000
Departamento MICROBIOLOGIA.

AUTORIZAÇÃO PARA USO DE MATERIAL DE BIOREPOSITÓRIO DE ORIGEM HUMANA

De acordo com a Resolução nº 441/11, artigo 1º, item 15, venho informar que disponho de um **biorepositório autorizado em 04/02/2021 (CEPSH. 007.2021)** e autorizo o uso das amostras de sangue (soro) que serão utilizados no projeto de pesquisa intitulado "**Produção de proteínas recombinantes de SARS-CoV-2 e utilização para detecção de anticorpos em pacientes coalescentes**", sob responsabilidade da pesquisadora **Ana Paula Barbosa**, aluna de Mestrado do Departamento de Microbiologia. As amostras biológicas estão armazenadas a -70 °C em recipientes adequados (tubos de criogenia) e apropriadas para o uso.

A utilização dessas amostras será essencial para **avaliação da presença de anticorpos em pacientes coalescentes de COVID-19 através de Western Blot e ELISA utilizando proteínas recombinantes de SARS-CoV-2**. Por fim, garanto a confidencialidade da identidade dos pacientes dos quais não pretendemos estudar o material genético.

São Paulo, 04 de fevereiro de 2021.

Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Professor Titular

Responsável pela coleção

Departamento de Microbiologia



Projeto de Pesquisa:
Validação de teste sorológico baseado em plataforma de ELISA para o diagnóstico da Covid-19

Informações Preliminares

Responsável Principal

CPF/Documento: 439.911.497-53	Nome: LUIS CARLOS DE SOUZA FERREIRA
Telefone: 1130917356	E-mail: lcsf@usp.br

Instituição Proponente

CNPJ: 63.025.530/0005-38	Nome da Instituição: Universidade de São Paulo
--------------------------	--

Essa submissão de emenda é exclusiva do seu Centro Coordenador?

A emenda é exclusiva de seu Centro Coordenador, então as alterações realizadas em seu projeto, em virtude da emenda, NÃO serão replicadas nos Centros Participantes vinculados e nos Comitês de Ética das Instituições Coparticipantes, quando da sua aprovação.

É um estudo internacional? Não

Assistentes

CPF/Documento	Nome
267.737.518-45	Camila Squarzon Dale
658.300.839-49	Katia Valtrudes Sendeveski Melo

Equipe de Pesquisa

CPF/Documento	Nome
267.737.518-45	Camila Squarzon Dale
004.242.028-83	Edison Luiz Durigon
934.906.239-91	Silvia Beatriz Boscardin
414.025.688-51	CAMILA GASQUE BOMFIM
302.261.778-07	DENISE MORAIS DA FONSECA
013.092.988-31	PAOLA MARCELLA CAMARGO MINOPRIO
309.408.648-94	ANA PAULA BARBOSA
089.861.798-73	CLÁUDIO ROMERO FARIAS MARINHO
148.874.358-43	Anderson de Sá Nunes
199.948.488-60	Vanessa Morais Freitas

Área de Estudo

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

- Grande Área 2. Ciências Biológicas
- Grande Área 4. Ciências da Saúde

Propósito Principal do Estudo (OMS)

- Saúde Coletiva / Saúde Pública

Título Público da Pesquisa: Validação de teste sorológico baseado em plataforma de ELISA para o diagnóstico da Covid-19

Contato Público

CPF/Documento	Nome	Telefone	E-mail
658.300.839-49	Katia Valtrudes Sendeveski Melo	1137844024	katiavsm@usp.br

Contato Científico: LUIS CARLOS DE SOUZA FERREIRA



USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - ICB/USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Validação de teste sorológico baseado em plataforma de ELISA para o diagnóstico da Covid-19

Pesquisador: LUIS CARLOS DE SOUZA FERREIRA

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 33459120.8.0000.5467

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.215.938

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda solicitando a formação de biorrepositório com a seguinte justificativa : "O projeto de pesquisa CEP SH.007.2021 (CAAE: 33459120.8.0000.5467) necessita de um biorrepositório de amostras biológicas humanas dado que, por se tratar de um estudo longitudinal, análises comparativas poderão ser necessárias em fases futuras do projeto em estudo e/ou até mesmo para comprovação do resultado obtido".

Objetivo da Pesquisa:

não se aplica

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Foram anexados todos os documentos necessários: 1- regulamento de biorrepositórios; 2-declaração de formação de biorrepositórios; 3- justificativa do biorrepositório.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

não se aplica

Recomendações:

Não há recomendações

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br



USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - ICB/USP



Continuação do Parecer: 5.215.938

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Por não haver pendências ou inadequações recomendo a aprovação do presente pleito.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar a emenda ao projeto. Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Após análise e discussão o colegiado concorda com o parecer do Relator e aprova o projeto com a recomendação de acerto de alguns termos do TCLE de difícil entendimento para o participante da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1849840_E2.pdf	23/12/2021 09:40:02		Aceito
Outros	Justificativa_Biorrepositorio.pdf	23/12/2021 09:38:16	Katia Valtrudes Sendeveski Melo	Aceito
Outros	Declaracao_formacao_biorrepositorio.pdf	23/12/2021 09:37:44	Katia Valtrudes Sendeveski Melo	Aceito
Outros	Regulamento_Biorrepositorio.pdf	23/12/2021 09:36:39	Katia Valtrudes Sendeveski Melo	Aceito
Cronograma	Cronograma_alterado.pdf	23/12/2021 09:32:25	Katia Valtrudes Sendeveski Melo	Aceito
Outros	Emenda_1.docx	01/02/2021 10:59:17	Katia Valtrudes Sendeveski Melo	Aceito
Outros	concordanciaCamila.pdf	01/02/2021 10:56:45	Katia Valtrudes Sendeveski Melo	Aceito
Outros	concordanciaAnaPaula.pdf	01/02/2021 10:56:17	Katia Valtrudes Sendeveski Melo	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	10/06/2020 16:11:17	LUIS CARLOS DE SOUZA FERREIRA	Aceito
Outros	Declaracoes_outros.pdf	10/06/2020 16:07:46	LUIS CARLOS DE SOUZA FERREIRA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio_Covid19.pdf	10/06/2020 16:04:45	LUIS CARLOS DE SOUZA FERREIRA	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE_adulto.pdf	10/06/2020	LUIS CARLOS DE	Aceito

Endereço: Av. Profª Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br



USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - ICB/USP



Continuação do Parecer: 5.215.938

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_adulto.pdf	16:02:35	SOUZA FERREIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_sorologia.pdf	10/06/2020 16:02:18	LUIS CARLOS DE SOUZA FERREIRA	Aceito
Declaração de concordância	Declaracoes_todos.pdf	09/06/2020 19:08:05	LUIS CARLOS DE SOUZA FERREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Compromisso_Luis.pdf	09/06/2020 18:55:35	LUIS CARLOS DE SOUZA FERREIRA	Aceito
Cronograma	CronogramaCovid.pdf	09/06/2020 18:53:24	LUIS CARLOS DE SOUZA FERREIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 28 de Janeiro de 2022

Assinado por:
Regina Scivoletto
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br

Agradecimentos

É com imensurável gratidão à minha mãe Maria Helena, que inicio meus agradecimentos. Meu exemplo de fé, honestidade e força. Agradeço aos meus filhos Miguel e Felipe pela compreensão e perdão pelos momentos de ausência na pior fase das nossas vidas: a pandemia. Aos meus irmãos Amauri e Maisa, ao meu amigo Marco e a sua mãe Maria, tenho imensa gratidão pelo incentivo e rede de apoio prestados aos meus meninos durante minha ausência. Agradeço à minha amiga de vida e colega de laboratório Camila pelos momentos de acalento durante os episódios de desespero no isolamento social. Minha gratidão aos meus amigos Antônia, Bianca, Fernando e Maurício pelo incentivo e compreensão. Aos amigos que trouxe da graduação para a vida Beatriz, Bruna, Débora, Luiza, Maria, Sara e Victor por tornarem mais doce essa caminhada.

Agradeço aos técnicos Márcia e Marco, aos meus colegas do Laboratório de Estrutura e Evolução de Proteínas André, Anielle, Angél, Aline, Daniel, Davi, Gabo, Gilberto, Michelle, Natalia, Rodolfo, Stephanie, Tania, Bruna, Julia e Íris pela convivência e ensinamentos.

À Gisele e Renato, funcionários da Secretaria de Pós-Graduação em Microbiologia, pelo auxílio e incentivo durante essa jornada.

Agradeço à orientadora, Profa. Dra. Cristiane Guzzo e ao Prof. Dr. Robson de Souza pela orientação e esclarecimentos. Minha gratidão ao Laboratório BSL3+ de Virologia do Prof. Dr. Edison Durigon, ao Laboratório de Neurociências do Prof. Dr. Henning Ulrich, ao Laboratório de Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação (LaNEFI) da Profa Dra. Carolina Munhoz e que, através de seus pesquisadores Danielle, Rafael, Ralyria, Jean, Luiza e Érica viabilizaram grande parte dos experimentos aqui apresentados. Agradeço também ao Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan da Dra. Roxane Fontes e Dra. Juliana Polado pelo apoio e parceria.

E meu especial agradecimento ao pesquisador Nilton Barreto dos Santos pela paciência, dedicação e doçura ofertados a mim, ou qualquer outro aluno inexperiente, durante nossa convivência no LaNEFI. Nilton foi um cientista dedicado que tinha o sonho de devolver para a sociedade todo o conhecimento adquirido durante sua permanência conosco. Ele trabalhou durante o período pandêmico desenvolvendo um projeto que visava elucidar como a COVID-19 afetava o Sistema Nervoso Central. Não teve oportunidade de ser vacinado devido aos atrasos provocados pelo governo negligente e negacionista brasileiro e, como milhares de brasileiros, poderia ter sua morte evitada. Nilton faleceu de COVID-19 aos 34 anos de idade em 4 de maio de 2021, deixando pais, irmãs e esposa.

Agradecimento à instituição de fomento

Meus agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte e financiamento desse projeto de mestrado.

***Em memória do estimado amigo e colega de bancada,
Nilton Barreto dos Santos***

RESUMO

BARBOSA, A.P. Produção de Proteínas Recombinantes de SARS-CoV-2 e Utilização para Detecção de Anticorpos em Pacientes Convalescentes. 2023, p. 160. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A crise global resultante da pandemia de COVID-19 oportunizou diversas lições para o enfrentamento das próximas pandemias. A testagem em massa de indivíduos suspeitos é uma importante ferramenta para a diminuição da transmissibilidade viral, visto que possibilita o isolamento social precoce de indivíduos infectados. A proteína do nucleocapsídeo de SARS-CoV-2, vírus causador da COVID-19, apresentou ótimo desempenho em ensaios sorológicos de detecção anticorpos em pacientes convalescentes, o que auxiliou a mapear indivíduos infectados assintomáticos ou com sintomas tardios. Os testes sorológicos permitiram a identificação de indivíduos infectados antes da vacinação, inclusive em lugares onde a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) não era praticada, o que interferiu na elaboração de medidas de saúde pública. Somado a isso, sabe-se que os piores prognósticos da COVID-19 estão relacionados à reação inflamatória exacerbada, causada pela produção e liberação excessiva, aguda e descontrolada de sinalizadores pró-inflamatórios, como as interleucinas IL-1, IL-6, IL-17 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), que causam dano no epitélio respiratório. As proteínas virais produzidas na célula infectada parecem interferir na resposta imune do hospedeiro, inibindo mecanismos inatos de defesa e regulação da resposta inflamatória. A produção de proteínas recombinantes de SARS-CoV-2 podem viabilizar o desenvolvimento de testes sorológicos com maior sensibilidade e especificidade além auxiliar a elucidar os mecanismos de liberação de citocinas inflamatórias em estudos *in vitro*. Este trabalho iniciou-se com o desenho de variadas construções para produção de proteínas recombinantes de SARS-CoV-2 para inferir a imunogenicidade através da avaliação da capacidade de detecção de anticorpos no soro de pacientes convalescentes de COVID-19 pelas metodologias de Western Blotting e ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*). As proteínas recombinantes solúveis produzidas foram 3CLpro, Nsp8, Nucleocapsídeo e seus fragmentos N e C-terminal. Destas, apenas a proteína Nucleocapsídeo e seus fragmentos apresentaram resultados relevantes na detecção de anticorpos no soro de pacientes convalescentes de COVID-19 por Western Blotting e ELISA, com destaque para a sensibilidade e especificidade resultante pelo último método para a proteína inteira (98% e 95%, respectivamente). As proteínas recombinantes 3CLpro, Nsp8, Nucleocapsídeo também foram incubadas em cultura de macrófagos para avaliação da liberação de TNF-alfa, IL-1, e IL-17 relacionadas à tempestade de citocinas observadas em pacientes graves de COVID-19. Esta análise foi prejudicada devido à presença de endotoxinas bacterianas nas proteínas recombinantes em questão, o que poderia interferir nos resultados obtidos, sendo necessária a implementação de novos processos de purificação antes de novos ensaios.

Palavras chave: COVID-19, Nucleocapsídeo, ELISA, Western Blotting, citocinas

ABSTRACT

BARBOSA, A.P. Production of SARS-CoV-2 Recombinant Proteins and Use for Detection of Antibodies in Convalescent Patients. 2023, p. 160. Dissertation (Masters in Biological Sciences - Microbiology) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo.

The global crisis resulting from the COVID-19 pandemic provided several lessons for facing future pandemics. Mass testing of suspected individuals is an important tool for reducing viral transmissibility, as it enables early isolation of infected individuals. The nucleocapsid protein of SARS-CoV-2, the virus which causes the COVID-19 disease, showed excellent performance in serological antibody detection assays in convalescent patients, which helped to map asymptomatic infected individuals or those with late symptoms. Serological tests allowed the identification of infected individuals before vaccination, especially in places where the Polymerase Chain Reaction (PCR) diagnosis was not available, contributing to the development of public health measures. In addition, it is known that the prognoses of COVID-19 is related to the exacerbated inflammatory response, caused by the excessive, acute and uncontrolled production and release of pro-inflammatory signals, such as interleukins IL-1, IL-6, IL - 17 and tumor necrosis factor alpha (TNF-Alpha), resulting in extensive epithelial damage. Viral proteins produced in infected cells appear to interfere with the host's immune response, inhibiting innate defense mechanisms and control of the inflammation. The production of recombinant SARS-CoV-2 proteins can enable the development of serological tests with greater sensitivity and specificity, in addition to helping to elucidate the mechanisms of release of inflammatory cytokines in *in vitro* studies. This work began with the design of several constructs for the production of recombinant SARS-CoV-2 proteins to infer immunogenicity by evaluating the ability to detect antibodies in the serum of patients convalescent from COVID-19 using Western Blotting and ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). The soluble recombinant proteins produced were 3CLpro, Nsp8, Nucleocapsid and its N and C-terminal fragments. Of these, only the Nucleocapsid protein and its fragments presented relevant results in the detection of antibodies in the serum of convalescent COVID-19 patients by Western Blotting and ELISA, with emphasis on the sensitivity and specificity resulting from the latter method for the whole protein (98% and 95%, respectively). The recombinant proteins were also incubated in macrophage culture to evaluate the production of TNF-alpha, IL-1, and IL-17, related to the cytokine storm observed in severe COVID-19 patients. This analysis was hampered by the presence of bacterial endotoxins in the recombinant proteins in question, which could interfere with the results obtained, making it necessary to implement additional purification processes before the tests.

Keywords: COVID-19, Nucleocapsid, ELISA, Western Blotting, cytokines

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Taxonomia do SARS-CoV-2.....	22
Figura 2.	Arranjo genômico do SARS-CoV-2.....	25
Figura 3.	Proteínas codificadas pelo SARS-CoV-2.....	26
Figura 4.	Complexo de Replicação e Transcrição do SARS-CoV-2.....	34
Figura 5.	RTC e replicação do RNA do SARS-CoV-2.....	35
Figura 6.	Nsp1.....	37
Figura 7.	Nsp2.....	37
Figura 8.	Nsp3.....	38
Figura 9.	Nsp5.....	39
Figura 10.	Nsp7.....	40
Figura 11.	Nsp8.....	41
Figura 12.	Nsp9.....	41
Figura 13.	Nsp10.....	42
Figura 14.	Nsp12.....	42
Figura 15.	Nsp13.....	43
Figura 16.	Nsp14.....	44
Figura 17.	Nsp15.....	45
Figura 18.	Nsp16.....	45
Figura 19.	ORF2 Spike.....	46
Figura 20.	ORF3a.....	47
Figura 21.	ORF5 Membrana.....	48
Figura 22.	ORF7a.....	49
Figura 23.	ORF8.....	49
Figura 24.	ORF9a Nucleocapsídeo.....	50
Figura 25.	ORF14 N interna.....	50
Figura 26.	Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR (C1, 7, 9, 10, 17-22 e 24).....	73
Figura 27.	Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR (C2, 4-6, 8, 11-15).....	73
Figura 28.	Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR (C3, 23, cCTD e cNTD).....	74

Figura 29.	Alinhamento das construções sequenciadas.....	75
Figura 30.	Teste de expressão de C3-1341.....	76
Figura 31.	Teste de expressão de C3-1945.....	76
Figura 32.	Teste de expressão especial de C3-1341 e C3-1945.....	77
Figura 33.	Teste de expressão de C5 Protease 3CLpro e C8 Nsp8.....	77
Figura 34.	Teste de expressão de C22 ORF8.....	78
Figura 35.	Teste de expressão de C23-Nucleocapsídeo.....	78
Figura 36.	Teste de expressão de cNTD e cNTD da Nucleocapsídeo.....	79
Figura 37.	Frações do ensaio de expressão em larga escala da proteína C3-1945.....	81
Figura 38.	Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho da proteína C5.....	81
Figura 39.	SDS-PAGE das frações do ensaio de expressão em larga escala da proteína C5.....	82
Figura 40.	Imunoidentificação de C5.....	82
Figura 41.	Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho da proteína C8.....	83
Figura 42.	SDS-PAGE das frações do ensaio de expressão em larga escala da proteína C8.....	83
Figura 43.	Imunoidentificação de C8.....	84
Figura 44.	Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho da proteína C23.....	84
Figura 45.	SDS-PAGE das frações do ensaio de expressão em larga escala da proteína C23.....	85
Figura 46.	Imunoidentificação de C23.....	85
Figura 47.	Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho da proteína cNTD.....	86
Figura 48.	SDS-PAGE das frações do ensaio de expressão em larga escala da proteína cNTD....	86
Figura 49.	Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho da proteína cCTD.....	87
Figura 50.	SDS-PAGE das frações do ensaio de expressão em larga escala da proteína cCTD....	87
Figura 51.	Imunoidentificação de cCTD e cNTD.....	88
Figura 52.	Imunoidentificação de C5, C8 e C23.....	89
Figura 53.	Imunoidentificação de C23, cCTD e cNTD.....	89
Figura 54.	Curva ROC do Western Blotting da C23.....	91
Figura 55.	Curva ROC do Western Blotting da cNTD.....	92
Figura 56.	Curva ROC do Western Blotting da cCTD.....	92
Figura 57.	Curva ROC do ELISA da C23.....	93
Figura 58.	Curva ROC do ELISA da cNTD.....	94

Figura 59.	Curva ROC do ELISA da cCTD.....	94
Figura 60.	Curva concentração- resposta utilizando a proteína C5.....	96
Figura 61.	Curva concentração- resposta utilizando a proteína C8.....	97
Figura 62.	Curva concentração- resposta com aplicação da proteína C23.....	97
Figura 63.	Teste de expressão em ClearColi ® BL21™(DE3).....	102
Figura 64.	Representação esquemática do plasmídeo pET28a(+)......	118
Figura 65.	Representação esquemática da sequência do sítio de clonagem múltipla.....	118
Figura 66.	Western Blotting e reatividade dos soros humanos contra a C23, cNTD e cCTD.....	148

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1.	Composição dos tampões utilizados durante o processo de lise e purificação.....	68
Quadro 2.	Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos genes das construções de fragmentos e proteínas de SARS-CoV-2.....	119
Tabela 1.	Organização do genoma do SARS-CoV-2.....	27
Tabela 2.	Características das proteínas recombinantes de SARS-CoV-2.....	67
Tabela 3.	Dados de sensibilidade e especificidade dos ensaios realizados.....	95
Tabela 4.	Quantificação de endotoxinas incubadas com as culturas celulares.....	100
Tabela 5.	Elaboração das construções.....	121
Tabela 6.	Proteínas recombinantes de SARS-CoV-2 expressas e purificadas.....	147
Tabela 7.	Dados de reatividade do WB das proteínas C23 e a cCTD.....	149
Tabela 8.	Dados de reatividade do ELISA das proteínas C23, cCTD e cNTD.....	150

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACE2	<i>Angiotensin-Converting Enzyme 2</i> - enzima conversora de angiotensina 2
ATC	<i>Antigen-presenting cell</i> - célula apresentadora de antígenos
cap	5' m ⁷ GpppN - guanosina metilada adicionada no primeiro nucleotídeo
CD	<i>cluster of differentiation</i> - grupo de diferenciação celular
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> - Centro de Controle e Prevenção de Doenças
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid - ácido desoxirribonucleico complementar
CCL5	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i> - Ligante 5 de quimiocina CC
CEPI	<i>Coalition for Epidemic Preparedness Innovations</i> - Coligações para Inovações na Preparação para Epidemia
CSM	<i>Computed Structure Models</i> - modelos de estrutura computadorizada
CoV	Coronavírus - vírus pertencentes à Família Coronaviridae
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 19</i> - Doença do coronavírus 2019
Crio-EM	<i>Cryogenic Electron Microscopy</i> - microscopia crioeletrônica
C-terminal	<i>carboxyl group terminus</i> - COOH-terminal - grupo carboxi terminal
CTL	<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i> - linfócito T citotóxico
CXCL	<i>(C-X-C motif) ligand 1</i> - (motivo CXC) ligante 1
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> - Padrões moleculares associados à danos
DMV	<i>Double-Membrane Vesicle</i> - vesícula de membrana dupla
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> - ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade óptica
dsRNA	<i>Double-stranded Ribonucleic acid</i> - RNA de fita dupla
E	<i>Envelop Protein</i> - Proteína Envelope
eIF	<i>eukaryotic translation Initiation Factor</i> - fator de iniciação eucariótica
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensaio de imunoabsorção enzimática
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i> - retículo endoplasmático
ESPIN	Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional
ExoN	<i>3'-to-5' exoribonuclease</i> - exoribonuclease 3'-5'

FDA USA	<i>Food and Drug Administration</i> - Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> - Fator estimulador de colônias de macrófagos granulócitos
GMP	<i>Guanosine Monophosphate</i> - guanosina monofosfato
gRNA	<i>genomic Ribonucleic acid</i> - ácido ribonucleico genômico
GTP	<i>Guanosine Triphosphate</i> - guanosina trifosfato
HCoV	<i>Human Coronavirus</i> - Coronavírus Humano
Hel	Helicase
IBV	<i>Infectious Bronchitis Virus</i> - vírus da Bronquite Infecciosa Aviária
IFN	<i>Interferon</i>
Ig	<i>Immunoglobulins</i> - imunoglobulinas
IL	<i>Interleukin</i> - interleucina
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i> - Fator regulador de Interferon
LPS	<i>Lipopolysaccharides</i> - lipopolissacarídeos, endotoxinas
M	<i>Membrane Protein</i> - Proteína Membrana
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i> - Proteína Químioatraente de Monócitos
MERS-CoV	<i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i> - Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MHC I	<i>Major Histocompatibility Complex type 1</i> - complexo principal de histocompatibilidade do tipo 1
MHC II	<i>Major Histocompatibility Complex type 2</i> - complexo principal de histocompatibilidade do tipo 2
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i> - Proteína inflamatória de macrófagos
mRNA	<i>messenger Ribonucleic acid</i> - ácido ribonucleico mensageiro
MTase	<i>methyltransferase</i> - metiltransferase
N	<i>Nucleocapsid Protein</i> - Proteína Nucleocapsídeo
NCBI-NLM	<i>National Center for National Biotechnology Information-National Library of Medicine</i> - Centro Nacional de Informação Nacional sobre Biotecnologia - Biblioteca Nacional de Medicina
NF	<i>Nuclear Factor</i> - fator nuclear
NK	<i>Natural Killer</i> - célula assassina natural
NLR	<i>NOD Like Receptors</i> - receptores semelhante à NOD

NOD	<i>Nucleotide-binding and Oligomerization Domain</i> - Domínio de ligação de nucleotídeos e oligomerização
Nsp	<i>Non-Structural Proteins</i> - proteínas não estruturais
N-terminal	<i>amino group terminus</i> - NH ₂ -terminal - grupo amino terminal
ORF	<i>Open Reading Frames</i> - quadro aberto de leitura
OTC	<i>Over the Counter Test</i> - Teste de balcão
pp1a	<i>polyproteins 1a</i> - poliproteína 1a
pp1ab	<i>polyproteins 1ab</i> - poliproteína 1ab
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> - Padrões moleculares associados à patógenos
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> - Tampão fosfato salino
pH	potencial de Hidrogênio
PHB	<i>prohibitin</i> - proinitina
PHEIC	<i>Public Health Emergency of International Concern</i> - emergência de saúde pública de interesse internacional
PI	Ponto Isoelétrico
PLpro	<i>Papain-Like protease</i> - protease do semelhante à papaína
PM	Peso molecular
PRF-1	<i>Programmed -1 Ribosomal Frameshift</i> - mudança de quadro de leitura ribossômico programado -1
R₀	número/taxa básica de reprodução
RCSB PDB	<i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank</i> - Colaborador de Pesquisa de Bioinformática Estrutural para Banco de Dados de Proteínas
RBD	<i>Receptor Binding Domain</i> - domínio de ligação ao receptor
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i> - RNA polimerase dependente de RNA
RIG	<i>Retinoic acid-Inducing Genes</i> - genes indutores de ácido retinóico
RLR	<i>RIG Like Receptors</i> - Receptores semelhantes à RIG
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - ácido ribonucleico
RO	<i>Organelle Replication</i> - organela de replicação viral
ROC	<i>Receiver Operating characteristic Curve</i> - curva característica de operação do receptor
RTC	<i>Replication Transcription Complex</i> - Complexo de Replicação-Transcrição

RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> - Reação de Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
S1PR	<i>Sphingosine-1 phosphate receptor</i> - receptor de esfingosina -1 fosfato
S	<i>Spike Protein</i> - Proteína Espícula
SAM	<i>S-Adenosyl methionine</i> - S-adenosil-L-metionina
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i> - Síndrome Respiratória Aguda Grave coronavírus do tipo 1
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> - Síndrome Respiratória Aguda Grave coronavírus do tipo 2
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
sgRNA	<i>subgenomic Ribonucleic acid</i> - ácido ribonucleico subgenômico
SUS	Sistema Único de Saúde
TH1	<i>Type 1 T helper</i> - linfócito T auxiliar do tipo 1
TLR	<i>Toll Like Receptors</i> - Receptores do tipo Toll
TMPRSS2	Transmembrane serine protease 2 - serina protease transmembrana tipo 2
TNF	Tumour Necrosis Factor - fator de necrose tumoral
TRM	<i>Tissue-Resident Memory</i> - memória residente de tecido
TRS	<i>Transcriptional Regulatory Sequence</i> - Sequência Reguladora de Transcrição
TRS-L	<i>Transcriptional Regulatory Sequence Lider</i> - Sequência Reguladora de Transcrição Lider
UTR	<i>Untranslated Region</i> - Região Não Traduzida
VOCs	<i>Variants Of Concern</i> - variantes de preocupação
2XTY	2x Yeast Extract Tryptone medium - meio triptona de extrato de levedura duas vezes
3CLpro	<i>3-chymotrypsin-Like protease</i> - Protease semelhante à 3-quimotripsina
+ssRNA	<i>Positive-sense single-stranded RNA</i> - RNA fita simples de sentido positivo
°C	unidade de grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Evolução da pandemia por SARS-CoV-2	18
1.2 Origem e classificação por SARS-CoV-2	21
1.3 Estrutura e organização do genoma do SARS-CoV-2	23
1.4 Ciclo de infecção do SARS-CoV-2	28
1.5 Proteínas do SARS-CoV-2	35
1.6 COVID-19: Doença do Coronavírus SARS-CoV-2	51
1.7 Variantes	53
1.8 Resposta imune antiviral	55
1.8.1 Resposta imune anti-SARS-CoV-2	57
1.9 Diagnóstico da COVID-19	60
1.10 Vacinas contra SARS-CoV-2	61
2 OBJETIVOS	64
2.1 Objetivos específicos	64
3 MATERIAIS E MÉTODOS	65
3.1 Construção de plasmídeos recombinantes	65
3.2 Teste de expressão recombinante e lise bacteriana	66
3.3 Expressão e purificação de proteínas recombinantes em larga escala	68
3.4 Amostras e Ética	69
3.5 Western Blotting	69
3.6 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)	70
3.7 Cultivo celular e teste de viabilidade	71
3.8 Análise dos Dados	72
4 RESULTADOS	72
4.1 Construção de plasmídeos recombinantes	72
4.2 Teste de expressão recombinante e lise bacteriana	75
4.3 Expressão e purificação de proteínas recombinantes em larga escala	80
4.4 Padronização do Western Blotting e ELISA com proteínas recombinantes	88
4.5 Western Blotting	91
4.6 ELISA	93
4.7 Cultivo celular e teste de viabilidade	95
5 DISCUSSÃO	98
7 PRODUTIVIDADE	104
7.1 Artigos publicados	104
7.2 Artigo em fase de redação	104
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
9 ANEXOS	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 Evolução da pandemia por SARS-CoV-2

A doença de Coronavírus 2019 (COVID-19, *Coronavirus Disease 2019*), causada pelo Betacoronavírus SARS-CoV-2 (Wang et al., 2020) foi responsável por aproximadamente 6,9 milhões de mortes e pela infecção de mais de 770 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2023a). A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) e a Insuficiência Respiratória observadas em casos graves de COVID-19 ocorre, principalmente, devido à pneumonia desencadeada pela tempestade de citocinas pró-inflamatórias, tanto local como sistemicamente (Montazersaheb et al., 2022; Hu B. et al., 2021).

Embora não haja um consenso sobre a origem do novo coronavírus, o compartilhamento de 79,6% de identidade de sequência com o SARS-CoV e relação próxima com o betacoronavírus BatCov RaTG13 (identidade de 96%), indica que o SARS-CoV-2 pode ter naturalmente evoluído do coronavírus RaTG13, que tem morcegos como seu reservatório natural (Zhou et al., 2020). A alta identidade de aminoácidos com o coronavírus de pangolim malaio (mamífero mais traficada no comércio ilegal de animais selvagens), sugere que o atual coronavírus pode ter se originado na recombinação de um vírus semelhante ao pangolim-CoV com um semelhante ao RaTG13 (Xiao et al., 2020). O genoma do SARS-CoV-2 abriga assinaturas de vários eventos de recombinação abrangendo várias espécies de diferentes regiões geográficas, o que sugere que a proximidade física de portadores de diferentes coronavírus, como no mercado de Wuhan, permitiu a troca de vírus e a recombinação entre as diferentes cepas, levando à diversificação e evolução de uma cepa capaz de infectar células humanas (Singh e Yi, 2021).

A transmissão do SARS-CoV-2 pode ocorrer através da inalação (transmissão direta) de gotículas com o vírus expelidas na respiração, fala, tosse e espirro de infectados, sintomáticos ou assintomáticos. Essas gotículas podem ser depositadas em superfícies que se tornam pontos para contaminação (fômites) em potencial, por contato das mãos e posterior contato com as mucosas dos olhos, nariz e boca (transmissão indireta), espalhando a infecção (Meselson, 2020). Amostras fecais persistentemente positivas no ensaio de RT-PCR (Reação de Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase) de pacientes convalescentes, sem

manifestações intestinais e com teste de nasofaringe negativo, sugerem a via fecal-oral como possível fonte de transmissão (Xu et al., 2020; Bonato; Dioscoridi; Mutignani, 2020). Dadas as possíveis formas de transmissão, o Centro para Controle e Prevenção de Doenças recomendou o isolamento social, uso de máscara, higiene frequente das mãos e superfícies como medidas de contenção à transmissão do vírus (CDC, 2021).

Na COVID-19, o número básico de reprodução (R_0) para o SARS-CoV-2, uma importante ferramenta epidemiológica para avaliar a propagação de doenças, foi inicialmente estabelecido entre 1,6 e 4,1, variando entre diferentes etnias e regiões geográficas (Cao et al., 2020; Liu et al., 2020; Read et al., 2021). Todavia, o Brasil alcançou o R_0 de 3,1, tendo associação entre o desenvolvimento de casos de infecção respiratória aguda grave à renda per capita mais baixa (de Souza W. et al., 2020). Com o surgimento de novas variantes de preocupação (VOCs), que tendem a evadir a resposta imune, observou-se um aumento de transmissibilidade, com valores de R_0 superiores a 10, como no caso da variante Omicron (de Souza, 2022a).

No Brasil, os óbitos resultantes da COVID-19 até outubro de 2023 alcançaram o número de 704.659, quase 10% do total de mortes confirmadas em todo o mundo, colocando o país entre os mais afetados pela pandemia, atrás apenas dos Estados Unidos da América. O número de mortes diárias chegou a 1000 entre maio e setembro de 2020, alcançando 3500 no final de março do mesmo ano (WHO, 2023b).

As falhas de liderança governamental no mais alto nível contribuíram para essas taxas de mortalidade no Brasil visto que o presidente Jair Bolsonaro subestimou a pandemia, utilizou de desinformação como estratégia política e promoveu a pseudociência para destruir o Ministério da Saúde Nacional. O discurso visava desmotivar as medidas de isolamento social incentivada pelos governos estaduais a fim de proteger a economia do país, enfraquecendo o distanciamento social, o uso de máscaras e outras medidas preventivas apoiadas pela Ciência (Fonseca et al., 2021). As narrativas do ex-presidente, alinhadas com as agendas e preconceitos pessoais, priorizaram desmobilizar provas científicas no combate à pandemia no lugar de explicar a crise para a sociedade e conceber políticas aprovadas, o que resultou em efeitos significativamente negativos na concepção de respostas políticas (Peci, González e Dussauge-Laguna, 2023). O presidente negou

continuamente a gravidade da pandemia e propagou o tratamento com cloroquina, medicamento antimalárico sem efeito comprovado contra COVID-19, visando beneficiar aliados políticos que lucraram financeiramente com a produção da droga (Nowak, 2023).

A resposta do governo federal brasileiro frente à pandemia de COVID-19 ('governança do caos') falhou nos parâmetros de governança de riscos, parâmetros estes que contemplam estratégias institucionais que abordam a sociedade integral para adotar medidas que visam mitigar os efeitos de uma emergência sanitária. O governo brasileiro falhou na comunicação de riscos, transparência e acessibilidade de dados, negociação entre atores, coesão social, participação pública e tomou medidas baseadas em dados não científicos, o que resultou em uma série de efeitos além dos danos individuais associados à doença (Di Giulio et al., 2023).

Dado o legado do sistema público de saúde brasileiro, a pandemia de COVID-19 é um lamentável exemplo de perda de oportunidade de coordenação federal, juntamente com estados e municípios, em diminuir os efeitos pandêmicos. Os impactos da pandemia tiveram significativa heterogeneidade regional nos níveis sociodemográficos, onde descendentes de negros, indígenas e asiáticos foram mais afetados pela doença (Colonia et al., 2023). Dados sugerem que as atitudes e decisões do presidente em questão influenciaram negativamente o comportamento da população frente à pandemia, o que pode ser chamado de "efeito bolsonaro", visto que as municípios pró Bolsonaro (gestão 2019-2022) apresentaram menores níveis de cumprimentos de medidas de distanciamento social e vacinação, o que impactou o histórico Plano Nacional de Vacinal Brasileiro (Razafindrakoto, et al., 2023).

Em maio de 2022, o Governo Federal do Brasil anunciou o fim do estado de Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) decretado em função da pandemia, determinando o relaxamento das medidas de enfrentamento à pandemia de COVID-19, decisão tomada com base no cenário epidemiológico mais controlado, com menos casos de contágio e avanço da campanha de vacinação no país (Agência Senado Federal, 2022). Em 5 de maio de 2023, a Organização Mundial da Saúde (WHO, *World Health Organization*) anunciou que a COVID-19 deixou de ser uma Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional (PHEIC, *Public Health Emergency of International Concern*) para ser considerada um

problema de saúde estabelecido e contínuo para a gestão da pandemia à longo prazo (WHO, 2023c).

1.2 Origem e classificação por SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 pertence ao gênero *Betacoronavirus*, família *Coronaviridae* da ordem dos *Nidovirales*. A família *Coronaviridae* (CoVs) é composta por vírus envelopados com genoma de RNA de fita simples de sentido positivo (+ssRNA), não segmentado e de alta variabilidade e taxa de recombinação genética, com distribuição mundial entre humanos e animais (Tu et al., 2020). Esta família é composta pelas subfamílias Letovirinae (gênero *Alphaletovirus*), Orthocoronavirinae (gêneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus*) e Pitovirinae (gênero *Alphapirionavirus*) (ICTV, 2023). Destes, destaca-se a subfamília Orthocoronavirinae por contemplar membros que podem infectar uma ampla variedade de mamíferos e aves (Woo et al., 2023). Os HCoV-229E (*Alphacoronavirus*) e HCoV-OC43 (*Betacoronavirus*) foram identificados na população humana em meados de 1965 e, juntamente com os HCoV-NL63 (*Alphacoronavirus*) e HCoV-HKU1 (*Betacoronavirus*), relatados em 2004 e 2005 respectivamente, circulam na população humana continuamente como causadores de infecções sazonais do trato respiratório (Figura 1) (V'kovski et al., 2021; Corman, et al., 2019). Os HCoV-229E, -OC43, -NL63 e -HKU1 compõe o grupo CAR-CoV (*Community-Acquired Respiratory-CoV*) dos coronavírus respiratórios adquiridos na comunidade e são responsáveis por 15 a 30% dos casos de resfriado em indivíduos imunocompetentes podendo causar infecções graves, principalmente em crianças e idosos (Santos et al., 2021).

Neste século, outros dois *Betacoronavirus* de origem zoonótica (morcegos como reservatório) foram responsáveis por epidemias respiratórias: Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV), com origem em Hong Kong, causador de 774 óbitos em 2003 (taxa de mortalidade de 10%) (WHO, 2021); e o Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), com origem na Arábia Saudita, causador de 858 óbitos à partir de 2012 (taxa de mortalidade de 36%) (WHO, 2019).

A transmissão de SARS-CoV ocorria pelo contato próximo com pacientes doentes através de gotículas respiratórias ou aerossóis, sendo possível a

transmissão fecal-oral. O período de latência era de 2 a 7 dias e o período contagioso era de 10 dias após o início da doença. O hospedeiro intermediário é a civeta mascarada. A apresentação clínica variava de assintomática ou leve até desconforto respiratório superior agudo, falência múltipla de órgãos e óbito. Vômitos e diarreia eram ocasionais. A MERS-CoV ainda pode ser transmitida por gotículas de respiratórias pelo contato próximo com pacientes ou dromedários doentes (hospedeiro intermediário), ou ainda ingestão de leite de dromedários infectados. A latência é de 2 a 14 dias com manifestação clínica semelhante à da SARS-CoV (Tu et al., 2020).

A identificação do SARS-CoV-2, anteriormente denominado 2019-nCoV, ocorreu em dezembro de 2019 em Wuhan (Hubei, China), em uma epidemia de casos de pneumonia grave (SARS, *Severe Acute Respiratory Syndrome*) em frequentadores do Mercado Atacadista de Frutos do Mar de Huanan, acometendo posteriormente seus familiares e profissionais de saúde (Wu W. et al., 2020), sendo declarada emergência de saúde pública de interesse internacional (PHEIC) pela World Health Organization (WHO) no mês seguinte (Wang et al., 2020).

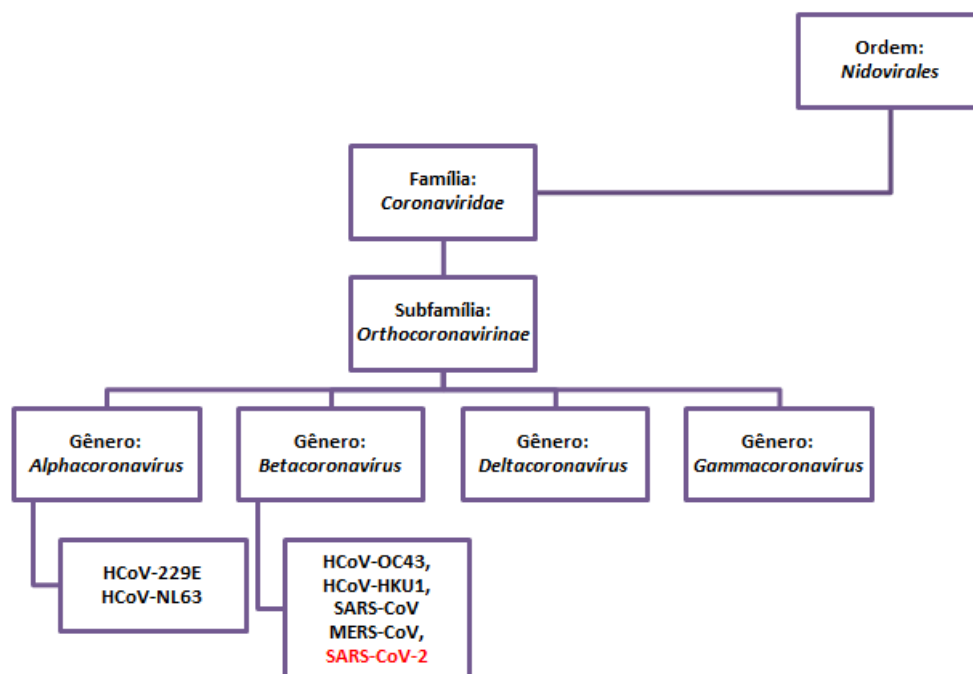


Figura 1. Taxonomia do SARS-CoV-2. HCoV-Coronavírus Humanos (229E, NL63, OC43 e HKU1) que circulam na população causando infecções sazonais do trato respiratório. Coronavírus causadores das epidemias respiratórias MERS-CoV (Síndrome Respiratória do Oriente Médio), SARS-CoV (Síndrome Respiratória Aguda Severa) e da pandemia de COVID-19 SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Severa tipo 2) (Adaptado ICTV, 2023).

1.3 Estrutura e organização do genoma do SARS-CoV-2

Os SARS-CoV-2 são esféricos e tem aproximadamente 80-120 nm de diâmetro. Em seu envelope viral formado por uma bicamada lipídica estão ancoradas as proteínas estruturais Membrana, Envelope e Spike, cujas projeções superficiais externas conferem um aspecto de coroa solar ao vírus. O genoma de aproximadamente 29,9 kb organizadas em um RNA fita simples de sentido positivo (+ssRNA) envolto em um nucleocapsídeo helicoidal (Gorkhali et al., 2021) codifica as quatro proteínas estruturais, Spike (S), Membrana (M), Envelope (E) e Nucleocapsídeo (N), dezesseis não estruturais e oito proteínas acessórias (Bosch et al., 2003; Wang et al., 2020).

O RNA genômico viral (gRNA) apresenta uma região 5'-capeada e 3'-poliadenilada que permite a tradução imediata das poliproteínas virais pela maquinaria da célula hospedeira. Estas regiões conferem estabilidade ao gRNA, visto que RNA desencapados são detectados por receptores celulares inatos e degradados em compartimentos granulares citoplasmáticos. As extremidades 5' e 3' do gRNA contam ainda com uma região não traduzida (UTR) altamente estruturada formando alças e grampos que participam da regulação da replicação e transcrição do RNA (Romano et al., 2020).

O genoma do SARS-CoV-2 é composto aparentemente por quatorze quadros de leitura aberta (ORFs, *Open Reading Frames*) precedidos de sequências regulatórias transcricionais (TRS) que desempenham um papel importante para o salto da RNA polimerase na produção de RNAs subgenômicos (sgRNAs) (Zhang et al. 2021). Existem oito TRS de comprimento variando de 6 a 49 pb entre cada gene e a jusante da ORF1a (O'Leary et al., 2020).

Há divergências quanto ao número exato de ORFs de SARS-CoV-2, o que ainda demanda validações experimentais (V'kovski et al., 2021). Neste trabalho seguiremos a organização de ORFs proposta por Yadav e colaboradores (2021) que consiste em 14 ORFs (Figura 2): ORF1a, ORF1b, ORF2 (Spike), ORF3a, ORF3d (dentro da ORF3a), ORF4 (Envelope), ORF5 (Membrana), ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9a (Nucleocapsídeo), ORF14 (dentro da ORF9a) e ORF10.

As duas principais ORFs, ORF1a e ORF1b, estão próximas ao terminal 5' e ocupam quase dois terços de todo o gRNA viral. Elas codificam até 16 proteínas não estruturais (Nps1-16) envolvidas na replicação e transcrição viral (Chen; Liu; Guo,

2020). A ORF1a e ORF1b estão sobrepostas em uma região que permite a mudança de quadro de leitura ribossomal programado (PRF-1, *Programmed -1 Ribosomal Frameshift*), que resulta na leitura completa da ORF1 e geração da poliproteína pp1ab. Outros coronavírus, como o vírus da Bronquite Infecciosa Aviária (IBV), também contém um sinal eficiente de mudança de quadro ribossômico na junção de dois quadros abertos de leitura sobrepostos. No IBV foi possível identificar um limite a montante do sinal sequência UUUAAAC, onde provavelmente ocorre o deslizamento ribossômico. A jusante dessa sequência, denominada “sequência escorregadia”, o RNA se dobra em uma estrutura terciária, um pseudonó, essencial para a mudança de quadro (Brierley; Digard; Inglis, 1989). No SARS-CoV-2, a mudança de quadro ribossômico ocorre dentro da região conhecida como “elemento de estimulação de mudança de quadro de coronavírus *stem-loop 1*” (posição 13.476-13.503pb) após a detecção da sequência escorregadia U_UUA_AAC pelo ribossomo e seu encontro com uma estrutura de três hastes de RNA a jusante conhecida como pseudonó do “tipo H”, compostos por duas alças empilhadas. O pseudonó pode promover a pausa do alongamento dos ribossomos, um passo crítico para a ocorrência de PRF-1 eficiente para a leitura completa da ORF1. A sequência escorregadia permite o reemparelhamento do ribossomo com os códons do quadro -1 depois que eles deslizam por 1 base na direção 5’ ao longo do gRNA viral. A resolução subsequente do pseudonó no gRNA permite que o ribossomo continue o alongamento da poliproteína nascente no novo quadro de leitura, gerando a pp1ab. A pausa prolongada da leitura ribossomal devido à presença de um pseudonó no gRNA viral resulta na saída do ribossomo após a leitura da ORF1a, traduzindo apenas a pp1a (Kelly et al., 2020; O’Leary et al., 2020).

Assim, estas ORFs dão origem às poliproteínas pp1a e pp1ab, que são processadas pelas proteases virais para produzir as Nsp1-16. Algumas destas proteínas juntamente com fatores do hospedeiro formam a maquinaria de replicação-transcrição viral (Complexo de Replicação-Transcrição RTC) dentro de vesículas de membrana dupla (DMVs) na célula infectada que são utilizadas como organelas de replicação viral (ROs) por oferecer um microambiente favorável para a replicação do gRNA e a transcrição dos sgRNAs (Arya et al., 2021).

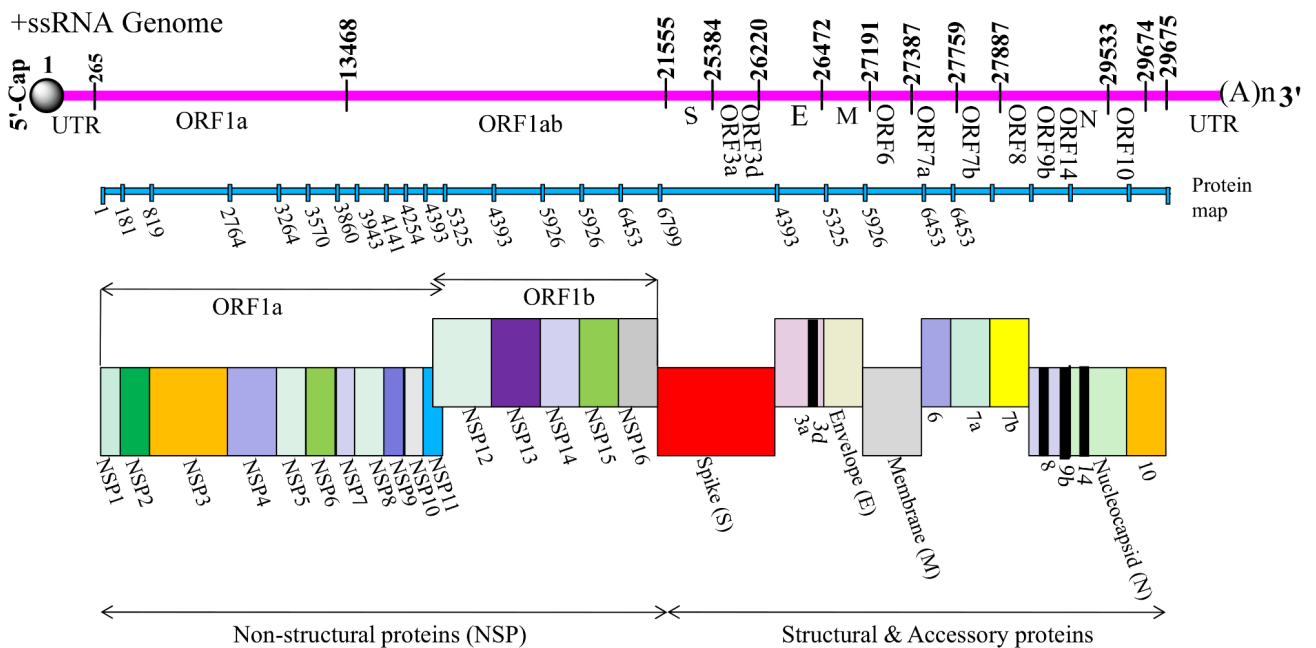


Figura 2. Arranjo genômico do SARS-CoV-2. Organização dos genes 5'cap-líder-UTR-Nsp1-16-Replicase-Spike-Envelope-Membrana-Nucleocapsídeo-3'UTR-cauda-poliA. Os genes acessórios 3a, 3d, 6, 7a, 7b, 8, 14 e 10 intercalados entre os genes estruturais anteriores à extremidade 3' do genoma de RNA viral (Yadav et al., 2021).

As demais ORFs ocupam o terço próximo ao terminal 3' do gRNA e, de maneira intercalada ou sobreposta, codificam proteínas estruturais e acessórias, que são traduzidas dos sgRNAs sintetizados pelo RTC de forma descontínua. As ORF2, ORF4, ORF5 e ORF9a codificam as proteínas estruturais (S, E, M e N) e as demais (ORF3a, ORF3d, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF14 e ORF10), proteínas acessórias que participam da montagem das partículas virais (Zhang et al. 2021). As proteínas acessórias são assim classificadas por não apresentarem homologia com proteínas de outros grupos de vírus, e apresentarem grande variabilidade genética mesmo entre os coronavírus, diferentemente das proteínas estruturais. Estas proteínas são pequenas e apresentam papéis indiretos na replicação viral e podem estar associadas à modulação das respostas do hospedeiro à infecção e patogenicidade viral (Gorkhali et al., 2021; V'kovski et al., 2021; Yadav et al., 2021).

No esquema elaborado por O'Leary e colaboradores (2020) (Figura 3) com base na sequência do isolado Wuhan-Hu-1 (Wu et al., 2020) MN908947 depositada no NCBI-NLM é possível observar as alças formadas pelo gRNA na ORF1ab e na

região 3'UTR. A presença desta alça na ORF1ab somada à uma região escorregadia codificada no gRNA determinará a produção das poliproteínas pp1a ou pp1ab, como será mostrado na próxima sessão. É importante salientar que as regiões codificadoras não são executadas consecutivamente, dada à presença de sequências regulatórias transcricionais (TRS). Assim, o comprimento das ORFs compreendem a região gênica, mais espaçadores e TRS.

Neste estudo, para a construção dos clones de SARS-CoV-2, também utilizamos a sequência depositada MN908947 depositada no NCBI-NLM. A tabela 1 traz as informações básicas para o planejamento das construções. Excluímos a Nsp11 devido à falta de informações sobre sua provável função na literatura, assim como as ORF3d, ORF7b e ORF14 por estarem sobrepostas à outras construções.

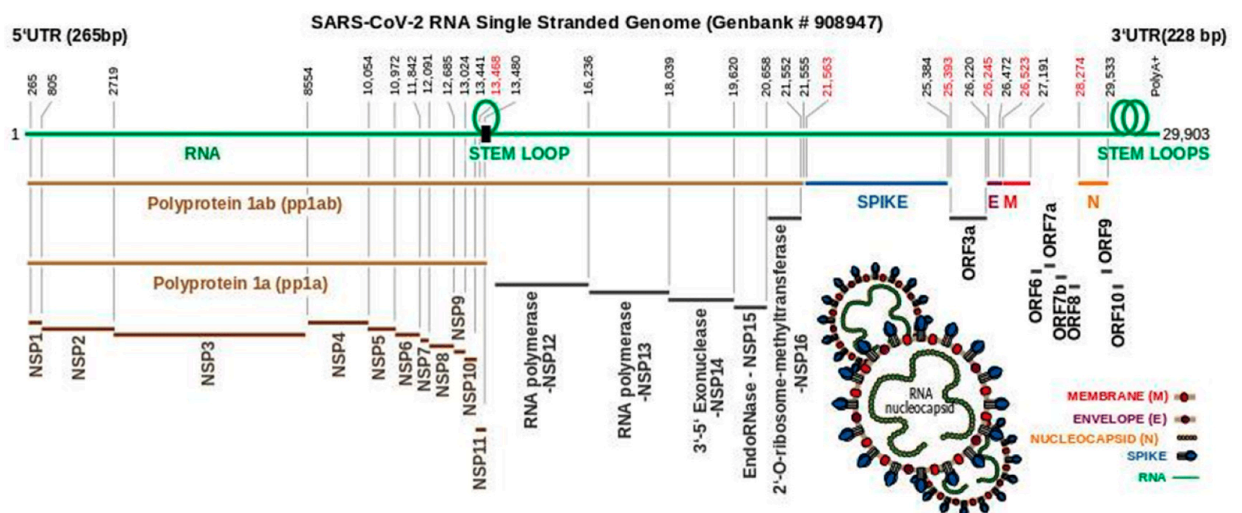


Figura 3. Proteínas codificadas pelo SARS-CoV-2. Genoma do isolado Wuhan-Hu-1 (Wu et al., 2020) com sequência MN908947 depositada no NCBI-NLM. Os números (pretos) representam o início e o fim de uma região de codificação. É importante notar que as regiões de codificação não são executadas consecutivamente (números em vermelho). A ORF1ab (266–21.555pb) contém uma região escorregadia de deslizamento do ribossomo (retângulo preto) e formação de alça de haste que interferem na tradução para produção das poliproteínas 1ab (pp1ab) e 1a (pp1a) que, após autoclivagem dão origem às proteínas não estruturais Nsp1–16 e Nsp1–11, respectivamente. Genes das proteínas estruturais S/Spike (21.563–25.384pb), E/Envelope (26.245–26.472pb), M/Membrana/M (26.523–27.191pb) e N/Nucleocapsídeo (28.274–29.533pb). Quadros de leitura abertos (ORF) ORF3a, 6, 7a, 7b, 8, 9 e 10 são codificados por segmentos genômicos intermediários conforme indicado. A ORF3d e ORF14 estão inseridos nas ORF3a e ORF9a (não mostrados) A localização de duas alças de haste é mostrada adjacente ao 3'UTR representando uma alça de haste de pseudonó (esquerda) e s2m (direita) (O'Leary et al., 2020).

Tabela 1. Organização do genoma do SARS-CoV-2. A tabela a seguir é baseada na sequência do genoma de SARS-CoV-2 de Wuhan (Genbank: MN908947.3 no NCBI-NLM).

Região	Posição inicial	Posição final	Tamanho (pb)	Quantidade de aminoácidos
5'UTR	1	265	265	Não traduzida
ORF1a	266	13480	13215	pp1a (Nsp1-11)
ORF1ab	266	21555	21290	pp1ab (Nsp1-16)
Nsp1	266	805	540	180
Nsp2	806	2719	1914	638
Nsp3	2720	8554	5835	1945
Nsp4	8555	10054	1500	500
Nsp5	10055	10972	918	306
Nsp6	10973	11842	870	290
Nsp7a	11843	12091	249	83 (ORF7b inserida)
Nsp8	12092	12685	594	198
Nsp9	12686	13024	339	113
Nsp10	13025	13441	417	139
Nsp11	13442	13480	39	13
Nsp12	13468	16236	2769	923
Nsp13	16237	18039	1803	601
Nsp14	18040	19620	1581	527
Nsp16	20659	21555	897	298
ORF2 S	21563	25384	3822	1273
ORF3a	25393	26220	828	275 (ORF 3d inserida)
ORF4 E	26245	26472	228	75
ORF5 M	26523	27191	669	222
ORF6	27202	27387	186	61
ORF7a	27394	27759	366	121
ORF8	27894	28259	366	121
ORF9a N	28274	29533	1260	419 (ORF14a inserida)
ORF10	29558	29674	117	38
3'UTR	29675	29903	228	+3'poli A 33pb - Não traduzida

1.4 Ciclo de infecção do SARS-CoV-2

De maneira geral, a infecção ocorre quando o vírus funde seu envelope viral à membrana celular da célula hospedeira, liberando o material genético no citoplasma para replicação do gRNA e tradução das proteínas virais, que se organizam em novas partículas virais e saem da célula por brotamento (Siordia Jr, 2020). O brotamento viral normalmente não rompe a célula, a fim de maximizar a replicação do vírus, mas o grande acúmulo de partículas virais acaba por lisar a célula. A infecção por SARS-CoV-2 produz de 3×10^9 a 3×10^{12} vírions por célula durante o curso completo de uma infecção característica (Sender et al., 2021).

A entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira pode ocorrer por fusão direta do envelope viral com a membrana celular ou por fusão do envelope viral à membrana endossomal após endocitose do vírion (Walls et al., 2020).

A entrada direta do vírus na célula hospedeira ocorre pela ligação da proteína S (Spike), uma glicoproteína de fusão homotrimétrica de classe I do envelope viral, ao receptor humano ACE2 (enzima conversora de angiotensina 2). A Spike tem duas porções distintas funcionalmente: S1 é o ápice do trímero, contendo a porção exposta com domínio de ligação ao receptor (RBD, *receptor binding domain*), que determina o tropismo viral. O RBD alterna constantemente entre uma posição em pé para ligação ao ACE2 e uma posição deitada para evasão do sistema imune; e S2 tem o peptídeo de fusão, duas regiões de repetição de heptal (resíduos de aminoácidos com as mesmas características bioquímicas) denominadas HR1 e HR2 e o domínio transmembrana que medeia a fusão das membranas viral e celular através de rearranjos estruturais irreversíveis. Após a ligação da proteína S com o ACE2, proteases celulares como a serina protease de membrana tipo 2 TMPRSS2 (principalmente, por ser expressa nas células do trato respiratório), ou as cisteína proteases endossomais catepsina B (CatB) e catepsina L (CatL) clivam os sítios S1/S2 (iniciação) e S2 (ativação), levando à fusão das membranas viral e celular (V'kovski et al., 2021; Li et al., 2020; Zhou et al., 2020).

No estudo comparativo entre SARS-CoV e SARS-CoV-2, Shang e colaboradores (2020) demonstram que o RBD de SARS-CoV-2 tem maior afinidade de ligação ao ACE2 o que tornaria mais eficiente a entrada nas células. Entretanto, a afinidade de ligação do ACE2 de toda a proteína S do SARS-CoV-2 é comparável ou inferior à do pico do SARS-CoV. Isso sugere que o RBD do SARS-CoV-2, embora

mais potente, está menos exposto do que o RBD do SARS-CoV, o que justificaria o estado deitado ao qual o RBD permanece na maior parte do tempo para evasão imunológica. SARS-CoV-2 ainda teria adquirido uma região de clivagem polibásica (PRRAR) entre os sítios S1/S2, que permite a clivagem eficiente pelo protótipo da pró-proteína convertase furina, o que reduziria a dependência por proteases celulares, aumentando o poder de infecção e o tropismo celular e, conseqüentemente o potencial zoonótico e transmissibilidade (V'kovski et al., 2021; Shang et al., 2020; Walls et al., 2020).

Após a fusão entre o envelope viral e a membrana celular, o gRNA viral é descoberto da proteína N, liberado no citoplasma e traduzido pelos ribossomos da célula hospedeira de maneira altamente regulada no espaço e no tempo. As primeiras proteínas virais expressas são as poliproteínas pp1a ou pp1ab que correspondem às 16 proteínas não estruturais (Nsps) responsáveis pela replicação e transcrição viral codificadas pelas ORF1a e ORF1b (Arya et al., 2021). A eficiência diferencial de *frameshift* ribossomal entre as ORF1a e ORF1b tem eficiência entre 45% e 70% com expressão de pp1a de 1,4 a 2,2 vezes maior do que pp1ab. A poliproteínas pp1a e pp1ab são então proteoliticamente autoclivadas em Nsp1-11 e Nsp1-10-Nsp12-16, respectivamente, pelas proteases virais Protease semelhante à papaina PLpro (Nsp3) e 3CLpro (Nsp5) (Finkel et al., 2021).

A protease PLpro Nsp3 cliva três sítios da poliproteína liberando Nsp1, Nsp2, Nsp3 e o terminal amino de Nsp4. Já a protease 3CLpro Nsp5, também chamada de Mpro, cliva sete ou onze sítios da pp1a ou pp1ab liberando o terminal carboxilo de Nsp4 e as proteínas Nsp5 a Nsp16 (Arya et al., 2021; V'kovski et al., 2021; Mielech et al., 2014).

Ocorre então a rápida liberação da Nsp1 que insere seu domínio C-terminal no canal de mRNA da subunidade 40S do complexo ribossomal. Esta ação interfere na ligação do mRNA ao ribossomo, o que parece inibir a tradução proteica *in vitro* em células humanas. Em SARS-CoV, a proteína Nsp1 suprime a expressão de genes do hospedeiro, incluindo o do interferon tipo I, nas células infectadas, sendo um importante fator de virulência (Narayanan et al., 2008). A Nsp1 é conhecida como fator de desligamento do hospedeiro por suprimir as respostas imunes inatas da célula infectada (Schubert et al., 2020).

Concomitantemente à liberação Nsp1, a autoclivagem das poliproteínas pp1a e pp1ab, resulta na liberação das Nsp2 a Nsp16 que interagem com fatores

celulares para modular as membranas intracelulares na formação vesículas de membrana dupla (DMVs). Estas proteínas liberadas também compõem a maquinaria de replicação e transcrição viral, chamada de complexo de replicação-transcrição (RTC) ou complexo replicase-transcriptase dentro destas vesículas. As DMVs, são chamadas de organelas de replicação viral (ROs) por serem uma estrutura subcelular que serve ao vírus invasor por fornecer plataformas ideais para a síntese viral. Além de coordenar espacialmente as etapas do ciclo celular, as DMVs ainda o otimizam por concentrar as proteínas replicativas virais e ocultá-las, junto ao RNA viral, dos sensores inatos celulares. Embora os mecanismos utilizados pelo vírus para a indução da formação de DMVs não estejam totalmente solucionados, Nsp3, Nsp4 e Nsp6 parecem ser cruciais para a remodelação coordenada da membrana do Retículo Endoplasmático (RE) e formação desta RO, o que às tornam alvos atraentes para terapias antivirais (Wolff et al., 2020a). Nsp3, Nsp4 e Nsp6 são as únicas proteínas virais com domínios transmembranas e são responsáveis por ancorar o RTC às DMVs (Romano et al., 2020). Em recente estudo, Williams e colaboradores (2023) mostraram que SARS-CoV-2 pode sequestrar fatores do hospedeiro, como as proteínas morfogênicas do retículo endoplasmático Reticulon-3 e 4 (RTN3 e RNT4), para construir as DMVs, inclusive envolvendo as Nsp3 e Nsp4 fisicamente. Ainda não está elucidado quais proteínas virais ou celulares seriam os conectores de membrana fina que fixariam o RO ao RE. Todavia, estudos mostraram que Nsp6 forma um zíper na membrana do RE e funcionaria como um filtro de comunicação entre a RO e o RE, permitindo o fluxo lipídico, mas restringindo o acesso das proteínas luminais do RE aos DMVs (Ricciardi et al., 2022). Embora as DMVs pareçam compartimentos completamente fechados para o citosol, foi possível identificar através de microscopia crioeletrônica (crio-EM) um poro molecular que atravessa a membrana dupla que funciona como canal de exportação de RNA viral recém sintetizado para tradução (sgRNAs) e montagem dos vírions da progênie (gRNA empacotado pela proteína Nucleocapsídeo no citosol). Um dos componentes principais do canal é a organização hexamérica de Nsp6 como núcleo do complexo em forma de coroa (Wolff et al., 2020b).

O complexo de replicação-transcrição (RTC) ou complexo replicase-transcriptase (Figuras 4 e 5) é a maquinaria de replicação viral formada pelo processamento durante ou após a tradução dos terminais N e C da pp1ab em 16 proteínas não estruturais. As Nsp2-16 fornecem suporte ao RTC na modulação

das membranas intracelulares, evasão do sistema imune e servem como cofatores para a replicação viral enquanto Nsp12-16 participam da atividade enzimática da maquinaria para síntese, revisão e modificação do RNA viral (V'kovski et al., 2021). O RTC requer integração funcional das atividades de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp Nsp12 e seus cofatores Nsp7 e primase Nsp8), helicase de ligação ao zinco (Hel Nsp13), capeamento do mRNA (RNA 5'-trifosfatase Hel Nsp13, N7-MTase Nsp14, 2'-O-metiltransferase Nsp16 e seu cofator Nsp10) e revisão (exoribonuclease 3'-5' ExoN Nsp14) durante a replicação, como será detalhado à diante. As demais proteínas não estruturais Nsp7-10 podem estar associadas ao RTC, auxiliando na processabilidade da RdRp e regulando as atividades enzimáticas no processo de replicação e transcrição (Romano et al., 2020; V'kovski et al., 2021; Snijder; Decroly; Ziebuhr, 2016).

Dentro das DMVs e graças ao RTC, ocorre a replicação do genoma viral para a síntese de múltiplas cópias de gRNA que serão empacotados em novos vírions ou traduzidos em Nsps e RTCs. Como observado em outros coronavírus e descrito por Sola e colaboradores (2015), a replicação do gRNA é um processo de síntese contínua em que a fita viral de RNA(+) é replicada pela RdRp pela extremidade 3' em fita de RNA(-) e esta, por sua vez, é usada como molde para síntese do novo RNA(+). Durante a síntese de RNA(-), a RdRp se liga na extremidade 3' do gRNA graças à sequências e estruturas locais, gerando RNA de fita dupla (dsRNA). As DMVs atuam então como ambiente protetor contra a detecção e degradação deste dsRNA por sensores inatos e mecanismos celulares (Knoops et al., 2008).

A replicação do RNA dá origem à intermediários de RNA fita dupla (dsRNA) que podem ser detectados como não próprios por receptores citoplasmáticos de reconhecimento de padrão intracelular (RIG) da imunidade inata. Esse reconhecimento promove, em última análise, o desenvolvimento de um estado antiviral dentro da célula que impossibilita, por exemplo, a expressão de proteínas virais e produção de novos vírions. Estudos mostraram que a infecção por coronavírus Nsp5 mutantes resultam em ativação exacerbada das respostas RIG dependentes. Este resultado sugeriu que a endorribonuclease específica de uridilato NendU Nsp15 pode mascarar o RNA dupla fita (dsRNA) dos padrões citosólicos imunes celulares ou suprimir a ativação destes sensores de dsRNA, embora os mecanismos ainda permaneçam desconhecidos (Deng et al., 2017).

A síntese do RNA viral é acompanhada de revisão da ExoN-N7-MTase Nsp14 graças a sua atividade exoribonuclease 3'-5' ExoN N-terminal. Esta atividade de revisão dos coronavírus é única no mundo dos vírus RNA e garantem a manutenção do grande tamanho do seu genoma (Romano et al., 2020). Conforme proposto por Denison e colaboradores (2011), considerando que Nsp14 hidrolisa apenas os nucleotídeos no terminal 3' do RNA, haveria uma atividade sequencial da NendoU Nsp15 seguida da ExoN Nsp14, com a remoção de nucleotídeos internos incompatíveis seguido de reparo por recombinação de RNA. A presença de ExoN pode explicar as baixas taxas de mutação ($\sim 1/10^6$ de nucleotídeos copiados por ciclo) dos coronavírus em comparação com outros vírus de RNA, como a Influenza ($\sim 3/10^3$ nucleotídeos copiados por ciclo), o que permitiu a expansão do seu genoma (Bar-On et al., 2020; Sanjuán et al., 2010; Minskaia et al., 2006).

O RNA viral recém replicado nas DMVs deve ser capeado antes de ser liberado para o citosol porque a presença de uma estrutura 5' *cap* viabiliza reconhecimento deste RNA pelos ribossomos da célula hospedeira e evita sua degradação. O *cap* RNA (m7GpppN-RNA) é composto por uma 7-metilguanossina (m7G) ligada à 5'-nucleosídeo (N) da cadeia de RNA através de uma ponte trifosfato (ppp) 5'-5'. O processo de capeamento inicia-se com a hidrólise do primeiro grupo fosfato do nucleotídeo trifosfatado da extremidade 5' (5' γ -fosfato) do RNA nascente (pppN-RNA) pela RNA 5'-trifosfatase Helicase Nsp13. Esta remoção recruta uma GTPase ainda não identificada que hidrolisa uma molécula de GTP e transfere o GMP para o 5'-difosfato da cadeia de RNA (ppN-RNA), levando à formação de GpppN-RNA através de uma ligação 5'-5'. Ocorre metilação no nitrogênio 7 (N7) no conjunto de β -N9 glicosídico do GMP incorporado pelo domínio N7-metiltransferase C-terminal da ExoN-N7-MTase Nsp14 utilizando o doador de metila S-adenosil-L-metionina (SAM). Esta primeira modificação (m7GpppN-RNA) através de metilação (*cap* 0) é seguida pela metilação do segundo carbono da ribose (2'-O) do primeiro nucleotídeo da cadeia (*cap* 1), realizada pela enzima 2'-O-metiltransferase Nsp16 (m7GpppNm-RNA) utilizando a Nsp10 como cofator (Gorkhali et.al, 2021, Romano et al., 2020).

Alternativamente à replicação do RNA viral, o RTC pode transcrever o RNA(-) de maneira descontínua, produzindo fitas menores do que o molde genômico. Isto ocorre porque a polimerase tem a capacidade de reconhecer sequência regulatória transcricional (TRS) que precede cada gene, a montante da maioria das ORFs. A

TRS inclui uma sequência central conservada e sequências flanqueadoras variáveis 5' e 3'. A sequência líder, importante para o reconhecimento do ribossomo da célula hospedeira, está localizada na extremidade 5' do genoma viral e tem a TRS exposta. No decurso da produção da fita negativa, a RdRp faz uma pausa a cada TRS, que pode ser resolvida e continuar a síntese através da TRS do gene adjacente. Caso a pausa não seja resolvida, RdRp alinha a região central da TRS do gene transcrito com a região central da TRS da sequência líder (TRS-L), viabilizando a interação entre as regiões, a troca de molde e a continuação da síntese da fita nascente. Ocorre então o término da transcrição com a produção de RNA(-) de diferentes tamanhos e regiões da porção 3' do genoma, que transcritas para um RNA(+) como o gRNA, geram um conjunto alinhado de sgRNAs. Este processo de síntese descontínua à partir de intermediários do RNA(-) garante que cada sgRNA seja 3'-coterminar com o genoma e que compartilhe uma sequência líder 5' idêntica a parte da 5' UTR do genoma viral (Lamkiewicz et al., 2023). Os sgRNAs são traduzidos em proteínas estruturais (S, M, E e N) e acessórias (3a, 3d, 6, 7a, 7b e 8) pelos ribossomos da célula hospedeira (Romano et al., 2020). A proteína 14 é expressa como vazamento do sgRNA da proteína N enquanto há divergências sobre a expressão da ORF10 a jusante do gene N (Kim et al., 2020). A proteína 3d está sobreposta à ORF3a (Yadav et al., 2021).

As proteínas estruturais S, M e E e a maioria das proteínas acessórias são sintetizadas pelos ribossomos ligados ao RE. A proteína estrutural N e outras acessórias são traduzidas por ribossomos citosólicos e posteriormente translocadas para o RE. As proteínas estruturais sofrem modificações pós-traducionais que modulam suas funções (Yadav et al., 2021). Estas proteínas seguem para o chamado Retículo Endoplasmático-Compartimento Intermediário de Golgi (ERGIC), onde a proteína M estrutura e organiza a montagem do vírion através da interação heterotípica com as demais proteínas estruturais (MS e ME) para incorporação molecular. Simultaneamente ocorre a interação do gRNA recém produzido com a proteína N para a formação do nucleocapsídeo helicoidal. A interação MN resulta na incorporação do nucleocapsídeo à proteína E presente no envelope viral. Após a montagem dos vírions eles são transportados em vesículas de parede lisa, trafegando do lúmen dos compartimentos vesiculares secretores para a membrana plasmática. Exocitose destas partículas virais resultam no espalhamento do vírus e na lise da células hospedeira (V'kovski et al., 2021; Yadav et al., 2021).

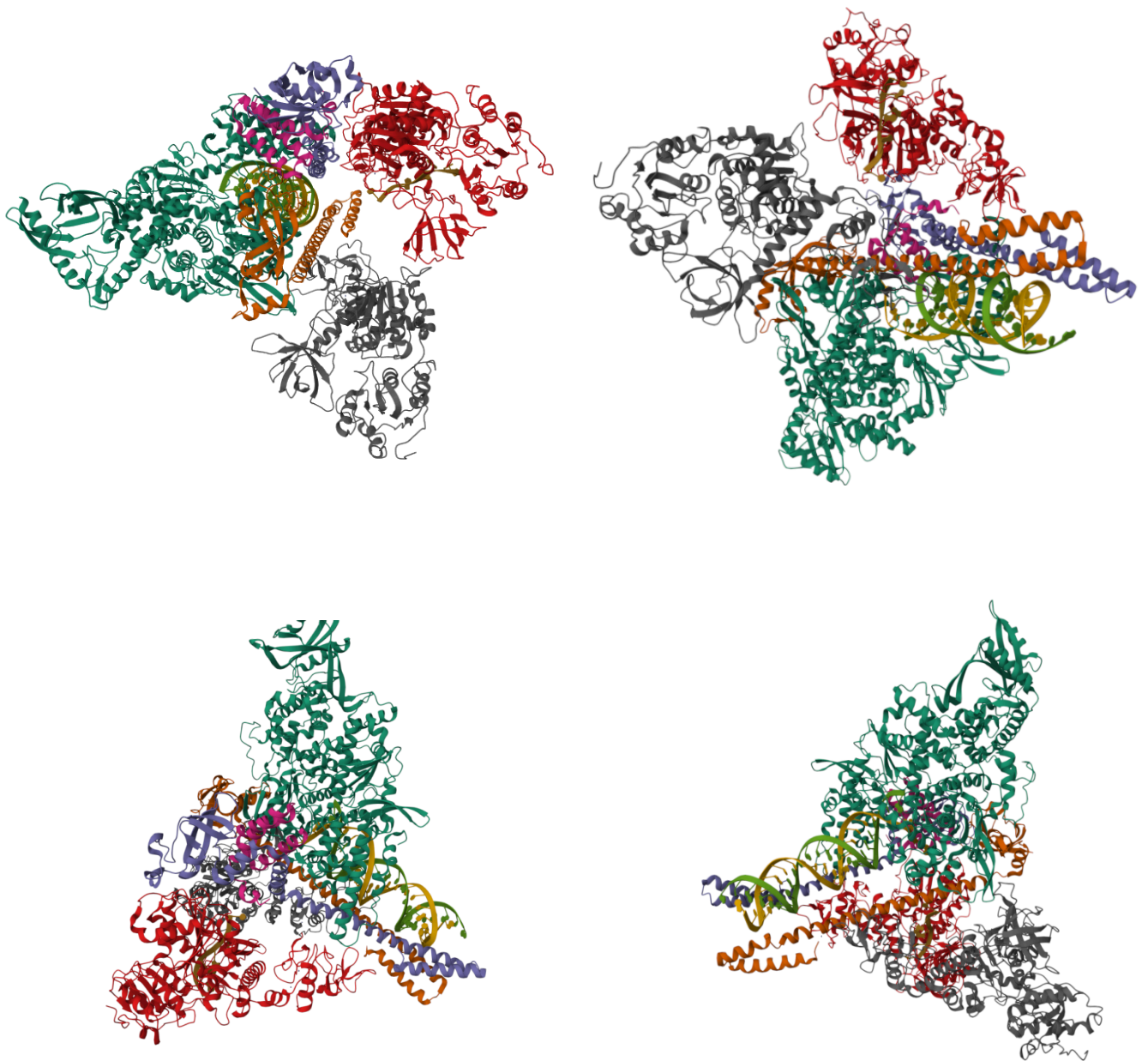


Figura 4. Complexo de Replicação e Transcrição do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica do RTC de SARS-CoV-2. RdRp Nsp12 (ciano), dímero de Primase Nsp8 (lilás e laranja), Cofator Nsp7 (rosa), Helicase Nsp13 (cinza e vermelho), dsRNA (verde e amarelo). ExoN-N7-MTase Nsp14, 2'-O-MTase Nsp16 e o estimulador destas, Nsp10, não são mostrados. (PDBID 7CXN, <https://doi.org/10.2210/pdb7CXN/pdb>).

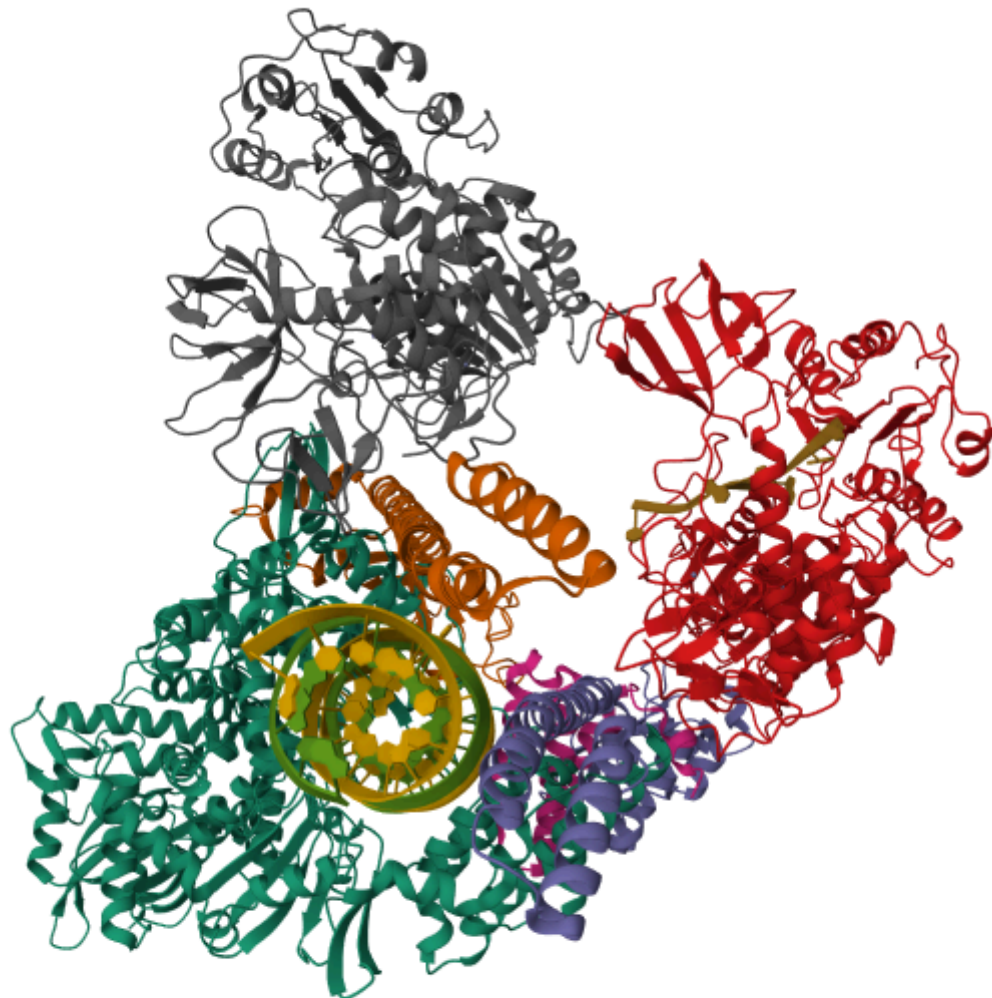


Figura 5. RTC e replicação do RNA do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica do RTC de SARS-CoV-2. RdRp Nsp12 (ciano), dímero de Primase Nsp8 (lilás e laranja), Cofator Nsp7 (rosa), Helicase Nsp13 (cinza e vermelho), dsRNA (verde e amarelo). ExoN-N7-MTase Nsp14, 2'-O-MTase Nsp16 e o estimulador destas, Nsp10, não são mostrados. (PDBID 7CXN, <https://doi.org/10.2210/pdb7CXN/pdb>).

1.5 Proteínas do SARS-CoV-2

Vários grupos de pesquisa concentraram-se em estudar a função e a estrutura das proteínas do SARS-CoV-2 tanto experimentalmente (resoluções por cristalografia de raios X e microscopia eletrônica criogênica) quanto utilizando modelos de estrutura computadorizada (CSM) de bioinformática. Estes levantamentos subsidiaram e ainda dão suporte às pesquisas sobre interação de

proteínas virais com mecanismos do hospedeiro e à busca por medicamentos contra infecção viral (Tu et al., 2020).

De maneira resumida por Gorkhali e colaboradores (2021), sabe-se que o genoma de SARS-CoV-2 codifica 16 proteínas não estruturais (Nsps), 4 estruturais e 8 acessórias. As Nsps são liberadas após a expressão e clivagem de uma ou duas poliproteínas (pp1a ou pp1ab) por duas dessas Nps que são proteases virais (PLpro e 3CLpro). As demais Nsps auxiliam na formação das vesículas de membrana duplas (DMVs) e compõem o complexo de replicação e transcrição (RTC) proporcionando um ambiente favorável e otimizando a replicação. Estas Nsps conseguem controlar a tradução e os mecanismos imunológicos do hospedeiro. A RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e a exoribonuclease (ExoN) polimerizam e revisam o RNA viral recém sintetizado, minimizando a taxa de mutação. O capeamento deste RNA é realizado com ajuda de uma helicase (Hel), duas metiltransferases (2'-O-MTase e N7-MTase) e seu fator. As proteínas estruturais traduzidas de RNAs subgenômicos (sgRNAs) contemplam o receptor viral (S Spike), o protetor do gRNA viral formando um nucleocapsídeo (N) e os integrantes do envelope viral (E e M). As proteínas virais acessórias também são produto da tradução de RNAs subgenômicos e participam da montagem e saída de novos vírions, além de possuírem possíveis funções imunomoduladoras.

Dados depositados no Banco de dados de proteínas (RCSB PDBID, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank) somados à levantamentos bibliográficos sobre as características estruturais e funcionais de SARS-CoV-2 estão resumidas a seguir (Arya et al., 2021; Gorkhali et.al, 2021; V'kovski et al., 2021; Yadav et al., 2021; Mielech et al., 2014):

- Nsp1 (180 aminoácidos) - Fator de virulência - PDBID 7K3N (Figura 6). Interage com a subunidade ribossômica 40S através da inserção de seu domínio C-terminal na entrada do canal de mRNA, obstruindo a ligação do mRNA do hospedeiro. Induz a clivagem endonucleolítica próximo à região 5'UTR do mRNAs do hospedeiro direcionando-os para degradação. Isto resulta na inibição da tradução de proteínas do hospedeiro e otimização da expressão de proteínas virais. Esta degradação não ocorre com os RNAs virais graças à presença da sequência líder na extremidade 5'. Auxilia na evasão da resposta imune inata e garante a expressão eficiente de proteínas

virais. A degradação de mRNA celular inibe a sinalização de IFN-1. A taxa de mutação de Nsp1 é menor que 0,01 para todos os resíduos de aminoácido (Vilar e Isom, 2021).



Figura 6. Nsp1 do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica do Fator de virulência Nsp1 (PDBID 7K3N, <https://doi.org/10.2210/pdb7K3N/pdb>).

- Nsp2 (638 aminoácidos) - Proteína associada ao endossomo - PDBID 7MSW (Figura 7). Apesar da sua função não ser completamente conhecida, sabe-se que Nsp2 interage com proteínas da biogênese mitocondrial (PHB1 e 2) e que se associa aos endossomos do hospedeiro, restringindo estes ambientes à replicação viral. Pode estar envolvida na regulação das atividades de Nsp1 e Nsp3. A taxa de mutação de Nsp1 é superior à 0,01 em cinco resíduos (Vilar e Isom, 2021).



Figura 7. Nsp2 do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica da Proteína associada ao endossomo Nsp2 (PDBID 7MSW, <https://doi.org/10.2210/pdb7MSW/pdb>).

- Nsp3 (1945 aminoácidos) - PLpro/Protease semelhante à papaína - Cortador de proteínas - PDBID 6W9C (Figura 8 - trímero). É uma cisteína protease com tríade catalítica cisteína, histidina e ácido aspártico. Contém dois domínios transmembranas liberados das poliproteínas pelo seu próprio domínio protease semelhante à papaína. A PLpro utiliza uma ou duas de suas unidades para fazer o processamento de três locais na região Nsp1-Nsp4 e libera Nsp1, Nsp2, Nsp3 e o terminal amino de Nsp4 das poliproteínas. Pode efetuar modificações pós-traducionais das proteínas do hospedeiro bloqueando a resposta imune inata, promovendo a expressão de citocinas. Remove as marcações de proteínas antigas (desubiquitinação e delSG15zação) encaminhadas para degradação e interage com proteínas do hospedeiro, alterando o balanço de proteínas na célula o que resulta numa diminuição da resposta celular contra o vírus e maior sobrevivência viral. O sítio de clivagem consiste em LXGG*X onde a enzima reconhece uma região leucina ligada à qualquer aminoácido ligado à duas glicínias e rompe a ligação peptídica entre uma glicina e qualquer aminoácido. A taxa de mutação de Nsp3 é de 0,075 em três resíduos e 0,01 em outros sete resíduos (Vilar e Isom, 2021).

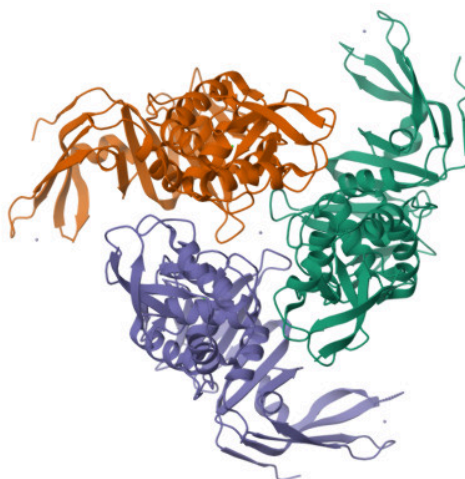


Figura 8. Nsp3 do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica do trímero de PLpro/Protease semelhante à papaína (PDBID 6W9C, <https://doi.org/10.2210/pdb6W9C/pdb>). Monômeros de PLpro (ciano, lilás e laranja).

- Nsp4 (500 aminoácidos) - Âncora molecular - Sem estrutura depositada no PDBID. A predição estrutural por bioinformática indica a existência de quatro domínios transmembranares, com ambos terminais projetados para o lado citoplasmático da membrana e três regiões de alça. Juntamente com Nsp3 e Nsp6, ajuda a construir as DMVs e ancorar o RTC nessas membranas. A taxa de mutação de Nsp4 é superior a 0,01 em apenas um resíduo (Vilar e Isom, 2021).
- Nsp5 (306 aminoácidos) - 3CLpro/Mpro/Protease principal/Protease semelhante à quimiotripsina - PDBID 6LU7 (Figura 9 - dímero). É uma cisteína protease cuja dimerização é essencial para sua atividade catalítica na clivagem das regiões central e C-terminal das poliproteínas virais para liberação e maturação das Nsps. Possui três domínios, cujo sítio ativo consiste numa díade catalítica CysHis (Cys145 e His41) localizada na lacuna entre os domínios I e II. Esta protease faz autoclivagem para se ativar e então clivar sete ou onze sítios da pp1a ou pp1ab liberando o terminal carboxilo de Nsp4 e as proteínas Nsp5 a Nsp16 (Replicase). O sítio de clivagem consiste em Q*(S/A/G) onde a enzima rompe a ligação peptídica entre uma glutamina e um pequeno aminoácido (serina, alanina ou glicina). A taxa de mutação de Nsp5 está entre 0,01 e 0,02 em cinco resíduos (Vilar e Isom, 2021).

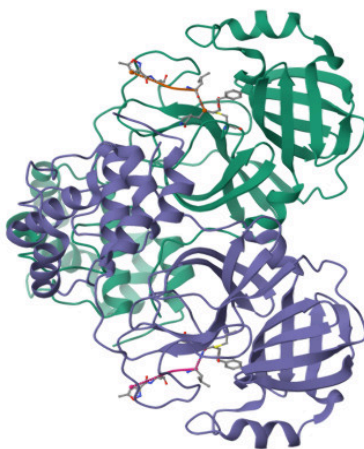


Figura 9. Nsp5 do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica do dímero de 3CLpro/Protease semelhante à quimiotripsina (PDB 6LU7, <https://doi.org/10.2210/pdb6LU7/pdb>) Monômeros de 3CLpro (ciano e lilás).

- Nsp6 (290 aminoácidos) - Fabricante de vesículas de membranas duplas - Sem estrutura depositada no PDBID. Compreende seis hélices transmembranas localizadas no RE da célula hospedeira na predição estrutural por bioinformática. Das 16 Nsps, apenas Nsp3, Nsp4 e Nsp6 possuem domínios transmembrana e por isso elas são necessárias para formação das DMVs. A Nsp6 expressa isoladamente promove somente a proliferação da membrana, induzindo a formação de vesículas perinucleares. Parece imprescindível a expressão de Nsp3 para a completa formação de DMVs, já que não houve formação de DMVs em células que só co-expressaram Nsp4. A taxa de mutação de Nsp6 é superior à 0,01 em seis resíduos (Vilar e Isom, 2021).
- Nsp7 (83 aminoácidos) - Assistente da copiadora - PDBID 7LHQ (Figura 10). Forma estrutura anelar hexadecamerica com oito unidades de Nsp8 e circundam o dsRNA. A taxa de mutação de Nsp7 é superior à 0,01 em apenas um resíduo (Vilar e Isom, 2021).

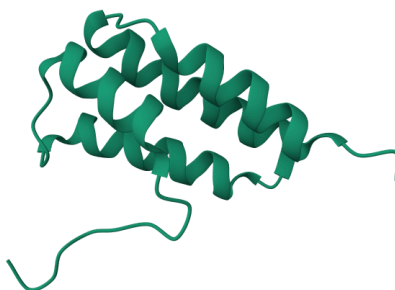


Figura 10. Nsp7 do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica da Assistente de copiadora Nsp7 (PDBID 7LHQ, <https://doi.org/10.2210/pdb7LHQ/pdb>).

- Nsp8 (198 aminoácidos) - Primase/Iniciador - PDBID 7DCD (Figura 11 - complexo com Nsp7). Forma estrutura anelar hexadecamerica com oito unidades de Nsp7, circundando o dsRNA na forma de uma estrutura semelhante a um cilindro com canal central ligado à RdRp. Pode iniciar a replicação pela capacidade de sintetizar RNA de novo com baixa fidelidade em modelos de ssRNA. Aparentemente não houve mutações em Nsp8 (Vilar e Isom, 2021).

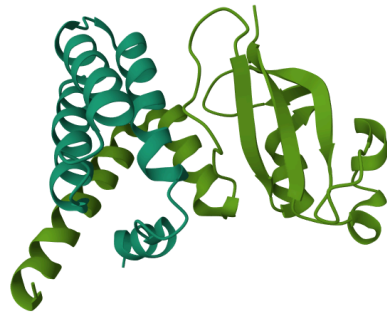


Figura 11. Nsp8 do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica do complexo da Primase Nsp8 com a Assistente de copiadora Nsp7 (PDBID 7DCD, <https://doi.org/10.2210/pdb7DCD/pdb>). Nsp7 (ciano) e Nsp8 (verde).

- Nsp9 (113 aminoácidos) - Ligante do RNA - PDBID 6WXD (Figura 12 - dímero). Se liga ao RNA simples fita e pode alterar o comportamento da Nsp8. A taxa de mutação de Nsp9 é superior à 0,01 em apenas um resíduo (Vilar e Isom, 2021).

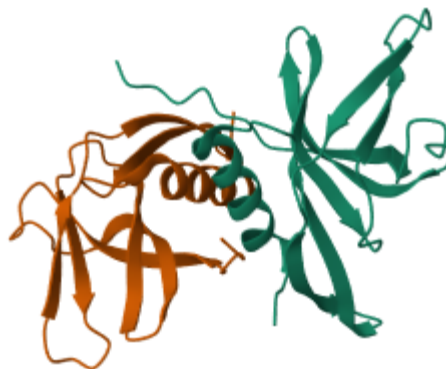


Figura 12. Nsp9 do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica do dímero do Ligante do RNA Primase Nsp8 (PDBID 6WXD, <https://doi.org/10.2210/pdb6WXD/pdb>). Monômeros de Nsp9 (laranja e ciano).

- Nsp10 (139 aminoácidos) - Estimuladora de metiltransferase - PDBID 6WVN (Figura 13) (complexo com Nsp16 em ciano). Interage e estimula Nsp16 na atividade metiltransferase (MTase) dependente de S-adenosil-L-metionina (SAM) para metilar a ribose 2'-O que compõe o *cap* 1 dos RNAs virais e auxilia a fuga dos receptores celulares inatos. Nenhum dos resíduos de Nsp10 teve taxa de mutação superior à 0,01 (Vilar e Isom, 2021).

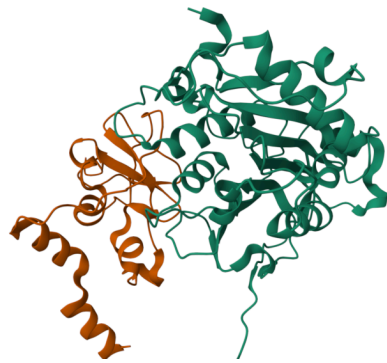


Figura 13. Nsp10 do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica do complexo da estimuladora de metiltransferase com 2'-O-MTase/Metiltransferase Nsp16 (PDBID 6WVN, <https://doi.org/10.2210/pdb6WVN/pdb>). Nsp10 (laranja) e Nsp16 (ciano).

- Nsp11 (13 aminoácidos) - Sem estrutura depositada no PDBID. É idêntica ao primeiro segmento de Nsp12 e sua função é desconhecida.
- Nsp12 (923 aminoácidos) - RdRp/RNA Polimerase dependente de RNA - PDBID 6YYT (Figura 14 - complexo com RNA, dímero de Nsp8 e Nsp7). Consiste na unidade essencial de polimerização da Replicase em associação com seus cofatores Nsp7 e Nsp8. A interação Nsp12 com o heterodímero Nsp7-Nsp8 pode facilitar a interação da polimerase com outros componentes para formação do RTC, essenciais para a atividade de polimerização. A taxa de mutação de Nsp12 é superior à 0,01 em seis resíduos (Vilar e Isom, 2021).

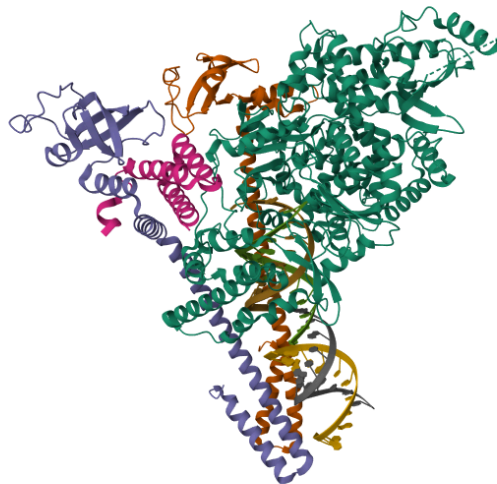


Figura 14. Nsp12 do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica do complexo da RdRp/RNA Polimerase dependente de RNA Nps12 com o dímero da Primase Nsp8 mais a Assistente da copiadora Nsp7 com dsRNA. (PDBID 6YYT, <https://doi.org/10.2210/pdb6YYT/pdb>). Nsp12 (ciano), dímero de Nsp8 (laranja e lilás), Nsp7 (rosa) e dsRNA (verde, amarelo, marrom e cinza)

- Nsp13 (601 aminoácidos) - Helicase e 5' trifosfatase - PDBID 7NNG (Figura 15). Separa dsRNA com polaridade 5'-3' desenrolando o ácido nucleico e ainda auxilia no capeamento de mRNA por sua atividade NTPase. A taxa de mutação de Nsp13 é superior à 0,01 em cinco resíduos (Vilar e Isom, 2021).

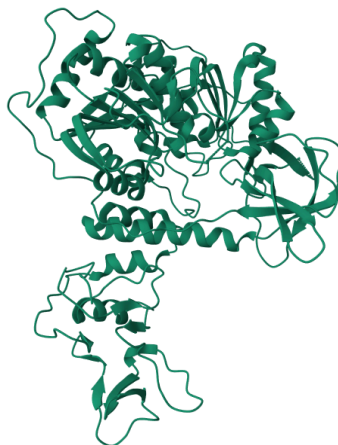


Figura 15. Nsp13 do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica da Helicase e 5' trifosfatase Nsp13 (PDBID 7NNG, <https://doi.org/10.2210/pdb7NNG/pdb>)..

- Nsp14 (527 aminoácidos) - Revisora ExoN-N7-MTase/3'-5' exoribonuclease e N7-metiltransferase - PDBID 7QIF (Figura 16). Tem um domínio de exoribonuclease no N-terminal (ExoN) e um domínio Guanosina-N7-metiltransferase (N7-MTase) dependente de S-adenosil metionina (SAM) no C-terminal. O domínio ExoN tem papel de revisão do RNA viral recém sintetizado, o que evita a mutagênese letal viral. O fato de ExoN ser crucial para a viabilidade de SARS-CoV-2 nos leva a crer que esta enzima desempenhe uma função adicional essencial somada à importante função de revisão que aumenta a fidelidade de replicação viral. A revisão confere ainda resistência de análogos de nucleosídeos virais, aumentando a virulência, evasão imune, recombinação e evolução viral. Já o domínio N7-MTase participa do capeamento do RNA viral recém sintetizado através da metilação do nitrogênio 7 do conjunto β -N9 glicosídico do GMP (*cap 0*) utilizando o doador de metila S-adenosil-L-metionina (SAM). A taxa de mutação de Nsp14 é superior à 0,01 em dois resíduos (Vilar e Isom, 2021).



Figura 16. Nsp14 do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica da Revisora ExoN-N7-MTase/3'-5'exoribonuclease-N7-metiltransferase Nsp14 de SARS-CoV-2. (PDBID 7QIF, <https://doi.org/10.2210/pdb7QIF/pdb>).

- Nsp15 (346 aminoácidos) - NendoU/Endonuclease - PDBID 7RB0 (Figura 17 - hexâmero em laranja, amarelo, rosa, verde, azul e ciano ou dois trímeros em laranja e ciano). Forma dímeros e trímeros que se organizam em hexâmeros. Tem o domínio catalítico C-terminal dependente de manganês específico para 3' de uridinas (família EndoU). Esta enzima cliva poliuridinas do terminal 5' da fita negativa do RNA viral visto que estas sequências são reconhecidas por receptores celulares de defesa como Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs). Assim, a atividade da endorribonuclease pode auxiliar o vírus a escapar do sistema imune. A taxa de mutação de Nsp15 é superior à 0,01 em quatro resíduos (Vilar e Isom, 2021).

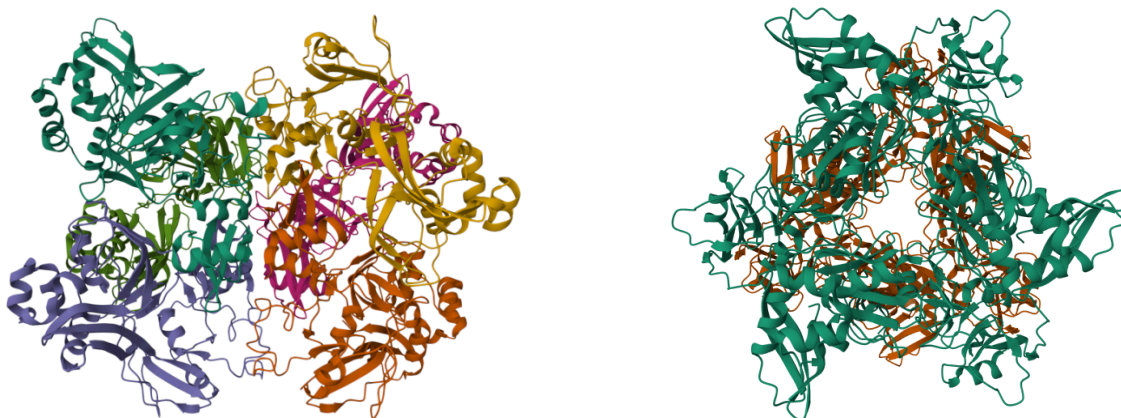


Figura 17. Nsp15 do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica do hexâmero da NendoU/Endonuclease Nsp15 (PDBID 7RB0, <https://doi.org/10.2210/pdb7RB0/pdb>). Monômeros de Nsp15 (laranja, amarelo, rosa, verde, azul e ciano) e dois trimeros (laranja e ciano).

- Nsp16 (298 aminoácidos) - 2'-O-MTase/Metiltransferase (2'-O) - PDBID 6WVN (Figura 18 - complexo com Nsp10). Participa do processo de capeamento do RNA viral por metilar o segundo carbono da ribose (2'-O) do primeiro nucleotídeo da cadeia recém sintetizada (*cap* 1) utilizando Nsp10 como cofator e S-adenosil-L-metionina (SAM) como doador de metila. Estudos com outros coronavírus indicam que Nsp10 auxilia a ligação de Nsp16 ao RNA coberto por SAM.

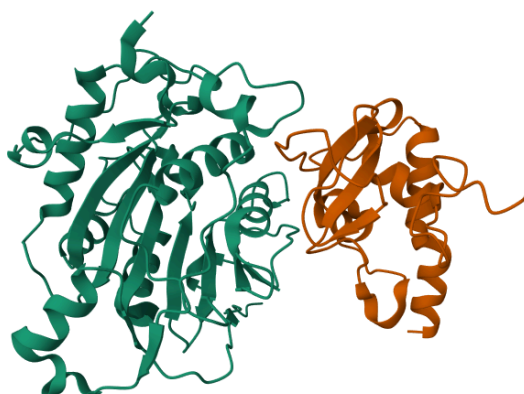


Figura 18. Nsp16 do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica do complexo da 2'-O-MTase/Metiltransferase (2'-O) Nsp16 com a Estimuladora de metiltransferase Nsp10 (PDBID 6WVN, <https://doi.org/10.2210/pdb6WVN/pdb>). Nsp16 (ciano) Nsp10s (laranja).

- ORF2 (1273 aminoácidos) - Spike/S - PDBID 7ZH1 (Figura 19 - trímtero). Glicoproteína organizada em homotrímeros ancorados no envelope que se projetam da superfície viral dando a característica de coroa, inspiração para o nome coronavírus. Por ficar exposta na superfície do vírus, a Spike é importante alvo de medicamentos e anticorpos de neutralização. É responsável pela ancoragem viral a um receptor da célula hospedeira e medeia a fusão entre o envelope viral e a membrana celular hospedeira para permitir a entrada viral. A Spike é dividida em subunidades S1, com o domínio de ligação RBD aos receptores celulares hACE2; e S2 compõem a maquinaria de fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira. A região de clivagem S1/S2 pode ser clivada por proteases do hospedeiro como a serina protease transmembrana tipo 2 (TMPRSS2), catepsinas ou furina em SARS-CoV-2, uma inovação entre os Coronavírus. Este sítio de furina pode ter aumentado a transmissibilidade, patogenicidade e tropismo tecidual deste vírus. A taxa de mutação de Spike foi a mais frequente, sendo superior à 0,02 em três resíduos (Vilar e Isom, 2021).

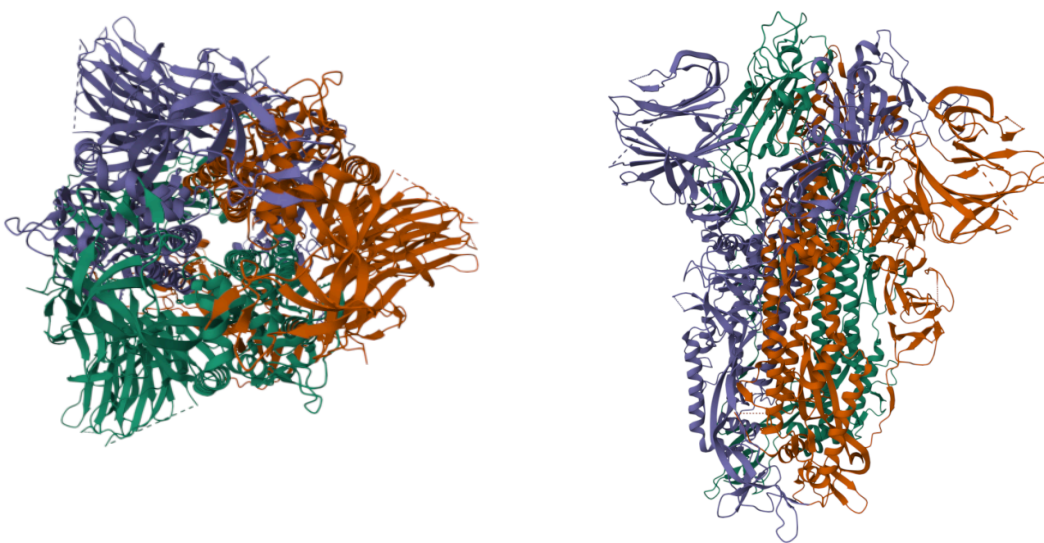


Figura 19. ORF2 Spike do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica do trímtero de Spike ORF2 de SARS-CoV-2. PDBID 7ZW1. Monômeros de Spike (ciano, azul e laranja).

- ORF3a (275 aminoácidos) - Perfurador/Canal iônico - PDBID 6XDC (Figura 20 - dímero). Interage com as proteínas S, M e E e presume-se que cria buracos na membrana da célula hospedeira para fuga do vírus. Pode causar ativação de NF-kappaB (fator nuclear kappa B) e JNK, aumentando a atividade da interleucina 8 (IL-8) e do Ligante 5 de quimiocina CC (CCL5).. Estudos *in vitro* indicam que 3a pode regular a expressão de fibrinogênio, induzir apoptose e ativar o inflamassoma. A taxa de mutação de 3a é frequente, sendo superior à 0,01 em nove resíduos (Vilar e Isom, 2021).

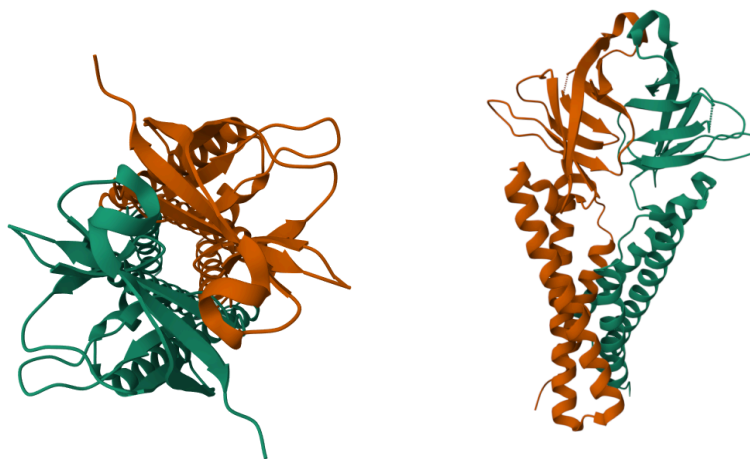


Figura 20. ORF3a do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica do dímero de Perfurador/Canal iônico (PDBID 6XDC, <https://doi.org/10.2210/pdb6XDC/pdb>). Monômeros de ORF3a (ciano e laranja).

- ORF3d (151 aminoácidos) - Modulador imunológico - Sem estrutura depositada no PDBID. Não se sabe ao certo se há expressão desta proteína já que a ORD3d sobrepõe a sequência da ORF3a. Pode induzir apoptose e necrose, dificultando a resposta imune inata antiviral. Em estudos *in vitro*, a resposta antiviral do interferon tipo I reduzida pode estar associada à expressão da 3d.
- ORF4 (75 aminoácidos) - E/Envelope - Sem estrutura depositada no PDBID. Interage com a proteína M para compor o envelope viral. Possui um domínio hidrofóbico transmembrana (TMD) e forma um canal iônico (homo-oligomerização) na membrana viral. A montagem da proteína E ocorre principalmente no RE e Complexo de Golgi, onde ela sofre modificações pós-traducionais que vão direcionar seu tráfego e suas interações com a

proteína M no ERGIC . Não há resíduos com taxa de mutação superior a 0,01 (Vilar e Isom, 2021).

- ORF5 (222 aminoácidos) - M/Membrana - PDBID 8CTK (Figura 21 - dímero). Possui três domínios transmembrana e desempenha papel crucial na montagem do envelope viral através das interações MN, MM e MS. Determina a formação do centro organizador da montagem e morfogênese viral. A proteína M é glicosilada no aparelho aparelho de Golgi e interage com a proteína N associada ao gRNA no ERGIC, ativando e regulando a montagem viral. Não há resíduos com taxa de mutação superior a 0,01 (Vilar e Isom, 2021).

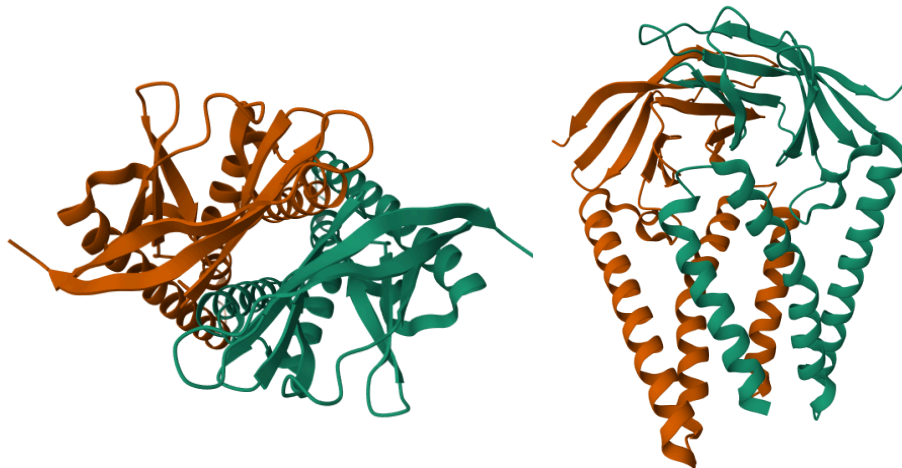


Figura 21. ORF5 Membrana do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica do dímero de Membrana ORF5 (PDBID 8CTK <https://doi.org/10.2210/pdb8CTK/pdb>). Monômeros de ORF5 (ciano e laranja).

- ORF6 (61 aminoácidos) - Antagonista de Interferon do tipo 1 - Sem estrutura depositada no PDBID. Bloqueia a transmissão de sinais da célula infectada ao sistema imunológico e inativa algumas proteínas envolvidas no combate viral. Antagoniza a sinalização do interferon do hospedeiro pela inibição da exportação nuclear de mRNA. Não há resíduos com taxa de mutação superior a 0,01 (Vilar e Isom, 2021).
- ORF7a (121 aminoácidos) - Evasor imune - PDBID 7CI3 (Figura 22 - ectodomínio). Induz apoptose, inibe a síntese proteica celular e interrompe o

ciclo celular em G0/G1. A taxa de mutação de 7a é superior à 0,01 em apenas um resíduo (Vilar e Isom, 2021).



Figura 22. ORF7a do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica de Evasor imune ORF7a (PDBID 7CI3, <https://doi.org/10.2210/pdb7CI3/pdb>).

- ORF7b (43 aminoácidos) - Evasor imune - Sem estrutura depositada no PDBID. É uma proteína de membrana integral e sobrepõe um trecho da ORF7a. A taxa de mutação de 7b é superior à 0,01 em apenas um resíduo (Vilar e Isom, 2021).
- ORF8 (121 aminoácidos) - Modulador imunológico - PDBID 7JX6 (Figura 23 - dímero). Melhora a replicação viral e interage com proteínas estruturais. A taxa de mutação de 8 é superior à 0,01 em dois resíduos (Vilar e Isom, 2021).

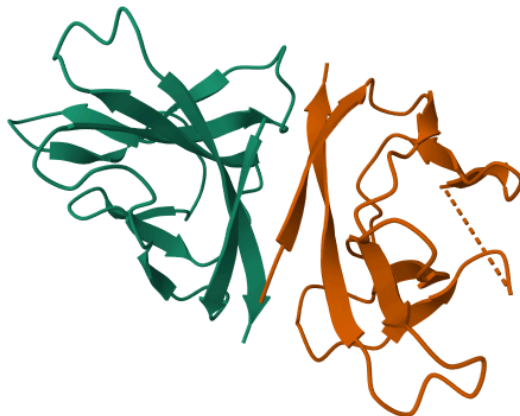


Figura 23. ORF8 do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica do dímero de Modulador imunológico ORF8 (PDBID 7JX6, <https://doi.org/10.2210/pdb7JX6/pdb>). Monômeros de ORF8 (ciano e laranja).

- ORF9a (419 aminoácidos) - Nucleocapsídeo/N - PDBID 8FD5 (Figura 24). Compõe o complexo ribonucleoproteína helicoidal (RNP) para o empacotamento do gRNA, mantendo-o estável. O capsídeo se forma através do reconhecimento da proteína do gRNA seguido de auto-associação de oligômeros para formação do capsídeo. Possivelmente está associada à desregulação do ciclo celular do hospedeiro por regular negativamente fatores relacionados à fase S. Inibe a produção de IFN e regula positivamente a expressão da proteína ciclooxygenase-2 (COX2) pró-inflamatória. A taxa de mutação de Nucleocapsídeo é muito frequente, sendo superior ao limite 0,01 em dezesseis resíduos, ficando abaixo somente da taxa de mutação da Spike (Vilar e Isom, 2021).

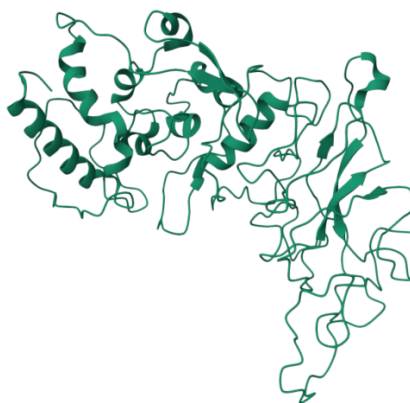


Figura 24. ORF9a Nucleocapsídeo do SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica da Nucleocapsídeo ORF9a (PDBID 8FD5, <https://doi.org/10.2210/pdb8FD5/pdb>).

- ORF14 (97 aminoácidos) - Proteína N interna - PDBID 6Z4U (Figura 25 - dímero). Interage com algumas proteínas não estruturais e é incorporado aos vírions maduros. Antagonista de IFN do tipo 1. A taxa de mutação de 14 é superior à 0,01 em dois resíduos (Vilar e Isom, 2021).

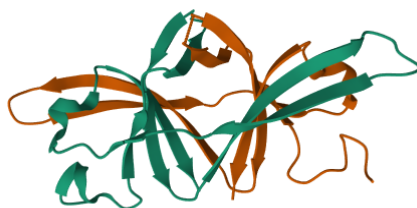


Figura 25. ORF14 N interna SARS-CoV-2. Representação da estrutura cristalográfica do dímero de Proteína N interna ORF14 (PDB 6Z4U, <https://doi.org/10.2210/pdb6Z4U/pdb>). Monômeros de ORF14 (ciano e laranja).

- ORF10 (38 aminoácidos) - Proteína Misteriosa - Sem estrutura depositada no PDBID. A análise de bioinformática indica a presença de pelo menos um domínio transmembrana e parece interagir com a maquinaria de ubiquitinação do hospedeiro e, portanto, tem potencial papel imunomodulador.

1.6 COVID-19: Doença do Coronavírus SARS-CoV-2

Em uma revisão abrangente, Kaye e colaboradores (2021) apontaram que as características clínicas da COVID-19 tem variado entre indivíduos assintomáticos, sintomáticos com evoluções benignas e óbito nas primeiras 3 semanas do início dos sintomas, que compreendem leucopenia, linfopenia, fadiga, febre, tosse seca e anosmia. Outros autores incluem falta de ar, dor muscular, confusão mental, dor de cabeça, dor de garganta, rinorreia, dor no peito, diarreia, náusea, vômito, calafrios, expectoração, hemoptise, dispneia, pneumonia bilateral, anorexia e níveis elevados de citocinas no plasma (Wang et al., 2020; Jin et al., 2020). Ainda segundo Kaye e colaboradores (2021), 80% dos casos são leves e autolimitados, envolvendo as vias aéreas superiores e pulmões de maneira discreta. A infecção grave acomete 15% dos casos e afeta extensamente os pulmões, resultando em dispnéia, taquipnéia, hipoxemia com lesão miocárdica e sequelas cardiovasculares. Já a infecção crítica (5% restantes), resulta em insuficiência respiratória, choque séptico e disfunção múltipla de órgãos, devido à complicações da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e coagulopatia intravascular disseminada (CID). A SDRA decorre do dano alveolar difuso, deposição de fibrina, aumento da permeabilidade das células epiteliais e endoteliais, acúmulo de fluído no interstício pulmonar, bloqueio das trocas gasosas, hipóxia e insuficiência respiratória (Ranucci et al., 2020).

As complicações observadas pela infecção por SARS-CoV-2 poderiam estar relacionadas à utilização do receptor ACE2 para a invasão viral somada à expressão de ACE2 no epitélio pulmonar, coração, íleo, esôfago, rim e bexiga, como componente do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) na manutenção da homeostase da pressão arterial (Zou et al., 2020; de Souza et al., 2020). A ocupação de ACE2 para invasão viral aumentaria o efeito vasoconstritor, pró-inflamatório e pró-fibrose

da Angiotensina II, o que poderia intensificar o processo inflamatório alveolar (Delpino e Quarleri, 2020). Há maior nível de expressão de ACE2 nos pulmões de asiáticos, homens (3 vezes mais), adultos, fumantes, diabéticos e obesos, o que poderia influenciar na susceptibilidade à COVID-19 (Beyerstedt; Casaro; Rangel, 2021).

A maior parte dos doentes encaminhados para as unidades de terapia intensiva infectados pelo vírus tem insuficiência respiratória hipoxêmica aguda e necessita de suporte respiratório através de intubação endotraqueal e ventilação mecânica invasiva (Grasseli et al., 2020). Destes pacientes críticos, a taxa de letalidade geral estimada é de 2%, podendo alcançar 49% (Kaye et al., 2021).

Comorbidades como hipertensão, Diabetes Mellitus, doença cardiovascular, doença pulmonar e doença cerebrovascular aumentam o risco de óbito e, por acumular tais comorbidades, idosos tem maior risco de evolução desfavorável na COVID-19 (Kaye et al., 2021). Alguns estudos apontam que a maior prevalência destas comorbidades em homens está relacionada ao fumo e consumo de álcool e que, conseqüentemente, são os mais acometidos por COVID-19 grave. Em crianças há menor liberação das citocinas pró-inflamatórias que governam as funções dos neutrófilos no microambiente pulmonar, o que explicaria a menor ocorrência de casos graves em pacientes pediátricos (Yuki; Fujiogi; Koutsogiannaki, 2020).

Os estudos realizados com SARS-CoV revelaram que pacientes convalescentes podem apresentar anticorpos neutralizantes direcionados à proteína Spike até 24 meses após a infecção, o que estimulou estudos quanto ao uso de vacinas com proteína S recombinante (He et al., 2006). Estudos com SARS-CoV-2 indicam a existência de resposta imune em pacientes infectados, com produção de imunoglobulinas M e G (IgM e IgG) após 14 dias de infecção (To et al., 2020; Zhao et al., 2020).

Até março de 2023, a *Food and Drug Administration* (FDA USA) havia concedido aprovação para comercialização de três antivirais: Remdesivir (Veklury), Nirmatrelvir/Ritonavir (Paxlovid), Molnupiravir (Lagevrio) para tratamento de infecções leves a moderadas por COVID-19 em adultos de risco (Werbel et al., 2023). Entretanto, existem diversos estudos, inclusive de reposicionamento de fármacos e triagem *in silico*, que sugerem potenciais agentes terapêuticos para tratamento de pacientes com COVID-19, incluindo agentes antivirais (favipiravir, ribavirina, interferons, lopinavir, arbidol, ACE2 solúvel recombinante, nitazoxanida,

mesilato de camostat, entre outros), agentes biológicos (anticorpos monoclonais, plasma convalescente, soros hiperimunes, entre outros), agentes anti-inflamatórios (corticosteróides, fluvoxamina, anakinra, imunoglobulina intravenosa, inibidores de JAK, colchicina, entre outros) e agentes fitoterápicos (*Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*, *Fructus forsythia*, *Lonicerae Japonicae Flos*, *Saposhnikoviae Radix*) (Panahi, et al., 2023, Vaz et al., 2023).

O manejo clínico para COVID-19 envolve prevenção da infecção, medidas de controle e suporte, como oxigenoterapia, ventilação mecânica, uso de anti-inflamatórios e anticoagulantes quando há indicação médica (Santos et al., 2021). Atualmente, a principal preocupação das entidades de saúde é desenvolver metodologias para auxiliar o processo de recuperação dos sobreviventes que relataram pelo menos um sintoma como efeito residual da COVID-19. Em janeiro do presente ano, a Organização Mundial da Saúde lançou um guia com diretrizes de orientação para médicos e responsáveis por programas de saúde pública no desenvolvimento de programas de reabilitação e modelos de implementação de cuidados (WHO, 2023d).

1.7 Variantes

O surgimento de variantes de SARS-CoV-2 podem decorrer após a recombinação genética entre duas linhagens virais, coinfectando o mesmo hospedeiro ou mutações no RNA viral resultantes da edição do RNA do hospedeiro como parte da resposta imune celular. As mutações devidas à erro na síntese de RNA durante a replicação são menos prováveis em coronavírus devido a presença de revisão da ExoN Nsp14 viral (Santos et al., 2021)

Diversas mutações em SARS-CoV-2 foram relatadas resultando em maior poder de infectividade, estabilidade e transmissibilidade viral. As cepas que abrigam as mutações podem ter maior virulência, melhor capacidade de escapar do sistema imunológico e serem menos sensíveis ao soro convalescente, o que resulta no aumento da gravidade e taxa de mortalidade da doença. Estas variantes interferem nas estratégias vacinais e terapêuticas atualmente disponíveis (Hu et al., 2020; Korber et al., 2020; Li et al., 2020). Tais mutações também podem ser resultado das

replicações contínuas em infecções crônicas permitindo mudanças evolutivas para o vírus (Markov et al., 2023).

A primeira variante foi detectada no Reino Unido em fevereiro de 2020 e apresentava uma substituição D614G no gene da proteína Spike, o que aumentou sua infecciosidade e transmissibilidade. Em poucos meses esta variante substituiu o vírus original Wuhan-Hu-1 e se tornou a forma dominante mundial. Sete meses depois (setembro de 2020), também no Reino Unido, foi detectada uma descendente da D614G com 17 mutações que foi chamada de B.1.1.7 (20I/501Y.V1). As principais mutações de B.1.1.7 ocorreram novamente no gene da proteína Spike com as substituições N501Y no domínio RBD, P681H próxima ao sítio de clivagem da furina e a deleção do aminoácido 69/70 que alterou a conformação da proteína S. Estas mudanças aumentaram em torno de 40% a transmissibilidade do SARS-CoV-2, aumentando o risco de óbito, com espalhamento desta variante em 90 países. Em outubro de 2020, foi detectada na Índia a linhagem B.1.617 ou P4 (B.1.617.1, B.1.617.2 e B.1.617.3), com a substituição L452R no gene da proteína S. Esta variante se espalhou por mais de 50 países e parece ser descendente da linhagem P1 detectada em Manaus/AM três meses depois. Em dezembro de 2020, detectaram a variante denominada B.1.351 (20H/501Y.V2) na África do Sul, com as substituições K417N, E484K e N501Y no gene da proteína S, sem a deleção observada em B.1.1.7. Essa variante se espalhou em 50 países e foi associada a maior carga viral no indivíduo sem alterações na gravidade da doença. Já em janeiro de 2021, detectaram a variante denominada P1 (20J/501Y.V3) em brasileiros no aeroporto do Japão. As mutações também no gene da proteína S eram as substituições K417T, E484K e N501Y, que indicaram afetar a transmissibilidade e perfil antigênico, causando um surto de Manaus/AM que resultou num colapso no sistema de saúde do Estado. Esta variante ainda foi detectada em 25 países. Outras variantes detectadas apenas nos Estados Unidos da América foram a B.1.427 e B.1.429 com as substituições L452R que aumentaram o poder de adesão viral, e B.1.526 com as substituições E484K e S477N (Lamkiewicz et al., 2023; de Souza et al., 2022).

A dinâmica de transição de variantes difere substancialmente entre locais podendo estar associada às taxas de vacinação, taxas de infecção anteriores, tempo desde o último pico de COVID-19, demografia da população e número de co-

variantes circulantes em competição com a variante emergente (Beesley et al., 2023).

As variantes de preocupação (VOCs) declaradas pela Organização Mundial da Saúde foram *Alfa* (B.1.1.7), *Beta* (B.1.351), *Delta* (B.1.617.2), *Gama* (P.1) e *Ômicron* (B.1.1.529) com suas subvariantes BA.1, BA.1.1, BA.2 e BA.3 (Bazargan; Elahi; Esmaeilzadeh, 2022). O aumento da aptidão destas variantes é o resultado de uma interação complexa da biologia do vírus no contexto da alteração da imunidade humana devido à vacinação e à infecção anterior. Há evidências que mutações nas demais proteínas estruturais possam ter aumentado a infecciosidade das variantes, como o par de substituições R203K e G204R no gene da proteína N observadas na linhagem B.1.1 (Alpha, Gamma e Omicron), R203M na Delta e T205I na Beta. Substituições nos genes das proteínas M e E em BA.1 (Ômicron) reduzem a entrada celular de partículas virais, sendo compensadas por substituições adicionais nos genes das proteínas S e N. Os impactos das mutações nos genes que codificam as das proteínas não estruturais e acessórias não foi elucidado (Carabelli et al., 2023).

1.8 Resposta imune antiviral

A resposta imune contra o vírus conta com mecanismos da resposta imune inata e adaptativa, a saber (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012):

- Inata: 1- inibição da infecção por produção de interferons do tipo I (IFN-I: IFN-alfa e IFN-beta) por células infectadas e células dendríticas do tipo plasmocitóide, desencadeada pelo reconhecimento do material genético viral no citoplasma por receptores de reconhecimento de padrões (*Toll Like Receptors*, *NOD Like Receptors* e *RIG Like Receptors*) da célula hospedeira, transcrição de IRF (fatores reguladores de interferon) e IFN. Este IFN-I age autócrina e paracrinamente na indução do estado antiviral, ativando mecanismos apoptóticos ou que bloqueiam a replicação viral, como a inibição de síntese proteica viral (eIF2-alfa), degradação do RNA viral (RNAase L), inibição da montagem do vírus (Mx GTPases), entre outros. O IFN-I reduz a expressão superficial do receptor de esfingosina 1-fosfato (S1PR) nos linfócitos, estimulando sua saída dos órgãos linfóides;

2- morte de células infectadas mediada pelas células *Natural Killer* (NK), que as reconhecem pelo bloqueio de expressão da molécula de histocompatibilidade de classe I (MHC I), utilizado como mecanismo de escape ao reconhecimento de linfócitos T citotóxicos (CTL CD8⁺);

3- IFN aumenta a citotoxicidade das células NK e CTL CD8⁺ e estimula a diferenciação de CTL virgens e linfócitos T auxiliares (*helper* CD4⁺) do subtipo T_H1 e liberação de IFN-gama. Esta, por sua vez, promove a ativação de macrófagos, recrutamento e ativação de leucócitos a fim de eliminar microrganismos fagocitados, além de estimular a expressão de MHC, o que auxilia na identificação de células infectadas;

4- Os macrófagos residentes ou recrutados da corrente sanguínea como monócitos tem receptores para padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou danos (DAMPs) como TLR, NLR e RLR e podem detectar tanto a presença do vírus como de fragmentos da célula infectada lisada. Estes macrófagos ativam o fator de transcrição NF-kappaB para produção e liberação do Fator de Necrose Tumoral (TNF) que induz apoptose em células infectadas, ativação de células endoteliais (inflamação e coagulação), ativação de neutrófilos, ativação dos mecanismos de febre no hipotálamo, síntese de proteínas de fase aguda no fígado, que desencadeiam opsonização, quimiotaxia e ativação do Sistema Complemento. Estes macrófagos também expressam Interleucina 1 (IL-1), com efeitos semelhantes à TNF, como ativação de células endoteliais, febre e produção de proteínas de fase aguda e Interleucina 6 (IL-6) que além da síntese de proteínas de fase aguda, também estimula a proliferação de linfócitos B para produção de anticorpos.

- Adaptativa: 1- neutralização do vírus em fase extracelular (tanto na infecção inicial quanto na liberação de novas partículas virais de células infectadas), impedindo a disseminação para novas células. Os anticorpos também fazem a opsonização das partículas virais para facilitar a identificação e eliminação por fagócitos, direcionando ainda o sistema complemento para a lise direta do vírus com envoltório lipídico.

2- eliminação por morte de células infectadas por LT CD8⁺ efetoras que reconhecem peptídeos virais citosólicos gerados no ciclo viral e apresentados

por MHC I pela célula infectada. A diferenciação e proliferação dos CTL CD8⁺ contra peptídeos virais decorre da apresentação de antígenos virais por macrófagos e células dendríticas (células apresentadoras de antígenos - APC) infectadas (MHC de classe I) ou após fagocitose de outras células infectadas (MHC de classe II), denominada apresentação cruzada. Os CTL CD8⁺ estimulam as células infectadas a ativar nucleases para degradação do genoma viral e secreção de IFN-gama para ativação de fagócitos. O IFN-gama produzido por CTL CD4⁺ age nos linfócitos B para produção de IgG que participa da eliminação do vírus por fagócitos.

1.8.1 Resposta imune anti-SARS-CoV-2

Dados da revisão abrangente realizada por Morris et al. (2020) detalham que, após a invasão e replicação do SARS-CoV-2 nas células do trato respiratório superior, ocorre a migração do vírus para o epitélio pulmonar. No microambiente pulmonar, além da secreção de IFN-I nas células invadidas, há ativação dos demais mecanismos da resposta imune inata pela morte por apoptose e piroptose de pneumócitos do tipo 2, levando à ativação de macrófagos alveolares. A maioria destes macrófagos apresentam o perfil de resposta M1 e secretam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias a fim de desencadear ativação de células endoteliais vasculares, recrutamento de neutrófilos citotóxicos e plaquetas para os alvéolos.

O endotélio e plaquetas ativados pelos macrófagos inflamatórios promovem o aumento da produção e liberação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (ROS) que, somadas às demais alterações, levam ao desenvolvimento de coagulopatia, sepse, tempestade de citocinas e Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) (Tay et al., 2020). O ambiente pró-coagulante e pró-inflamatório é intensificado com a ativação dos neutrófilos citotóxicos pulmonares pelas plaquetas ativadas que juntos formam os complexos plaquetas-neutrófilos (PNCs), resultando na quimiotaxia de novos neutrófilos para o espaço alveolar. A piroptose de células respiratórias e lise de células imunes expõem histonas, DNA mitocondrial e a proteína de cromatina HMGB1, resultando na diminuição da capacidade de fagocitose de macrófagos e indução da tempestade de citocinas, necroinflamação e linfopenia (Morris et al., 2020).

Meidaninikjeh e colaboradores (2021) ressaltam o papel dos monócitos (célula imune inata circulante) e macrófagos (células teciduais derivadas de monócitos) na resposta hiperinflamatória como principal mecanismo de patogenicidade do SARS-CoV-2, visto que estas células são os mais importantes mecanismos inatos de defesa contra infecções virais, sendo as principais células envolvidas com tempestade de citocinas e efeitos associados na COVID-19. Os autores destacam que macrófagos e monócitos poderiam estar envolvidos em reações hipersensíveis e exacerbadas, resultando em danos no tecido pulmonar e distúrbio respiratório.

As células dendríticas e os macrófagos intersticiais e alveolares são responsáveis pela fagocitose e eliminação de partículas estranhas no pulmão, além de secretar citocinas indutoras de inflamação, reparação tecidual e desencadear respostas imunes adaptativas indispensáveis para o desenvolvimento de linfócitos T CD8⁺ de memória residentes (TRM) no pulmão, através da apresentação de antígenos virais associados ao MHC I (Dunbar et al., 2020).

Os monócitos circulantes nos vasos periféricos, fundamentais para controle das infecções, apresentam alterada quimiotaxia e deficiente produção de citocinas na COVID-19, resultando na perda de controle da resposta nesses pacientes (Pence, 2020). As contagens absoluta e relativa de monócitos sanguíneos variam de acordo com a fase da doença, assim como sua morfologia e perfil de citocinas secretadas, não havendo um consenso quanto ao assunto (Meidaninikjeh et al., 2021). Essas células também apresentam mudanças na função e fenótipo características tanto do envelhecimento quanto do agravamento da doença, o que sugere um potencial mecanismo de aumento da morbidade e mortalidade em idosos (Pence, 2020).

Há uma relação importante entre o agravamento da doença e a tempestade de citocinas que incluem IL-1, IL-2, IL-7, IL-9, IL-10, IL-17, TNF-alfa, GM-CSF, IFN-gamma, MCP1, MIP1A, MIP1B, CXCL10 e CXCL8, sendo que grande parte destes mediadores são secretados por monócitos e macrófagos, envolvendo essas células diretamente na imunopatologia da doença (Jamilloux et al., 2020).

Análises de interação revelaram que no mínimo 8 proteínas de SARS-CoV-2 interferem na sinalização de IFN-I (Lei, 2020; Xia, 2020). Em cultivo celular, as proteínas codificadas por SARS-CoV-2 antagonizaram a resposta imune inata através diminuição da indução de citocinas (Nsp1, Nsp3, Nsp5, Nsp10, ORF6 e ORF7b), diminuição da sinalização (Nsp1, Nsp5, Nsp13, Nsp14, ORF6 e ORF7b) e

autofagia (Nsp15, ORF3a, E, M e ORF7a) (Hayn et al., 2021). Um estudo mais abrangente com as proteínas de SARS-CoV-2, revelou 332 interações proteína-proteína de alta confiança entre SARS-CoV-2 e proteínas humanas, muitas destas conectadas à vários processos biológicos, incluindo tráfego de proteínas, tradução, transcrição e regulação da ubiquitinação. No mesmo trabalho foram identificados 69 compostos, incluindo medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA USA), que visam impedir essas interações para o controle dos danos causados pela COVID-19 (Gordon et al., 2020).

Sabendo que os macrófagos são os principais atores na tempestade de citocinas e que esta resposta hiperinflamatória pode ser inicializada após a detecção de PAMPs virais tanto no início da infecção, quanto na sua disseminação e lise de células hospedeira, é interessante avaliar a resposta celular em cultura de macrófagos à exposição a diferentes proteínas de SARS-CoV-2. Através da avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa, IL-1 e IL-6) será possível sugerir quais principais porções virais que desencadeiam a resposta imune desenfreada, com o objetivo de estabelecer alvos promissores para o desenvolvimento de vacinas e possíveis tratamentos.

Em levantamento realizado por Guo e colaboradores (2020) a fim de traçar um perfil de resposta humoral precoce para diagnosticar a COVID-19 que viabilizasse a detecção dos indivíduos falso-negativos determinados pela PCR quantitativa (qPCR), foi possível estabelecer uma possível cinética temporal da produção de anticorpos contra SARS-CoV-2. Utilizando o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) com a proteína N recombinante, o grupo demonstrou que a duração média da detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 é de 5 dias para IgM e IgA, enquanto IgG foi detectada 14 dias após o início dos sintomas, com taxas positivas de 85,4%, 92,7% e 77,9%, respectivamente. Este estudo demonstrou que os níveis de anticorpos IgM eram elevados em pacientes sintomáticos e subclínicos 5 dias após o início da doença, o que corrobora que teste sorológico para detecção deste anticorpo pelo ensaio de ELISA possa ser combinado com qPCR para aumentar a sensibilidade de detecção.

1.9 Diagnóstico da COVID-19

Em artigo revisado em 24 de agosto de 2020, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) preconizava a testagem de pessoas que apresentavam sintomas de COVID-19, pessoas que tiveram contato próximo (menos de 2 metros por pelo menos 15 minutos) com alguém com COVID-19 confirmado e pessoas encaminhadas pelo serviços de saúde (McFee, 2020):

- Realização de testes virais para confirmação de infecção aguda utilizando amostra de trato urinário superior (saliva, esfregaços nasais ou orais) ou inferior (escarro, lavado broncoalveolar ou do tubo endotraqueal) para detecção de ácido nucleico do SARS-CoV-2 através de RT-PCR (Reação de Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase) ou de antígeno viral. Os testes virais são considerados diagnóstico quando realizados em indivíduos com sintomas consistentes de COVID-19, indivíduos assintomáticos com exposição recente conhecida ou suspeita, para controlar a transmissão ou determinar a resolução para viabilizar a interrupção do isolamento social. Para vigilância em saúde, os testes virais devem ser realizados entre indivíduos assintomáticos sem exposição conhecida ou suspeita para identificação precoce e detectar pontos críticos de transmissão (instalações de cuidados de longa duração, por exemplo) ou caracterizar tendências de espalhamento da doença.
- Realização de testes sorológicos para confirmação de infecção prévia (mesmo sem nenhuma apresentação de sintomas) com o SARS-CoV-2 assim como confirmação de doença tardia ou síndrome pós infecciosa (por exemplo, síndrome inflamatória multissistêmica em crianças) utilizando sangue total ou soro sanguíneo para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2. Estes testes podem falhar na detecção de infecção recente, já que a produção de anticorpos é variável e pode levar de 1 a 3 semanas após a infecção. A apresentação de anticorpos, independente dos níveis titulados, não tem correlação com imunidade.

Ainda neste documento, o CDC traz diretrizes quanto à coleta, armazenamento e envio e processamento de amostras relacionados à otimização da detecção do alvo quanto às normas de biossegurança.

A principal agência reguladora ligada ao departamento de saúde do governo norte-americano FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou uma lista de testes moleculares para detecção de ácidos nucleicos e testes de antígenos para diagnóstico de COVID-19 vendidos como testes de balcão sem receita médica (OTC, *Over the Counter Test*) virtual ou localmente. A coleta do material biológico (cotonete nasal médio) e a realização do teste de antígeno pode ser efetuado pelo próprio indivíduo em casa ou por profissional de saúde habilitado e corretamente paramentado (com equipamento de proteção individual incluindo proteção respiratória e ocular) nos locais de venda. Para a realização dos testes moleculares, existe a necessidade de leitura de resultados por aparelhos específicos disponibilizados nos respectivos pontos comerciais (FDA, 2023).

1.10 Vacinas contra SARS-CoV-2

A escala do impacto humanitário e econômico observados na pandemia de SARS-CoV-2, impulsionaram as pesquisas globais para o desenvolvimento, no tempo recorde de um ano, da primeira vacina Pfizer-BioNTech autorizada pela FDA USA em dezembro de 2020. Este processo levava em média dez anos até a conclusão dos ensaios clínicos, ou cinco anos para protocolos de aprovação para doenças graves como Ebola. Este episódio ressalta a necessidade de revisão dos paradigmas do desenvolvimento de vacinas, processos regulatórios e aumento da capacidade de produção (Le et al., 2020).

O sucesso do rápido desenvolvimento da vacina contra COVID-19 pode estar associado à gama de plataformas tecnológicas utilizadas, incluindo ácido nucléico, (DNA e RNA), partículas semelhantes a vírus, peptídeo, vetor viral replicante e não replicante, proteína recombinante, abordagens de vírus vivos atenuados ou inativados, somada aos conhecimentos acumulados das epidemias de MERS-CoV e SARS-CoV, ao rápido mapeamento e depósito de sequências genômicas virais em bancos de acesso público e a formação de Coligações para Inovações na Preparação para Epidemia (CEPI) (Le et al., 2020).

Embora as vacinas aprovadas demonstrem uma relevante eficiência contra hospitalização e morte, há necessidade da continuidade no processo de melhoria

das vacinas visto a extensão da duração da pandemia por mais de dois anos e o surgimento de linhagens variantes (Bayani et al., 2023).

Apesar do histórico notável de políticas governamentais bem-sucedidas para vacinação em massa do Brasil coordenadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), o Governo Federal, sob gestão do ex-presidente Jair Bolsonaro (gestão 2019-2022) atrasou inexplicavelmente a distribuição das vacinas contra COVID-19 o que pode ter resultado no aumento do número de óbitos evitáveis decorrentes à doença (Ferreira et al., 2023). A desenvolvedora Pfizer, primeira a receber autorização para comercialização da vacina contra COVID-19 de agências reguladoras internacionais rigorosas, insistiu em negociar as vendas com o governo brasileiro desde julho de 2020. Todavia, o governo brasileiro paralisou as negociações do Ministério da Saúde alegando divergências sobre a quantidade de doses e jurisdição. O ex-presidente também defendeu a desaceleração do processo de aprovação regulatória das vacinas a serem importadas pelo Instituto Butantan em outubro de 2020, como estratégia política para atrasar a disponibilidade do produto patrocinado pelo seu adversário político em São Paulo. Estes atrasos na aquisição e na aprovação regulatória encorajaram os governadores estaduais, Congresso e atores da sociedade a pressionar o Ministério da Saúde a importar milhões de doses da vacina AZ em acordo com a Sinovac, para produção local junto ao Butantan (Da Fonseca et al., 2023). Só então, em 17 de janeiro de 2021, iniciou-se a vacinação de grupos prioritários no Brasil (profissionais de saúde, população idosa, pacientes com comorbidades e outras pessoas com maior vulnerabilidade), implementação seguida de má coordenação e logística no nível federal, o que atrasou e retardou o processo (Ferreira et al., 2023). Nos primeiros seis meses de 2021, o Ministério da Saúde assinou acordos com Pfizer, Janssen e Bharat Biotech (produtora da Covaxin, apesar da falta de transparência nos ensaios clínicos) (Da Fonseca et al., 2023).

Até 2 de junho de 2023, foram administradas um total de 513.329.718 doses de vacinas no Brasil (WHO, 2023b). Atualmente, o Sistema Único de Saúde (SUS) está promovendo o Movimento Nacional pela Vacinação, que visa atualização do esquema vacinal do povo brasileiro e inclui a vacinação contra COVID-19 (Ministério da Saúde, 2023a):

- Crianças de 6 meses a 4 anos, 11 meses e 29 dias de idade: três doses (D1, D2 e D3) com a vacina da Pfizer, com intervalo de 4 semanas após a D1 e 8 semanas após a D2;
- Crianças de 3 anos a 4 anos, 11 meses e 29 dias de idade: duas doses (D1 e D2) com a vacina CoronaVac®, com intervalo de 4 semanas após D1. Recomenda-se reforço 4 meses após a D2, preferencialmente Pfizer e, na indisponibilidade desta, CoronaVac®;
- Crianças de 5 a 11 anos e pessoas de 12 a 17 anos de idade: duas doses (D1 e D2) com a vacina Pfizer ou CoronaVac®. Caso a D1 seja Pfizer, a D2 deve ser aplicada 8 semanas após a D1; caso a D1 seja CoronaVac®, o intervalo para D2 é de 4 semanas. O reforço deve ser dado no mínimo 4 meses após a D2, preferencialmente com a vacina Pfizer ou, na indisponibilidade desta, CoronaVac®;
- Pessoas de 18 a 59 anos de idade: duas doses (D1 e D2) com a vacina Pfizer ou CoronaVac®. Caso a D1 seja Pfizer, a D2 deve ser aplicada 8 semanas após a D1; caso a D1 seja CoronaVac®, o intervalo para D2 é de 4 semanas. O reforço deve ser dado no mínimo 4 meses após a D2, preferencialmente com a vacina Pfizer ou, na indisponibilidade desta, poderá ser utilizado a vacina disponível no momento (AstraZeneca ou Janssen);
- Grupos prioritários (início da campanha em 27 de fevereiro) - pessoas de 60 anos ou mais, pessoas vivendo em instituições de longa permanência e seus trabalhadores, pessoas imunocomprometidas, indígenas, ribeirinhos, quilombolas, pessoas com deficiência permanente a partir de 12 anos, trabalhadores da saúde, gestantes e puérperas, população privada de liberdade (a partir dos 18 anos), adolescentes cumprindo medidas socioeducativas (menores de 18 anos) e funcionários do sistema prisional: três doses (D1, D2 e D3) com as vacinas Astrazeneca, Janssen, Coronavac e Pfizer, com intervalo de 8 semanas após a D2, 8 semanas para a D3 (4 semanas se CoronaVac). O reforço após 4 meses da D3 deve ser realizado com as vacinas bivalentes (atualização publicada em 21/09/2023).

À partir de 25 de abril deste ano, o Ministério da Saúde do Brasil liberou a dose de reforço bivalente contra COVID-19 para a população acima de 18 anos que

tenha recebido ao menos duas doses de vacinas monovalentes (Coronovac, Astrazeneca ou Pfizer) como esquema primário ou recebido previamente qualquer vacina, respeitando o intervalo mínimo de quatro meses da última dose de qualquer reforço monovalente ou última dose do reforço primário (Ministério da Saúde, 2023b; Secretaria de Comunicação Social, 2023).

2 OBJETIVOS

Expressar e purificar diferentes proteínas codificadas pelo genoma do SARS-CoV-2 em sistema heterólogo com a finalidade de avaliar a capacidade de detecção de anticorpos em pacientes convalescentes de COVID-19 e analisar as citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa, IL-1 e IL-6) sintetizadas por macrófagos (linhagem de macrófago de murino J774.1) em cultura após exposição à essas proteínas.

2.1 Objetivos específicos

- A. Clonar os genes de SARS-CoV-2 no vetor de expressão pET28a(+) e validar a clonagem por sequenciamento de DNA;
- B. Realizar a expressão e purificação das proteínas recombinantes solúveis;
- C. Padronizar o Western Blotting e ELISA utilizando as proteínas purificadas;
- D. Avaliar a detecção de anticorpos IgG produzidos após infecção por SARS-CoV-2 através dos métodos de Western Blotting e ELISA utilizando proteínas recombinantes;
- E. Incubar as proteínas recombinantes em cultura de macrófagos e realizar testes de viabilidade celular;
- F. Co-localizar as proteínas inoculadas em cultura celular de macrófagos por imunofluorescência e dosar de citocinas pró-inflamatórias do tipo TNF-alfa, IL-1 e IL-6 produzidas pelas células incubadas por ELISA/PCR;
- G. Realizar análise estatística dos dados, revisão bibliográfica e elaboração da dissertação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Construção de plasmídeos recombinantes

A partir da sequência genômica de SARS-CoV-2 do primeiro paciente diagnosticado com COVID-19 no Brasil (SARS-CoV-2/SP02/human/2020/BRA) (Araújo et al., 2020) e com o auxílio do Dr. Gabriel Oka, Prof. Dr. Germán Gustavo Sgro, Natália Fernanda Bueno, Edgar Enrique Llontop do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Shaker Chuck Farah do IQ-USP, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para amplificação de 23 proteínas (Anexos - Quadro 2 e Tabela 5). O desenho foi realizado para produção das proteínas inteiras e também de fragmentos que excluíssem porções de interação com a membrana plasmática da célula hospedeira visando aumentar as chances de obtenção de proteínas solúveis. Para predição de domínios transmembranares foi utilizado a ferramenta TMHMM - 2.0 *Prediction of transmembrane helices in proteins* (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>). Este desenho foi realizado conforme o modelo sugerido pelo site YangZhangLab da Universidade de Michigan (<https://zhanggroup.org/COVID-19/>) em abril de 2020 relatada por Zhang e colaboradores (2021). As ORF3d, ORF7b e ORF14 foram dispensadas nas construções por corresponderem à sequências contempladas às ORFs que elas estão inseridas. A construção da Nsp11 também foi desconsiderada neste trabalho devido às informações escassas nos bancos de dados consultados. A ORF9a referente a proteína Spike não foi inserida neste projeto por compor um projeto paralelo, devido a complexidade de expressão da proteína solúvel em sistema bacteriano, possivelmente pela presença de glicosilações imprescindíveis para manutenção de seu arranjo estrutural. As construções cNTD (47-177 N-terminal) e cCTD (210-419 C-terminal) da Nucleocapsídeo foram incluídas neste projeto a fim de avaliar a especificidade dos fragmentos desenhados nos testes de WB/ELISA, visto a proteína Nucleocapsídeo de SARS-CoV-2 é a utilizada nos testes sorológicos padronizados (Andreatta-Santos e et al., 2023).

Os fragmentos de DNA foram amplificados por reação em cadeia de polimerase (PCR) a partir do *template* de cDNA de SARS-CoV-2 (GenBank: MT126808 e MT350282), produzido por transcrição reversa e gentilmente cedido pelo Laboratório BSL3+ de Virologia do Departamento de Microbiologia do Instituto

de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, através da Dra. Danielle Bastos Araujo (Araujo et al., 2020). As reações de amplificação dos genes utilizaram a Phusion DNA Polimerase (Thermo Scientific™) com perfil de PCR de 98°C por 30 segundos (desnaturação inicial); 10 ciclos variando temperaturas entre 98°C por 10 segundos (desnaturação), 62°C por 30 segundos (anelamento dos *primers* com o *template*) e 72°C por 30 segundos/kb (extensão do fragmento) e mais 25 ciclos aumentando apenas a temperatura de anelamento para 66°C, com período de extensão final de 15 minutos. Os produtos de PCR e o vetor de clonagem e expressão pET28a(+) (Novagen) foram digeridos com enzimas de restrição (Anexos - Quadro 1) (FastDigest, Thermo Scientific™), analisados para as bandas de interesse em gel de agarose 1% e purificados através de um kit de extração de gel (GeneJET Gel Extraction Kit, Thermo Scientific™). O vetor pET28a(+) (Anexos - Figuras 63 e 64) contém o promotor T7 e um sítio com fusão de seis histidinas. A enzima T4 Ligase (Thermo Scientific™) foi utilizada para a ligação dos produtos ao vetor (proporção de 3:1), realizada por aproximadamente 12 horas a 16°C. As construções foram transformadas em células *E. coli* Stellar (Stellar™ Competent Cells, Takara Bio) e selecionadas para a presença do plasmídeo em placa com 50mM kanamicina (resistência conferida pelo vetor). Os plasmídeos purificados por kit *miniprep* (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo Scientific™ Scientific) de colônias transformantes foram digeridos pelas mesmas enzimas de restrição e separados por eletroforese em gel de agarose para confirmação da clonagem (presença de plasmídeo e inserto). As construções foram encaminhadas para análise por sequenciamento genético.

3.2 Teste de expressão recombinante e lise bacteriana

As construções foram transformadas em células bacterianas quimiocompetentes (*Escherichia coli*) preparadas para transformação via choque térmico para padronização das melhores condições de expressão. As células inicialmente testadas foram BL21 Star™(DE3) (Thermo Scientific™) e BL21(DE3) (New England Biolabs). Os clones sem expressão proteica ou que produziram proteínas que ficaram presas no precipitado bacteriano após lise e centrifugação, resultado da formação de corpos de inclusão durante a expressão heteróloga, foram transformadas em BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Agilent Technologies) e

ArcticExpress (DE3) Competent Cells (Agilent Technologies) como alternativas otimização. Os clones transformantes foram semeados em meio 2XTY com glicose 1% (para evitar vazamento de expressão antes da indução) e antimicrobianos necessários para cada cepa e cultivados por 16 a 18 horas, sob agitação, a 37°C (pré-inóculo). O inóculo foi preparado a partir da transferência de pré-inóculo para novo meio líquido, desta vez sem glicose, em um valor não superior à 10% do volume total do novo inóculo, o qual cresceu até a D.O._{600nm} 0,6 a 0,8, sob agitação, a 37°C. A expressão foi então induzida com adição de 0,5mM de Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) a 37°C sob agitação 4 horas ou 10-13°C por 24 horas para ArcticExpress (DE3). Após indução da expressão, as culturas foram colhidas por centrifugação (4.500xg, 4°C, 15 minutos) e o sedimentado bacteriano submetido à lise celular por sonicação em tampão de lise (TRIS HCl 50mM, NaCl 200mM, Imidazol 20mM, EDTA 1mM, Glicerol 10%, Triton x-100 0,03%, Tween-20 0,03%) em um sonicador Vibracell VCX750 Ultrasonic Cell Disruptor (Sonics, Newton CT), em banho de gelo e sob agitação. As amostras foram centrifugadas (30.000xg, 4°C, 1h) para retirada dos corpos de inclusão e restos celulares. Alíquotas de cada cepa bacteriana foram submetidas a eletroforese em gel de poli-acrilamida (SDS-PAGE) para determinação daquela mais adequada para expressão de proteína e verificação de solubilidade (presença no sobrenadante do lisado após centrifugação). Alíquotas das cepas escolhidas, retiradas do inóculo antes da indução, foram estocadas em 25% glicerol a -80°C para serem utilizadas em ensaios de expressão futuros.

A seleção do pH ideal para os tampões de lise e purificação priorizou o afastamento dos valores do ponto isoelétrico de cada proteína ou peptídeo de interesse, favorecendo sua solubilidade, de acordo com os dados obtidos para cada construção com a ferramenta <http://pfam.xfam.org/> (**Tabela 2**).

Tabela 2. Características das proteínas recombinantes de SARS-CoV-2. PI - Ponto isoelétrico teórico; PM - Peso molecular.

Construção	Proteína	PM (kDa)	PI teórico	pH dos tampões
C3-1341	Protease tipo Papaína N-terminal	153,28	5,23	7,5
C3-1945	Protease tipo Papaína C-terminal	43,19	8,75	7,5
C5	3CL-PRO	36,25	6,52	7,5
C8	Nsp8	24,33	7,80	6,5
C22	ORF8	16,28	6,38	7,5
C23 Full	Nucleocapsídeo	47,95	10,11	7,5
cNTD	Nucleocapsídeo N-terminal	16,84	9,74	7,5
cCTD	Nucleocapsídeo C-terminal	25,63	9,70	7,5

3.3 Expressão e purificação de proteínas recombinantes em larga escala

Utilizando as cepas bacterianas que apresentaram maior expressão das proteínas de interesse solúveis, foram realizadas expressões de 4 litros de 2XTY para cada proteína, com processo de lise e centrifugação estabelecidos nos testes de expressão. A purificação das proteínas solúveis foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (HisTrap™ HP, Cytiva™) previamente equilibrada com tampão A (Quadro 1) e eluídas em 20 volumes de coluna usando o tampão B (Quadro 1) para produção de gradiente de imidazol de 20 mM à 1 M. O imidazol compete com a cauda de histidina, inserida na proteína pelo plasmídeo pET28a(+), pela interação com o níquel da coluna. A eluição da proteína de interesse foi verificada por pico de absorvância ultravioleta a 280 nm gerado pelos resíduos de triptofano presentes na construção. O pico de eluição foi submetido a SDS-PAGE a 15% seguido por coloração com azul de Coomassie para identificar as frações com a proteína de interesse e as mais puras foram submetidas a concentração por centrifugação em filtro concêntrico Millipore (Amicon Ultra-4 4 mL 10 kDa cutoff). A amostra concentrada foi então carregada em uma coluna para purificação por cromatografia de exclusão de tamanho (HiLoad 16/600 Superdex 75 pg, Cytiva™) em tampão GF (Quadro 1). A eluição da proteína foi verificada pela absorvância a 280nm e as amostras contendo a proteína de interesse foram novamente analisadas em géis SDS-PAGE a 15% corado com azul de Coomassie, confirmadas por Western Blotting (WB) anti-HisTag (Monoclonal Anti-polyHistidine-Peroxidase Antibody produced in mouse, Sigma-Aldrich), concentradas e armazenadas a 4°C.

Quadro 1. Composição dos tampões utilizados durante o processo de lise e purificação. Lise - tampão para lise bacteriana; A - tampão para equilíbrio da coluna e amostra para purificação por afinidade em coluna de níquel; B - tampão para gradiente de eluição da amostra para purificação por afinidade em coluna de níquel; GF - tampão para equilíbrio de coluna e eluição de amostra na cromatografia por exclusão de tamanho. O pH dos tampões obedeceu a Tabela 2.

Tampões	Lise	A	B	GF
PBS	X	X	X	X
200mM NaCl	X	X	X	X
1mM EDTA	X	X	X	
20mM Imidazol	X	X		
1M Imidazol			X	
0,03% Tween-20	X			
0,03% Triton x-100	X			
Glicerol 10%	X			

3.4 Amostras e Ética

As amostras de soro sanguíneo fazem parte do Biorrepositório do Projeto “Validação de teste sorológico baseado em plataforma de ELISA para o diagnóstico da Covid-19.” CEP SH.007.2021 (CAAE: 33459120.8.0000.5467) e foram gentilmente cedidas pelo laboratório LDV do ICB-USP sob a responsabilidade do professor Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira através do pesquisador Dr. Roberto Andreatta-Santos. As amostras de sangue humano foram obtidas por punção venosa com *vacutainers* em tubos com ativador de coágulos (Becton Dickinson) e centrifugadas por 10 minutos a 805 xg, de acordo com um protocolo relatado por Andreatta-Santos e colaboradores (2022). O soro sanguíneo foi aliquoteado e inativado a 56°C por 30 min e armazenado a -20°C. Estas amostras totalizam 51 indivíduos positivos e 149 negativos para presença de IgG anti-SARS-CoV-2, inicialmente examinadas com o imunoensaio Elecsys® Anti-SARS-CoV-2 (Elecsys) (Roche Diagnostics) (Andreatta-Santos e et al., 2023).

Todas as amostras testadas neste estudo foram obtidas após consentimento por escrito e estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo sob número de projeto CEP SH.007.2021.

As amostras de soro sanguíneo foram neutralizadas com extrato de *E. coli* (lisados como no processo de expressão de proteínas recombinantes) durante 1h em temperatura ambiente. A diluição padronizada foi 1uL de soro + 100 uL de extrato de bactéria + 889 uL de Tampão, sendo PBST+5% *skim milk* para WB ou Tampão Caseína para a ELISA, agitando levemente a cada 20 minutos. Este procedimento visa diminuir o *background* produzido pelos anticorpos humanos contra as proteínas bacterianas que possam ter sido purificadas junto às proteínas de interesse.

3.5 Western Blotting

O Western Blotting foi primeiramente realizado para a confirmação da purificação das proteínas recombinantes de interesse através da utilização do anticorpo anti-HisTag (Monoclonal Anti-polyHistidine-Peroxidase Antibody produced in mouse, Sigma-Aldrich). Posteriormente, o procedimento foi realizado utilizando

200 amostras de soro humano, sendo 51 positivos e 149 negativos para COVID-19, conforme identificado no Biorrepositório, previamente neutralizadas com extrato de *E.coli*.

A transferência das proteínas separadas em gel de SDS-PAGE para uma membrana de nitrocelulose com poro de 0,2 µm com o sistema Semi-Dry (BioRad), foi realizada utilizando-se do tampão Tris-Metanol (25mM TRIS, 192mM Glicina, 0,1% SDS e 20% Metanol) a 15V por 18 minutos. Após a coloração da membrana com Ponceau S para verificar a qualidade da transferência, marcou-se as bandas de interesse com grafite para confirmação durante a revelação. A membrana foi lavada gentilmente em tampão PBS com adição de Tween-20 0,001% (PBST) para posterior realização do bloqueio em solução PBST+5% *skim milk* por 4 e 12 horas em câmara fria, sob leve agitação, para utilização do anticorpo anti-HisTag e anti-SARS-CoV-2, respectivamente. Essa etapa impede que o anticorpo, que será aplicado em seguida, interaja com a membrana, gerando falsos positivos ou alto *background*, o que compromete a qualidade da imagem obtida. Após bloqueio, incubou-se em câmara fria o anticorpo de interesse em concentração 1:10.000 para anti-HisTag, durante 2 horas, e 1:1.000 para os soros sanguíneos de pacientes, durante 14 a 16 horas. As membranas contendo soros sanguíneos foram lavadas três vezes com PBS-T e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG humano peroxidase (*Anti-Human IgG Fc specific-Peroxidase antibody produced in goat*, Sigma-Aldrich) a 1:5.000 por 2 horas. A revelação foi realizada com o kit de substrato para peroxidase Clarity Western Substrate (BioRad).

3.6 Ensaios de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

A avaliação qualitativa da presença de anticorpos IgG específicos contra proteínas recombinantes de SARS-CoV-2 seguiu o protocolo desenvolvido Kanno e colaboradores (2020). Para sensibilização das microplacas de poliestireno de 96 poços (COSTAR Corning Inc., Nova York, EUA) foram revestidas com 0,44nm das proteínas recombinantes de interesse diluídas em 100µl de tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 por 1h à 37°C. Após três lavagens com PBS-T 0,05% e secagem através de batidas em papel absorvente, realizou-se o bloqueio com 300µl/poço da solução de PBS com lisina e manitol por 3 horas a 37°C. Após cinco lavagens PBS-T 0,05% para retirada da solução de bloqueio. Os soros sanguíneos

previamente neutralizados com extrato bacteriano, foram diluídos em 1:100 em tampão amostra contendo tampão Tris-NaCl, caseína e EDTA. Com as placas completamente secas, foram distribuídos 100µl/poço de soro diluído, incubadas a 37°C por 1h. Os poços foram então lavados cinco vezes com PBS-T 0,05% e incubados com anticorpo secundário anti-IgG humano peroxidase (*Anti-Human IgG Fc specific-Peroxidase antibody produced in goat*, Sigma-Aldrich) a 1:5.000 por 2h. Os poços foram novamente lavados cinco vezes com PBS-T 0,05%. Com as placas secas, foi adicionado 100µl/poço do revelador TMB (Tetrametilbenzidina) (Aldrich™ Sigma, EUA) incubado por 10min ao abrigo da luz. A reação foi interrompida pela adição de 100µL/poço de H₂SO₄ a 0,5 M. A leitura da DO foi medida a 450nm em um leitor de placas (Labsystems Multiscan, ThermoScientific, EUA).

3.7 Cultivo celular e teste de viabilidade

As células da linhagem J774.1 (macrófago derivado de sarcoma do retículo de camundongo da linhagem BALB/c) foram obtidas banco de nitrogênio do Laboratório de Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação (LaNEFI) do Departamento de Farmacologia do ICB USP. As células foram cultivadas em DMEM (Vitrocell) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Vitrocell) e antibióticos (0,5% estreptomicina/penicilina; Vitrocell), mantidas em estufa úmida sob temperatura de 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. As células foram mantidas em garrafas de 75cm² (Sarstedt) e as passagens foram realizadas semanalmente, conforme confluência alcançada.

Antes da avaliação do efeito pró-inflamatório das proteínas nas células em cultura é importante determinar seus efeitos citotóxicos, considerando que a expressão de citocinas inflamatórias pode ser afetada em células com a viabilidade comprometida. O ensaio de viabilidade celular por MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazólio) baseia-se na conversão deste composto em cristais de formazan por células viáveis, determinando a presença de atividade mitocondrial. Esse ensaio foi realizado em placas de 96 poços contendo aproximadamente 3 x 10⁴ células/poço mantidas em estufa úmida sob temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, o meio foi aspirado e foram adicionados 10µL/poço das diferentes concentrações (2000nM, 1000nM, 200nM, 40nM e 8nM) de proteínas recombinantes C5, C8 e C23 em tampão e 90uL/poço do mesmo meio

de cultivo. As proteínas cNTD e cCTD não foram utilizadas por estarem representadas pela construção C23. As células foram mantidas em estufa úmida sob temperatura de 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas. Como controles foram utilizadas células mantidas em 90uL de meio de cultivo adicionado de 10uL de tampão das proteínas. Os ensaios de MTT foram realizados conforme Mosmann (1983) em quadruplicata com quantificação através de espectrometria com valores de absorbância a 570 nm.

3.8 Análise dos Dados

Para análise da capacidade de detecção dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 no soro de pacientes convalescentes das diferentes proteínas recombinantes, foi elaborada uma curva ROC (Receiver Operating Characteristic Curve) para avaliar a relação de sensibilidade e especificidade com diferentes pontos de corte.

A análise de viabilidade celular foi realizada através das curvas concentração-resposta obtidas nos ensaios calculadas pelo modelo de regressão não linear (inclinação variável, quatro parâmetros) mínimos quadrados. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram adotados valores para $p < 0,05$ como estatisticamente significantes. Todas as análises apresentadas a seguir foram realizadas com o software GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Construção de plasmídeos recombinantes

A maior parte dos genes foram corretamente amplificados utilizando a temperatura de anelamento e tempo de extensão sugeridos nos manuais dos fabricantes dos iniciadores e polimerase (Figuras 26-28). Não encontramos as condições favoráveis para amplificação do gene da C3 Protease semelhante à papaína. Como alternativa, amplificaram-se suas frações N-terminal (resíduos 1-1341) e C-terminal (resíduos 1588-1945) separadamente (Figura 28). A C16 refere-se a ORF9a da proteína Spike, que faz parte de um projeto paralelo, devido à

complexidade de expressão desta proteína em bactérias por conta da rica glicosilação presente na proteína de pico.

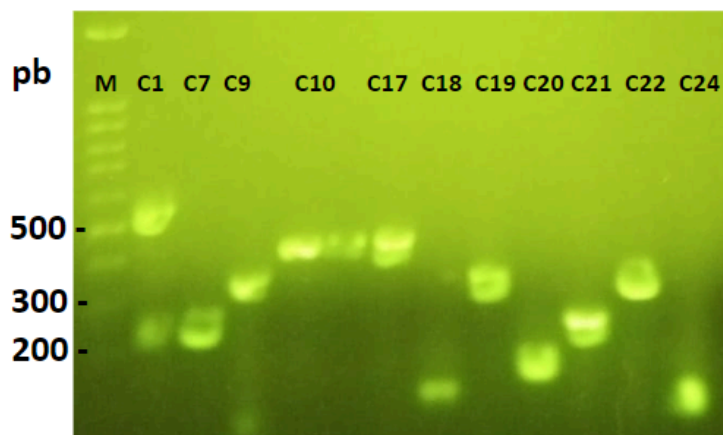


Figura 26. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR (C1, 7, 9, 10, 17-22 e 24). Amplificação dos genes de interesse C1 (543pb), C7 (252pb), C9 (342pb), C10 (420pb) em duplicidade, C17 (438pb), C18 (108pb), C19 (345pb), C20 (186pb), C21 (258pb), C22 (366pb) e C24 (117pb). TAE Agarose Gel 1,5%. Marcador de peso molecular utilizado: 1kb Ladder Plus (Sinapse Biotecnologia).

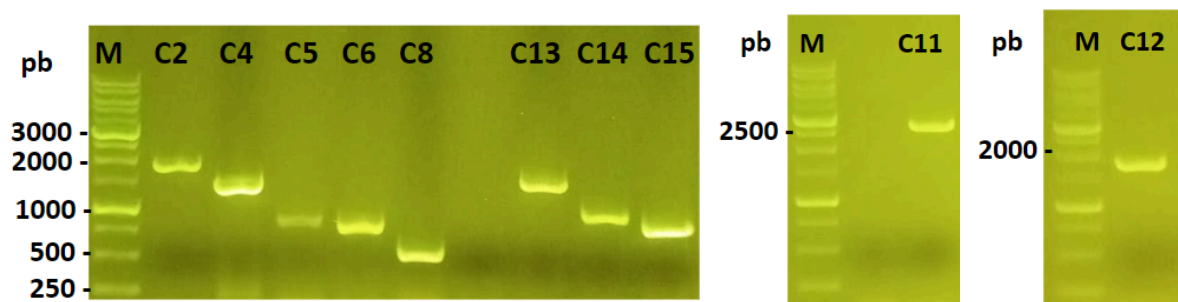


Figura 27. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR (C2, 4-6, 8, 11-15). Amplificação dos genes de interesse C2 (1917pb), C4 (1503pb), C5 (921pb), C6 (873pb), C8 (597pb), C13 (1584pb), C14 (1041pb), C15 (897pb) e C11 (2772pb) e C12 (1806pb). TAE Agarose Gel 1,0%. Marcador de peso molecular utilizado: 1kb Ladder Plus (Sinapse Biotecnologia).

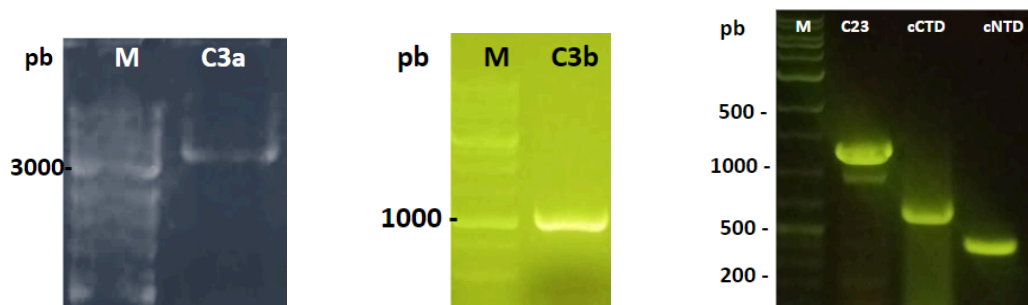


Figura 28. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR (C3, 23, cCTD e cNTD). Amplificação dos genes de interesse C3a 1-1341 (4026pb), C3b 1588-1945 (1077pb), C23 (1257pb), cCTD (627pb) e cNTD (210pb). TAE Agarose Gel 1,0%. Marcador de peso molecular utilizado: 1kb Ladder Plus (Sinapse Biotecnologia).

Após clonagem no plasmídeo pET28a(+), foram escolhidas três colônias de cada construção para o teste com enzimas de restrição. Entretanto, devido à dificuldade de visualização no gel de agarose à 1 e 1,5% das bandas do insertos menores, decidiu-se extrair os vetores destas colônias e encaminhá-los para sequenciamento genético pelo Método de Sanger no Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências USP, utilizando-se os *primers* Forward e Reverse do T7 promoter do vetor pET28a(+). A análise do sequenciamento revelou que o vetor pET28a(+) não foi digerido completamente ou recircularizou sem o inserto, visto que 47 das 69 construções tem alinhamento com a sequência interna do vetor entre as enzimas *NdeI* e *NotI*, que deveria ter sido retirada no ensaio de digestão do vetor vazio (Figura 29). As construções digeridas com *NotI* e *BamHI* tiveram sucesso na clonagem, o que indicou falha na atividade de *NdeI*. As construções das C3-1341, C3-1945, C5 , C8, C22, C23, cNTD e cCTD seguiram para teste de expressão proteica nas diferentes cepas de expressão de *E. coli*.

```

APB-97      CGCGGCCNTATGGGTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-89      CGGGGCCCATGRRTAGSATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-64      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-68      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-80      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-25      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-102     CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-29      CGGCAGCCATATGGMTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-44      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-43      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-41      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-27      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-53      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-76      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-37      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-45      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-70      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-39      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-52      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-66      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-108     CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-74      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-103     CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-92      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-72      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-94      CGGCAGCCATATGGTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-55      CGGCAGCCATATGGTAGSATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-96      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-101     CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-98      CGGCAGCCATATGGMTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-60      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-62      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-54      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-93      CGGCAG-AAAAAGGGKGGGATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-78      CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-88      GCGGACCCYATATGGTAMATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-84      CGGCAGCCATATGRRTAGMATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-56      CGGCAGCCATATGGTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-107     CGGCAGCCATATGGTAMATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-100     CGGCAGCCATATGGTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-82      CGGCAGCCATATGGTAMATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-95      GCGGACAGAAAAGGGTAAAAATGAGTGGKGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-99      CGGCAGCCATATGGTAMATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-91      CGGCAG-TAAATGGRRRATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-86      CGGCAGTTAAAGAAAAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-90      CGGCAGCATACRAGRKAAMATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
APB-57      CGGCAGCCATATAGAGAAAGTATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG
pet28a     CGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGA  GCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGACTCAGACACCACCACCACCACCCTGAGATCCGG

```

Figura 29. Alinhamento das construções sequenciadas. É possível observar a presença do sítio não digerido entre as enzimas NdeI (CATATG) e NotI (GCGGCCGC) o vetor pET28a(+), comprovando o insucesso da clonagem (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

4.2 Teste de expressão recombinante e lise bacteriana

A identificação da expressão das proteínas recombinantes foi realizada através da visualização das bandas mais intensas e com peso molecular aproximado do esperado nos géis SDS-PAGE corados com azul de Coomassie (Figuras 30 a 36).

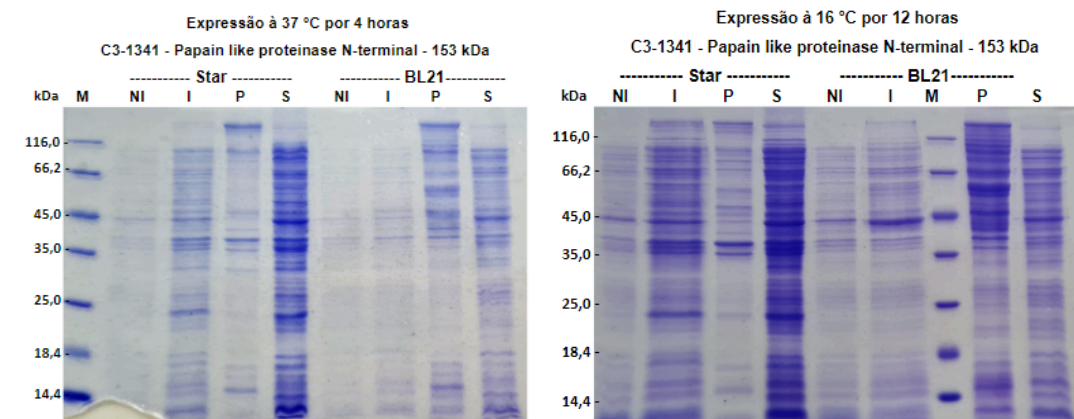


Figura 30. Teste de expressão de C3-1341. Protease semelhante à papaína N-terminal em *E. coli* BL21 Star™(DE3) (Thermo Scientific™) e BL21(DE3) (New England Biolabs) induzida com 0,5mM de IPTG com expressão à 37°C por 4 horas (esquerda) e 16°C por 12 horas (direita). Não foi observada banda de indução de peso molecular aproximado à proteína de interesse (153 kDa). NI- amostra Não Induzida; I- amostra Induzida; P- Precipitado/corpos de inclusão; S- Sobrenadante/proteínas solúveis; M- Padrão de peso molecular em kDa (Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific™). Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie.

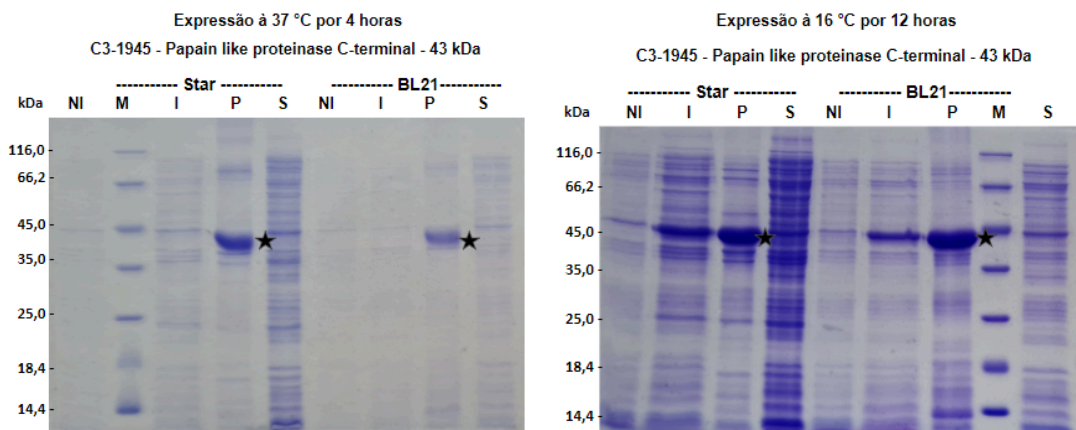


Figura 31. Teste de expressão de C3-1945. Protease semelhante à papaína C-terminal em *E. coli* BL21 Star™(DE3) (Thermo Scientific™) e BL21(DE3) (New England Biolabs) induzida com 0,5mM de IPTG à 37°C por 4 horas (esquerda) e 16°C por 12 horas (direita). Observou-se banda de indução de peso molecular aproximado à proteína de interesse (43kDa) (estrelas) no precipitado bacteriano nas quatro condições. NI- amostra Não Induzida; I- amostra Induzida; P- Precipitado/corpos de inclusão; S- Sobrenadante/proteínas solúveis; M- Padrão de peso molecular em kDa (Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific™). Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie.

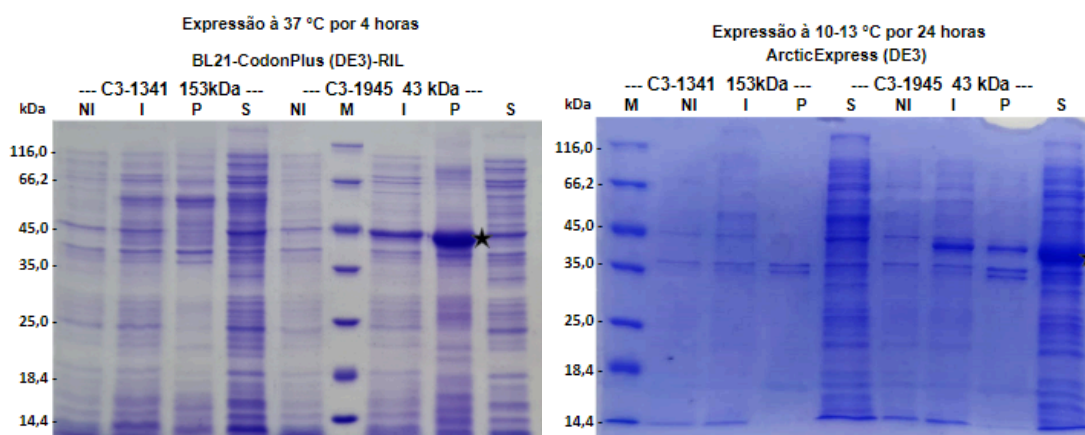


Figura 32. Teste de expressão especial de C3-1341 e C3-1945. C3-1341 Protease semelhante à papaína N-terminal e C3-1945 Protease semelhante à papaína C-terminal em *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Agilent Technologies, esquerda) e ArcticExpress (DE3) Competent Cells (Agilent Technologies, direita). A cepa RIL foi induzida com 0,5mM de IPTG à 37°C por 4 horas e a Arctic com 1mM de IPTG à 10-13°C por 24 horas. Observou-se banda de indução de peso molecular aproximado à proteína C3-1945 (43kDa) (estrela) no precipitado bacteriano em RIL e no sobrenadante de Arctic (estrelas). NI- amostra Não Induzida; I- amostra Induzida; P- Precipitado/corpos de inclusão; S- Sobrenadante/proteínas solúveis; M- Padrão de peso molecular em kDa (Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific™). Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie.

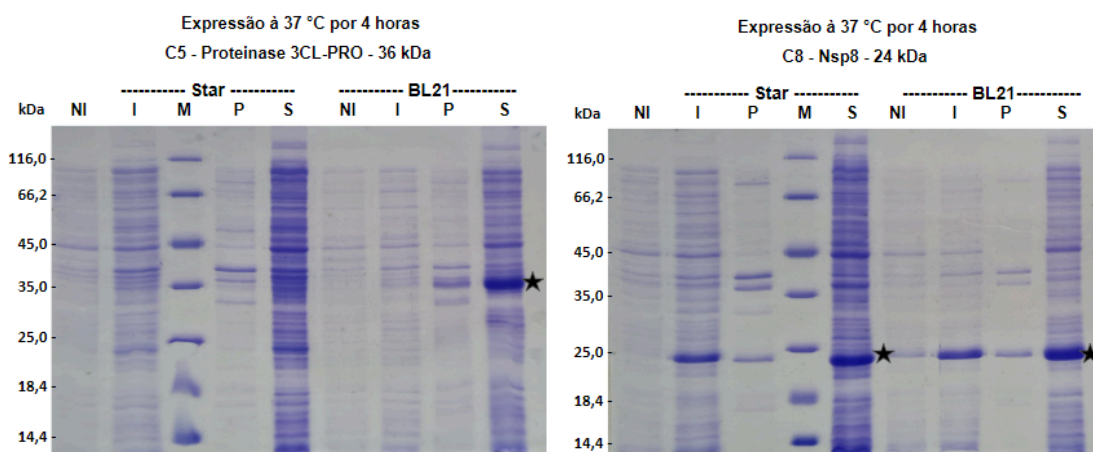


Figura 33. Teste de expressão de C5 Protease 3CLpro (esquerda) e C8 Nsp8 (direita) em *E. coli* BL21 Star™(DE3) (Thermo Scientific™), BL21(DE3) (New England Biolabs), induzida com 0,5mM de IPTG com expressão à 37°C por 4 horas. Observou-se banda de indução peso molecular aproximado às proteínas de interesse (36kDa e 24kDa, respectivamente) (estrelas), sendo no sobrenadante das duas cepas para C8 e apenas no sobrenadante de BL21 de C5. NI- amostra Não Induzida; I- amostra Induzida; P- Precipitado/corpos de inclusão; S- Sobrenadante/proteínas solúveis; M- Padrão de peso molecular em kDa (Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific™). Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie.

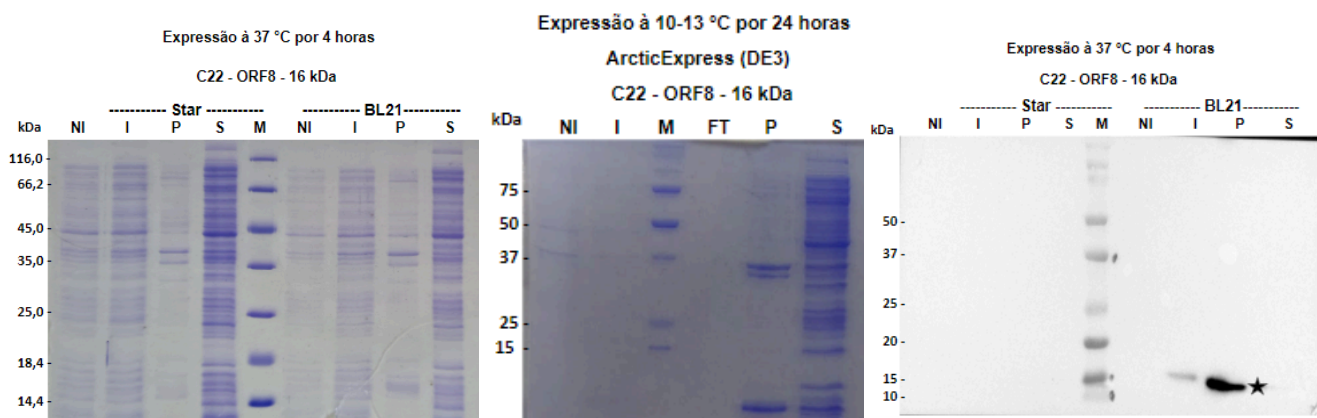


Figura 34. Teste de expressão de C22 ORF8 em *E. coli* BL21 Star™(DE3) (Thermo Scientific, direita), BL21(DE3) (New England Biolabs, direita) e ArcticExpress (DE3) Competent Cells (Agilent Technologies, esquerda). A indução de Star e BL21 foi realizada com 0,5mM de IPTG à 37°C por 4 horas a Arctic com 1mM de IPTG à 10-13°C por 24 horas. Não foi observada banda de indução peso molecular aproximado à proteína de interesse nos géis de SDS-PAGE. Entretanto, após a realização de Western Blot (centro), a proteína de interesse revelou-se presa ao precipitado bacteriano (16kDa) (estrela). NI- amostra Não Induzida; I- amostra Induzida; P- Precipitado/corpos de inclusão; S- Sobrenadante/proteínas solúveis; M- Padrão de peso molecular em kDa (Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific™). Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie.

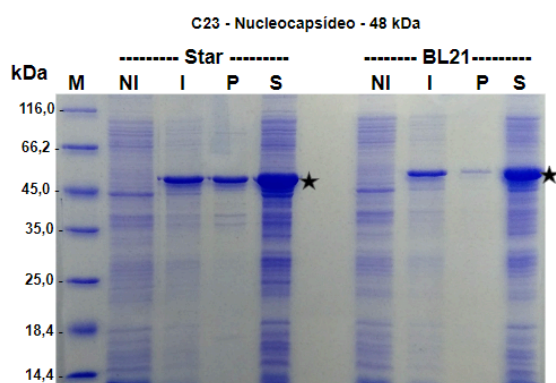


Figura 35. Teste de expressão de C23-Nucleocapsídeo em *E. coli* BL21 Star™(DE3) (Thermo Scientific™) e BL21(DE3) (New England Biolabs) induzida com 0,5mM de IPTG à 37°C por 4 horas. Observou-se banda de indução de peso molecular aproximado à proteína de interesse (48kDa) (estrelas) no sobrenadante das duas cepas. A cepa escolhida foi a Star por apresentar a banda de indução discretamente mais intensa que a outra cepa. NI- amostra Não Induzida; I- amostra Induzida; P- Precipitado/corpos de inclusão; S- Sobrenadante/proteínas solúveis; M- Padrão de peso molecular em kDa (Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific™). Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie.

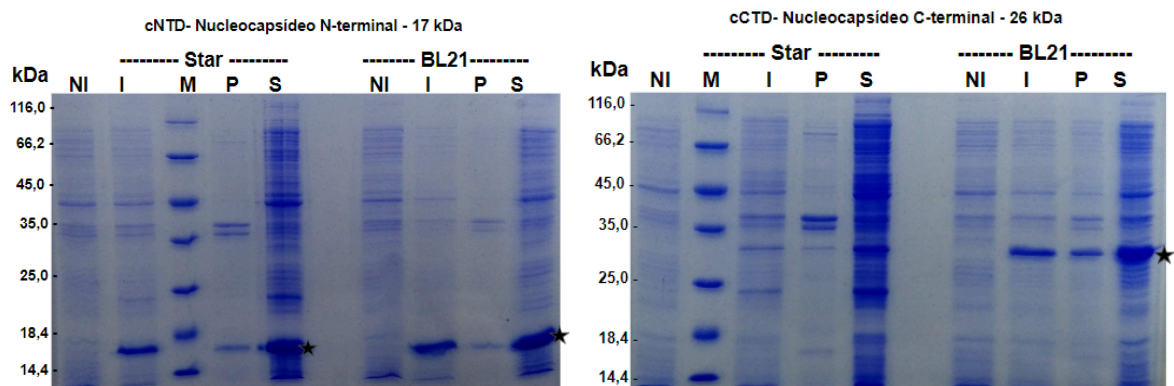


Figura 36. Teste de expressão de cNTD (esquerda) e cCTD (direita) frações N- e C-terminal da Nucleocapsídeo em *E. coli* BL21 Star™(DE3) (Thermo Scientific™) e BL21(DE3) (New England Biolabs) induzida com 0,5mM de IPTG à 37°C por 4 horas. Observou-se banda de indução de peso molecular aproximado à proteína de interesse (17kDa e 26kDa, respectivamente) (estrelas) no sobrenadante das duas cepas para cNTD e apenas no sobrenadante de BL21 de cCTD. A cepa escolhida foi a BL21 por apresentar a banda de indução discretamente mais intensa que a outra cepa, para as duas proteínas. NI- amostra Não Induzida; I- amostra Induzida; P- Precipitado/corpos de inclusão; S- Sobrenadante/proteínas solúveis; M- Padrão de peso molecular em kDa (Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific™). Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie.

A análise das amostras (Figuras 33 e 36) revelou a BL21(DE3) (New England Biolabs) como a cepa de melhor expressão para as proteínas C5, C8, cNTD e cCTD e BL21 Star™(DE3) para C23 (Figura 35), com indução a 37°C por 4 horas. Nas expressões à 37°C por 4 horas, aparentemente não houve condição de expressão de C3-1345 e a C3-1945 revelou-se no precipitado bacteriano de BL21(DE3) (New England Biolabs) e BL21 Star™(DE3) na expressão após lise e centrifugação. Foi então realizado novo teste de indução com as cepas BL21 Star™(DE3) e BL21(DE3) em baixa temperatura (13° C por 24 horas) na expectativa que a indução mais lenta favorecesse a expressão da proteína, na conformação nativa para solubilização no sobrenadante da amostra, mas não houve melhoria nos resultados (Figuras 30 e 31). Para C3-1945 foi realizada ainda lise bacteriana utilizando tampões com pH 6,5 mas as proteínas permaneceram em corpos de inclusão (dados não mostrados). A proteína C22 também apresentou-se nos corpos de inclusão nos testes de expressão com BL21 Star™(DE3) e BL21(DE3) (Figura 34).

Assim, as três proteínas, C3-1341, C3-1945 e C22, foram submetidas ao teste de expressão em BL21(DE3) RIL e ArcticExpress (DE3), que são cepas otimizadas para a solucionar problemas na expressão e solubilização de proteínas recombinantes.

A cepa BL21(DE3) RIL foi projetada com cópias extras de genes que codificam os tRNAs que mais frequentemente limitam a tradução de proteínas heterólogas em *E. coli* para viabilizar a expressão de proteínas difíceis ou com códons raros para arginina (R), isoleucina (I) e leucina (L). Já a expressão em baixas temperaturas de ArcticExpress (DE3) somada à expressão de chaperonas, favorecem o dobramento adequado da proteína recombinante. Somente a obtenção da proteína C3-1945 na porção solúvel foi possível, sendo observada exclusivamente em ArcticExpress (DE3) (Figura 32), com expressão em baixa temperatura (10 a 13°C por 24 horas), como recomendado pelo fabricante. Aparentemente não houve condições de expressão da C3-1341. A C22 foi identificada no precipitado bacteriano em todas as condições testadas. Desta forma, C3-1341 e C22 não foram usadas para futuros experimentos.

4.3 Expressão e purificação de proteínas recombinantes em larga escala

As proteínas C3-1945, C5, C8, C23, cNTD e cCTD foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de níquel e cromatografia de exclusão de tamanho conforme descrito anteriormente, produzindo as frações indicadas nas figuras 39, 42, 45, 48 e 50. A proteína C3-1945 não formou pico no cromatograma de afinidade, tampouco revelou frações do peso esperado no gel SDS-PAGE (Figura 37), impossibilitando a posterior purificação por cromatografia de exclusão de tamanho. Isso pode sugerir a degradação da proteína durante a lise bacteriana, a ocultação da cauda de histidina tornando-a indisponível para ligar na resina da coluna de afinidade ou problemas no carregamento ou eluição da amostra na coluna de níquel. Assim, antes de nova expressão em maior escala da proteína C3-1945, Western Blotting (WB) usando anticorpos que reconhecem a cauda de histidina (anti-HisTag) deve ser realizado para confirmar a presença da cauda de histidina na construção. As demais proteínas tiveram pico do cromatograma observados no gel SDS-PAGE e confirmados por WB anti-HisTag (Figuras 38 a 51).

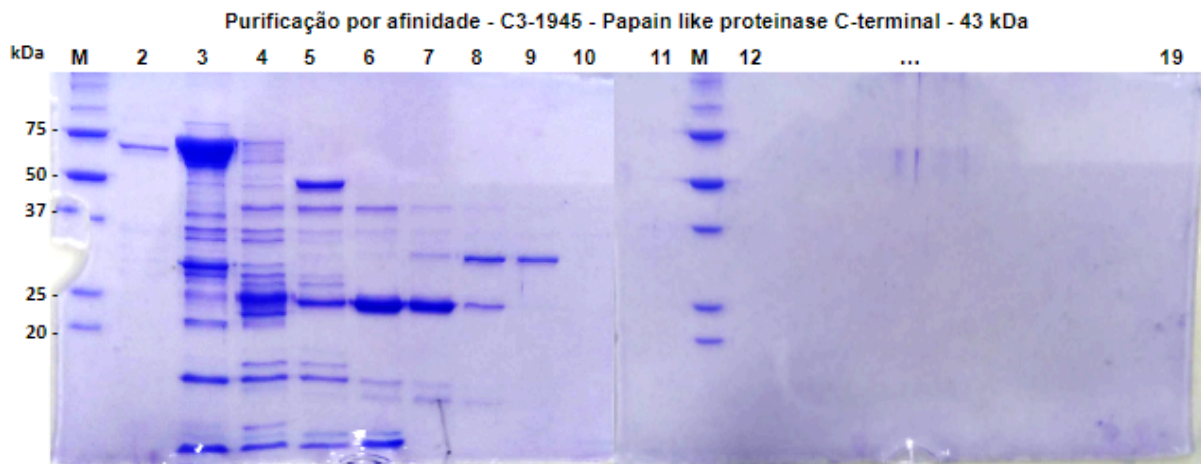


Figura 37. Frações do ensaio de expressão em larga escala da proteína C3-1945 (Protease semelhante à papaína C-terminal) eluídas na cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Não foi possível identificar a banda da proteína de interesse (43kDa). M– Padrão de peso molecular em kDa (Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, Bio-Rad). Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie.

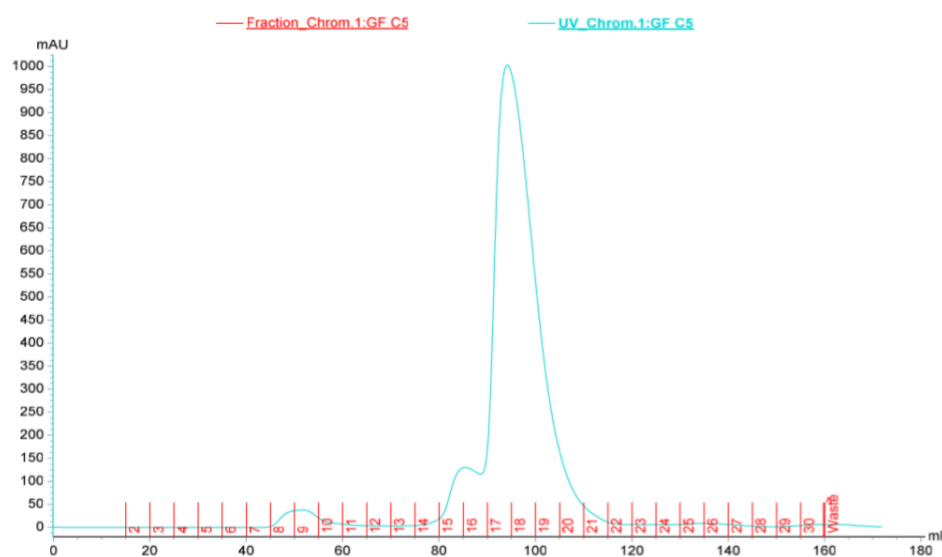


Figura 38. Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho da proteína C5 (Protease 3CLpro). Observou-se a formação do pico de absorvância ultravioleta a 280 nm, gerado pelos resíduos de triptofano presentes na construção, nas frações 15 a 21 da eluição. O discreto sinal observado nas frações 8 e 9 eram artefatos que foram confirmados no gel de SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie. Fraction- fração de eluição; UV.Chrom - absorvância ultravioleta a 280nm dada em mAU.

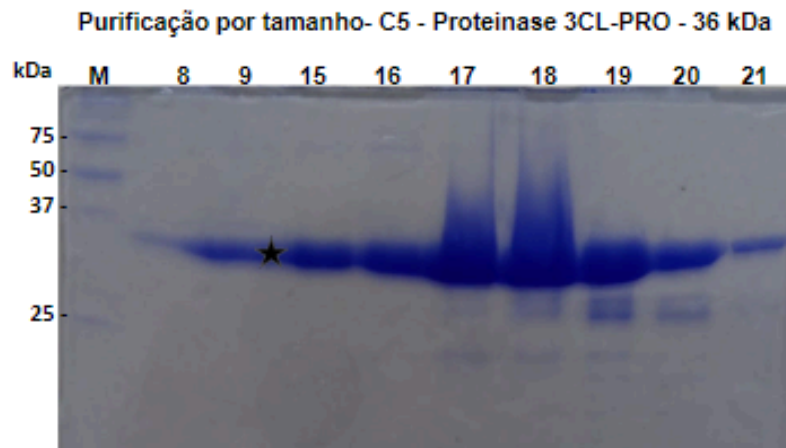


Figura 39. Frações do ensaio de expressão em larga escala da proteína C5 Protease 3CLpro eluídas na cromatografia de exclusão de tamanho. Identificou-se a banda da proteína de interesse nas frações 15 a 21 da eluição (36kDa) (estrela). Embora as frações 8 e 9 aparentam ter a banda de interesse, estas amostras não foram juntadas, pela possibilidade de artefato de vazamento da proteína dos poços vizinhos, já que não coincidem com o pico de absorbância. Observou-se a formação de discretas bandas abaixo da proteína de interesse, o que sugere degradação proteica. M – Padrão de peso molecular em kDa (Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, Bio-Rad). Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie.

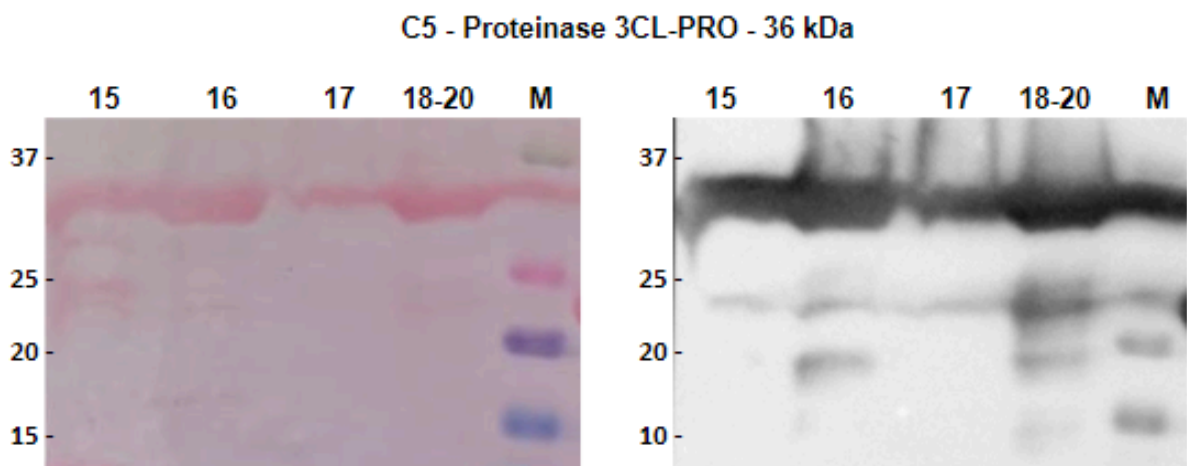


Figura 40. Imunoidentificação de C5 Protease 3CLpro. Membrana de nitrocelulose após transferência corada com Ponceau e após revelação. As bandas identificadas abaixo da proteína de interesse (36kDa) sugerem degradação da mesma. Linhas - frações da cromatografia de exclusão por tamanho. *Western Blotting* com anticorpo anti-histag em gel SDS-PAGE 15%. M – Padrão de peso molecular em kDa (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™, Bio-Rad).

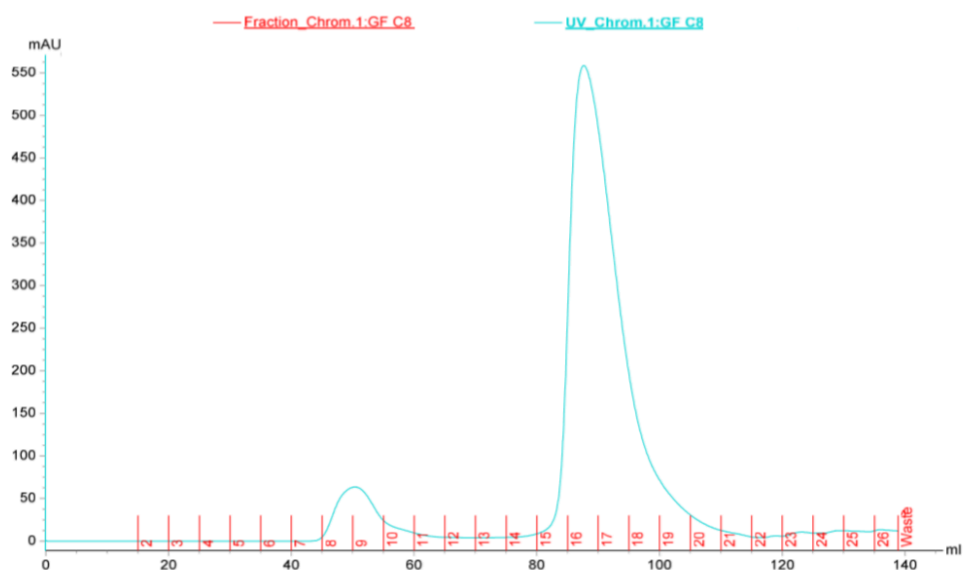


Figura 41. Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho da proteína C8 (Nsp8). Observou-se a formação do pico de absorvância ultravioleta a 280nm, gerado pelos resíduos de triptofano presentes na construção, nas frações 15 a 20 da eluição. O discreto sinal observado nas frações 8 e 9 eram artefatos que foram confirmados no gel de SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie. Fraction- fração de eluição; UV.Chrom- absorvância ultravioleta a 280nm dada em mAU.

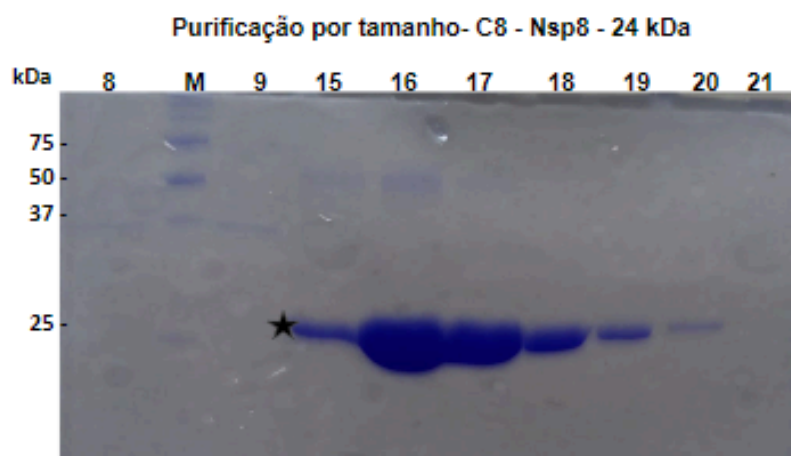


Figura 42. Frações do ensaio de expressão em larga escala da proteína C8 (Nsp8) eluídas na cromatografia de exclusão de tamanho. Identificou-se a banda da proteína de interesse nas frações 15 a 20 da eluição (24kDa) (estrela). M- Padrão de peso molecular em kDa (Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards, Bio-Rad). Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie.

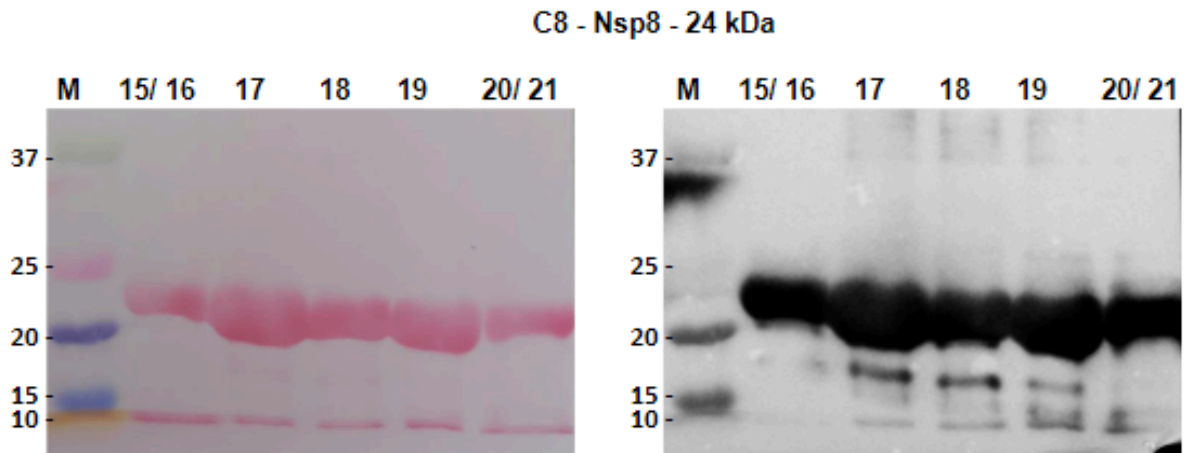


Figura 43. Imunoidentificação de C8 (Nsp8). Membrana de nitrocelulose após transferência corada com Ponceau S (direita) e após a revelação com substrato para peroxidase (esquerda). As bandas identificadas abaixo da proteína de interesse (24kDa) sugerem degradação da mesma. Linhas - frações da cromatografia de exclusão por tamanho. *Western Blotting* com anticorpo anti-histag em gel SDS-PAGE 15%. M- Padrão de peso molecular em kDa (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™, Bio-Rad).

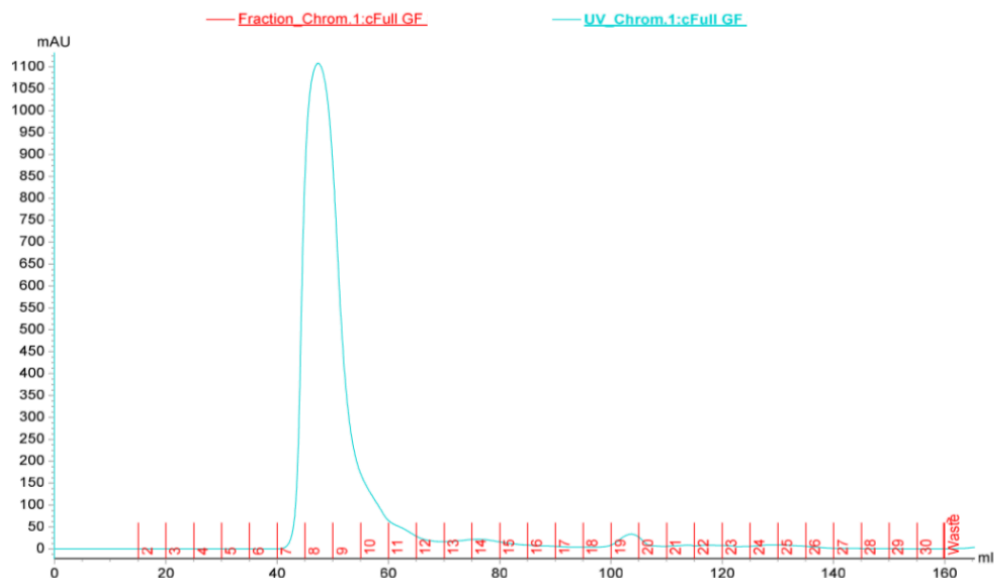


Figura 44. Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho da proteína C23 (Nucleocapsídeo). Observou-se a formação do pico de absorvância ultravioleta a 280nm nas frações 7 a 12 da eluição. Fraction- fração de eluição; UV.Chrom- absorvância ultravioleta a 280nm dada em mAU.

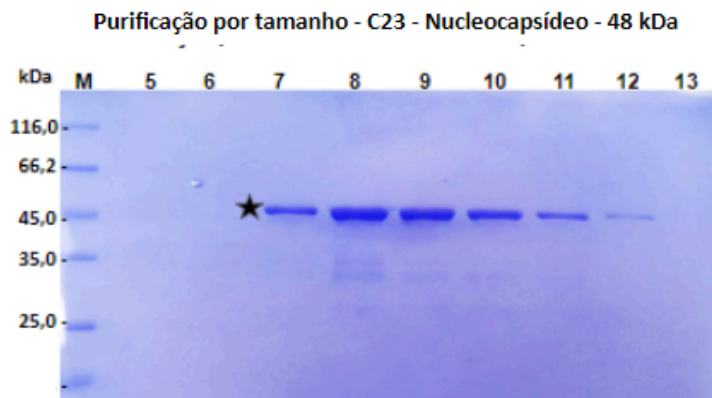


Figura 45. Frações do ensaio de expressão em larga escala da proteína C23 (Nucleocapsídeo) eluídas na cromatografia de exclusão de tamanho. Identificou-se a banda da proteína de interesse nas frações 7 a 12 da eluição (estrela). Observou-se a formação de discretas bandas abaixo da proteína de interesse (45kDa), o que sugere degradação proteica. M– Padrão de peso molecular em kDa (Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific™). Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie. Gel carregado com redução de cerca de 70% do volume com relação à C5 e C8 a fim de diminuir o arraste visualizado nos géis anteriores.

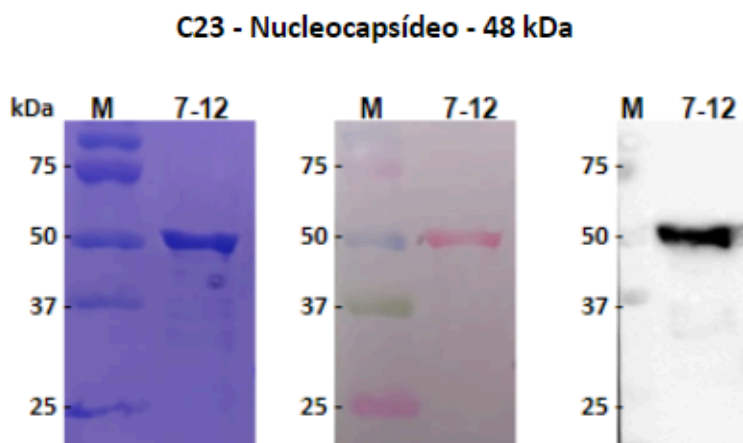


Figura 46. Imunoidentificação de C23 (Nucleocapsídeo). Gel de SDS-PAGE (direita), membrana de nitrocelulose após transferência corada com Ponceau S (centro) e após revelação (esquerda). Previamente a esse ensaio, as frações 7 a 12 foram juntadas e concentradas por centrifugação. *Western Blotting* com anticorpo anti-histag em gel SDS-PAGE 15%. M– Padrão de peso molecular em kDa (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™, Bio-Rad).

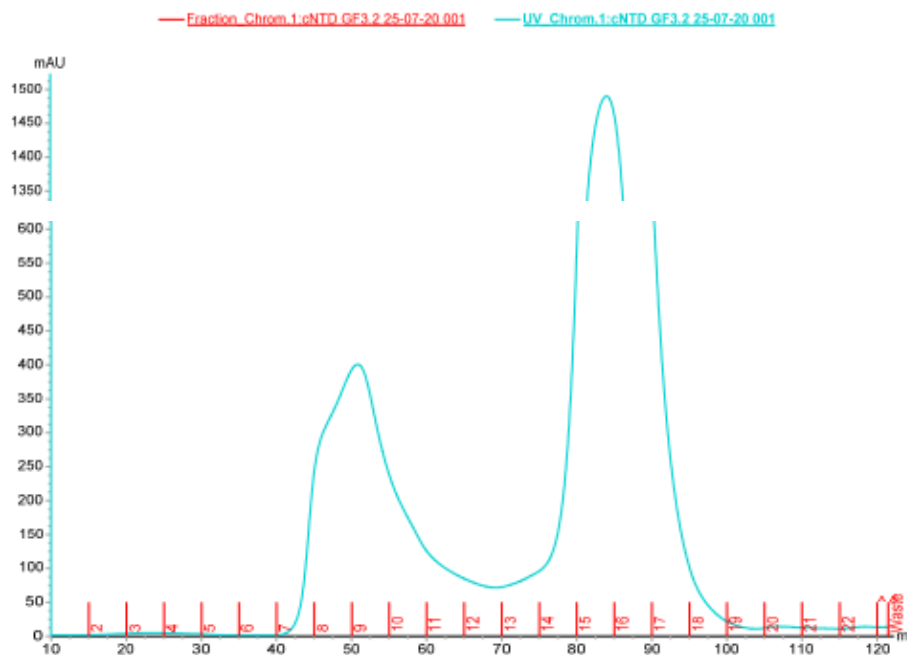


Figura 47. Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho da proteína cNTD (Nucleocapsídeo N-terminal). Observou-se a formação do pico de absorvância ultravioleta a 280nm nas frações 14 a 17 da eluição (pico cortado entre 620 a 1300mAU). Fraction- fração de eluição; UV.Chrom- absorvância ultravioleta a 280nm dada em mAU.

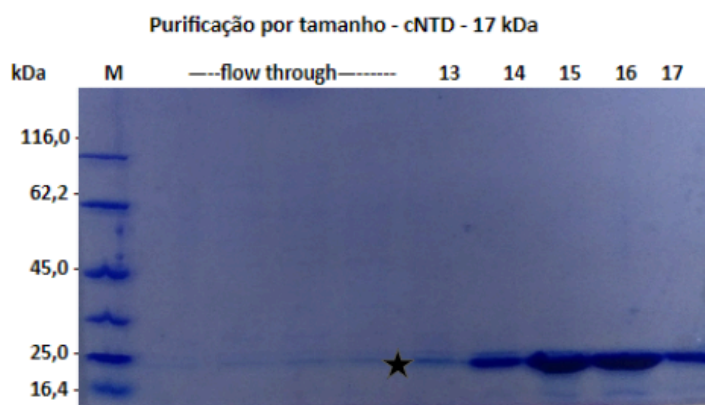


Figura 48. Frações do ensaio de expressão em larga escala da proteína cNTD (Nucleocapsídeo N-terminal) eluídas na cromatografia de exclusão de tamanho. Identificou-se a banda da proteína de interesse nas frações 13 a 17 da eluição (estrela). M- Padrão de peso molecular em kDa (Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific™). Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie. Gel carregado com redução de cerca de 70% do volume com relação à C5 e C8 a fim de diminuir o arraste visualizado nos géis anteriores.

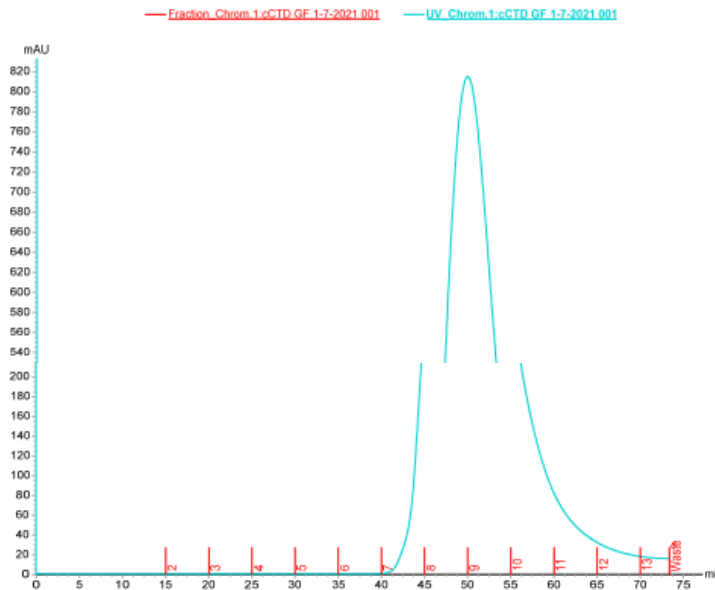


Figura 49. Cromatograma da purificação por exclusão de tamanho da proteína cCTD (Nucleocapsídeo N-terminal). Observou-se a formação do pico de absorvância ultravioleta a 280nm nas frações 7 a 12 da eluição (pico cortado entre 250 a 500mAU). Fraction- fração de eluição; UV.Chrom- absorvância ultravioleta a 280nm dada em mAU.

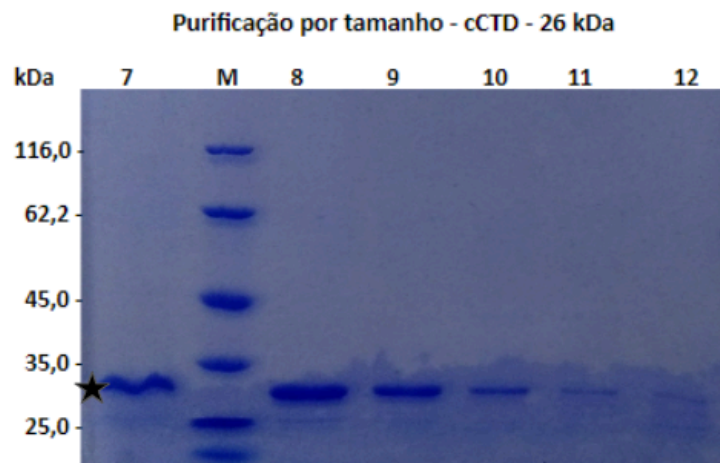


Figura 50. Frações do ensaio de expressão em larga escala da proteína cCTD (Nucleocapsídeo N-terminal) eluídas na cromatografia de exclusão de tamanho. Identificou-se a banda da proteína de interesse nas frações 7 a 12 da eluição (estrela). M- Padrão de peso molecular em kDa (Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific™). Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie. Gel carregado com redução de cerca de 70% do volume com relação à C5 e C8 a fim de diminuir o arraste visualizado nos géis anteriores.

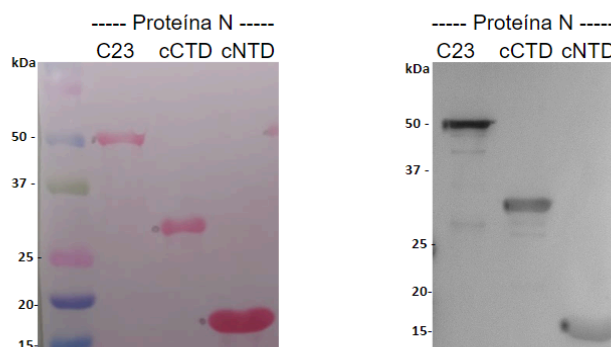


Figura 51. Imunoidentificação de cCTD (Nucleocapsídeo C-terminal) e cNTD (Nucleocapsídeo C-terminal). Membrana de nitrocelulose após transferência corada com Ponceau S (direita) e após revelação (esquerda). *Western Blotting* com anticorpo anti-histag em gel SDS-PAGE 15%. M– Padrão de peso molecular em kDa (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™, Bio-Rad).

4.4 Padronização do Western Blotting e ELISA com proteínas recombinantes

A imunoidentificação por WB com a utilização de anticorpo anti-HisTag revelou que as proteínas C5, C8, C23, cNTD e cCTD foram corretamente purificadas e apresentam importante grau de pureza, como indicado na figura 52. Algumas bandas observadas na membrana encontram-se abaixo da banda de interesse, de maneira discreta, indicando algum grau de degradação durante a purificação ou nas condições de armazenamento. Futuros testes devem ser realizados adicionando glicerol 10% nos tampões de purificação ou armazenamento a fim de diminuir a degradação observada, em conjunto com testes de estabilidade após congelamento.

O WB realizado utilizando o soro de pacientes positivo e negativo para SARS-CoV-2 revelou, ao menos preliminarmente, que o ensaio anti-IgM não foi capaz de reconhecer nenhuma das proteínas recombinantes deste estudo, como observado na figura 52. Outra possibilidade levantada é a de o paciente não apresentar títulos detectáveis de IgM anti-SARS-CoV-2 por esta metodologia, por estar no décimo dia de sintomas da doença no momento da coleta sanguínea, tendo em vista que a triagem inicial foi feita por ELISA apenas de IgG, contra construções das proteínas N (comercial) e S (recombinante). Das proteínas testadas por Western Blotting, os anticorpos IgG do paciente positivo foram capazes de reconhecer apenas a construção C23 e seus fragmentos N e C-terminal (proteína N recombinante) (Figura 53).

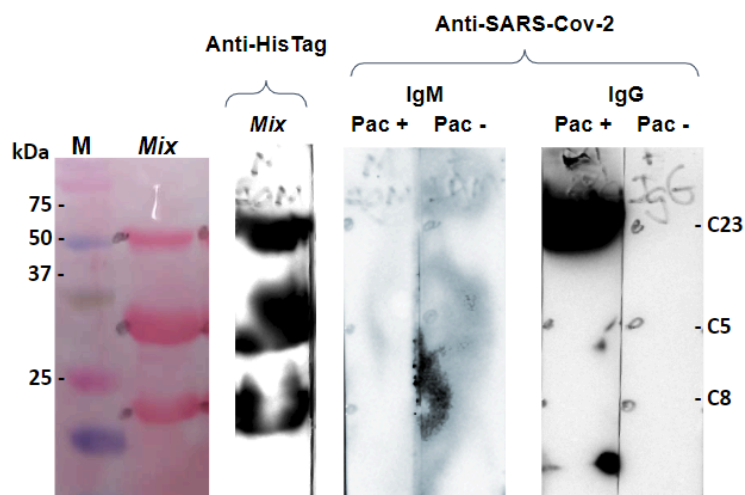


Figura 52. Imunoidentificação de C5, C8 e C23. Ponceau S (esquerda) de uma mistura de C5, C8 e C23 (com composição da amostra calculada por molaridade, a fim de homogeneizar a intensidade das bandas), para conferência do padrão de corrida das bandas. Western blotting (direita) das proteínas recombinantes de SARS-CoV-2. C5 (Protease 3CLpro); C8 (Nsp8); C23 (Nucleocapsídeo); Mix - mistura de C5, C8 e C23. Foram utilizados anticorpos anti-HisTag e soros sanguíneos de pacientes sorologicamente negativos (Pac-) e positivo (Pac+) para SARS-CoV-2 para detecção de IgM e IgG contra as proteínas recombinantes. M- Padrão de peso molecular em kDa (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™, Bio-Rad).

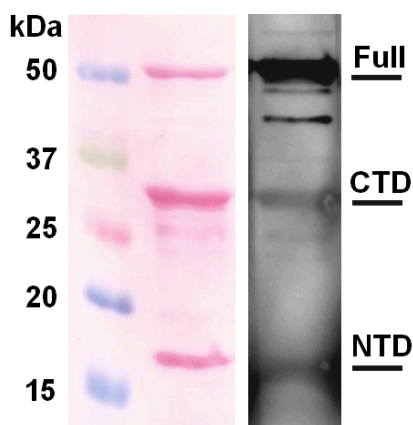


Figura 53. Imunoidentificação de C23, cCTD e cNTD. Ponceau S (esquerda) de uma mistura de C23, cNTD e cCTD (com composição da amostra calculada por molaridade, a fim de aproximar a intensidade das bandas), para conferência do padrão de corrida das bandas. Western blotting (direita) das proteínas recombinantes de SARS-CoV-2. C23 (Nucleocapsídeo) cNTD (N-terminal da Nucleocapsídeo) e cCTD (C-terminal da Nucleocapsídeo); Foi utilizado soros sanguíneos de pacientes sorologicamente positivo para SARS-CoV-2 para detecção de IgG contra as proteínas recombinantes. M- Padrão de peso molecular em kDa (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™, Bio-Rad).

A maioria das publicações apontam que os infectados por SARS-CoV-2 soroconvertem dentro de 2 semanas após o início dos sintomas, produzindo anticorpos IgM e IgG que reconhecem predominantemente as proteínas Spike e Nucleocapsídeo (Koerber et al., 2022; Long et al., 2020; Suthar et al., 2020). Em um estudo realizado com proteínas de SARS-CoV em hamsters, o contato com as proteínas M (Membrana), E (Envelope) ou N (Nucleocapsídeo), na ausência da proteína S (Spike), não induziu uma resposta detectável de anticorpos neutralizantes contra o vírus (Buchholz et al., 2004). Somado a isso, alguns autores sugerem que a Amplificação Dependente de Anticorpos (ADE, *Antibody-Dependent Enhancement*) pode ocorrer quando anticorpos não neutralizantes ou subneutralizantes se ligam e facilitam a entrada do vírus nas células que expressam o receptor Fc (FcγR), ou quando esses anticorpos causam inflamação excessiva e patologia imunológica (Qi et al., 2022). Os FcγR são expressos em diferentes células do sistema imunológico, como macrófagos, neutrófilos, linfócitos, entre outras, e podem desencadear diversos processos nessas células, como fagocitose, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e liberação de enzimas lisossomais, após sua ligação à dos domínios Fc (fragmento cristalizável) da IgG. Embora não hajam fortes evidências clínicas da ocorrência de ADE em pacientes convalescentes de COVID-19, estudos recentes demonstraram a produção de anticorpos relacionados à ADE pela infecção por SARS-CoV-2 em processos mediados FcγR e o componente C1q do sistema complemento (Okuya et al., 2022).

Não há dados sobre a formação de anticorpos neutralizantes contra as proteínas C5 e C8 até o presente momento, o que desperta a necessidade da realização de um mapeamento sorológico com amostras de pacientes em diversas fases da doença, utilizando uma metodologia de maior sensibilidade (ELISA) para verificação da formação de anticorpos para esclarecer os mecanismos envolvidos no ADE. Assim, o Laboratório BSL3+ de Virologia representado pela pesquisadora Ralyria Melo realizou a seleção de soro sanguíneos de pacientes em diversas condições para, através do ELISA, analisar a produção de anticorpos IgG contra as proteínas C5 3CLpro e C8 Nsp8 de SARS-CoV-2. O protocolo utilizado foi o mesmo apresentado no tópico 3.6 da metodologia deste trabalho. Foram utilizados soros coletados antes da pandemia de COVID-19, o controle positivo utilizado nos testes de rotina do laboratório, soros de pacientes imunizados com diferentes vacinas contra COVID sem contato prévio com SARS-CoV-2, assim como soro de pacientes

positivos para COVID (comprovado por ELISA com Nucleocapsídeo comercial) imunizados com diferentes vacinas. Os valores de absorbância dos positivos variaram de 0,031 a 0,107 e 0,043 a 0,195 para C5 e C8, respectivamente, enquanto os negativos variaram de 0,037 a 0,096 e 0,023 a 0,162. Não houve diferença significativa entre as amostras positivas e negativas em nenhuma condição, o que pode indicar que não haja produção de anticorpos para tais proteínas, considerando que elas são expressas no citoplasma da célula hospedeira, o que pode diminuir sua exposição e detecção por receptores imunes extracelulares que desencadeiam a produção de anticorpos.

4.5 Western Blotting

As reatividades mensuradas (Anexos - Figura 66 e Tabela 7) para cada proteína, baseadas nos dados de positividade e negatividade fornecidos pelo grupo responsável pelas amostras, viabilizou a produção das curvas ROC para C23, cNTD e cCTD, possibilitando estabelecer o ponto de corte (*cutt-off*) que será usado para o cálculo da sensibilidade e especificidade de cada teste (Figuras 54 a 56).

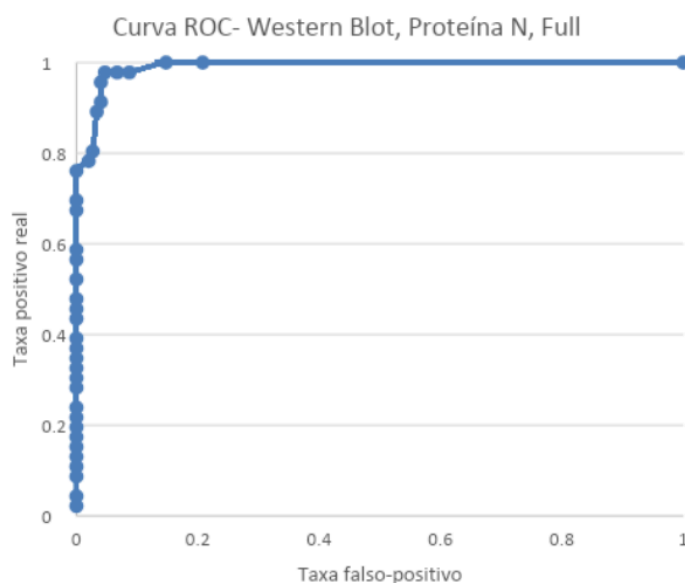


Figura 54. Curva ROC do Western Blotting da C23. Utilizando esta análise, selecionamos o ponto equivalente à intensidade de banda 2, que gera um teste de sensibilidade de 98% e especificidade de 84%.

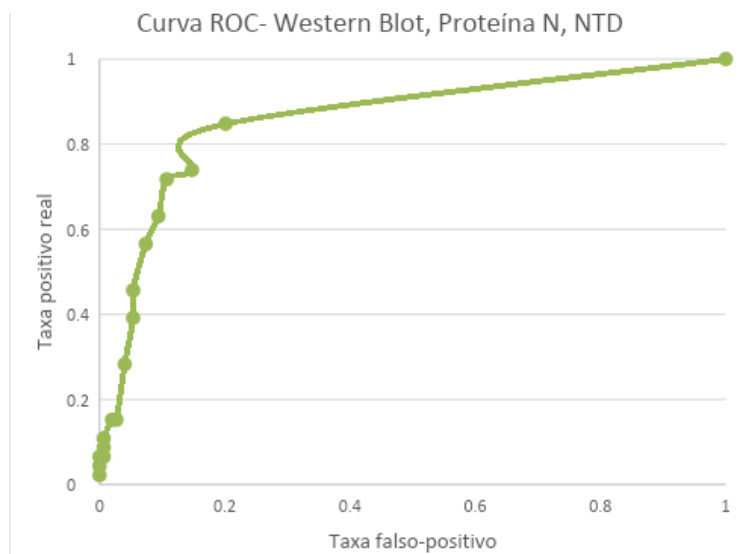


Figura 55. Curva ROC do Western Blotting da cNTD. Utilizando esta análise, não é possível selecionar cutoff para o teste com o fragmento N-terminal da proteína Nucleocapsídeo, tendo em vista que a curva produzida está muito distante do aceitável para o estabelecimento de um teste diagnóstico. O melhor ponto selecionado neste caso seria com intensidade de banda 4, que gera um teste de sensibilidade de 63% e especificidade de 91%.

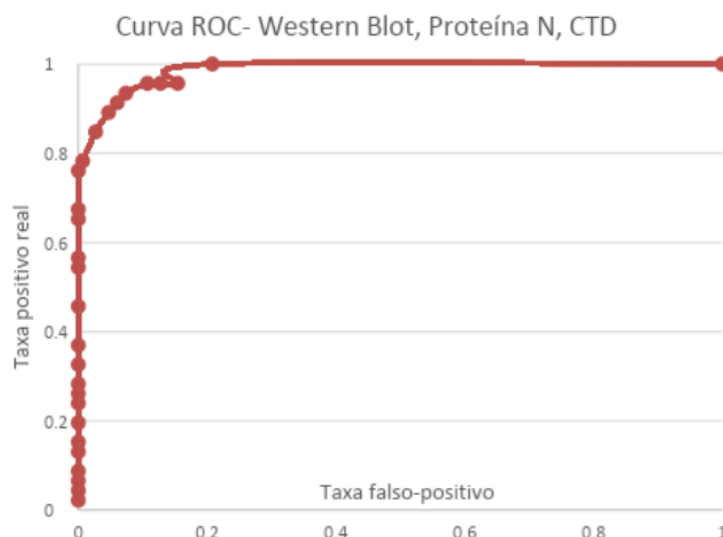


Figura 56. Curva ROC do Western Blotting da cCTD. Utilizando esta análise, selecionamos o ponto equivalente à intensidade de banda 1, que gera um teste de sensibilidade de 60% e especificidade de 100%.

A C23 (Figura 54), também chamada de Proteína N Full por se tratar a proteína nucleocapsídeo inteira, teve *cut off* na intensidade 2 de banda, que gera um teste de sensibilidade de 98% e especificidade de 84%.

Conforme observado na figura 55, não foi possível determinar ponto de corte para o cNTD, o fragmento N-terminal da proteína Nucleocapsídeo, haja vista que a curva apresenta-se disforme, padrão não aceitável para o estabelecimento de um teste diagnóstico. O *cut off* na intensidade 4 de banda, gera um teste de sensibilidade de 63% e especificidade de 91%.

Para o cCTD, o fragmento C-terminal da proteína Nucleocapsídeo, conforme mostrado na figura 56, o *cut off* na intensidade 1 de banda, gera um teste de sensibilidade de 60% e especificidade de 100%

Estes dados foram plotados na Tabela 3 a fim de facilitar a comparação entre a sensibilidade e especificidade das construções nos diferentes ensaios.

4.6 ELISA

As absorvâncias mensuradas (Anexos - Tabela 8) para cada proteína, baseadas nos dados de positividade e negatividade fornecidos pelo grupos responsável pelas amostras, viabilizou a produção das curva ROC para C23, cNTD e cCTD, possibilitando estabelecer o ponto de corte (*cutt-off*) que será usado para o cálculo da sensibilidade e especificidade de cada teste (Figuras 57 a 59).

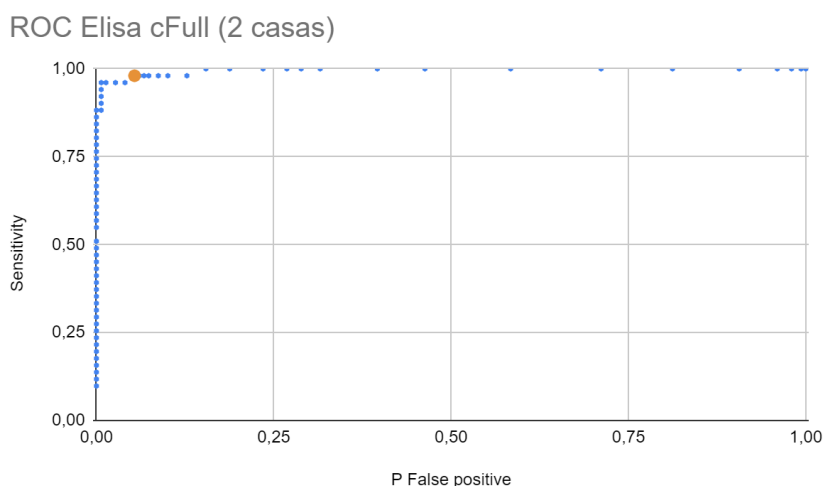


Figura 57. Curva ROC do ELISA da C23. Utilizando esta análise, selecionamos o ponto equivalente à absorvância 0,24, que gera um teste de sensibilidade de 98% e especificidade de 95%.

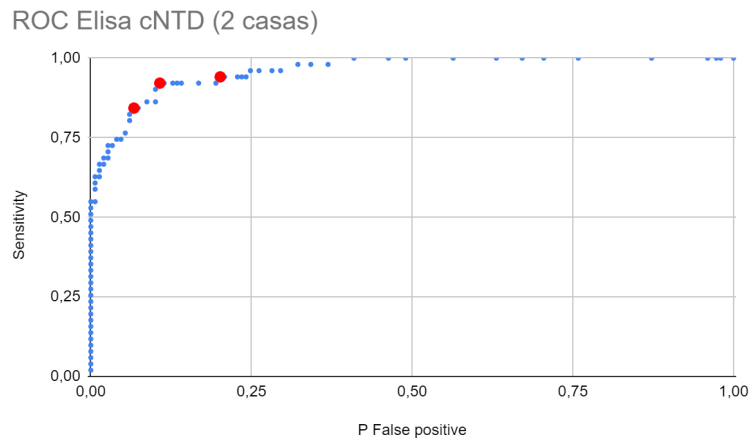


Figura 58. Curva ROC do ELISA da cNTD. Utilizando esta análise, selecionamos o ponto equivalente à absorbância 0,38, que gera um teste de sensibilidade de 92% e especificidade de 90%.

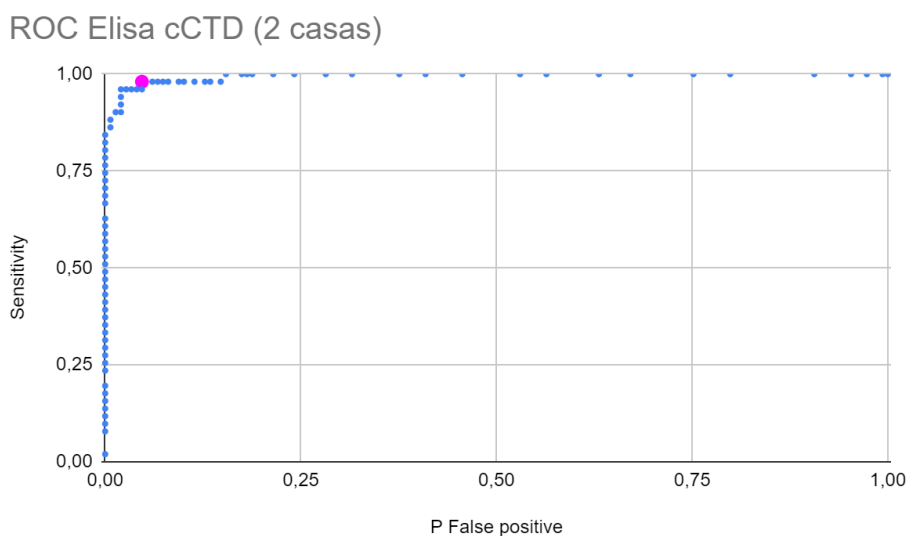


Figura 59. Curva ROC do ELISA da cCTD. Utilizando esta análise, selecionamos o ponto equivalente à absorbância 0,38, que gera um teste de sensibilidade de 98% e especificidade de 94%.

Para C23 também chamada de cFull por se tratar da proteína Nucleocapsídeo inteira, a escolha do *cut off* a absorbância de 0,24 gera um teste de sensibilidade de 98% e especificidade de 95% (Figura 57).

Já para cNTD, é possível observar a possibilidade de três diferentes *cut off* (pontos vermelhos), que gerariam diferentes valores de sensibilidade e especificidade. O ponto que apresenta maiores valores de sensibilidade e

especificidades somados é o de absorbância 0,38, que gera um teste de sensibilidade de 92% e especificidade de 90%.

A curva para cCTD apresenta cut off igual ao da cNTD, porém resultando valores diferentes de sensibilidade e especificidade, à saber 98% e 94%, respectivamente.

Estes dados também foram plotados na Tabela 3 a fim de facilitar a comparação entre a sensibilidade e especificidade das construções nos diferentes ensaios.

Tabela 3. Dados de sensibilidade e especificidade dos ensaios realizados.

Proteína	WB		ELISA	
	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade
C23	98%	84%	98%	95%
cNTD	63%	91%	92%	90%
cCTD	60%	100%	98%	94%

4.7 Cultivo celular e teste de viabilidade

A análise da conversão de MTT em formazan, demonstrada nas figuras 60, 61 e 62, revelou que houve uma pequena redução de viabilidade celular de 17,8% ($p < 0,05$) das proteínas C23 na concentração de 2000nM de proteína (Figura 62) em comparação com o tampão (veículo) em que as proteínas estão diluídas. Assim, não foi possível estabelecer uma concentração citotóxica para 50% dos cultivos celulares (IC50, parâmetro central no estudo de viabilidade celular). O ensaio de MTT avalia a atividade mitocondrial das células (Mosmann, 1983), assim, não é um parâmetro direto para estudo da viabilidade da cultura, visto que diversos eventos benéficos ou prejudiciais para a célula podem alterar a atividade das mitocôndrias. Em estágios iniciais de apoptose, por exemplo, as células podem permanecer com suas mitocôndrias intactas e continuar reduzindo o MTT (Lotze e Thomson, 2011). Dessa forma, outros testes devem ser combinados com o MTT a fim de otimizar a análise

de viabilidade celular, como o ensaio de LDH (Lactato Desidrogenase) para verificação da integridade de membrana celular.

As curvas concentração-resposta obtidas nos ensaios de MTT foram calculadas pelo modelo de regressão não linear (inclinação variável, quatro parâmetros) mínimos quadrados. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram adotados valores para $p < 0.05$ como estatisticamente significantes. As análises apresentadas a seguir foram realizadas com o software GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, EUA).

Os tampões das proteínas C5, C8 e C23 têm osmolaridade calculada de 732,6mOs/L, o que não tem poder de mudança da osmolaridade do meio de cultura considerando a proporção de diluição experimental (1:10). A concentração final calculada de NaCl no meio de cultura após a diluição das proteínas é de 133mM, o que também não influenciaria na viabilidade celular, conforme Machado e colaboradores (2021).

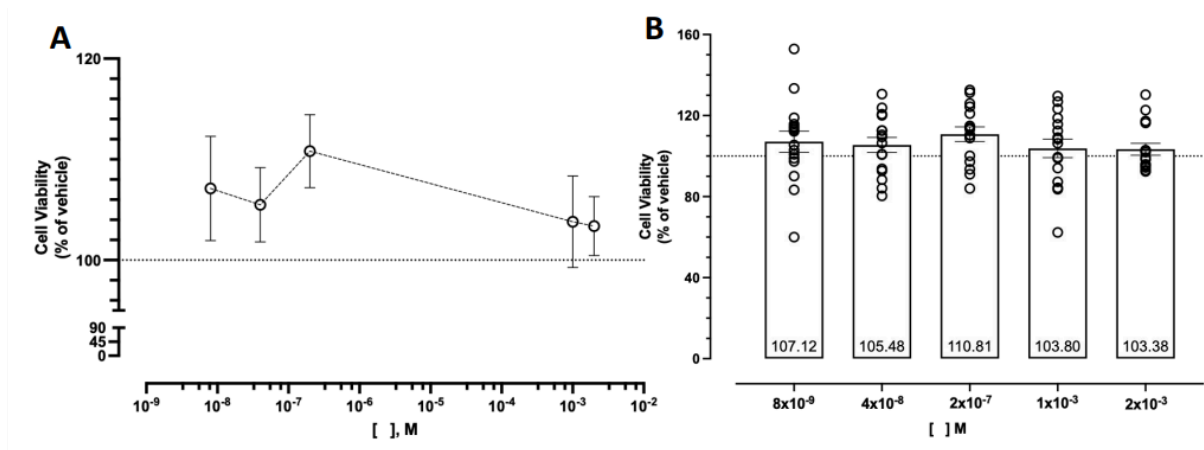


Figura 60. Curva concentração- resposta utilizando a proteína C5 (Proteinase 3CLpro). A. log(inibitor) vs. responseVariable slope (four parameters)- Least squares fit; N= 4 experimentos independentes com 4 replicatas técnicas. A linha pontilhada aponta 100% viabilidade (vehicle). B. One-way ANOVA - $F(5, 90) = 0.7624$ - $P=0.5793$. Cell Viability (% vehicle)- viabilidade celular com aplicação da proteína, em comparação com as células que receberam apenas veículo. [], M- Concentração da proteína, em molar.

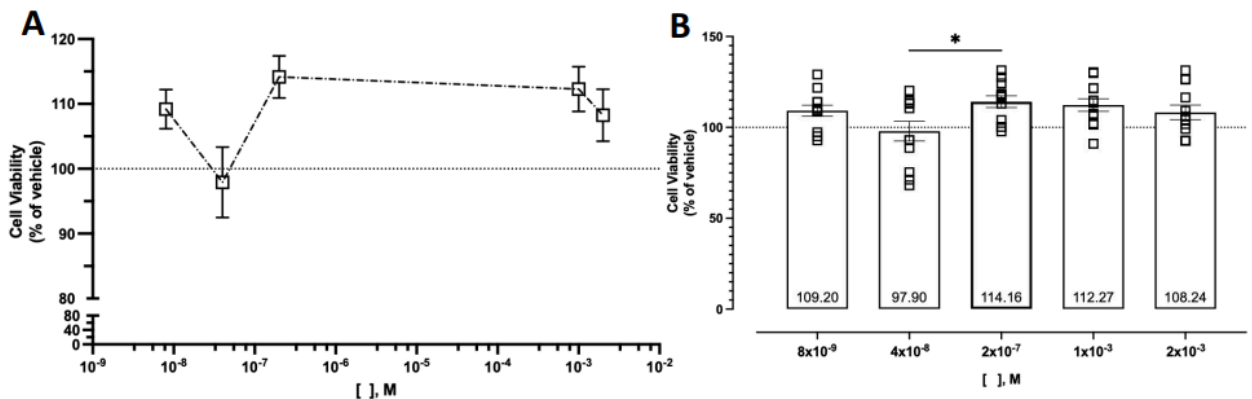


Figura 61. Curva concentração- resposta utilizando a proteína C8 (Nsp8). A. log(inhíbitor) vs. response -- Variable slope (four parameters) - Least squares fit, N= 3 experimentos independentes com 4 replicatas técnicas. A linha pontilhada aponta 100% viabilidade (vehicle). B. One-way ANOVA - $F(5, 66) = 3.064 - P=0.0151$. Post-hoc: Tukey's test, * $p = 0,0402$. Cell Viability (% vehicle)- viabilidade celular com aplicação da proteína, em comparação com as células que receberam apenas veículo. [], M- Concentração da proteína, em molar.

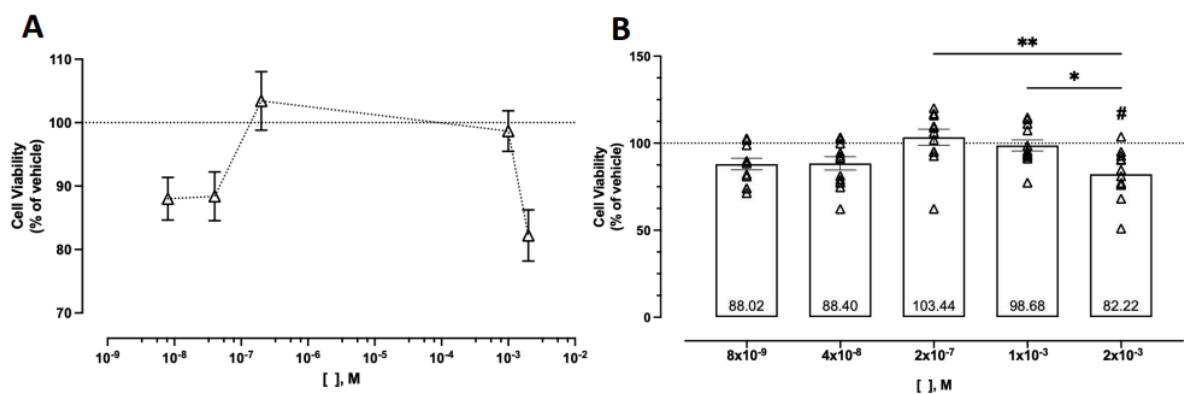


Figura 62. Curva concentração- resposta com aplicação da proteína C23 (Nucleocapsídeo). A. log(inhíbitor) vs. response -- Variable slope (four parameters) - Least squares fit, N= 3 experimentos independentes com 4 replicatas técnicas. A linha pontilhada aponta 100% viabilidade (vehicle). B. One-way ANOVA - $F(5, 66) = 4,976 - P=0.0006$. Post-hoc: Tukey's test, # $p = 0,0185$ vs vehicle; * $p = 0,0310$; ** $p = 0,0020$. Cell Viability (% vehicle)- viabilidade celular com aplicação da proteína, em comparação com as células que receberam apenas veículo. [], M- Concentração da proteína, em molar.

5 DISCUSSÃO

A crise global gerada pela pandemia de COVID-19 resultou das diversas incertezas quanto ao real número de infectados e mortos, dada a subnotificação devido à falta de testagem em massa. No Brasil, estas incertezas prejudicaram a formulação de políticas de saúde pública e desempenharam papel significativo no aumento de contágio em âmbito nacional (Bastos et al., 2021). Aqui, a crise da pandemia foi ainda mais agravada pelas desigualdades sociais e pela ausência de iniciativas do Governo Federal na aquisição de vacinas, o que acarretou efeitos drásticos nos sistemas de saúde brasileiro.

Preliminarmente, este projeto visava expressar e purificar as proteínas codificadas pelo genoma de SARS-CoV-2 a fim de rastrear quais destas proteínas recombinantes poderiam ser utilizadas no desenvolvimento de um teste sorológico para auxiliar no rastreamento de indivíduos previamente infectados, para auxiliar no levantamento dos dados epidemiológicos para implementação de medidas de saúde pública. Posteriormente, estas proteínas poderiam ser usadas em cultivo celular de macrófagos para auxiliar o rastreamento das vias inflamatórias ativadas envolvidas na tempestade de citocinas observadas nos pacientes graves de COVID, para direcionar o desenvolvimento de terapias anti-inflamatórias.

No presente trabalho desenhamos construções para 23 genes de SARS-CoV-2 para clonagem no vetor de expressão pET28a(+). Apenas 6 construções (PLpro N-terminal C3-1-1341 e C-terminal C3-1588-1945, C5 3CLpro, C8 Nsp8, C22 ORF8 e C23 Nucleocapsídeo) tiveram a clonagem bem sucedida. Destas, apenas 3 proteínas se apresentaram solúveis e estáveis durante a purificação (3CLpro, Nsp8 e Nucleocapsídeo). Os testes pilotos de Western Blotting e ELISA com as três proteínas recombinantes mostraram que apenas a Nucleocapsídeo consegue ser detectada por anticorpos de pacientes convalescentes. A realização do Western Blotting e ELISA com as porções N- e C-terminal da proteína Nucleocapsídeo separadamente, revelou que a C23 que compreende a proteína inteira apresenta melhores valores de sensibilidade e especificidade em ambas as técnicas utilizadas, sendo melhor no ensaio de ELISA (Tabela 3).

As proteínas 3CLpro e Nsp8 que não puderam ser utilizadas nos testes de Western Blotting e ELISA em larga escala, por não terem resultados promissores

nos testes pilotos, foram utilizadas para incubações, com cultura de macrófagos para avaliar seu efeito inflamatório, assim como a Nucleocapsídeo.

Em testes de viabilidade celular usando a metodologia de MTT não foi observado decaimento significativo das taxas de sobrevivência com aplicação das proteínas C5, C8 e C23, mantendo a viabilidade celular acima de 70% para todas as concentrações testadas. Ensaio adicional para verificar a integridade das células, como o LDH, poderiam sugerir se uma eventual alteração no perfil de citocinas estaria relacionada à ativação do perfil inflamatório, afastando alterações relacionadas à morte celular, caso a viabilidade observada até então se mantivesse. Entretanto, antes de prosseguir com os ensaios de integridade celular e seguindo a sugestão da banca de qualificadora realizada em novembro de 2022, as proteínas recombinantes C5, C8 e C23 foram encaminhadas para análise da presença de endotoxinas no Instituto Butantan.

As endotoxinas ou lipopolissacarídeo (LPS) compõem a membrana externa das bactérias Gram-negativas e podem contaminar proteínas recombinantes quando purificadas junto às proteínas de interesse expressas em *E. coli*, como no presente projeto. O LPS é um potente estimulador imunológico natural uma vez que ao se ligar ao receptor celular de endotoxinas bacterianas Toll-like 4 (TLR4) ativa eventos que desencadeiam a imunidade e inflamação inatas em muitos tipos celulares, induzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias especialmente em monócitos/macrófagos. A liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como TNF-alfa, IL-1 e IL-6, assim como MCP e COX2, que desencadeiam vias de transdução de sinal para promover a resposta imune. A linhagem celular J774.1 escolhida neste projeto para avaliar a liberação de citocinas *in vitro* desencadeada pelas proteínas recombinantes de SARS-CoV-2 podem ser ativadas por 10ng/mL de LPS. Além de inibir o crescimento celular de J774.1, esta quantidade de LPS é capaz de estimular alterações significativas na expressão de mRNA das citocinas, com pico de ativação de 4 horas após a indução. Para a alteração da expressão de TNF-alfa basta a presença de 1 ng/mL de LPS (Huang et al., 2012).

Assim, seria importante minimizar a quantidade de LPS presente nas proteínas recombinantes antes da incubação em cultura celular, a fim de propiciar um ambiente fidedigno para análise da alteração dos perfis de liberação de TNF-alfa, IL-1 e IL-6, sem interferência da endotoxina.

Alguns autores afirmam que protocolos de purificação comuns que incluem várias etapas cromatográficas, como troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica e gel filtração podem reduzir as altas concentrações de endotoxinas no início do processo de expressão para cerca de 100 EU/ml sem tratamento especial (Petsch e Anspach, 2000). Entretanto, isto não foi observado nas proteínas deste projeto que passaram por duas etapas de purificação, sendo elas afinidade e gel filtração, já que o relatório realizado pelo Instituto Butantan revelou a presença de grande quantidade de endotoxinas nas amostras (Anexos - páginas 151 a 160). A unidade EU (Unidades de Endotoxina) refere-se à atividade biológica de uma endotoxina que pode diferir em atividade ou potência biológica. Não é possível converter EU em outra medida visto que a pirogenicidade ou reatividade em testes de detecção de endotoxina pode diferir entre moléculas do mesmo peso, ou mesmo endotoxinas de pesos diferentes podem apresentar a mesma reatividade. Como regra geral, considera-se que 1EU corresponde a 0,1 a 0,2ng de endotoxina (Petsch e Anspach, 2000). Utilizando a conversão de 1EU para 0,2ng e considerando que as culturas celulares foram incubadas com aproximadamente 50µL de cada amostra, percebemos que todas as condições ultrapassaram o limite de 0,5ng de LPS responsáveis pela ativação de macrófagos sugerida por Huang e colaboradores (2012) (Tabela 4). A quantidade de endotoxinas nas amostras pode comprometer a análise de citocinas pró-inflamatória já que este ativa as mesmas vias de liberação às quais desejávamos analisar. Seria importante remover as endotoxinas em questão e refazer os testes de MTT para reavaliação dos resultados, já que a maior queda de viabilidade foi observada na inoculação de C23, que é a proteína mais contaminada com endotoxina.

Tabela 4. Quantificação de endotoxinas incubadas com as culturas celulares

Amostra analisada	Endotoxina (UE/mL)	Endotoxina estimada (ng/µL)	Quantidade incubada (ng/50µL)
C5	1,13 x 10 ³	0,260	13,00
C8	342	0,068	3,42
C23	1,62 x 10 ⁴	3,240	162,00
Tampão C5 e C23	1,78 x 10 ³	0,356	17,80
Tampão C8	56,2	0,011	0,56

Vários métodos de remoção de endotoxinas estão disponíveis no mercado, como ultrafiltração, cromatografia de troca aniônica, sepharose imobilizada com histamina e histidina, sepharose imobilizada com polimixina B, assim como a utilização de carvão ativado e surfactantes. Todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens a serem considerados, dependendo das características da proteína de interesse e recuperação proteica esperada.

Atualmente, grande parte dos sistemas de remoção de endotoxinas disponíveis baseia-se na adsorção não específica de LPS em superfícies carregadas e/ou hidrofóbicas. Novas tecnologias utilizando micropartículas de anticorpo anti lipídeo A com igual eficiência de depuração de endotoxina, porém de maneira específica, tem mostrado 35% maior de capacidade de recuperação proteica (Casonato Melo et al., 2023).

O protocolo de etapa única desenvolvido por Reichelt, Schwarz e Donzeau (2006) para purificar proteínas recombinantes, utilizando detergente não iônico, como o Triton X-114, adicionado ao tampão de lavagem, remove com sucesso mais de 99% dos contaminantes de endotoxinas da amostra, com recuperação de quase 100% do rendimento proteico. Os detergentes utilizados acima da concentração micelar crítica formam interações apolares com o lipídeo A do LPS, acomodando a endotoxina nas micelas, permitindo a separação em fase aquosa em duas fases pelo aumento da temperatura ou centrifugação. Este protocolo foi eficaz em reduzir endotoxinas de 4 para 0,2EU/mg e testá-lo poderá ser uma alternativa para a continuidade do projeto no que se refere à incubação no cultivo celular, conforme proposto inicialmente.

Uma outra alternativa seria a utilização de bactérias livres de LPS para expressão heteróloga das proteínas de interesse. Temos, por exemplo, a exploração de bactérias do gênero *Sphingomonas*, que são livres de LPS por estes serem substituídas por glicosfingolipídeos não tóxicos (GSL) que, no estudo desenvolvido por Shahar e colaboradores (2023), produziram polipeptídeos virais complexos solúveis, reconhecidos por anticorpos criados contra o vírus completo.

Planejamos utilizar a cepa Endotoxin-Free ClearColi® BL21 (DE3) geneticamente modificada para remover os gatilhos da resposta imune associados ao LPS, mantendo a viabilidade e a capacidade de expressão proteica. Conforme

informações do fabricante Lucigen e a Research Corporation Technologies, as proteínas expressas a partir desta linha celular praticamente não causam produção de citocinas inflamatórias, dispensando tratamentos de remoção de endotoxinas nas proteínas purificadas de maneira tradicional. Durante a reativação da cepa mantida congelada no acervo do nosso laboratório, percebemos a resistência do inóculo à kanamicina, antes mesmo da transformação com os plasmídeos das construções deste projeto. Fizemos um teste de expressão antes da transformação utilizando 0,5mM de IPTG à 37°C por 4 horas e observamos a presença de bandas de indução no gel de SDS-PAGE com o peso molecular entre 45 e 66,2 kDa (Figura 63). Aparentemente, a cepa em estoque estava contaminada com o plasmídeo cuja indução de expressão era semelhante às proteínas de interesse, o que impossibilitou a sua utilização.

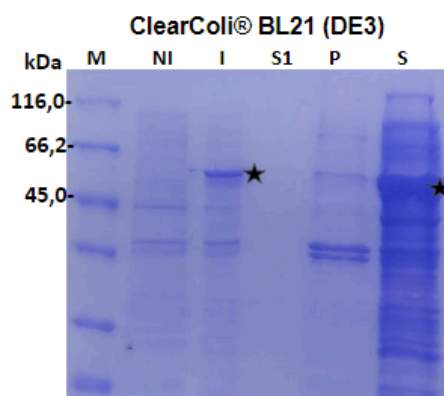


Figura 63. Teste de expressão em ClearColi® BL21™(DE3) (Lucigen e a Research Corporation Technologies) sem prévia transformação com plasmídeo de expressão, induzida com 0,5mM de IPTG à 37°C por 4 horas. Observou-se banda de indução de peso molecular entre 45 e 66,2kDa (estrelas) na indução e no sobrenadante. Descartou-se a utilização desta cepa pela suspeita de contaminação com plasmídeo com sistema de expressão semelhante ao deste projeto. NI- amostra Não Induzida; I- amostra Induzida; S1- sobrenadante antes da lise bacteriana; P- Precipitado/corpos de inclusão; S- Sobrenadante/proteínas solúveis; M- Padrão de peso molecular em kDa (Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo Scientific™). Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie.

Vale ressaltar que os tampões aos quais as proteínas C5 e C23 foram eluídas também apresentaram grande quantidade de LPS e seria necessária sua purificação para utilização como controle de ativação da inflamação. Considerando a

dificuldade de remoção de endotoxina dos biomateriais, seria necessário prevenir a sua contaminação, já que esta é predominante na água de torneira, no ar e nos dedos do manipulador. As colunas de destilação e deionização não são capazes de remover LPS da água, sendo necessárias colunas especiais e sistemas de filtragem ou aquisição de água livre de pirógenos até para os procedimentos de lavagem. Os reagentes químicos, matérias-primas e tampões podem ser fonte de endotoxinas, assim como vidrarias e equipamentos utilizados, mesmo após autoclavagem padrão. A água destilada e o PBS utilizados, podem apresentar 20 EU/mL e 76 EU/mL respectivamente, resultante em importante fonte de contaminação das proteínas e tampões (Gorbet e Sefton, 2005). Uma alternativa para purificação dos tampões seria a ultrafiltração com membranas com poro de 10 kDa, visto que o monômero de endotoxina tem massa molar de aproximadamente 10 kDa, podendo variar de 15 a 20 kDa devido à variabilidade da cadeia de oligossacarídeos. A endotoxina também tende a formar agregados com alta estabilidade, que seriam retirados por estas membranas. A ultrafiltração com membranas com poro de 10 kDa é costumeiramente utilizada para obter água ultrapura em sistemas de laboratório. Entretanto, as moléculas de endotoxina podem degradar lentamente alta temperatura (~100°C) ou em pH ácido (pH 3,5–4,5) e liberar a porção tóxica do LPS, o lipídeo A, que tem de 2 a 4 kDa e pode permear a membrana (Petsch e Anspach, 2000).

Assim, para utilização de proteínas recombinantes em culturas celulares, é importante observar e evitar as fontes de contaminação com LPS nos tampões e ainda adotar medidas de remoção de endotoxinas antes da incubação. É altamente recomendado a realização de testes de alta sensibilidade à endotoxinas a fim de estimar sua quantificação antes da inoculação de culturas celulares, principalmente quando o objetivo é a análise de ativação de vias de inflamação relacionadas à presença de endotoxinas.

Os próximos passos compreendem a (1) purificação das proteínas para minimização da presença de LPS. (2) repetição as inoculações das proteínas purificadas nas culturas celulares e realização de testes de viabilidade celular (AlamarBlue, MTT e LHD). (3) co-localização da proteína inoculada em cultura celular de macrófagos por imunofluorescência, (4) dosagem de citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa, IL-1 e IL-6) por ELISA/PCR, (5) análise estatística, (6) revisão bibliográfica, elaboração de hipótese.

7 PRODUTIVIDADE

7.1 Artigos publicados

COELHO, Fabiana Fioravante et al. SARS-CoV-2 Rapid Antigen Test Based on a New Anti-Nucleocapsid Protein Monoclonal Antibody: Development and Real-Time Validation. **Microorganisms**, v. 11, n. 10, p. 2422, 2023.

DE ALMEIDA, Michelle Teixeira et al. Obtaining a high titer of polyclonal antibodies from rats to the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its N-and C-terminal domains for diagnostic test development. **Journal of Immunological Methods**, p. 113558, 2023.

ROSA, Ivana F. et al. Photobiomodulation reduces the cytokine storm syndrome associated with Covid-19 in the zebrafish model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6104, 2023.

Fanelli, C., Francini, A. L., Celestrino, G. A., Teles, F., Barbosa, A. P., Noda, P., ... & Noronha, I. L. (2023). Tamoxifen associated to the conservative CKD treatment promoted additional antifibrotic effects on experimental hypertensive nephrosclerosis. *Scientific Reports*, 13(1), 13985.

SILVA, Everidiene KVB et al. Immunization with SARS-CoV-2 Nucleocapsid protein triggers a pulmonary immune response in rats. **PLoS One**, v. 17, n. 5, p. e0268434, 2022.

LUCIO CARRASCO, Caio Henrique et al. SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein is Associated With Lower Testosterone Levels: An Experimental Study. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 867444, 2022.

FERNANDES, Bianca H. Ventura et al. Toxicity of spike fragments SARS-CoV-2 S protein for zebrafish: A tool to study its hazardous for human health?. **Science of The Total Environment**, v. 813, p. 152345, 2022.

7.2 Artigo em fase de redação

BARBOSA, Ana Paula et al., Bomfim, C. G., Andreatta-Santos, Robert, et al. "Serological methods for COVID-19 and retrospective screening of visitors to the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo, Brazil".

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Básica**. Elsevier Health Sciences, 2012.

AGÊNCIA SENADO FEDERAL NOTÍCIAS. **Governo federal revoga decretos de enfrentamento à pandemia**. Disponível em: <<https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2022/05/23/governo-federal-revoga-decretos-de-enfrentamento-a-pandemia>>. Acesso em: 23 mai. 2024.

ANDREATA-SANTOS, Robert et al. Validation of Serological Methods for COVID-19 and Retrospective Screening of Health Employees and Visitors to the São Paulo University Hospital, Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 787411, 2022.

ARAUJO, Danielle Bastos et al. SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in Brazil and establishment of a coordinated task network. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, 2020.

ARYA, Rimanshee et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. **Journal of molecular biology**, v. 433, n. 2, p. 166725, 2021.

BAR-ON, Yinon M. et al. SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. **elife**, v. 9, p. e57309, 2020.

BASTOS, Saulo B. et al. The COVID-19 (SARS-CoV-2) uncertainty tripod in Brazil: Assessments on model-based predictions with large under-reporting. **Alexandria Engineering Journal**, v. 60, n. 5, p. 4363-4380, 2021.

BAYANI, Fatemeh et al. An overview of the vaccine platforms to combat COVID-19 with a focus on the subunit vaccines. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, 2023.

BAZARGAN, Mahsa; ELAHI, Reza; ESMAEILZADEH, Abdolreza. OMICRON: Virology, immunopathogenesis, and laboratory diagnosis. **The Journal of Gene Medicine**, v. 24, n. 7, p. e3435, 2022.

BEESLEY, Lauren J. et al. SARS-CoV-2 variant transition dynamics are associated with vaccination rates, number of co-circulating variants, and convalescent immunity. **EBioMedicine**, v. 91, 2023.

BEYERSTEDT, Stephany; CASARO, Expedito Barbosa; RANGEL, Érika Bevilaqua. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 40, p. 905-919, 2021.

BONATO, Giulia; DIOSCORIDI, Lorenzo; MUTIGNANI, Massimiliano. Fecal–oral transmission of SARS-COV-2: Practical implications. **Gastroenterology**, v. 159, n. 4, p. 1621-1622, 2020.

BOSCH, Berend Jan et al. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. **Journal of virology**, v. 77, n. 16, p. 8801-8811, 2003.

BRIERLEY, Ian; DIGARD, Paul; INGLIS, Stephen C. Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. **Cell**, v. 57, n. 4, p. 537-547, 1989.

BUCHHOLZ, Ursula J. et al. Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 26, p. 9804-9809, 2004.

CAO, Zhidong et al. Estimating the effective reproduction number of the 2019-nCoV in China. **MedRxiv**, p. 2020.01. 27.20018952, 2020.

CARABELLI, Alessandro M. et al. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 162-177, 2023.

CASONATO MELO, Cristiane et al. Recovering What Matters: High Protein Recovery after Endotoxin Removal from LPS-Contaminated Formulations Using Novel Anti-Lipid A Antibody Microparticle Conjugates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, p. 13971, 2023.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Guidance for unvaccinated people: how to protect yourself & others.** Disponível em:

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/prevention.html>. Acesso em: 20 jun. 2021.

CHEN, Yu; LIU, Qianyun; GUO, Deyin. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 4, p. 418-423, 2020.

COLONIA, Saditt Rocio Robles et al. Assessing COVID-19 pandemic excess deaths in Brazil: Years 2020 and 2021. **Plos one**, v. 18, n. 5, p. e0272752, 2023.

CORMAN, V. M. et al. Chapter eight—Hosts and sources of endemic human coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 100, 2019.

CORONAVIRUS, S. A. R. S. (2). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome. Nucleotide - NCBI. [s.d.]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947>. Acesso em: 17 jan. 2020.

DA FONSECA, Elize Massard; SHADLEN, Kenneth C.; BASTOS, Francisco I. The politics of COVID-19 vaccination in middle-income countries: Lessons from Brazil. **Social Science & Medicine**, v. 281, p. 114093, 2021.

DE SOUZA, Anacleto Silva et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 variants of concern: A perspective for emerging more transmissible and vaccine-resistant strains. **Viruses**, v. 14, n. 4, p. 827, 2022a.

DE SOUZA, Anacleto Silva et al. Molecular dynamics analysis of fast-spreading severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 variants and their effects on the interaction with human angiotensin-converting enzyme 2. **ACS omega**, v. 7, n. 35, p. 30700-30709, 2022b.

DE SOUZA, William Marciel et al. Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. **Nature human behaviour**, v. 4, n. 8, p. 856-865, 2020.

DELPINO, M. Victoria; QUARLERI, Jorge. SARS-CoV-2 pathogenesis: imbalance in the renin-angiotensin system favors lung fibrosis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 340, 2020.

DENG, Xufang et al. Coronavirus nonstructural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 21, p. E4251-E4260, 2017.

DENISON, Mark R. et al. Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. **RNA biology**, v. 8, n. 2, p. 270-279, 2011.

DI GIULIO, Gabriela Marques et al. Risk governance in the response to global health emergencies: understanding the governance of chaos in Brazil's handling of the Covid-19 pandemic. **Health Policy and Planning**, v. 38, n. 5, p. 593-608, 2023.

DUNBAR, Paul R. et al. Pulmonary monocytes interact with effector T cells in the lung tissue to drive TRM differentiation following viral infection. **Mucosal immunology**, v. 13, n. 1, p. 161-171, 2020.

FERREIRA, Leonardo Souto et al. Estimating the impact of implementation and timing of the COVID-19 vaccination programme in Brazil: a counterfactual analysis. **The Lancet Regional Health–Americas**, v. 17, 2023.

FINKEL, Yaara et al. The coding capacity of SARS-CoV-2. **Nature**, v. 589, n. 7840, p. 125-130, 2021.

FONSECA, Elize Massard da et al. Political discourse, denialism and leadership failure in Brazil's response to COVID-19. **Global public health**, v. 16, n. 8-9, p. 1251-1266, 2021.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **At-Home OTC COVID-19 Diagnostic Tests**. Disponível em: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/home-otc-covid-19-diagnostic-tests>. Acesso em: 29 set. 2023.

GRASSELLI, Giacomo; PESENTI, Antonio; CECCONI, Maurizio. Critical care utilization for the COVID-19 outbreak in Lombardy, Italy: early experience and forecast during an emergency response. **Jama**, v. 323, n. 16, p. 1545-1546, 2020.

GORBET, Maud B.; SEFTON, Michael V. Endotoxin: the uninvited guest. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6811-6817, 2005.

GORDON, David E. et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. **Nature**, v. 583, n. 7816, p. 459-468, 2020.

GORKHALI, Ritesh et al. Structure and function of major SARS-CoV-2 and SARS-CoV proteins. **Bioinformatics and biology insights**, v. 15, p. 11779322211025876, 2021.

GRASSELLI, Giacomo et al. Baseline characteristics and outcomes of 1591 patients infected with SARS-CoV-2 admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. **Jama**, v. 323, n. 16, p. 1574-1581, 2020.

GUO, Li et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). **Clinical infectious diseases**, v. 71, n. 15, p. 778-785, 2020.

HAYN, Manuel et al. Systematic functional analysis of SARS-CoV-2 proteins uncovers viral innate immune antagonists and remaining vulnerabilities. **Cell reports**, v. 35, n. 7, 2021.

HE, Yuxian et al. Antigenic and immunogenic characterization of recombinant baculovirus-expressed severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein: implication for vaccine design. **Journal of virology**, v. 80, n. 12, p. 5757-5767, 2006.

HU, Ben et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141-154, 2021.

HU, Jie et al. D614G mutation of SARS-CoV-2 spike protein enhances viral infectivity. **BioRxiv**, p. 2020.06. 20.161323, 2020.

HUANG, Haiqiu et al. Characterization of lipopolysaccharide-stimulated cytokine expression in macrophages and monocytes. **Inflammation Research**, v. 61, p. 1329-1338, 2012.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Current ICTV Taxonomy Release. Taxonomy Browser**. Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy>. Acesso em: 29 set. 2023.

JAMILLOUX, Yvan et al. Should we stimulate or suppress immune responses in COVID-19? Cytokine and anti-cytokine interventions. **Autoimmunity reviews**, v. 19, n. 7, p. 102567, 2020.

JIN, Yuefei et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-19. **Viruses**, v. 12, n. 4, p. 372, 2020.

KAYE, Alan D. et al. Biology of COVID-19 and related viruses: Epidemiology, signs, symptoms, diagnosis, and treatment. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 35, n. 3, p. 269-292, 2021.

KELLY, Jamie A. et al. Structural and functional conservation of the programmed-1 ribosomal frameshift signal of SARS coronavirus 2 (SARS-CoV-2). **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 31, p. 10741-10748, 2020.

KIM, Dongwan et al. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. **Cell**, v. 181, n. 4, p. 914-921. e10, 2020.

KNOOPS, Kèvin et al. SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. **PLoS biology**, v. 6, n. 9, p. e226, 2008.

KOERBER, Nina et al. Dynamics of spike-and nucleocapsid specific immunity during long-term follow-up and vaccination of SARS-CoV-2 convalescents. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 153, 2022.

KORBER, Bette et al. Spike mutation pipeline reveals the emergence of a more transmissible form of SARS-CoV-2. **BioRxiv**, 2020.

LAMKIEWICZ, Kevin et al. Genome structure, life cycle, and taxonomy of coronaviruses and the evolution of SARS-CoV-2. **Viral Fitness and Evolution: Population Dynamics and Adaptive Mechanisms**, p. 305-339, 2023.

LE, T. Thanh et al. The COVID-19 vaccine development landscape. **Nat Rev Drug Discov**, v. 19, n. 5, p. 305-306, 2020.

LEI, Xiaobo et al. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 3810, 2020.

LI, Qianqian et al. The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity. **Cell**, v. 182, n. 5, p. 1284-1294. e9, 2020.

LIU, Tao et al. Transmission dynamics of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). **Preprint with The Lancet**. 2020.

LONG, Quan-Xin et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. **Nature medicine**, v. 26, n. 6, p. 845-848, 2020.

LOTZE, Michael T.; THOMSON, Angus W. (Ed.). **Measuring Immunity: Basic science and clinical practice**. Elsevier, 2011.

MACHADO, Rafael RG et al. Inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 replication by hypertonic saline solution in lung and kidney epithelial cells. **ACS Pharmacology & Translational Science**, v. 4, n. 5, p. 1514-1527, 2021.

MARKOV, Peter V. et al. The evolution of SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 361-379, 2023.

MCREE, Robin B. COVID-19 laboratory testing/CDC guidelines. **Disease-a-month**, v. 66, n. 9, p. 101067, 2020.

MEIDANINIKJEH, Sepideh et al. Monocytes and macrophages in COVID-19: Friends and foes. **Life sciences**, v. 269, p. 119010, 2021.

MESELSON, Matthew. Droplets and aerosols in the transmission of SARS-CoV-2. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 21, p. 2063-2063, 2020.

MIELECH, Anna M. et al. MERS-CoV papain-like protease has deISGylating and deubiquitinating activities. **Virology**, v. 450, p. 64-70, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. 2023a. **Movimento Nacional pela vacinação contra COVID-19**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/campanhas-da-saude/2023/vacinacao-contra-a-covid-19>. Acesso em: 11 out. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. 2023b. **Esquema Vacinal de Doses - Para população geral com a dose de reforço da Pfizer Bivalente**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/esquema-vacinal/esquema-vacinal-de-doses-para-populacao-geral-com-a-dose-de-reforco-da-pfizer-bivalente/view>. Acesso em: 11 out. 2023.

MINSKAIA, Ekaterina et al. Discovery of an RNA virus 3'→ 5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 13, p. 5108-5113, 2006.

MONTAZERSAHEB, Soheila et al. COVID-19 infection: An overview on cytokine storm and related interventions. **Virology Journal**, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2022.

MORRIS, Gerwyn et al. The pathophysiology of SARS-CoV-2: A suggested model and therapeutic approach. **Life sciences**, v. 258, p. 118166, 2020.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NARAYANAN, Krishna et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 suppresses host gene expression, including that of type I interferon, in infected cells. **Journal of virology**, v. 82, n. 9, p. 4471-4479, 2008.

NOWAK, Jörg. The Pandemic Politics of the Bolsonaro Government in Brazil: COVID-19 Denial, the Chloroquine Economy and High Death Rates. In: **The Political Economy of Global Responses to COVID-19**. Cham: Springer International Publishing, 2023. p. 105-123.

O'LEARY, Valerie Bríd et al. Unpacking pandora from its box: Deciphering the molecular basis of the SARS-CoV-2 coronavirus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 386, 2020.

OKUYA, Kosuke et al. Multiple routes of antibody-dependent enhancement of SARS-CoV-2 infection. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, p. e01553-21, 2022.

PANAHI, Yunes et al. An overview on the treatments and prevention against COVID-19. **Virology Journal**, v. 20, n. 1, p. 1-29, 2023.

PECI, Alketa; GONZÁLEZ, Camilo Ignacio; DUSSAUGE-LAGUNA, Mauricio I. Presidential policy narratives and the (mis) use of scientific expertise: Covid-19 policy responses in Brazil, Colombia, and Mexico. **Policy Studies**, v. 44, n. 1, p. 68-89, 2023.

PENCE, Brandt D. Severe COVID-19 and aging: are monocytes the key?. **Geroscience**, v. 42, n. 4, p. 1051-1061, 2020.

PETSCH, Dagmar; ANSPACH, Friedrich Birger. Endotoxin removal from protein solutions. **Journal of biotechnology**, v. 76, n. 2-3, p. 97-119, 2000.

QI, Hai et al. The humoral response and antibodies against SARS-CoV-2 infection. **Nature Immunology**, v. 23, n. 7, p. 1008-1020, 2022.

RANUCCI, Marco et al. The procoagulant pattern of patients with COVID-19 acute respiratory distress syndrome. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 7, p. 1747-1751, 2020.

RAZAFINDRAKOTO, Mireille et al. Investigating the 'Bolsonaro effect' on the spread of the Covid-19 pandemic: an empirical analysis of observational data in Brazil. **medRxiv**, p. 2023.07. 07.23292354, 2023.

READ, Jonathan M. et al. Novel coronavirus 2019-nCoV (COVID-19): early estimation of epidemiological parameters and epidemic size estimates. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 376, n. 1829, p. 20200265, 2021.

REICHEL, Peter; SCHWARZ, Christoph; DONZEAU, Mariel. Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents. **Protein expression and purification**, v. 46, n. 2, p. 483-488, 2006.

RICCIARDI, Simona et al. The role of NSP6 in the biogenesis of the SARS-CoV-2 replication organelle. **Nature**, v. 606, n. 7915, p. 761-768, 2022.

ROMANO, Maria et al. A structural view of SARS-CoV-2 RNA replication machinery: RNA synthesis, proofreading and final capping. **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1267, 2020.

SANJUÁN, Rafael et al. Viral mutation rates. **Journal of virology**, v. 84, n. 19, p. 9733-9748, 2010.

SANTOS, Norma Suely de O. et al. **Virologia Humana**. Rio de Janeiro-RJ. Grupo GEN, 2021. *E-book*. ISBN 9788527738354. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527738354/>. Acesso em: 29 set. 2023.

SCHUBERT, Katharina et al. SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. **Nature structural & molecular biology**, v. 27, n. 10, p. 959-966, 2020.

SECRETARIA DE COMUNICAÇÃO SOCIAL DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA DO BRASIL. **Vacinação com dose de reforço bivalente contra Covid-19 é ampliada para toda a população acima de 18 anos**. Disponível em: <https://www.gov.br/secom/pt-br/assuntos/noticias/2023/04/vacinacao-com-dose-de-reforc>

o-bivalente-contra-covid-19-e-ampliada-para-toda-a-populacao-acima-de-18-anos.
Acesso em: 11 de out. 2023.

SENDER, Ron et al. The total number and mass of SARS-CoV-2 virions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 25, p. e2024815118, 2021.

SHAHAR, Ehud et al. Endotoxin-free gram-negative bacterium as a system for production and secretion of recombinant proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 107, n. 1, p. 287-298, 2023.

SHANG, Jian et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 21, p. 11727-11734, 2020.

SINGH, Devika; YI, Soojin V. On the origin and evolution of SARS-CoV-2. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 53, n. 4, p. 537-547, 2021.

SIORDIA JR, Juan A. Epidemiology and clinical features of COVID-19: A review of current literature. **Journal of Clinical Virology**, v. 127, p. 104357, 2020.

SNIJDER, E. J.; DECROLY, E.; ZIEBUHR, J. The nonstructural proteins directing coronavirus RNA synthesis and processing. **Advances in virus research**, v. 96, p. 59-126, 2016.

SOLA, Isabel et al. Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses. **Annual review of virology**, v. 2, p. 265-288, 2015.

SUTHAR, Mehul S. et al. Rapid generation of neutralizing antibody responses in COVID-19 patients. **Cell Reports Medicine**, v. 1, n. 3, 2020.

TAY, Matthew Zirui et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363-374, 2020.

TO, Kelvin Kai-Wang et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. **The Lancet infectious diseases**, v. 20, n. 5, p. 565-574, 2020.

TU, Yung-Fang et al. A review of SARS-CoV-2 and the ongoing clinical trials. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 7, p. 2657, 2020.

V'KOVSKI, Philip et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 155-170, 2021.

VAZ, Elisa Souza et al. Drug repositioning in the COVID-19 pandemic: fundamentals, synthetic routes, and overview of clinical studies. **European Journal of Clinical Pharmacology**, p. 1-29, 2023.

VILAR, Santiago; ISOM, Daniel G. One year of SARS-CoV-2: How much has the virus changed?. **Biology**, v. 10, n. 2, p. 91, 2021.

WALLS, Alexandra C. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281-292. e6, 2020.

WANG, Mei-Yue et al. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 587269, 2020.

WERBEL, William A. et al. Your outpatient has COVID-19: what are their treatment options in the current SARS-CoV-2 variant climate?. **Clinical Infectious Diseases**, p. ciad178, 2023.

WILLIAMS, Jeffrey M. et al. Reticulons promote formation of ER-derived double-membrane vesicles that facilitate SARS-CoV-2 replication. **Journal of Cell Biology**, v. 222, n. 7, p. e202203060, 2023.

WOLFF, Georg et al. Double-membrane vesicles as platforms for viral replication. **Trends in microbiology**, v. 28, n. 12, p. 1022-1033, 2020a.

WOLFF, Georg et al. A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle. **Science**, v. 369, n. 6509, p. 1395-1398, 2020b.

WOO, Patrick CY et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Coronaviridae 2023. **Journal of general virology**, v. 104, n. 4, p. 001843, 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) Overview. MERS-CoV transmission and geographic range - 19 January 2019.** Disponível em: https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers#tab=tab_1. Acesso em: 20 jun. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003 Based on data as of the 31 December 2003**. Disponível em http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/. Acesso em: 20 jun. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2023a. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 29 set. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2023b. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, Brazil**. Disponível em: <https://covid19.who.int/region/amro/country/br>. Acesso em 29 set 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2023c. **Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic**. Disponível em: [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic). Acesso em 29 set. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Clinical management of COVID-19: living guideline, 13 January 2023**. World Health Organization, 2023d.

WU, W. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

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

XIA, Hongjie et al. Evasion of type I interferon by SARS-CoV-2. **Cell reports**, v. 33, n. 1, 2020.

XIAO, Kangpeng et al. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. **Nature**, v. 583, n. 7815, p. 286-289, 2020.

XU, Yi et al. Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. **Nature medicine**, v. 26, n. 4, p. 502-505, 2020.

YADAV, Rohitash et al. Role of structural and non-structural proteins and therapeutic targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. **Cells**, v. 10, n. 4, p. 821, 2021.

YUKI, Koichi; FUJIOGI, Miho; KOUTSOGIANNAKI, Sophia. COVID-19 pathophysiology: A review. **Clinical immunology**, v. 215, p. 108427, 2020.

ZHANG, Qianqian et al. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 6, n. 1, p. 233, 2021.

ZHAO, Juanjuan et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with novel coronavirus disease 2019. **Clinical infectious diseases**, v. 71, n. 16, p. 2027-2034, 2020.

ZHOU, Peng et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **nature**, v. 579, n. 7798, p. 270-273, 2020.

ZOU, Xin et al. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. **Frontiers of medicine**, v. 14, p. 185-192, 2020.

9 ANEXOS

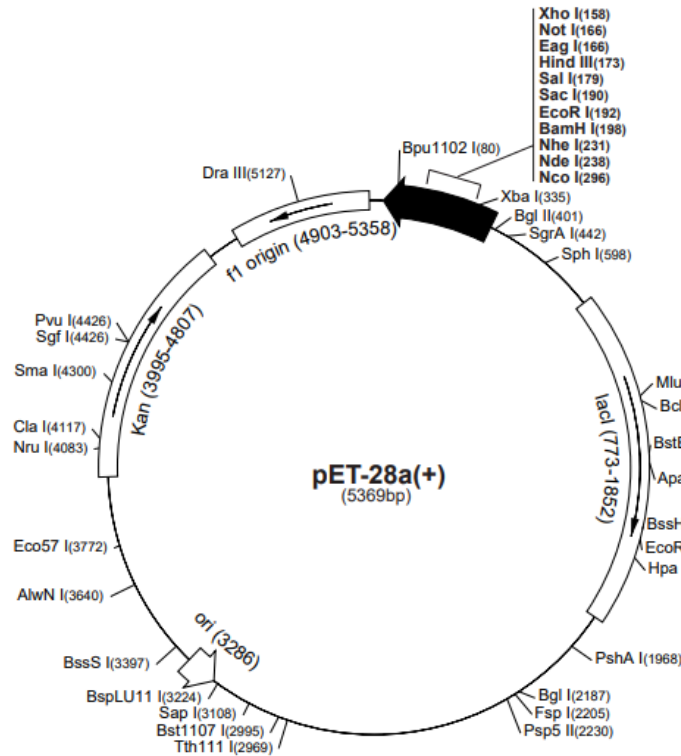


Figura 64. Representação esquemática do plasmídeo pET28a(+). A seta preta indica o sítio múltiplo de clonagem do vetor. Modificado de Novagen (2022).

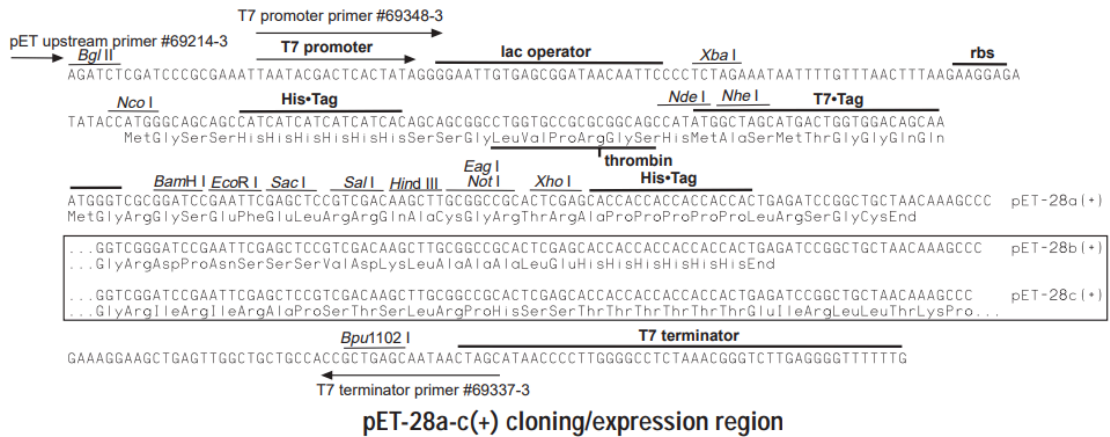



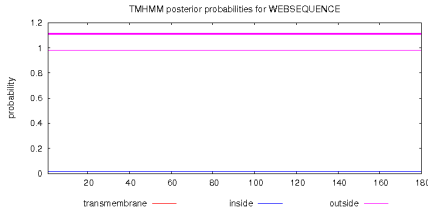
Figura 65. Representação esquemática da sequência do sítio de clonagem múltipla do vetor pET28a(+). Modificado de Novagen (2022).

Quadro 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos genes das construções de fragmentos e proteínas de SARS-CoV-2. F-forward e R-reverse. As sequências dos oligonucleotídeos foram sintetizadas pela empresa Thermo Scientific™. Enzimas de restrição (ER) utilizadas para digestão dos fragmentos durante a clonagem.

Construção	Oligonucleotídeos iniciadores (Primers)		ER
C1_FL Nsp1	F	ACTGCATATGGAGAGCCTTGCCCTG	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTACCCTCCGTTAAGCTCACG	<i>NotI</i>
C2_FL Nsp2	F	ACTGCATATGGCATACTCGCTATGTCGATAAC	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTAACCGCCTTTGAGTGTGAAG	<i>NotI</i>
C3a 1-1341 Protease tipo papaina N-terminal	F	ACTGGGATCCGCACCAACAAAGGTTACTTTTGG	<i>BamHI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTACCGTGTAAGTATGTTAGTAGTTGTAC	<i>NotI</i>
C3b 1588-1945 Protease tipo papaina C-terminal	F	ACTGGGATCCTCATCAACTGTATGATGTGTACAAAC	<i>BamHI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTAACCACCCCTAAGTGCTATCTTTG	<i>NotI</i>
C4_FL Nsp4	F	ACTGCATATGAAAATTGTTAATAATTGGTTGAAGCAGTTAATTAAG	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTACTGCAAAACAGCTGAGGTG	<i>NotI</i>
C5_FL Protease 3CLpro	F	ACTGGCTAGCAGTGGTTTTAGAAAAATGGCATTCC	<i>NheI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTATTGGAAAGTAACACCTGAGCATTG	<i>NotI</i>
C6_FL Nsp6	F	ACTGCATATGAGTGCAGTGAAAAGAACAATCAAG	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTACTGTACAGTGGCTACTTTGATAC	<i>NotI</i>
C7_FL Nsp7	F	ACTGCATATGTCTAAAATGTCAGATGTAAAGTGCAC	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTATTGTAAGGTTGCCCTGTTGTC	<i>NotI</i>
C8_FL Nsp8	F	ACTGGCTAGCGCTATAGCCTCAGAGTTTAGTTCC	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTACTGTAATTTGACAGCAGAATTGGC	<i>NotI</i>
C9_FL Nsp9	F	ACTGCATATGAATAATGAGCTTAGTCCTGTTGC	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTATTGTAGACGTAAGTGTGGCAG	<i>NotI</i>
C10_FL Nsp10	F	ACTGCATATGGCTGGTAATGCAACAGAAGTG	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTACTGAAGCATGGGTTCCG	<i>NotI</i>
C11_10-932 RdRp	F	ACTGCATATGCGGGTTTGGCGGTGTAAGTG	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTACTGTAAGACTGTATGCGGTGTG	<i>NotI</i>

C12_FL Helicase	F	ACTGCATATGGCTGTTGGGGCTTGTG	<i>NdeI</i>
C13_FL ExoN	F	ACTGCATATGGCTGAAAATGTAACAGGACTCTTTAAAG	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTACTGAAGTCTTGAAAAGTGTCCAG	<i>NotI</i>
C14_FL NendoU	F	ACTGCATATGAGTTTAGAAAATGTGGCTTTTAATGTTG	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTATTGTAATTTTGGGTAAAATGTTTCTACATG	<i>NotI</i>
C15_FL 2'-O-MT	F	ACTGCATATGTCTAGTCAAGCGTGCCAAC	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTAGTTGTTAACAAGAACATCACTAGAAATAAC	<i>NotI</i>
C17_131-275 ORF3a	F	ACTGCATATGTGGAAATGCCGTTCCAAAAC	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTACAAAGGCACGCTAGTAG	<i>NotI</i>
C18_41-75 E	F	ACTGCATATGGCGTACTGCTGCAATATTGTTAAC	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTAGACCAGAAGATCAGGAACTCTAG	<i>NotI</i>
C19_109-222 M	F	ACTGCATATGTGGTCATTCAATCCAGAACTAAC	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTACTGTACAAGCAAAGCAATATTGTC	<i>NotI</i>
C20_FL ORF6	F	ACTGCATATGTTTCATCTCGTTGACTTTCAG	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTAATCAATCTCCATTGGTTGCTC	<i>NotI</i>
C21_1-85 ORF7a	F	ACTGCATATGAAAATTATTCTTTTCTTGGCACTG	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTATTTAGGTGAAACTGATCTGGCAC	<i>NotI</i>
C22_FL ORF8	F	ACTGGCTAGCATGAAATTTCTTGTTTTCTTAGGAATCATC	<i>NheI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTTAGATGAAATCTAAAACAACACGAACG	<i>NotI</i>
C23_FL N	F	AGCATAGCTAGCTCTGATAATGGACCCCAAATCAGC	<i>NheI</i>
	R	ATTATCGGATCCTTAGGCCTGAGTTGAGTCAGC	<i>BamHI</i>
cNTD N	F	AGCATAGCTAGCAATAATACTGCGTCTTGGTTCACCG	<i>NheI</i>
	R	ATTATCGGATCCTTATCTGCTCCCTTCTGCGTAGAAG	<i>BamHI</i>
cCTD N	F	AGCATAGCTAGCATGGCTGGCAATGGCGG	<i>NheI</i>
	R	ATTATCGGATCCTTAGGCCTGAGTTGAGTCAGC	<i>BamHI</i>
C24_FL ORF10	F	ACTGCATATGGGCTATATAAACGTTTTTCGC	<i>NdeI</i>
	R	ACTGGCGGCCGCTATGTGAGATTAAGTTAACTACATCTACTTG	<i>NotI</i>

Tabela 5. Elaboração das construções, considerando a primeira sequência depositada no Brasil, os modelos descritos por Zhang e colaboradores (2021)

#	Sequência de proteínas traduzida do genoma do SARS-CoV-2	<u>C-I-TASSER</u> modelo de estrutura e precisão estimada	Nome e função da proteína (com base na curadoria UniProt do proteoma SARS-CoV-2)
1	<p>>QHD43415_1 (L=180) MESLVPGFNEKTHVQLSLPVLQVR DVLVRGFGDSVEEVLSEARQHLKD GTCGLVEVEKGVLPQLEQPYVFIKR SDARTAPHGHVMVELVAELEGIQYG RSGETLGVLPVHGEIPVAYRKVLL RKNGNKGAGGHSYGADLKSFDLG DELGTDPYEDFQENWNTKHSSGVT RELMRELNGG</p> <p>C1_FL: P1_Ndel_F: ACTGCCATATGGAGAGCCTTGTCCC TG - Tm: 64C P2_NotI_R: ACTGGCGGCCGCTTACCTCCGTT AAGCTCACG - Tm: 63C</p>	 <p>[QHD43415_1.PDBID] Pontuação TM estimada=0.55</p>  <p>Localização: Citoplasmática</p>	<h2>Nsp1</h2> <p>Inibe a tradução do hospedeiro interagindo com a subunidade ribossomal 40S. O complexo ribossomo Nsp1-40S induz ainda uma clivagem endonucleolítica perto da 5'UTR dos mRNAs do hospedeiro, direcionando-os para degradação. Os mRNAs virais não são suscetíveis à clivagem mediada por Nsp1 graças à presença de uma sequência líder na extremidade 5' e são, portanto, protegidos da degradação. Ao suprimir a expressão do gene hospedeiro, a Nsp1 facilita a expressão gênica viral eficiente em células infectadas e a evasão da resposta imune do hospedeiro.</p>

2

>QHD43415_2 (L=638)
 AYTRYVDN~~NFC~~PGPDGYPLECIKDLL
 ARAGKASCTLSEQLDFIDTKRGVY
 CCREHEHEIAWYTERSEKSYELQTP
 FEIKLAKKFD~~TF~~NGECPNFVFLNSI
 IKTIQPRVEKKKLDGFMGRIRSVYP
 VASPNECNQMCLSTLMKCDHCGET
 SWQTGDFVKATCEFCGTENLTKEG
 ATTCGYLPQNAVVKIYCPACHNSEV
 GPEHSLAEYHNESGLKTILRKGGR
 IAFGGCVFSYVGCHNKCAYWVPR
 SANIGCNHTGVVGESEGLNDNLL
 EILQKEKVNINIVGDFKLNEEIAIILAS
 FSASTSAFVETVKGLDYKAFKQIVE
 SCGNFKVTKGKAKKGAWNIGEQKS
 ILSPLYAFASEAARVRSIFSRTLET
 AQNSVRVLQKAAITILDGISQYSLRL
 IDAMMFTSDLATN~~NLV~~MAYITGGV
 VQLTSQWL~~TNIF~~GTVYEKLPVLDW
 LEEKFKEGVEFLRDGWEIVKFISTC
 ACEIVGGQIVTCAKEIKESVQTFFKL
 VNKFLALCADSIIGGAKLKALNLGE
 T~~FV~~THSKGLYRKC~~VKS~~SREETGLLM
 PLKAPKEIIFLEGETLPTEVLTEEVV
 LKTGDLQPLEQPTSEAVEAPLVGTP
 VCINGLMLLEIKDTEKYCALAPNMM
 VTNNTFTLKGG

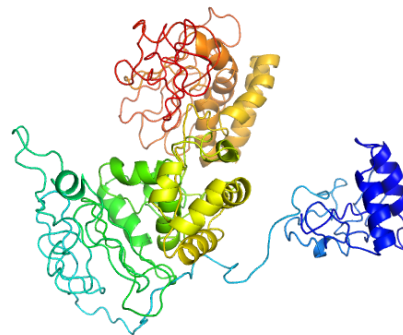
C2_FL:

P3_NdeI_F:

ACTGCATATGGCATACTCGCTAT
 GTCGATAAC - Tm 64C

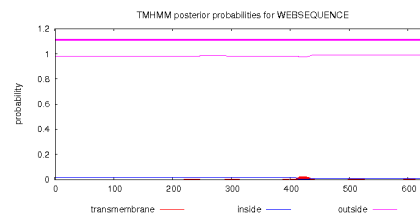
P6_NotI_R:

ACTGGCGGCGCGCTTAACCGCCTTT
 GAGTGTGAAG - Tm 63C

C2_1-110:

[QHD43415_2.PDBID]

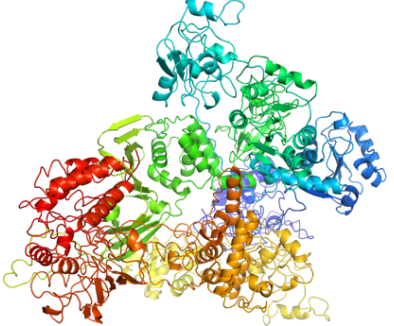
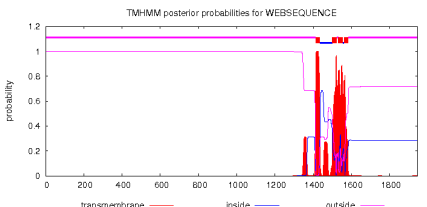
Pontuação TM estimada=0.33



Localização: Citoplasmática

Nsp2

Pode desempenhar um papel na modulação da via de sinalização de sobrevivência da célula hospedeira, interagindo com o PHB e o PHB2 do hospedeiro. Na verdade, estas duas proteínas desempenham um papel na manutenção da integridade funcional das mitocôndrias e na proteção das células contra o estresse.

	<p>P3_NdeI_F: ACTGCATATGGCATACTCGCTAT GTCGATAAC - Tm 64C</p> <p>P4_NotI_R: ACTGGCGGCCGCTTACTTTTCAAC CCTTGGTTGAATAGTC - Tm 63C</p> <p>C2_117-638:</p> <p>P5_NdeI_F: ACTGCATATGGGTAGAATTCGATCT GTCTATCC - Tm 64C</p> <p>P6_NotI_R: ACTGGCGGCCGCTTAACCGCCTTT GAGTGTGAAG - Tm 63C</p>		
3	<p>>QHD43415_3 (L=1945) APTKVTFGDDTVIEVQGYKSVNITFE LDERIKVLNEKCSAYTVELGTEVN EFACVVADAVIKTLQPVSELLTPLGI DLDEWSMATYYLFDESGEFKLASH MYCSFYPPEDEEEEGDCEEEEFEP STQYEYGTEDDYQGKPLEFGATSA ALQPEEEQEEDWLDDDSQQTVGQ QDGSEDNQTTTIQTIVEVQPQLEME LTPVVQTIEVNSFSGYLKLTDNVYIK NADIVEAKVKPTVVVNAANVYLK HGGGVAGALNKATNNAMQVESDD YIATNGPLKVGGSVCVLSGHNLAKH CLHVVGPNVNGEDIQLLSAYENF NQHEVLLAPLLSAGIFGADPIHSLR VCVDTVRTNVYLAVFDKNLYDKLVS SFLEMKSEKQVEQKIAEIPKEEVKP FITESKPSVEQRKQDDKKIKACVEE VTTTLEETKFLTENLLLYIDINGNLHP DSATLVSDIDITFLKKDAPYIVGDVV QEGVLTAVVIPTKKAGGTTEMLAKA LRKVPTDNYITTPYGQGLNGYTVVEE AKTVLKKCKSAFYILPSIISNEKQEIL</p>	 <p>[QHD43415_3.PDBID] Pontuação TM estimada=0.58</p>  <p>Localização: Citoplasmática ou Nuclear</p>	<h2>Nsp3</h2> <p>Protease semelhante à papaína.</p> <p>Responsável pelas clivagens localizadas no terminal N da poliproteína replicase. Além disso, PLpro possui uma atividade desubiquitinante e processa cadeias de poliubiquitina ligadas a 'Lys-48' e 'Lys-63' a partir de substratos celulares. Participa junto com o Nsp4 na montagem de vesículas citoplasmáticas de membrana dupla induzidas por vírus, necessárias para a replicação viral. Antagoniza a indução imune inata do interferon tipo I, bloqueando a fosforilação, dimerização e subsequente translocação nuclear do hospedeiro IRF3. Impede também a sinalização NF-kappa-B do hospedeiro.</p>

GTVSWNLREMLAHAETRKLMPVC
VETKAIVSTIQRKYKGIKIQEGVVDY
GARFYFYTSKTTVASLINTLNDLNET
LVTMPLGYVTHGLNLEEAARYMRS
LKVPATVSVSSPDAVTAYNGYLTSS
SKTPEEHFIETISLAGSYKDWSYSG
QSTQLGIEFLKRGDKSVYYTSNPTT
FHL DGEVITFDNLKTL LSLREVRTIK
VFTTVDNINLHTQVVDMSMTYGQQ
FGPTYLDGADVTKIKPHNSHEGKTF
YVLPNDDTLRVEAFEYHHTDPSFL
GRYMSALNHTKKWKYPQVNGLTSI
KWADNNCYLATALLTQQIELKFNP
PALQDAYYRARAGEAANFCALILAY
CNKTVGELGDVRETMSYLFQHANL
DSCKRVLNVVCKTCGQQQTTLKGV
EAVMYMGTLSEYQFKKGVQIPCTC
GKQATKYLVQQESPFVMSAPPAQ
YELKHGTFTCASEYTGNYQCGHYK
HITSKETLYCIDGALLKSSEYKGPIT
DVFYKENSYTTTIKPVYKLDGVVC
TEIDPKLDNYYKDNSYFTEQPIDL
PNQYPNASFDNFKFVCDNIKFADD
LNQLTGYKKPASRELKVTFPDLNG
DVVAIDYKHYTPSFKKGAKLLHKPI
VWHVNNATNKATYKPNTWCIRCLW
STKPVETSNSFDVLKSEDAQGMDN
LACEDLKPVSEEVVENPTIQKDVLE
CNVKTTEVVGDIILKPANNSLKITEE
VGHTDLMAAYVDNSSLTIKKNELS
RVLGLKTLATHGLAAVNSVPWDTIA
NYAKPFLNKVVSTTTNIVTRCLNRV
CTNYMPYFFTL LLLQLCTFTRSTNSRI
KASMP TTI AKNTVKS VGKFCLEASF
NYLKSPNFSKLINIIWFL LLSVCLGS
LIYSTAALGVLMSNLGMPSYCTGYR
EGYLNSTNVTIATYCTGSIPCSVCLS

GLDSLDTYPSLETIQITISSFKWDLT
AFGLVAEWFLAYILFTRFFYVLGLA
AIMQLFFSYFAVHFISNSWLMWLIIN
LVQMAPISAMVRMYIFFASFYVVK
SYVHVVDGCNSSTCMMCYKRNRAT
RVECTTIVNGVRRSFYVYANGGKGF
CKLHNWNCVNCDTFCAGSTFISDE
VARDLSLQFKRPINPTDQSSYIVDS
VTVKNGSIHLYFDKAGQKTYERHSL
SHFVNLDNLRANNTKGSPLINVIVF
DGKSKCEESSAKSASVYYSQLMCQ
PILLLDQALVSDVGDSA EVAVKMFD
AYVNTFSSTFNVPMEKLTVAE
AELAKNVSLDNVLSFISAARQGFV
DSDVETKDVVECLKLSHQSDIEVTG
DSCNNYMLTYNKVENMTPRDLGAC
IDCSARHINAQVAKSHNIALIWNVKD
FMSLSEQLRKQIRSAAKNNL PFKL
TCATTRQVVNVVTTKIALKGG

C3_FL:

P7_BamHI_F:

ACTGGGATCCGCACCAACAAAGGT
TACTTTTGG - Tm 64C

P14_NotI_R:

ACTGGCGCGCGCTTAACCACCCTT
AAGTGCTATCTTTG - Tm 63C

C3_1-1341:

P7_BamHI_F:

ACTGGGATCCGCACCAACAAAGGT
TACTTTTGG - Tm 64C

P12_NotI_R:

ACTGGCGCGCGCTTACC GTGTAAC
TATGTTAGTAGTTGTAC - Tm 63C

C3_1588-1945:

<p>P13_BamHI_F: ACTGGGATCCATCAACTTGTATG ATGTGTTACAAAC - Tm 63C</p> <p>P14_NotI_R: ACTGGCGCGCCTTAAACCACCCTT AAGTGCTATCTTTG - Tm 63C</p> <p>C3_207-378: P8_BamHI_F: ACTGGGATCCGTGAATAGTTTTAGT GGTATTTAAACTTACTG - Tm 63C</p> <p>P9_NotI_R: ACTGGCGCGCCTTATTTCACTCTT CATTTCCAAAAAGCTTG - Tm 64C</p> <p>C3_748-1060: P10_BamHI_F: ACTGGGATCCAGGACTATTAAGGT GTTTACAACAGTAG - Tm 64C</p> <p>P11_NotI_R: ACTGGCGCGCCTTATTTTATGGT TGTTGTGTAAGTGTTC - Tm 63C</p>		
---	--	--

4

>QHD43415_4 (L=500)
 KIVNNWLKQLIKVTLVFLFVAAIFYLI
 TPVHVMSKHTDFSSEIIGYKAIDGGV
 TRDIASDTDFANKHADFDTWFSQ
 RGGSYTNDKACPLIAAVITREVGTV
 VPGLPGTILRTTNGDFLHFLPRVFS
 AVGNICYTPSKLIEYDFATSACVLA
 AECTIFKDASGKVPYCYDTNVLEG
 SVAYESLRPDTRYVLMDSIIQFPNT
 YLEGSVRVTTDFSEYCRHGTCER
 SEAGVCVSTSGRWVLNNDYYRSLP
 GVFCGVDAVNLLTNMFTPLIQIGAL
 DISASIVAGGIVAVVTCLAYYFMRFR
 RAFGEYSHVAFNTLLFLMSFTVLC
 LTPVYSFLPGVYSVIYLYLTFYLTND
 VSFLAHIQWMVMFTPLVPFWITAIYII
 CISTKHFYWFFSNYLKRRVVFNGVS
 FSTFEEAALCTFLLNKEMYLKLRSD
 VLLPLTQYNRYLALYNKYKYFSGAM
 DTTSYREAACCHLAKALNDFSNSG
 SDVLYQPPQTSITSAVLQ

C4_FL:

P15_NdeI_F:

ACTGCATATGAAAATTGTTAATAATT
 GGTTGAAGCAGTTAATTAAG - Tm
 64C

P19_NotI_R:

ACTGGCGGCCGCTTACTGCAAAAC
 AGCTGAGGTG - Tm 63C

C4_33-259:

P16_NdeI_F:

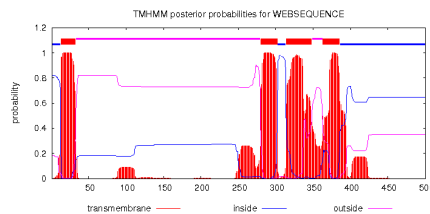
ACTGCATATGTCTAAACATACTGAC
 TTTTCAAGTG - Tm 63C

P17_NotI_R:



[QHD43415_4.PDBID]

Pontuação TM estimada=0.53



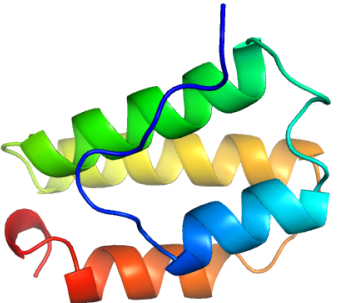
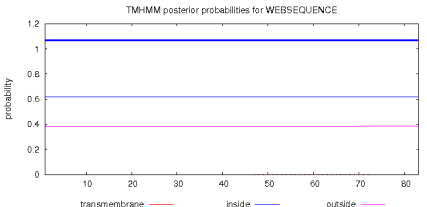
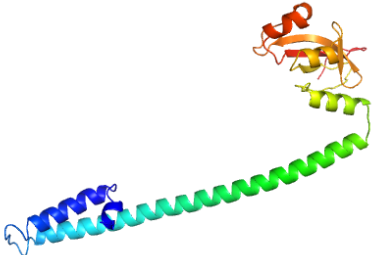
Localização: Membrana

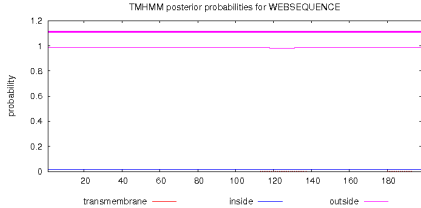
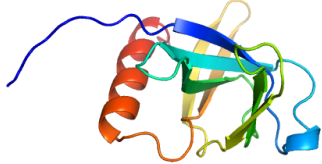
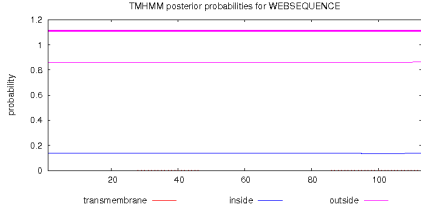
Nsp4

Participa da montagem de vesículas citoplasmáticas de membrana dupla induzidas por vírus, necessárias para a replicação viral.

	<p>ACTGGCGGCCGCTTAATCTACACC ACAGAAAACCTCCTG - Tm 63C</p> <p>C4_395-500: P18_NdeI_F: ACTGCATATGAGTAATTACCTAAAG AGACGTGTAGTC - Tm 63C P19_NotI_R: ACTGGCGGCCGCTTACTGCAAAAC AGCTGAGGTG - Tm 63C</p>		
5	<p>>QHD43415_5 (L=306) SGFRKMAFPSGKVEGCMVQVTCG TTTLNGLWLDVVYCPRHVICTSED MLNPNYEDLLIRKSNHNFLVQAGNV QLRVIGHSMQNCVLKLVDTANPK TPKYKFVRIQPGQTFVLACYNGSP SGVYQCAMRPNFTIKGSFLNGSCG SVGFNIDYDCVFCYMHMELPTG VHAGTDLEGNFYGPFVDRQTAQAA GDTTITVNVLAWLYAAVINGDRWF LNRFTTTLNDFNLVAMKYNIEPLTQ DHVDILGPLSAQTGIAVLDMCASLK ELLQNGMNGRTILGSALLEDEFTPF DVVRQCSGVTFQ</p> <p>C5_FL: P20_NheI_F: ACTGGCTAGCAGTGGTTTTAGAAA AATGGCATTCC - Tm 64C P21_NotI_R: ACTGGCGGCCGCTTATTGGAAAGT AACACCTGAGCATTG - Tm 64C</p>	<div data-bbox="824 587 1191 849" data-label="Chemical-Block"> </div> <p>[QHD43415_5.PDBID] Pontuação TM estimada=0.96</p> <div data-bbox="795 989 1214 1204" data-label="Figure"> </div> <p>Localização: Citoplasmática e Mitocondrial</p>	<p>Nsp5 Protease 3CLpro. Cliva o terminal C da poliproteína replicase em 11 locais. Reconhece substratos contendo a sequência central [ILMVF]-Q-[-SGACN].</p>

<p>6</p>	<p>>QHD43415_6 (L=290) SAVKRTIKGTHHWLLLTLTSLLVLV QSTQWSLFFFLYENAFLPFAMGIIA MSAFAMMFVKHKHAFLLCLFLLPSL ATVAYFNMVYMPASWVMRIMTWLD MVDTSLSGFKLKDCVMYASAVLLI LMTARTVYDDGARRVWTLMNVLTL VYKVVYGNALDQAISMWALIISVTS NYSGVVTVMFLARGIVFMCVEYCP IFFITGNTLQCIMLVYCFLGYFCTCY FGLFCLLNRYFRLTLGVYDYLVTQ EFRYMNSQGILLPPKNSIDAFKLNK LLGVGGKPCIKVATVQ</p> <p>C6_FL: P22_Ndel_F: ACTGCATATGAGTGCAGTGAAAAG AACAAATCAAG - Tm 63C P24_NotI_R: ACTGGCGCCGCITTACTGTACAGT GGCTACTTTGATAC - Tm 63C</p> <p>C6_232-290: P23_Ndel_F: ACTGCATATGAACCGCTACTTTAGA CTGACTC - Tm 63C P24_NotI_R: ACTGGCGCCGCITTACTGTACAGT GGCTACTTTGATAC - Tm 63C</p>	<div data-bbox="824 347 1182 662" data-label="Chemical-Block"> </div> <div data-bbox="824 694 1182 758" data-label="Text"> <p>[QHD43415_6.PDBID] Pontuação TM estimada=0.27</p> </div> <div data-bbox="795 805 1214 1013" data-label="Figure"> </div> <div data-bbox="660 1029 1041 1061" data-label="Text"> <p>Localização: Membrana integral</p> </div>	<h2>Nsp6</h2> <p>Desempenha um papel na indução inicial de autofagossomos do retículo endoplasmático do hospedeiro. Posteriormente, limita a expansão desses fagossomas que não são mais capazes de entregar componentes virais aos lisossomos.</p>
----------	--	--	---

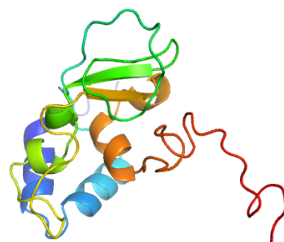
7	<p>>QHD43415_7 (L=83) SKMSDVKCTSVLLSVLQQLRVES SSKLWAQCVQLHNDILLAKDTTEAF EKMVSLLSVLLSMQGAVDINKLCEE MLDNRATLQ</p> <p>C7_FL: P25_NdeI_F: ACTGCATATGTCTAAAATGTCAGAT GTAAAGTGCAC - Tm 64C P26_NotI_R: ACTGGCGCCGCTTATTGTAAGGT TGCCCTGTTGTC - Tm 64C</p>	 <p>[QHD43415_7.PDBID] Pontuação TM estimada=0.89</p>  <p>Localização: Secretada</p>	<h2>Nsp7</h2> <p>Forma um hexadecâmero com Nsp8 (8 subunidades de cada) que pode participar da replicação viral agindo como primase. Alternativamente, podem sintetizar produtos substancialmente mais longos que os iniciadores oligonucleotídicos.</p>
8	<p>>QHD43415_8 (L=198) AIASEFSSLPSYAAFATAQEAYEQA VANGDSEVVLKLLKSLNVAKSEF DRDAAMQRKLEKMDAQMTQMYK QARSEDKRAKVTSAMQTMLFTMLR KLDNDALNNIINNARDGCVPLNIPL TTAAKLMVVIPDYNTYKNTCDGTTF TYASALWEIQVVDADSKIVQLSEIS MDNSPNLAWPLIVTALRANSVVKLQ</p> <p>C8_FL: P27_NheI_F: ACTGGCTAGCGCTATAGCCTCAGA GTTTAGTTCC - Tm 63C</p>	 <p>[QHD43415_8.PDBID] Pontuação TM estimada=0.88</p>	<h2>Nsp8</h2> <p>Forma um hexadecâmero com Nsp7 (8 subunidades de cada) que pode participar da replicação viral agindo como primase. Alternativamente, podem sintetizar produtos substancialmente mais longos que os iniciadores oligonucleotídicos.</p>

	<p>P30_NotI_R: ACTGGCGGCCGCITTACTGTAATTT GACAGCAGAATTGGC - Tm 64C</p> <p>C8_84-132: P28_NheI_F: ACTGGCTAGCACTAGTGCTATGCA GACAATGC - Tm 64C</p> <p>P29_NotI_R: ACTGGCGGCCGCITTATATGACAAC CATTAGTTTGGCTG - Tm 62C</p>	 <p>Localização: Citoplasmática ou Secretada</p>	
9	<p>>QHD43415_9 (L=113) NNELSPVALRQMSCAAGTTQACT DDNALAYYNTTKGGRFVLALLSDL QDLKWARFPKSDGTGTIYTELEPPC RFVTDTPKGPVKYLYFIKGLNNLN RGMVLGSLAATVRLQ</p> <p>C9_FL: P31_NdeI_F: ACTGCATATGAATAATGAGCTTAGT CCTGTTGC - Tm 63C</p> <p>P32_NotI_R: ACTGGCGGCCGCITTATTGTAGACG TACTGTGGCAG - Tm 63C</p>	 <p>[QHD43415_9.PDBID] Pontuação TM estimada=0.93</p>  <p>Localização: Citoplasmática</p>	<p>Nsp9</p> <p>Podem participar da replicação viral agindo como uma proteína de ligação ao ssRNA.</p>

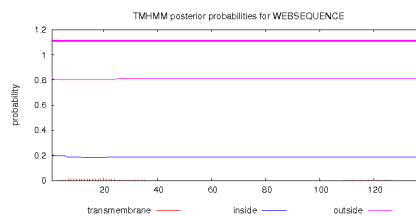
10

>QHD43415_10 (L=139)
 AGNATEVPANSTVLSFCAFAVDAAK
 AYKDYLASGGQPITNCVKMLCTHT
 GTGQAITVTPEANMDQESFGGASC
 CLYCRCHIDHPNPKGFCDLKGKYV
 QIPTTCANDPVGFTLKNTVCTVCGM
 WKGYGCSCDQLREPLMQ

C10_FL:
 P33_NdeI_F:
 ACTGC**CATATGG**CTGGTAATGCAAC
 AGAAGTG - Tm 63C
 P34_NotI_R:
 ACTGG**CGGCCGC**TTACTGAAGCAT
 GGGTTCGC
 - Tm 63C



[QHD43415_10.PDBID]
 Pontuação TM estimada=0.90



Localização: Nuclear

Nsp10

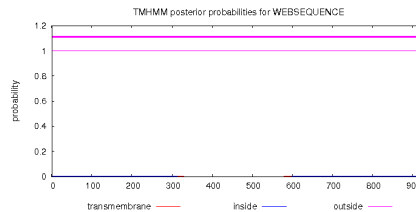
Desempenha um papel fundamental na transcrição viral, estimulando as atividades de exoribonuclease Nsp14 3'-5' e Nsp16 2'-O-metiltransferase. Portanto, desempenha um papel essencial na metilação do cap de mRNAs virais.

11

```
>QHD43415_11 (L=923)
RVCVSAARLTPCGTGTSTDVVYRA
FDIYNDKVAGFAKFLKTNCCRFQEK
DEDDNLIDSYFVVKRHTFSNYQHEE
TIYNLLKDCPAVAKHDFKFRIDGDM
VPHISRQRLTKYTMADLVYALRHFD
EGNCDTLKEILVTYNCCDDDYFNKK
DWYDFVENPDILRVYANLGERVRQ
ALLKTVQFCDAMRNAGIVGLTLDN
QDLNGNWWYDFGDFIQTPGSGVPV
VDSYYSLLMPILTLTRALTAESHVDT
DLTKPYIKWDLKLYDFTEERLKLFD
RYFKYWDQTYHPNCVNLDDRCIL
HCANFNVLFSVFPPTSFGPLVRKIF
VDGVPFVSTGYHFRELGVVHNQD
VNLHSSRSLFKELLYAADPAMHA
ASGNLLLDKRTTCFSVAALTNNVAF
QTVKPGNFNKDFYDFAVSKGFFKE
GSSVELKHFFFAQDGNAAISDYDYY
RYNLPTMCDIRQLLFVVEVDKYFD
CYDGGCINANQVIVNNLDKSAGFPF
NKWGKARLYDSMSYEDQDALFAY
TKRNVIPITQMNLKYAISAKNRART
VAGVSICSTMTNRQFHQKLLKSIAA
TRGATVVIGTSKFGYGGWHNMLKTV
YSDVENPHLMGWDYPKCDRAMPN
MLRIMASLVLARKHTTCCSLSHRFY
RLANCAQVLSEMVMCGGSLYVKP
GGTSSGDATTAYANSVFNICQAVTA
NVNALLSTDGNIADKYVRNLQHR
LYECLYRNRDVTDFVNEFYAYLRK
HFSMMILSDDAVVCFNSTYASQGLV
ASIKNFKSVLYYQNNVFMSEAKCW
TETDLTKGPHEFCSQHTMLVKQGD
DYVYLPYPDPSRILGAGCFVDDIVK
TDGTLMIERFVSLAIDAYPLTKHPNQ
EYADVFHLYLQYIRKLHDELTHGML
```



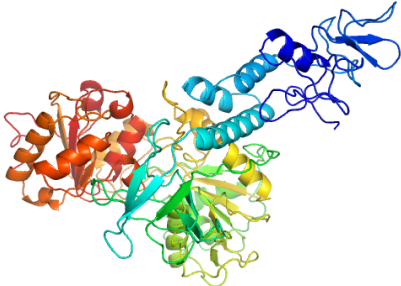
[QHD43415_11.PDBID]
Pontuação TM estimada=0.80

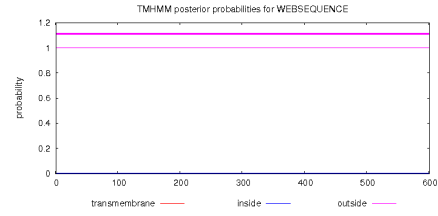



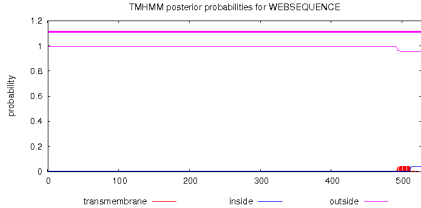
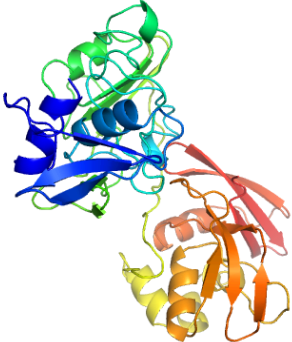
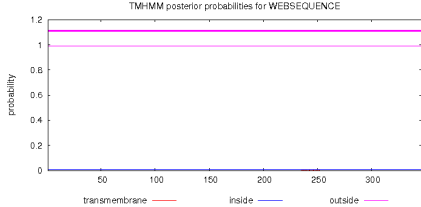
Localização: Nuclear ou Citoplasmática

Nsp12

RNA polimerase dirigida por RNA (RdRp).
Responsável pela replicação e transcrição do genoma do RNA viral.

	<p>DMYSVMLTNDNTSRYWEPEFYEAM YTPHTVLQ</p> <p>C11_1-923: P35_NdeI_F: ACTGCATATGCGGGTTTGCGGTGT AAGTG - Tm 64C P37_NotI_R: ACTGGCGGCCGCTTACTGTAAGAC TGTATGCGGTGTG - Tm 64C</p> <p>C11_100-923: P36_NdeI_F: ACTGCATATGGTACCACATATATCA CGTCAAC - Tm 64C P37_NotI_R: ACTGGCGGCCGCTTACTGTAAGAC TGTATGCGGTGTG - Tm 64C</p>		
12	<p>>QHD43415_12 (L=601) AVGACVLCNSQTSRLRCGACIRRPFL CCKCCYDHVISTSHKLVLSVNPYVC NAPGCDVTDVTQLYLGMSYYCKS HKPPISFPLCANGQVFLYKNTCVG SDNVTFNAIATCDWTNAGDYILAN TCTERLKLFAAETLKATEETFKLSY GIATVREVLSDRELHLSWEVGKPRP PLNRNYVFTGYRVTKNSKVQIGEY FEKGDYGDAVVYRGTTTTYKLNVD YFVLTSHTVMPLSAPTLVPQEHYVRI TGLYPTLNISDEFSSNVANYQKVG QKYSTLQPPGTGKSHFAIGLALYY PSARIVYTACSHAAVDALCEKALKY LPIDKCSRIPARARVECFDKFKVNS TLEQYVFCVNALPETTADIVVFDEI SMATNYDLSVNNARLRAKHVYIG DPAQLPAPRTLLTKGTLEPEYFNSV CRLMKTIGPDMFLGTCRRCPAEIVD</p>	 <p>[QHD43415_12.PDBID] Pontuação TM estimada=0.99</p>	<p>Nsp13</p> <p>Helicase (Hel). Proteína multifuncional com domínio de ligação ao zinco no terminal N exibindo atividades de desenrolamento duplex de RNA com polaridade de 5' a 3'. A atividade da helicase depende do magnésio.</p>

	<p>TVSALVYDNKCLKAHKDKSAQCCKM FYKGVITHDVSSAINRPQIGVVREFL TRNPAWRKAVFISPYNSQNAVASKI LGLPTQTVDSQSGSEYDYVIFTQTT ETAHSCNVNRFNVAITRAKVGILCIM SDRDLYDKLQFTSLEIPRRNVATLQ</p> <p>C12_FL: P38_Ndel_F: ACTGCATATGGCTGTTGGGGCTTG TG - Tm 64C P39_NotI_R: ACTGGCGGCCGCTTATTGTAAAGT TGCCACATTCTACG - Tm 64C</p>	 <p>Localização: Nuclear</p>	
13	<p>>QHD43415_13 (L=527) AENVTLGLFKDCSKVITGLHPTQAPT HLSVDTKFKTEGLCVDIPGPKDMT YRRLISMMGFKMNYQVNGYPNMF TREEAIRHVRAWIGFDVEGCHATRE AVGTNLPLQLGFSTGVNLVAVPTGY VDPNNTDFSRVSAKPPPGDQFKH LIPLMYKGLPWNVVRKIVQMLSDT LKNLSDRVVFVLWAHGFELTSMKY FVKIGPERTCCLDRRATCFSTASD TYACWHHSIGFDYVYNPFMIDVQQ WGFTGNLQSNHDLYCQVHGNAHV ASCDAIMTRCLAVHECFVKRVDWTI EYPIIGDELKINAACRQVQHMVVKA ALLADKFPVLHDIGNPKAIKCVPQA DVEWKFYDAQPCSDKAYKIEELFYS YATHSDKFTDGVCLFWNCNVDRYP ANSIVCRFDTRVLSNLNLPDGGG LYVNKHAFHTPAFDKSAFVNLKQLP FFYYSDSPCESHGKQVSDIDYVPL KSATCITRCNLGGAVCRHHANEYRL YLDAYNMMISAGFSLWVYKQFDY NLWNTFTRLQ</p>	 <p>[QHD43415_13.PDBID] Pontuação TM estimada=0.99</p>	<h2>Nsp14</h2> <p>Revisão de exoribonuclease ExoN/Guanosina-N7 metiltransferase MTase</p> <p>Enzima que possui duas atividades diferentes: uma atividade exoribonuclease atuando tanto no ssRNA quanto no dsRNA na direção 3' para 5' e uma atividade N7-guanina metiltransferase. Atua como uma exoribonuclease de revisão para replicação de RNA, diminuindo assim a sensibilidade do vírus aos mutagênicos de RNA.</p>

	<p>C13_FL: P40_NdeI_F: ACTGCCATATGGCTGAAAATGTAACA GGACTCTTTAAAG - Tm 64C P41_NotI_R: ACTGGCGGCCGCTTACTGAAGTCT TGTAAAAGTTTCCAG - Tm 63C</p>	 <p>Localização: Nuclear ou Citoplasmática</p>	
14	<p>>QHD43415_14 (L=346) SLENVAFNVVNGHFDGQQGEVPV SIINNTVYTKVDGVDVELFENKTTLP VNVAFELWAKRNIKPVEVKILNNL GVDIAANTVIWDYKRDAPAHISTIGV CSMTDIAKKPTETICAPLTVFFDGRV DGQVDLFRNARNGVLITEGSVKGL QPSVGPKQASLNGVTLIGEAVKTQF NYYKKVDGVVQQLPETYFTQSRNL QEFKPRSQMEIDFLELAMDEFIERY KLEGYAFEHIVGDFSHSQLGGLHL LIGLAKRFKESPFELEDFIPMDSTVK NYFITDAQTGSSKCVCSVIDLLDDF VEIKSQDLSVVSKVVKTIDYTEISF MLWCKDGHVETFYPKLQ</p> <p>C14_FL: P42_NdeI_F: ACTGCCATATGAGTTTAGAAAATGTG GCTTTTAATGTTG - Tm 63C P43_NotI_R: ACTGGCGGCCGCTTATTGTAATTTT GGGTAAAATGTTTCTACATG - Tm 63C</p>	 <p>[QHD43415_14.PDBID] Pontuação TM estimada=0.99</p>  <p>Localização: Nuclear ou Citoplasmática</p>	<h2>Nsp15</h2> <p>Endorribonuclease específica de uridilato (NendoU). Enzima específica do uridilato, dependente de Mn(2+), que deixa os fosfatos 2'-3'-cíclicos 5' da ligação clivada.</p>

<p>15</p>	<p>>QHD43415_15 (L=298) SSQAWQPGVAMPNLYKMQRMLLE KCDLQNYGDSATLPKGIMMNVAKY TQLCQYLNTLTLAVPYNMRVIHFGA GSDKGVAPGTAVLRQWLPTGTLV DSDLNDFVSDADSTLIGDCATVHTA NKWDLIISDMYDPKTKNVTKENDSK EGFFTYICGFIQKALGGSVAIKIT EHSWNADLYKLMGHFAWWTAFVT NVNASSEAFLLGICNYLKGPREQID GYVMHANYIFWRNTNPIQLSSYSLF DMSKFPLKLRGTAVMSLKEGQIND MILSLLSKGRLLIRENNRVVISDVLV NN</p> <p>C15_FL: P44_NdeI_F: ACTGCCATATGTCTAGTCAAGCGTG GCAAC - Tm 63C P45_NotI_R: ACTGGCGGCCCGCTTAGTTGTTAAC AAGAACATCACTAGAAATAAC - Tm 64C</p>	<div data-bbox="806 247 1209 582" data-label="Chemical-Block"> </div> <div data-bbox="817 614 1187 678" data-label="Text"> <p>[QHD43415_15.PDBID] Pontuação TM estimada=0.99</p> </div> <div data-bbox="784 726 1220 941" data-label="Figure"> </div> <div data-bbox="649 949 1120 981" data-label="Text"> <p>Localização: Nuclear e Citoplasmático</p> </div>	<h2 data-bbox="1366 454 1512 502">Nsp16</h2> <p data-bbox="1366 510 2072 758">2'-O-methyltransferase (2'-O-MT). Metiltransferase que medeia a metilação do cap 2'-O-ribose do mRNA na estrutura 5'-cap dos mRNAs virais. O cap N7-metil guanosina é um pré-requisito para a ligação do Nsp16. Portanto, desempenha um papel essencial na metilação dos mRNAs virais, que é essencial para escapar do sistema imunológico.</p>

>QHD43416 (L=1273)

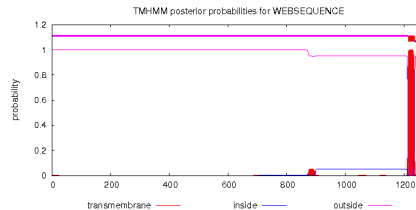
MFVFLVLLPLVSSQCVNLTRTQLP
PAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHS
TQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNG
TKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNII
RGWIFGTTLDSTQSLIVNATNV
VIKVFCEFCNDPFLGVYHKNKNS
WMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPF
LMDLEGKQGNFKNREFVFNIDG
YFKIYSKHTPINLVRDLPPQGSALP
LVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTPG
DSSSGWTAGAAAYVGYLQPRFTL
LKYNENGTITDAVDCALDPLSEK
TLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIV
RFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYA
WNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTF
KCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVI
RGDEVRQIAPGQTGKIADYNYKLPD
DFTGCVIAWNSNLDKVGNNYNY
LYRLFRKSNLKPFRDISTEIQAGS
TPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTN
GVGYQPYRVVLSFELLHAPATVC
GPKKSTNLVKNKCVNFNGLTGT
GVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTD
AVRDPQTLLEILDITPCSFGGVSVITP
GTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIH
ADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGC
LIGAEHVNSYECDIPIGAGICASYQ
TQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLG
AENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEIL
PVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNL
LLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKN
TQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNF
SQILPDPSPKRSFIEDLLFNKVTL
ADAGFIKQYGDCLGDIARDLICAQ
KFNGLTVLPPLLDemiaQYTSALL
AGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQM

16



[QHD43416.PDBID]

Pontuação TM estimada=0.61



Localização: Membrane

CONTRUÇÕES SPIKE JÁ CLONADAS

C450 - NTD 16-165 - N-terminal

Spike glycoprotein (S)

*Proteína Spike S1 (resíduo 13-685): fixa o vírion à membrana celular interagindo com o receptor do hospedeiro, iniciando a infecção. A ligação ao receptor ACE2 humano e a internalização do vírus nos endossomas da célula hospedeira induzem alterações conformacionais na glicoproteína Spike. Utiliza também TMPRSS2 humano para preparação em células pulmonares humanas, que é uma etapa essencial para a entrada viral. A proteólise pela catépsina CTSL pode desmascarar o peptídeo de fusão de S2 e ativar a fusão de membranas dentro dos endossomos

*Proteína Spike S2 (resíduo 686-1273): medeia a fusão do vírion e das membranas celulares, agindo como uma proteína de fusão viral de classe I. No modelo atual, a proteína tem pelo menos três estados conformacionais: estado nativo de pré-fusão, estado intermediário pré-grampo e estado em gancho pós-fusão. Durante a fusão da membrana celular viral é alvo, as regiões enroladas em espiral (repetições de heptal) assumem uma estrutura de trímero de grampos, posicionando o peptídeo de fusão próximo à região C-terminal do ectodomínio. A formação desta estrutura parece impulsionar a aposição e subseqüente fusão das membranas virais e das células alvo.

*Proteína Spike S2' (resíduo 816-1273): atua como um peptídeo de fusão viral que é desmascarado após a clivagem de S2 que ocorre após a endocitose do vírus.

<p> AYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQF NSAIGKIQDLSSTASALGKLQDVV NQNAQALNTLVKQLSSNFGAIVSVL NDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQS LQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATK MSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMS FPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNF TTAPAICHGKAHFPREGVFVSNGT HWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGN CDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKE ELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINAS VVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQ ELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAI VMVTIMLCCMTSCCCLKGCCSCG SCCKFDEDDSEPVKGVKLHYT </p> <p> Clonado. Insolúvel - Purificado em uréia 6M que afeta a viabilidade das células em cultura </p>	<p> C561 - CTD 333-519 RBD-terminal C741 - NTD 16-262 N-terminal C2400 - Full 274-1073 Inteira C420 - HR1-HR2 944-1083 C-terminal C5 NTD NTD 26-294 N-terminal C6 S2 NTD S2 26-697 N-terminal C7 RBD 333-530 RBD-terminal C8 SD1 RBD 321-590 RBD-terminal </p>	
--	---	--

17

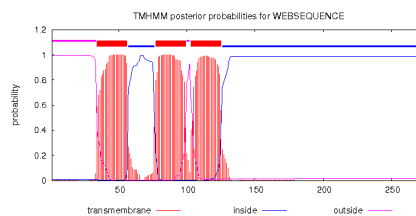
>QHD43417 (L=275)
 MDLFMRIFTIGTVTLKQGEIKDATPS
 DFVRATATIPIQASLPFGWLIVGVAL
 LAVFQSASKIITLKKRWQLALS~~SKGV~~
 HFVCNLLLLFVTVYSHLLLVAAGLE
 APFLYLYALVYFLQSIN~~FVRIIMRLWL~~
 CWKCRSKNPLLYDANYFLCWHTNC
 YDYCIPYNSVTSSIVITSGDGTSPIS
 EHDYQIGGYTEKWESGVKDCVVLH
 SYFTSDYYQLYSTQLSTDTGVEHVT
 FFIYNKIVDEPEEHVQIHTIDGSSGV
 VNPVMEPIYDEPTTTTSVPL

C17_131-275:
 P46_NdeI_F:
 ACTGCATATGTGGAAATGCCGTTCCAAAAAC - Tm 63C
 P47_NotI_R:
 ACTGGCGGCCGCTTACAAAGGCA
 CGCTAGTAG - Tm 63C



[QHD43417.PDBID]

Pontuação TM estimada=0.20



Localização: Membrana integral

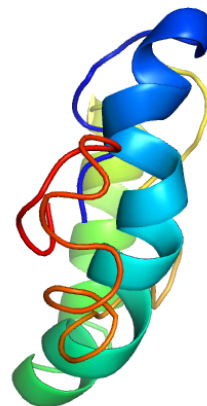
ORF3a

Forma canais iônicos homotetraméricos sensíveis ao potássio (viroporina) e pode modular a liberação do vírus. Regula positivamente a expressão das subunidades de fibrinogênio FGA, FGB e FGG nas células epiteliais do pulmão hospedeiro. Induz apoptose em cultura celular. Regula negativamente o receptor de interferon tipo 1, induzindo a fosforilação da serina dentro do motivo de degradação da subunidade 1 do receptor alfa do IFN (IFNAR1) e aumentando a ubiquitinação do IFNAR1.

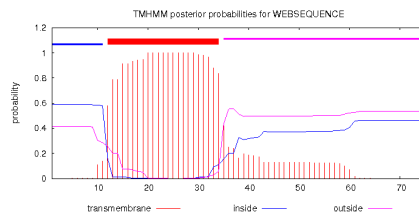
18

>QHD43418 (L=75)
MYSFVSEETGLIVNSVLLFLAFVVF
LLVTLAILTALRLCAYCCNIVNVLVK
PSFYVYSRVKLNLSRVPDLLV

C18_41-75:
P48_Ndel_F:
ACTG**CATAT**GCGTACTGCTGCAA
TATTGTTAAC - Tm 64C
P49_NotI_R:
ACTG**GCGGCCGC**TTAGACCAGAA
GATCAGGAACTCTAG - Tm 64C



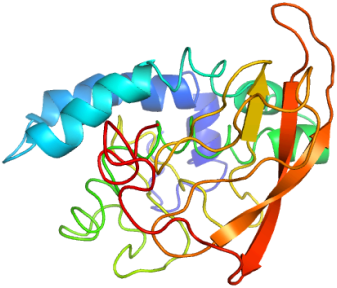
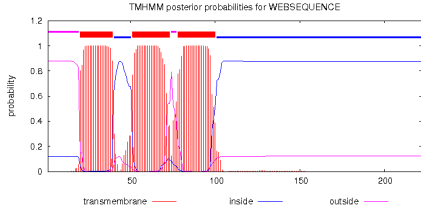
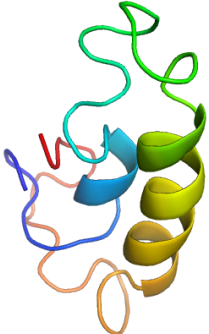
[QHD43418.PDBID]
Pontuação TM estimada=0.60

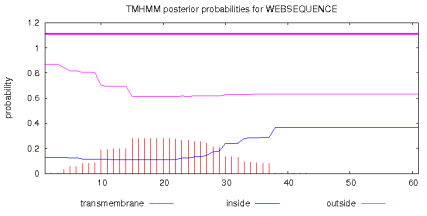
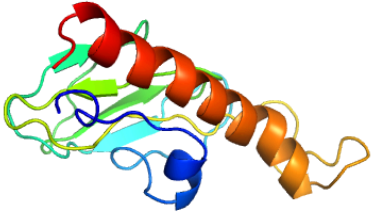
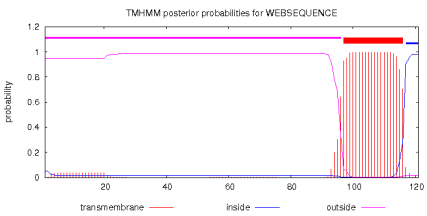



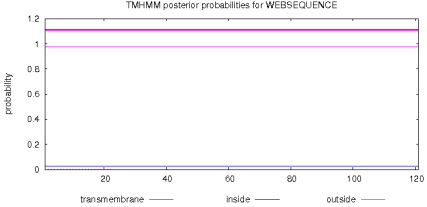
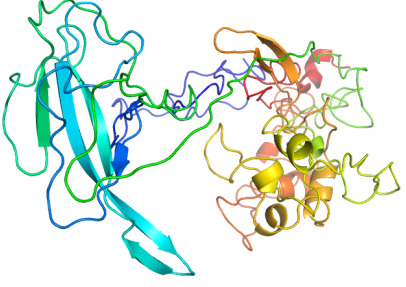
Localização: Membrana integral

Envelope (E)

Desempenha um papel central na morfogênese e montagem do vírus. Atua como uma viroporina e se automonta nas membranas do hospedeiro formando poros lipídicos-proteínas pentaméricas que permitem o transporte de íons. Também desempenha um papel na indução da apoptose. Ativa o inflamassoma NLRP3 hospedeiro, levando à superprodução de IL-1beta.

<p>19</p>	<p>>QHD43419 (L=222) MADSNGITVEELKKLLEQWNLVIG FLFTWICLLQFAYANRNRFLYIIKLIF LWLLWPVTLACFVLAAYRINWITG GIAIAMACLVGLMWLSYFIASFRLFA RTRSMWSFNPETNILLNVPLHGILT RPLLESELVIGAVILRGHLRIAGHHL GRCDIKDLPKEITVATSRTLSYYKLG ASQRVAGDSGFAAYSRYRIGNYKL NTDHSSSSDNIALLVQ</p> <p>C19_109-222: P50_NdeI_F: ACTGCCATATGTGGTCATTCAATCCA GAAACTAAC - Tm 64C P51_NotI_R: ACTGGCGGCCGCTTACTGTACAAG CAAAGCAATATTGTC - Tm 64C</p>	 <p>[QHD43419.PDBID] Pontuação TM estimada=0.29</p>  <p>Localização: Membrana integral</p>	<h2>Membrana (M)</h2> <p>Componente do envelope viral que desempenha um papel central na morfogênese e montagem do vírus através de suas interações com outras proteínas virais.</p>
<p>20</p>	<p>>QHD43420 (L=61) MFHLVDFQVTIAEILLIIMRTFKVSIW NLDYIINLIKKNLSKSLTENKYSQLDE EQPMEID</p> <p>C20_FL: P52_NdeI_F: ACTGCCATATGTTTCATCTCGTTGAC TTTCAG - Tm 63C P53_NotI_R: ACTGGCGGCCGCTTAATCAATCTC CATTGGTTGCTC - Tm 63C</p>	 <p>[QHD43420.PDBID] Pontuação TM estimada=0.44</p>	<h2>ORF6</h2> <p>Interrompe a formação do complexo de importação nuclear celular, prendendo a carioferina alfa 2 e a carioferina beta 1 à membrana. A retenção de fatores de importação na membrana do RE/Golgi leva a uma perda de transporte para o núcleo. Impede assim a translocação nuclear de STAT1 em resposta à sinalização de interferon, bloqueando assim a expressão de genes estimulados por interferon (ISGs) que apresentam múltiplas atividades antivirais.</p>

		 <p>Localização: Nuclear</p>	
21	<p>><u>QHD43421</u> (L=121) MKIILFLALITLATCELYHYQECVRG TTVLLKEPCSSGTYEGNSPFHPLAD NKFALTCFSTQFAFACPDGVKHVY QLRARSVSPKLFIRQEEVQELYSPIF LIVAAIVFITLCFTLKRKTE</p> <p>C21_1-85: P54_NdeI_F: ACTGCCATATGAAAATTATTCTTTTCT TGGCACTG - Tm 63C P55_NotI_R: ACTGGCGGCCGCTTATTTAGGTGA AACTGATCTGGCAC - Tm 64C</p>	 <p>[QHD43421.PDBID] Pontuação TM estimada=0.72</p>  <p>Localização: Secretada</p>	<p>ORF7a Proteína não estrutural dispensável para replicação de vírus em cultura celular.</p>

<p>22</p>	<p>>QHD43422 (L=121) MKFLVFLGIITVAAFHQECSLQSCT QHQPYYVDDPCPIHFYSKWYIRVGA RKSAPLIELCVDEAGSKSPIQYIDIG NYTVSCLPFTINCQEPKLGSLVVR SFYEDFLEYHDVRRVLDI</p> <p>C22_FL: P56_Nhel_F: ACTGGCTAGCATGAAATTTCTTGT TTCTTAGGAATCATC - Tm 63C P57_NotI_R: ACTGGCGGCCGCTTAGATGAAATC TAAACAACACGAACG - Tm 64C</p>	 <p>[QHD43422.PDBID] Pontuação TM estimada=0.42</p>  <p>Localização: Secretada</p>	<p>ORF8 Pode desempenhar um papel na interação vírus-hospedeiro.</p>
<p>23</p>	<p>>QHD43423 (L=419) MSDNGPQNQRNAPRITFGGPSDST GSNQNGERSGARSKQRRPQGLPN NTASWFTALTQHGEDLKFPRGQG VPINTNSSPDDQIGYYRRATRRIRG GDGKMKDLSRWYFYFLGTGPEA GLPYGANKDGIWVATEGALNTPKD HIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPK GFYAEGSRGGSQASSRSSSRSRNS SRNSTPGSSRGTSPPARMAGNGGD AALALLLDRLNQLESKMSGKGQQ QQGQVTTKKSAAEASKKPRQKRT ATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFG</p>	 <p>[QHD43423.PDBID] Pontuação TM estimada=0.67</p>	<p>Nucleocapsídeo (N) Embala o RNA do genoma viral de fita positiva em um ribonucleocapsídeo helicoidal (RNP) e desempenha um papel fundamental durante a montagem do vírion por meio de suas interações com o genoma viral e a proteína de membrana M. Desempenha um papel importante no aumento da eficiência da transcrição do RNA viral subgenômico, bem como replicação viral.</p>

DQELIRQGTDYKHWPQIAQFAPSA
SAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTG
AIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYK
TFPTEPKKDKKKKADETQALPQR
QKKQQTVLLPAADLDDFSKQLQQ
SMSSADSTQA

C23_FL:

P1_NheI_F:

AGCATAGCTAGCTCTGATAATGGAC
CCCAAATCAGC

P419_BamHI_R:

ATTATCGGATCCITAGGCCTGAGTT
GAGTCAGC - Tm 65C

C23_NTD 47-177:

P47-N_NheI_F:

AGCATAGCTAGCAATAATACTGCGT
CTTGGTTCACCG

P177-N_BamHI_R:

ATTATCGGATCCITATCTGCTCCCT
TCTGCGTAGAAG - Tm 65C

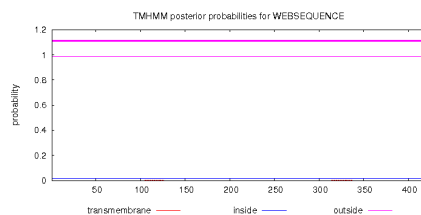
C23_CTD 210-419:

P210-C_NheI_F:

AGCATAGCTAGCATGGCTGGCAAT
GGCGG

P419_BamHI_R:

ATTATCGGATCCITAGGCCTGAGTT
GAGTCAGC - Tm 65C

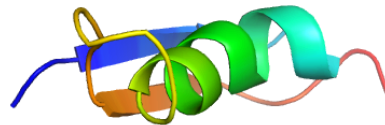


Localização: Nuclear

24

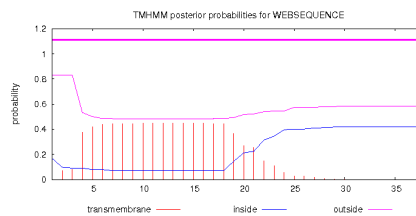
>QHI42199 (L=38)
MGYINVFAFPFTIYSLLLCRMNSRN
YIAQVDVVFNL

C24_FL:
P58_Ndel_F:
ACTGCATATGGGCTATATAACGTT
TTCGC - Tm 63C
P59_NotI_R:
ACTGGCGCGCCCTATGTGAGATT
AAAGTAACTACATCTACTTG - Tm
63C



[QHI42199.PDBID]

Pontuação TM estimada=0.47



Localização: Nuclear

ORF10

Proteína duvidosa/incerta. Atualmente não está claro se esta região se traduz em uma proteína funcional. A respectiva região em beta-coronavírus relacionados, como o SARS-CoV, não corresponde ao peptídeo traduzido.

Tabela 6. Proteínas recombinantes de SARS-CoV-2 expressas e purificadas

Construção	Proteína	Microrganismo original	Vetor	Expressão	Condição de expressão	Solubilidade	Peso (kDa)	PI	pH Buffers
450	NTD 16-165 N-terminal SPIKE	SARS-CoV-2	pet28a	STAR	37°C 4h - D.O. 0,6 a 0,8	Insolúvel	19,65	9,17	TRIS pH 7,5
561	CTD 333-519 RBD-terminal SPIKE	SARS-CoV-2	pet28a	BL21DE3	37°C 4h - D.O. 0,6 a 0,8	Insolúvel	23,61	8,42	TRIS pH 7,5
741	NTD 16-262 N-terminal SPIKE	SARS-CoV-2	pet28a	STAR	37°C 4h - D.O. 0,6 a 0,8	Insolúvel	30,59	8,9	TRIS pH 7,5
2400	Full 274-1073 SPIKE	SARS-CoV-2	pet28a	BL21DE3	37°C 4h - D.O. 0,6 a 0,8	Insolúvel	90,10	7,41	TRIS pH 8,5
420	HR1-HR2 944-1083 C-terminal SPIKE	SARS-CoV-2	pet28a	BL21DE3	37°C 4h - D.O. 0,6 a 0,8	Insolúvel	17,72	9,15	TRIS pH 7,5
C5 NTD	NTD 26-294 N-terminal SPIKE	SARS-CoV-2	pet28a	RIL e RP	37°C 3h 18°C 8h- D.O. 0,6 a 0,8	Insolúvel	32,89	7,75	TRIS pH 9,0
C6 S2	NTD S2 26-697 N-terminal SPIKE	SARS-CoV-2	pet28a	RIL e RP	37°C 3h 18°C 8h- D.O. 0,6 a 0,8	Insolúvel	77,44	8,26	MOPS pH 7,0
C7 RBD	RBD 333-530 RBD-terminal SPIKE	SARS-CoV-2	pet28a	Shuffle	18°C 12h - D.O. 0,6 a 0,8	Ins.Refolding	24,49	8,72	MOPS pH 7,0
C8 SD1	RBD SD1 321-590 RBD-terminal SPIKE	SARS-CoV-2	pet28a	RIL e RP	37°C 3h 18°C 8h- D.O. 0,6 a 0,8	Insolúvel	32,58	8,46	MOPS pH 7,0
cNTD	NTD 47-177 N-terminal Nucleocapsídeo	SARS-CoV-2	pet28a	BL21DE3	37°C 4h - D.O. 0,8 a 1,0	Solúvel	16,84	9,74	TRIS pH 8,0
cCTD	CTD 210-419 C-terminal Nucleocapsídeo	SARS-CoV-2	pet28a	BL21DE3	37°C 4h - D.O. 0,8 a 1,0	Solúvel	25,63	9,7	TRIS pH 8,0
cFULL C23	Nucleocapsídeo	SARS-CoV-2	pet28a	STAR	37°C 4h - D.O. 0,8 a 1,0	Solúvel	47,95	10,11	TRIS pH 8,0
cNTD SUMO	N-terminal Nucleocapsídeo	SARS-CoV-2	pet28a	BL21DE3	37°C 4h - D.O. 0,8 a 1,0	Solúvel	28,17	7,21	TRIS pH 8,0
C3 1341	N-terminal Papain Like Proteinase	SARS-CoV-2	pet28a	BL21DE3	37°C 4h - D.O. 0,8 a 1,0	Insolúvel	153,28	5,23	PBS pH 7,5
C3 1945	C-terminal Papain Like Proteinase	SARS-CoV-2	pet28a	ARCTIC	10-13°C 24h - D.O. 0,6 a 0,8	Solúvel	43,19	8,75	PBS pH 7,5
C5	3 CL Pro	SARS-CoV-2	pet28a	BL21DE3	37°C 4h - D.O. 0,6 a 0,8	Solúvel	36,25	6,52	PBS pH 7,5
C8	Nsp8	SARS-CoV-2	pet28a	BL21DE3	37°C 4h - D.O. 0,6 a 0,8	Solúvel	24,33	7,8	PBS pH 6,5
C22	ORF8	SARS-CoV-2	pet28a	BL21DE3	37°C 4h - D.O. 0,6 a 0,8	Insolúvel	16,28	6,38	PBS pH 7,5

Figura 66. Western Blotting e reatividade dos soros humanos contra a C23, cNTD e cCTD.

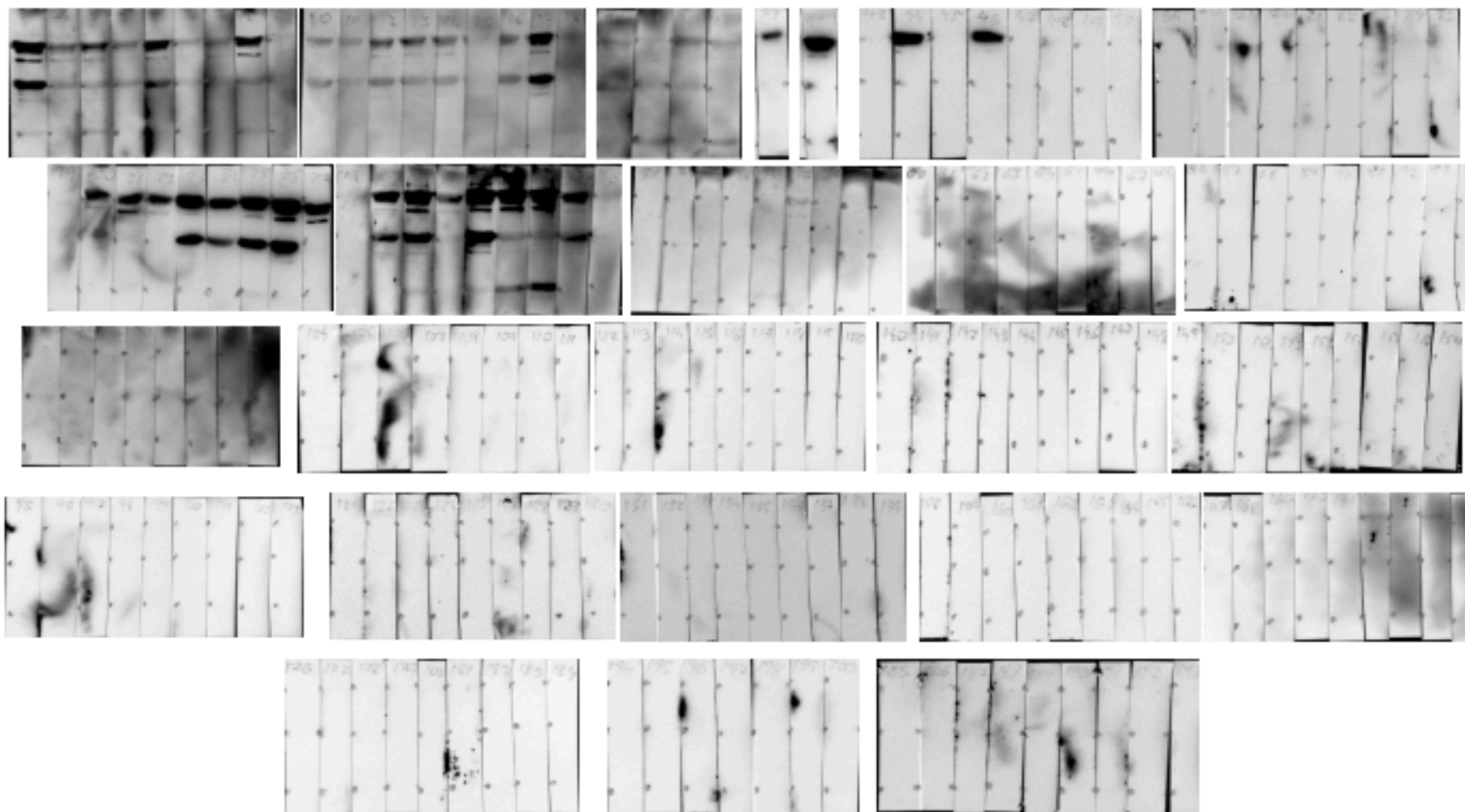


Tabela 7. Dados de reatividade do WB das proteínas C23 (esquerda) e a cCTD (direita).

WB Prot N FL	Diagnóstico ELISA		
	Reatividade	Negativo	Positivo
0	118		118
1	9		9
2	9	1	10
3	3		3
4	3		3
6	1	1	2
8		2	2
9	1	1	2
10	1	4	5
11	1	1	2
12	3	2	5
14		3	3
15		1	1
16		5	5
19		1	1
20		2	2
21		2	2
22		1	1
23		1	1
24		2	2
26		1	1
29		1	1
31		1	1
32		2	2
34		1	1
36		2	2
37		1	1
41		1	1
45		1	1
46		1	1
48		1	1
50		1	1
51		1	1
52		1	1
53		1	1
55		2	2
56		1	1
62		1	1
Total	149	51	200

WB Prot N CTD	Diagnóstico ELISA		
	Reatividade	Negativo	Positivo
0	118	3	121
1	8	2	10
2	4		4
3	3		3
4	5	1	6
5	2	1	3
6	2	1	3
7	3	2	5
8	3	3	6
9	1	1	2
10		5	5
11		1	1
12		4	4
13		1	1
14		4	4
15		4	4
16		2	2
17		2	2
18		1	1
21		1	1
24		2	2
26		2	2
27		1	1
28		2	2
34		1	1
35		1	1
38		1	1
41		1	1
44		1	1
Total	149	51	200

Tabela 8. Dados de reatividade do ELISA das proteínas C23 (esquerda), cCTD (centro) e cNTD (direita).

C23				cCTD				cNTD			
Reatividade	Negativo	Positivo	Total	Reatividade	Negativo	Positivo	Total	Reatividade	Negativo	Positivo	Total
0,02	1		1	0,01	1		1	0,03	3		3
0,03	2		2	0,02	3		3	0,04	1		1
0,04	3		3	0,03	3		3	0,05	2		2
0,05	8		8	0,04	7		7	0,06	13		13
0,06	14		14	0,05	16		16	0,07	17		17
0,07	15		15	0,06	7		7	0,08	8		8
0,08	19		19	0,07	12		12	0,09	5		5
0,09	18		18	0,08	6		6	0,10	6		6
0,10	10		10	0,09	10		10	0,11	10		10
0,11	12		12	0,10	5		5	0,12	11		11
0,12	4		4	0,11	11		11	0,13	4		4
0,13	3		3	0,12	7		7	0,14	8		8
0,14	5		5	0,13	5		5	0,15	6	1	7
0,15	7		7	0,14	9		9	0,16	4		4
0,16	5		5	0,15	5		5	0,17	3		3
0,17	4	1	5	0,16	6		6	0,18	4	1	5
0,18	4		4	0,17	4		4	0,19	2		2
0,19	2		2	0,18	4		4	0,20	3		3
0,20	2		2	0,19	1		1	0,22	2		2
0,21	1		1	0,20	1		1	0,23	1	1	2
0,22	1		1	0,21	3		3	0,24	1		1
0,23	1		1	0,22	1	1	2	0,25	1		1
0,24	2	1	3	0,23	2		2	0,27	3		3
0,26	2		2	0,24	1		1	0,28	1		1
0,27	2		2	0,25	2		2	0,29	1	1	2
0,32	1		1	0,26	2		2	0,30	4		4
0,37		1	1	0,29	1		1	0,32	4		4
0,39		1	1	0,32	2		2	0,33	1		1
0,45		1	1	0,33	1		1	0,35	1		1
0,47		1	1	0,36	1		1	0,36	2		2
0,56	1		1	0,37	1		1	0,37	1		1
0,64		1	1	0,38	2		2	0,38	1	1	2
0,66		1	1	0,39		1	1	0,39		2	2
0,68		1	1	0,41	1		1	0,41	2		2
0,69		1	1	0,46	1		1	0,44	2	1	3
0,73		1	1	0,57	1		1	0,48	1		1
0,76		1	1	0,64	1		1	0,49	1	1	2
0,77		1	1	0,67		1	1	0,50		1	1
0,78		1	1	0,68		1	1	0,51	1	2	3
0,80		1	1	0,69		1	1	0,52	1	1	2
0,81		1	1	0,78	1		1	0,58	1		1
0,99		1	1	0,79	1	1	2	0,61	1	1	2
1,00		1	1	0,84		1	1	0,62	1		1
1,10		1	1	0,86	1	1	2	0,65		1	1
1,21		1	1	0,90		1	1	0,67		1	1
1,36		1	1	0,99		1	1	0,73	1		1
1,37		1	1	1,06		1	1	0,75		1	1
1,38		1	1	1,11		1	1	0,80	1		1
1,47		2	2	1,14		1	1	0,87		1	1
1,49		1	1	1,18		1	1	0,88		1	1
1,58		1	1	1,37		1	1	0,95	1		1
1,83		1	1	1,55		1	1	0,96		1	1
1,91		1	1	1,57		1	1	0,97		1	1
2,10		1	1	1,61		2	2	0,98		2	2

C23

Reatividade	Negativo	Positivo	Total
2,25		1	1
2,35		1	1
2,37		1	1
2,60		1	1
2,75		1	1
2,83		1	1
2,91		1	1
3,16		1	1
3,19		1	1
3,24		1	1
3,29		1	1
3,31		1	1
3,62		1	1
3,67		1	1
3,68		1	1
3,92		1	1
3,94		5	5
Total geral	149	51	200

cCTD

Reatividade	Negativo	Positivo	Total
1,74		1	1
1,88		1	1
2,03		1	1
2,10		1	1
2,22		1	1
2,26		1	1
2,30		1	1
2,31		1	1
2,41		1	1
2,79		1	1
2,82		1	1
2,95		1	1
3,14		1	1
3,16		1	1
3,28		1	1
3,30		1	1
3,40		1	1
3,52		1	1
3,57		1	1
3,58		1	1
3,61		2	2
3,65		1	1
3,66		1	1
3,73		1	1
3,74		1	1
3,85		1	1
3,88		1	1
3,94		3	3
3,95		1	1
Total geral	149	51	200

cNTD

Reatividade	Negativo	Positivo	Total
1,00	1		1
1,14		1	1
1,15		1	1
1,28		1	1
1,29		1	1
1,40		1	1
1,42		1	1
1,43		1	1
1,51		1	1
1,59		1	1
1,63		1	1
2,06		1	1
2,25		1	1
2,30		1	1
2,34		1	1
2,46		1	1
2,79		1	1
2,85		1	1
3,10		1	1
3,21		1	1
3,32		1	1
3,47		1	1
3,64		1	1
3,66		1	1
3,80		1	1
3,86		1	1
3,91		1	1
3,93		1	1
3,94		1	1
Total geral	149	51	200



REGISTRO DE ANÁLISE

TÍTULO:	TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA - MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
CÓDIGO/VERSÃO:	IB/RDA/CDQ/CQM-0004-05
DOCUMENTO ASSOCIADO:	IB/MET/GER/CQM-0008 - TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
DATA DE HOMOLOGAÇÃO:	04/08/2022

Data do teste: 27 / 02 / 23 NR: 02295/23 Lote: 360223C

Procedência: Laboratório de Bacteriologia I

Amostra: Proteína recombinante 3CLPro SARS - COV2 em PBS -
Tubo 3

1. Rastreabilidade

Caderno N°/Ano/Página	Sequencial
<u>03 / 2023 / 23</u>	<u>IB/RDA/CDQ/CQM-0004-05-02-30/27/2022-09:58:45</u>

2. Execução da análise

Quantidade de amostra pesada (g/mg): _____

fs 27/02/23

Diluição de trabalho da amostra: 1:3000

1:30 - 3800 µl de água apirogênica + 200 µl da amostra
 1:300 - 4500 µl de água apirogênica + 500 µl de diluição 1:30
 1:3000 - 4500 µl de água apirogênica + 500 µl de diluição 1:300

pH verificado após a análise:
7,0

3. Resultados do teste e cálculos adicionais

Cálculos adicionais

fs 27/02/23


REGISTRO DE ANÁLISE

TÍTULO:	TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA - MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
CÓDIGO/VERSÃO:	IB/RDA/CDQ/CQM-0004-05
DOCUMENTO ASSOCIADO:	IB/MET/GER/CQM-0008 - TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
DATA DE HOMOLOGAÇÃO:	04/08/2022

CV(%) amostra	CV (%) Spike	Recuperação endotoxina (PPC Recovery)	Especificação (UE/ml)	Resultado (UE/ml)
3,4	2,63	304%	Informativo	$3,33 \times 10^3$

4. Critérios de aceitação

Critérios de aceitação	C/NC/NA
O valor absoluto de correlação linear da curva é maior ou igual a 0,980.	C
O controle negativo não excede o valor em UE/mL da menor concentração da curva padrão.	C
A recuperação de endotoxina (PPC - Recovery) está dentro da faixa de 50 a 200%.	C
O coeficiente de variação do Spike e da amostra é menor que 10%.	C

Legenda: C: Conforme, NC: Não conforme, NA: Não se aplica

 Resultado dentro do critério de aceitação – Conforme Resultado fora do critério de aceitação – Não conforme

Conclusão
<input type="checkbox"/> Resultado inválido (IL-RI _____)
<input checked="" type="checkbox"/> Resultado informativo.
<input type="checkbox"/> Resultado da análise fora do limite de alerta/ação, porém dentro dos limites de especificação. (IL-RFT _____ Abertura de RFT: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim (RFT-_____)
<input type="checkbox"/> Resultado da análise dentro dos critérios de especificação – CONFORME
<input type="checkbox"/> Resultado da análise fora dos critérios de especificação – NÃO CONFORME (IL-RFE _____ Abertura de desvio: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim (RNC-_____)

 Observações: _____

Realizado por:	Conferido por:	Aprovado por:
Joyce dos Santos Analista de Controle de Qualidade Seção de Controle Microbiológico fa 27/02/23	Marina Paganini Marques Analista de Controle de Qualidade SR Controle de Qualidade Microbiológico fa 20/02/23	Ariana Bezerra da Andrade Supervisora de Controle de Qualidade @ 21/02/23
ASSINATURA, DATA E CARIMBO	ASSINATURA, DATA E CARIMBO	ASSINATURA, DATA E CARIMBO



REGISTRO DE ANÁLISE

TÍTULO:	TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA - MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
CÓDIGO/VERSÃO:	IB/RDA/CDQ/CQM-0004-05
DOCUMENTO ASSOCIADO:	IB/MET/GER/CQM-0008 - TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
DATA DE HOMOLOGAÇÃO:	04/08/2022

Data do teste: 31 / 02 / 23 NR: 02234/23 Lote: 360223B

Procedência: Laboratório de Bacteriologia I

Amostra: Proteína recombinante nucleocapsídeo SARS-COV2 em PBS - Tubo 2

1. Rastreabilidade

Caderno N°/Ano/Página	Sequencial
<u>03 / 2023 / 39</u>	<u>IB/RDA/CDQ/CQM-0038-02-30/32/2022 - 09:58:45</u>

2. Execução da análise

Quantidade de amostra pesada (g/mg): _____

fs 31/02/23

Diluição de trabalho da amostra: 1:30000

1:30 - 3800 µl de água apirrogênica + 200 µl da amostra
 1:300 - 4500 µl de água apirrogênica + 500 µl da diluição 1:30
 1:3000 - 4500 µl de água apirrogênica + 500 µl da diluição 1:300
 1:30000 - 4500 µl de água apirrogênica + 500 µl da diluição 1:3000

pH verificado após a análise:

7,0

3. Resultados do teste e cálculos adicionais

Cálculos adicionais

fs 31/02/23

REGISTRO DE ANÁLISE

TÍTULO:	TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA - MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
CÓDIGO/VERSÃO:	IB/RDA/CDQ/CQM-0004-05
DOCUMENTO ASSOCIADO:	IB/MET/GER/CQM-0008 - TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
DATA DE HOMOLOGAÇÃO:	04/08/2022

INSTITUTO BUTANTAN
TÍTULO:
CÓDIGO/VERSÃO:
DOCUMENTO ASSOCIADO:
DATA:

CV(%) amostra	CV (%) Spike	Recuperação endotoxina (PPC Recovery)	Especificação (UE/ml)	Resultado (UE/ml)
0,63	1,33	88%	Informativo	$1,62 \times 10^4$

4. Critérios de aceitação

Critérios de aceitação	C/NC/NA
O valor absoluto de correlação linear da curva é maior ou igual a 0,980.	C
O controle negativo não excede o valor em UE/mL da menor concentração da curva padrão.	C
A recuperação de endotoxina (PPC - Recovery) está dentro da faixa de 50 a 200%.	C
O coeficiente de variação do Spike e da amostra é menor que 10%.	C

Legenda: C: Conforme, NC: Não conforme, NA: Não se aplica

Resultado dentro do critério de aceitação – Conforme Resultado fora do critério de aceitação – Não conforme

Conclusão
<input type="checkbox"/> Resultado inválido (IL-RI _____)
<input checked="" type="checkbox"/> Resultado informativo.
<input type="checkbox"/> Resultado da análise fora do limite de alerta/ação, porém dentro dos limites de especificação. (IL-RFT _____ Abertura de RFT: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim (RFT- _____)
<input type="checkbox"/> Resultado da análise dentro dos critérios de especificação – CONFORME
<input type="checkbox"/> Resultado da análise fora dos critérios de especificação – NÃO CONFORME (IL-RFE _____ Abertura de desvio: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim (RNC- _____)

Observações: _____

Realizado por:	Conferido por:	Aprovado por:
Joyce dos Santos Analista de Controle de Qualidade Seção de Controle Microbiológico Assinatura, DATA E CARIMBO <i>J.S. 17/02/23</i>	Marina Paganini Marques Analista de Controle de Qualidade SR Seção de Qualidade Microbiológico Assinatura, DATA E CARIMBO <i>M.P. 17/02/23</i>	<i>A.B. 02/02/23</i> Arlene Bezerra de Almeida Supervisora de Controle de Qualidade Assinatura, DATA E CARIMBO

Informações e registros contidos nesse documento são de propriedade do Instituto Butantan.
A publicidade do conteúdo não está autorizada sem permissão formal do Instituto Butantan.



REGISTRO DE ANÁLISE

TÍTULO:	TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA - MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
CÓDIGO/VERSÃO:	IB/RDA/CDQ/CQM-0004-05
DOCUMENTO ASSOCIADO:	IB/MET/GER/CQM-0008 - TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
DATA DE HOMOLOGAÇÃO:	04/08/2022

Data do teste: 17 / 02 / 23 NR: 02297/23 Lote: 180223E

Procedência: Laboratório de Bacteriologia I

Amostra: Amplão das proteínas nucleocapsídeo e 3CLPro - Tuba 5

1. Rastreabilidade

Caderno N°/Ano/Página	Sequencial
<u>03 / 2023 / 39</u>	<u>IB/RDA/CDQ/CQM-0008-02-30/32/2022-09:58:45</u>

2. Execução da análise

Quantidade de amostra pesada (g/mg): _____

fs 17/02/23

Diluição de trabalho da amostra: 1:1000

1:10 - 1800 µl de água apirrogênica + 200 µl da amostra
 1:100 - 4500 µl de água apirrogênica + 500 µl da diluição 1:10
 1:1000 - 4500 µl de água apirrogênica + 500 µl da diluição 1:100

pH verificado após a análise:

7,0

3. Resultados do teste e cálculos adicionais

Cálculos adicionais

fs 17/02/23

REGISTRO DE ANÁLISE

TÍTULO:	TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA - MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
CÓDIGO/VERSÃO:	IB/RDA/CDQ/CQM-0004-05
DOCUMENTO ASSOCIADO:	IB/MET/GER/CQM-0008 - TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
DATA DE HOMOLOGAÇÃO:	04/08/2022

CV(%) amostra	CV (%) Spike	Recuperação endotoxina (PPC Recovery)	Especificação (UE/ml)	Resultado (UE/ml)
3,63	2,47	195%	Informativo	$3,78 \times 10^3$

4. Critérios de aceitação

Critérios de aceitação	C/NC/NA
O valor absoluto de correlação linear da curva é maior ou igual a 0,980.	C
O controle negativo não excede o valor em UE/mL da menor concentração da curva padrão.	C
A recuperação de endotoxina (PPC - Recovery) está dentro da faixa de 50 a 200%.	C
O coeficiente de variação do Spike e da amostra é menor que 10%.	C

Legenda: C: Conforme, NC: Não conforme, NA: Não se aplica

 Resultado dentro do critério de aceitação – Conforme Resultado fora do critério de aceitação – Não conforme

Conclusão
<input type="checkbox"/> Resultado inválido (IL-RI _____)
<input checked="" type="checkbox"/> Resultado informativo.
<input type="checkbox"/> Resultado da análise fora do limite de alerta/ação, porém dentro dos limites de especificação. (IL-RFT _____ Abertura de RFT: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim (RFT- _____)
<input type="checkbox"/> Resultado da análise dentro dos critérios de especificação – CONFORME
<input type="checkbox"/> Resultado da análise fora dos critérios de especificação – NÃO CONFORME (IL-RFE _____ Abertura de desvio: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim (RNC- _____)

 Observações: _____

Realizado por:	Conferido por:	Aprovado por:
Joyce dos Santos Analista de Controle de Qualidade Seção de Controle Microbiológico fs 12/02/23	Marina Paganini Marques Analista de Controle de Qualidade SR Controle de Qualidade Microbiológico fs 20/02/23	21/02/23 Ariana Bezerra da Andrade Supervisora de Controle de Qualidade
ASSINATURA, DATA E CARIMBO	ASSINATURA, DATA E CARIMBO	ASSINATURA, DATA E CARIMBO

 Informações e registros contidos nesse documento são de propriedade do Instituto Butantan.
 A publicação do conteúdo não está autorizada sem permissão formal do Instituto Butantan.



REGISTRO DE ANÁLISE

TÍTULO:	TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA - MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
CÓDIGO/VERSÃO:	IB/RDA/CDQ/CQM-0004-05
DOCUMENTO ASSOCIADO:	IB/MET/GER/CQM-0008 - TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
DATA DE HOMOLOGAÇÃO:	04/08/2022

Data do teste: 17 / 02 / 23 NR: 02296/23 Lote: 160223D

Procedência: Laboratório de Bacteriologia I

Amostra: Proteína recombinante nsp8 SARS-COV2 em PBS -
Tubo 4

1. Rastreabilidade

Caderno N°/Ano/Página	Sequencial
<u>03 / 2023 / 38</u>	<u>IB/RDA/CDQ/CQM-0008-02-30/12/2022-03-58:45</u>

2. Execução da análise

Quantidade de amostra pesada (g/mg): _____

fs 17/02/23

Diluição de trabalho da amostra: 1:30

1:30 - 3000 µl de água fisiológica + 200 µl de amostra

pH verificado após a análise: _____

7,0

3. Resultados do teste e cálculos adicionais

Cálculos adicionais

fs 17/02/23

Informações e registros contidos nesse documento são de propriedade do Instituto Butantan.
A publicidade do conteúdo não está autorizada sem permissão formal do Instituto Butantan.



REGISTRO DE ANÁLISE

TÍTULO:	TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA - MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
CÓDIGO/VERSÃO:	IB/RDA/CDQ/CQM-0004-05
DOCUMENTO ASSOCIADO:	IB/MET/GER/CQM-0008 - TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
DATA DE HOMOLOGAÇÃO:	04/08/2022

Data do teste: 17/02/23 NR: 02298/23 Lote: 160223FProcedência: Laboratório de Bacteriologia IAmostra: Tampão de proteína nsp8 - Tubo Gfs 17/02/23

1. Rastreabilidade

Caderno N°/Ano/Página	Sequencial
<u>03/2023/39</u>	<u>IB/RDA/CDQ/CQM-0008-02-30/12/2022-09:58:45</u>

2. Execução da análise

Quantidade de amostra pesada (g/mg): _____

fs 17/02/23

Diluição de trabalho da amostra: 1:10

1:10 - 1800 µl de água fisiológica + 200 µl da amostra

pH verificado após a análise:

7,0

3. Resultados do teste e cálculos adicionais

Cálculos adicionais

fs 17/02/23

REGISTRO DE ANÁLISE

TÍTULO:	TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA - MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
CÓDIGO/VERSÃO:	IB/RDA/CDQ/CQM-0004-05
DOCUMENTO ASSOCIADO:	IB/MET/GER/CQM-0008 - TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA MÉTODO CINÉTICO TURBIDIMÉTRICO
DATA DE HOMOLOGAÇÃO:	04/08/2022

INSTITUTO BUTANTAN
TÍTULO:
CÓDIGO:

CV(%) amostra	CV (%) Spike	Recuperação endotoxina (PPC Recovery)	Especificação (UE/ ml)	Resultado (UE/ ml)
2,32	2,89	97%	Informativo	56,2

4. Critérios de aceitação

Critérios de aceitação	C/NC/NA
O valor absoluto de correlação linear da curva é maior ou igual a 0,980.	C
O controle negativo não excede o valor em UE/mL da menor concentração da curva padrão.	C
A recuperação de endotoxina (PPC - Recovery) está dentro da faixa de 50 a 200%.	C
O coeficiente de variação do Spike e da amostra é menor que 10%.	C

Legenda: C: Conforme, NC: Não conforme, NA: Não se aplica

Resultado dentro do critério de aceitação – Conforme Resultado fora do critério de aceitação – Não conforme

Conclusão
<input type="checkbox"/> Resultado inválido (IL-RI _____)
<input checked="" type="checkbox"/> Resultado informativo.
<input type="checkbox"/> Resultado da análise fora do limite de alerta/ação, porém dentro dos limites de especificação. (IL-RFT _____ Abertura de RFT: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim (RFT- _____)
<input type="checkbox"/> Resultado da análise dentro dos critérios de especificação – CONFORME
<input type="checkbox"/> Resultado da análise fora dos critérios de especificação – NÃO CONFORME (IL-RFE _____ Abertura de desvio: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim (RNC- _____)

Observações: _____

Realizado por:	Conferido por:	Aprovado por:
Joyce dos Santos Analista de Controle de Qualidade Seção de Controle Microbiológico	Marina Paganini Marques Analista de Controle de Qualidade SR Centro de Qualidade Microbiológico	Ariana Bezerra de Andrade Supervisora de Controle de Qualidade
Assinatura: _____ DATA E CARIMBO: 13/02/23	Assinatura: _____ DATA E CARIMBO: 20/02/23	Assinatura: _____ DATA E CARIMBO: 20/02/23